

*Глик Б., Пастернак Дж.* Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. – М.: Мир, 2002. — 589 с.  
Словарь терминов, Предметный и Латинский указатели, а также Оглавление НЕ  
РЕДАКТИРОВАЛИСЬ  
В ИСХОДНИКЕ «DJVU»ПРОПУЩЕНЫ 62 И 63 СТР!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!

[ЭЛЕКТРОННОЕ ОГЛАВЛЕНИЕ](#)



# Molecular Biotechnology

*Principles and Applications of Recombinant DNA*  
SECOND EDITION

Bernard R. Glick, Jack J. Pasternak

Department of Biology, University of Waterloo Waterloo, Ontario, Canada  
ASM PRESS  
WASHINGTON, D.C.

**Б. Глик, Дж. Пастернак**

# **Молекулярная биотехнология**

*Принципы и применение*

Перевод с английского

канд. мед. наук Н. В. Баскаковой, **О. А. Колесниковой,**

д-ра биол. наук **Ю. М. Романовой, М. А. Серовой,** канд. мед. наук **А. Л. Чухровой**

под редакцией д-ра биол. наук **Н. К. Янковского**



**Москва «Мир» 2002**

УДК 591.1  
ББК 28.69  
Г54

**Глик Б., Пастернак Дж.**

Г54 Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. - М.: Мир, 2002.  
— 589 с., ил.

ISBN 5-03-003328-9

Современное руководство по биотехнологии, написанное авторитетными канадскими учеными. В книге подробно изложены основы генной инженерии: механизмы репликации, транскрипции и трансляции; методы клонирования, амплификации и секвенирования ДНК; конструирование рекомбинантных ДНК; введение последовательностей-мишеней в геном микроорганизмов, растений и животных, а также практическое применение генной инженерии для получения лекарственных веществ, вакцин, факторов роста, инсектицидов и т.д. Большое внимание уделено генной терапии и связанным с ней морально-этическим проблемам, патентованию биотехнологических продуктов и способов их получения.

Для студентов университетов, сельскохозяйственных и медицинских институтов, а также для научных работников и специалистов по биотехнологии.

**ББК 28.69**

Федеральная программа книгоиздания России

*Редакция литературы по биологии*

© 199K by American Society for Microbiology. All rights reserved. Translated and published by arrangement with the American Society for Microbiology

ISBN 5-03-003328-9 (рус.)  
ISBN 1-55581-1361 (англ.)

© перевод на русский язык, оформление «Мир», 2002



## От редактора перевода

Книга, которую вы держите в руках, — это превосходное руководство по молекулярной биотехнологии с подробным изложением ее принципов, методов и сфер применения. В ней обобщен многолетний опыт чтения лекций по этому предмету студентам разных специальностей одного из ведущих университетов Канады. До сих пор в нашей стране не было отечественных или переводных изданий, которые одновременно охватывали бы все разделы биотехнологии и все объекты, к которым приложимы биотехнологические методы: микроорганизмы, растения, животные, в том числе и человек. А между тем потребность в таком учебнике весьма велика, поскольку биотехнология входит в круг интересов представителей многих специальностей, имеющих разное базовое образование.

Учебник построен таким образом и написан таким языком, что им могут пользоваться студенты-биологи, химики и даже будущие врачи. По каждой теме даются ссылки на работы, в которых представлены оптимальные методики конструирования рекомбинантных организмов, исследования их функционирования, определения качества и количества целевых продуктов. Текст прерывается вставками, названными «Важная веха». Они представляют собой рефераты ключевых научных статей, которые действительно стали важными вехами в истории современной биотехнологии.

Книга состоит из четырех частей. В первой из них четко и ясно изложены основы молекулярной биологии, во второй речь идет о молекулярной биотехнологии микроорганизмов, в третьей — о биотехнологии эукариотических систем, в том числе человека (молекулярная генетика человека и геновая терапия). Особый интерес для российского читателя представляет четвертая часть, посвященная контролю и патентованию в области молекулярной биотехнологии. Эти вопросы почти не затрагиваются ни в учебниках, ни в образовательном процессе в нашей стране, хотя в биотехнологии, как и в любой прикладной науке, новые разработки дают дивиденды только в том случае, когда они защищены патентом. Авторы обсуждают законодательную базу использования генноинженерных продуктов в пищевой и фармацевтической промышленности, применения рекомбинантных организмов в сельском хозяйстве, нормативные акты, относящиеся к предварительным испытаниям этих организмов, требования, предъявляемые к ним при крупномасштабном применении. Детально рассматриваются правила патентования впервые секвениро-

ванных последовательностей ДНК, а также результатов биотехнологических разработок в случае многоклеточных организмов. Заключительный раздел посвящен юридическим аспектам генной терапии как соматических клеток, так и клеток зародышевой линии, клонирования целых организмов, в том числе и человека. Очень ценной является также информация об особенностях патентной практики в разных странах, что исключительно важно для продвижения отечественных генноинженерных продуктов на внешний рынок.

Книга чрезвычайно полезна как студентам разных специальностей, которым читается курс биотехнологии, так и специалистам-практикам.

*Н. К. Янковский*

*Марики — с благодарностью за то, что она Марики*

*Б. Р. Г.*

*Лили — с благодарностью за всё*

*Дж. Дж. П.*

## Предисловие

За четыре года, прошедших со времени выхода в свет первого издания книги «Молекулярная биотехнология: принципы и применение», в области биотехнологии было сделано огромное количество открытий. На рынке появилось множество новых генноинженерных продуктов (например, вакцин и лекарственных препаратов). Рутинной практикой клинических лабораторий стало использование иммунологических методов диагностики и методов, основанных на применении по-лимеразной цепной реакции. Открыты и охарактеризованы многие гены, ассоциированные с различными заболеваниями человека, неизмеримо возрос объем клинических испытаний в области генной терапии. Построены подробные генетические и физические карты хромосом человека; впервые из дифференцированной соматической клетки клонировано жизнеспособное млекопитающее. Производство одного из трансгенных растений, сои, поставлено на коммерческую основу.

В первом издании мы описали принципы и применение молекулярной биотехнологии в широком биологическом контексте — в той форме, которая представлялась нам наиболее интересной и информативной. С тех пор мы получили много полезных замечаний от наших коллег, аспирантов и студентов из разных стран. Стараясь сохранить прежний подход и в то же время удовлетворить пожелания многих читателей, мы обновили, расширили и существенно переработали нашу книгу. Мы надеемся, что нам удалось передать ту волнующую атмосферу, в которой совершаются открытия в молекулярной биотехнологии, и в то же время ясно изложить ее основы, разъяснить смысл современных открытий и то, как их можно использовать для «производства товаров и услуг». В книге появилась новая глава, где рассмотрены микроорганизмы, обычно использующиеся в молекулярной биотехнологии. Кроме того, отдельная глава посвящена описанию основ молекулярной биологии. Значительно расширены главы по молекулярной генетике человека, генной терапии, биотехнологии растений, охватывающие самые последние достижения в этих областях. Пересмотрены главы, посвященные диагностическим системам и вакцинам. Кроме того, примерно в 1,5 раза увеличено число рисунков и таблиц, обновлен и расширен словарь терминов. Как мы надеемся, это позволит

лучше понять экспериментальные подходы и важные теоретические концепции. Несмотря на все эти изменения мы постарались сохранить стиль изложения — свободный от лабораторного жаргона и «дружелюбный по отношению к читателю» — сделавший первое издание книги столь популярным.

Мы очень признательны сотрудникам ASM Press, прежде всего Ken April, Susan Birch, Greg Payne, Jeff Holtmeier, за их постоянную помощь и поддержку, а также Susan Schmidler за превосходное, как всегда, оформление книги. Особая наша благодарность Ken April за неизменное внимание к рукописи и большое терпение в общении с нами.

*Бернард Р. Глик*

*Джек Дж. Пастернак*

# Предисловие к первому изданию

Молекулярная биотехнология как новая область исследований сформировалась в конце 1970-х гг. на стыке технологии рекомбинантных ДНК и традиционной промышленной микробиологии. Современное общество неплохо осведомлено о проблемах молекулярной биотехнологии. Так или иначе об этой науке знают практически все. Кто-то видел фильм «Парк Юрского периода» с его потрясающими, искусно нарисованными, но совершенно несостоятельными с научной точки зрения «клонированными» динозаврами. Кто-то прочитал в газетах о том, что на рынке появились новые, «биотехнологические» помидоры с большим сроком хранения. А кто-то слышал рассуждения критически настроенного знатока о страшных последствиях генной инженерии, ожидающих нас в будущем. В этой книге мы попытаемся объяснить, что собой представляет эта научная дисциплина на самом деле, как проводятся биотехнологические исследования и как они могут повлиять на нашу жизнь.

Книга «Молекулярная биотехнология: принципы и применение» написана как учебник по биотехнологии, технологии рекомбинантных ДНК и генной инженерии. В ее основу положен курс лекций по биотехнологии, который мы читали на протяжении 12 лет студентам старших курсов и аспирантам биологических и инженерных специальностей Университета Ватерлоо. Книга предназначена для студентов, знакомых с основами биохимии, молекулярной генетики и микробиологии, хотя мы понимаем, что вряд ли они успели освоить все эти дисциплины до того, как начали заниматься биотехнологией. Поэтому, приступая к изложению той или иной темы, мы сначала рассматриваем ее основы и лишь затем переходим к деталям.

Главное внимание в книге уделено тому, как с помощью технологии рекомбинантных ДНК можно создавать нужные человеку продукты. Там, где это возможно, мы старались проиллюстрировать основные теоретические концепции конкретными результатами и методиками, уже применяющимися на практике. Из лавинообразного потока научных публикаций мы выбирали в качестве примеров те работы, которые не только иллюстрируют определенные положения, но и формируют у читателя твердую научную базу, позволяющую ему ориентироваться в узкоспециальных вопросах молекулярной биотехнологии. Конечно, мы понимаем, что эта область исследований развивается чрезвычайно быстро и некото-

рые из наших примеров могут оказаться устаревшими к тому времени, когда книга выйдет в свет.

Очень часто научные работники — неважно, о какой области науки идет речь, — в повседневном общении, на конференциях, в ходе переписки используют специфическую терминологию, проще говоря, жаргон. Мы старались обойтись без него и во многих случаях намеренно давали словесное описание явления или процесса там, где, прибегая к лаконичному жаргону, мы могли бы сэкономить немало слов. Для описания одного и того же явления в любой области исследований существуют синонимы. Так, термины «технология рекомбинантных ДНК», «клонирование генов» и «генная инженерия» очень близки по смыслу. Когда в тексте впервые появлялся важный термин, мы давали в скобках его синоним или эквивалентное выражение. Освоить терминологию читателю поможет большой словарь терминов в конце книги.

Каждая глава завершается подробным резюме и списком вопросов для повторения. Мы надеемся, что это поможет усвоить прочитанное. Все ключевые идеи иллюстрируются тщательно подобранными цветными рисунками (всего их более 200); мы убеждены, что один рисунок может сказать больше, нежели тысяча слов. Гл. 1 знакомит читателя с основами молекулярной биотехнологии и некоторыми коммерческими аспектами, а следующие пять глав (гл. 2—6) — с ее методологией. Все вместе эти главы подготовят читателя к восприятию материала всех последующих глав. В гл. 7—12 части II рассмотрены способы получения ценных метаболитов, вакцин, лекарственных веществ и продуктов, использующихся для диагностики, а также методы биodeградации удобрений и пестицидов. В гл. 13 описаны способы крупномасштабного культивирования генетически измененных микроорганизмов с целью получения коммерческих продуктов. Часть III посвящена молекулярной биотехнологии растений и животных (гл. 14 и 15). Гл. 16 и 17 знакомят читателя с применением технологии рекомбинантных ДНК для идентификации генов человека, ответственных за развитие некоторых заболеваний, и подходами к генной терапии. В последней, IV части рассмотрены вопросы регламентации исследований в области молекулярной биотехнологии, оформления патентов на различные продукты и изобретения.

В конце каждой главы есть список литературы. В нем могут содержаться ссылки, не упоминаемые в самой главе. Иногда мы давали выдержки из статей или представляли данные в собственном изложении. Разумеется, мы несем полную ответственность за все неточности или не совсем корректные трактовки, которые при этом могли возникнуть, хотя и надеемся, что нам удалось этого избежать. Списки литературы включают ссылки и на работы более общего характера, способствующие лучшему усвоению материала.

## Благодарности

Мы хотели бы поблагодарить всех, кто согласился прочитать различные разделы этой книги, когда она еще находилась в виде рукописи. Их советы и замечания очень помогли нам. Среди тех, кого нам хотелось бы упомянуть, — Arthur I. Aronson, Purdue University; Ronald M. Atlas, University

of Louisville; Fred Ausubel, Massachusetts General Hospital; David R. Benson, University of Connecticut; Jean E. Brenchley, Pennsylvania State University; A. M. Chakrabarty, University of Illinois at Chicago; Stan Gelvin, Purdue University; Janet H. Glaser, University of Illinois at Urbana-Champaign; David Gwynne, Cambridge NeuroScience; George D. Hegeman, Indiana University; James B. Kaper, University of Maryland at Baltimore; Donald R. Lightfoot, Eastern Washington University at Cheney and Spokane; Cynthia Moore, Washington University; William E. Newton, Virginia Polytechnic University; Danton H. O'Day, University of Toronto in Mississauga; Richard D. Palmiter, University of Washington; David H. Persing, Mayo Clinic; William S. Reznikoff, University of Wisconsin; Campbell W. Robinson, University of Waterloo; Marc Siegel, University of Waterloo; Aaron J. Shatkin, Center for Advanced Biotechnology and Medicine at Rutgers University; Jim Schwartz, Genentech; Daniel C. Stein, University of Maryland at College Park; Dean A. Stetler, University of Kansas; and Robert T. Vinopal, University of Connecticut.

Мы весьма признательны также сотрудникам ASM Press: Susan Birch, главному редактору; Rith Siega], менеджеру; Jodi Simpson, литературному редактору; Susan Schmidler, главному художнику; Peg Markow из Rüttle, Shaw & Wetherill, Inc., главному менеджеру проекта; художникам Network Graphics; и наконец, Patrick Fitzgerald, директору ASM Press, который всеми доступными способами помогал претворению нашего замысла в жизнь.

*Бернард Р. Глик*

*Джек Дж. Пастернак*





# Часть I.

## Основы молекулярной биотехнологии

Молекулярная биотехнология — это увлекательнейшая область научных исследований, с появлением которой произошел настоящий переворот во взаимоотношениях человека с живой природой. В ее основе лежит перенос единиц наследственности (генов) из одного организма в другой, осуществляемый методами генной инженерии (технология рекомбинантных ДНК). В большинстве случаев целью такого переноса является создание нового продукта или получение уже известного продукта в промышленных масштабах. В ч. I мы познакомим читателя с концепциями молекулярной биотехнологии и теми микроорганизмами, которые в ней используются, с основами молекулярной биологии и методологией рекомбинантных ДНК. Будут описаны такие методы, как химический синтез генов, полимеразная цепная реакция (ПЦР), определение нуклеотидной последовательности (секвенирование) ДНК. Помимо успешного клонирования нужного гена очень важно обеспечить его правильное функционирование в организме нового хозяина, поэтому мы остановимся также на способах оптимизации работы клонированных генов в про- и эукариотических системах. И наконец, мы рассмотрим, как можно улучшить свойства конечных продуктов, модифицируя клонированные гены путем введения в них специфических нуклеотидных замен (мутагенез *in vitro*). В целом материал, изложенный в первой части, служит фундаментом, который позволяет понять различные аспекты конкретных применений молекулярной биотехнологии.



# ГЛАВА 1.

## Молекулярно-биотехнологическая революция

### Технология рекомбинантных ДНК

15 октября 1980 г. на Нью-Йоркской фондовой бирже произошло знаменательное событие: уже через 20 минут после начала торгов стоимость одной акции биотехнологической компании Genentech поднялась с 35 до 89 долларов. Это был рекордный для того времени скачок цен на акции коммерческого предприятия. К моменту закрытия торгов в тот день цена одной акции Genentech составляла 71,25 доллара, а стоимость всех 528 тысяч акций была столь баснословно высока, что мелкие инвесторы, собиравшиеся приобрести небольшой пакет акций, не имели никаких шансов.

По-видимому, это был первый случай в истории, когда о начале великой технологической революции возвестил биржевой колокол. В 1980 г., когда фирма Genentech впервые предложила обществу свои акции, это была небольшая компания в Калифорнии, в течение четырех лет успешно работавшая над проблемой получения рекомбинантных ДНК. За два года до этого ученым компании удалось выделить фрагменты гена (последовательности ДНК), кодирующие человеческий инсулин, и перенести их в генетические элементы (клонированные векторы), способные реплицироваться в клетках обычной кишечной палочки (*Escherichia coli*). Эти бактериальные клетки работали как биологические фабрики по производству человеческого инсулина, который после соответствующей очистки мог использоваться как лекарственный препарат для больных диабетом, дающих аллергическую реакцию на свиной инсулин. Еще десять лет назад такое развитие событий представлялось нереальным, но сегодня все это стало вполне привычным.

Головокружительный взлет стоимости акций компании Genentech предопределялся как реальной оценкой потенциала технологии рекомбинантных ДНК, так и мечтами о будущих возможностях. Многие думали, что новая технология станет тем рогом изобилия XX века, который напоит и накормит всех желающих. Эти мечты подпитывались энтузиазмом газетных и журнальных публикаций и телевизионных репортажей, подогревались активностью биржевых брокеров и научно-фантастическими сюжетами. Воображение будоражили полчища удивительных микробов, растения и животные, созданные человеком. Энтузиасты предрекали, что генноинженерные микробы вытеснят химические удобрения, будут уничтожать разливы нефти; появятся растения с передающимися по наследству устойчивостью к вредителям и исключительно высокой питательной ценностью; будут созданы сельскохозяйственные животные, более эффективно усваивающие пищу, быстро прибавляющие в весе и дающие нежирное мясо. Казалось, что копь скоро конкретные биологические свойства обуславливаются одним или несколькими генами (единицами наследственности), создание организмов с новым генетическим устройством не составит труда. И в самом деле, хотя шумиха, поднятая вокруг новой технологии, была не совсем адекватной, увлечение этой идеей имело основания. Прошло немногим более пятнадцати лет, и многие наиболее разумные проекты стали реальностью. В своей книге мы расскажем о том, как это произошло и каковы перспективы применения технологии рекомбинантных ДНК.

Стратегия переноса функциональной единицы наследственности (гена) из одного организма в другой была разработана американскими учеными Стэнли Коэном и Гербертом Бойером в 1973 г. И Коэну, и Бойеру, и многим другим было ясно, что технология рекомбинантных ДНК предоставляет огромные возможности. Как в то время отмечал Коэн, «...есть надежда, что удастся ввести в [бактериальную клетку] *E. coli* гены, ассоциированные с метаболическими или синтетическими функциями, присущими другим биологическим видам, например гены фотосинтеза или продукции антибиотиков».

Однако одним из первых откликов научного мира на создание новой технологии был мораторий на некоторые биотехнологические эксперименты, считавшиеся потенциально опасными. Запрет на собственные исследования был провозглашен группой молекулярных биологов, включая Коэна и Бойера. Они считали, что объединение генов, происходящих из двух разных организмов, может случайно привести к созданию нового организма с нежелательными и опасными свойствами. Прошло несколько лет, у ученых накопился опыт работы с новой технологией, были согласованы инструкции по обеспечению безопасности этих работ, и страсти постепенно улеглись. Временное прекращение реализации некоторых научных проектов, связанных с рекомбинантными ДНК, не уменьшило энтузиазма генных инженеров. Новая технология продолжает привлекать беспрецедентное внимание как со стороны общественности, так и со стороны ученых.

Весть о клонировании генов, осуществленном Коэном и Бойером, облетела весь мир. Многие исследователи немедленно оценили все преимущества этой стратегии и создали огромное количество методик, следуя которым, можно было с высокой эффективностью и относительно просто идентифицировать, выделять, охарактеризовывать и использовать гены. Эти технологические разработки внесли значительный вклад в развитие практически всех биологических дисциплин, включая науку о поведении животных, биологию развития, молекулярную эволюцию, клеточную биологию и генетику человека, однако наиболее глубокие изменения произошли в области биотехнологии.

## Возникновение молекулярной биотехнологии

В начале 70-х годов традиционная биотехнология как научная дисциплина была не слишком известна; исследования в этой области в основном проводились в отделах инженерной химии и иногда в рамках социальных микробиологических программ. В широком смысле биотехнология занимается производством коммерческих продуктов, образуемых микроорганизмами в результате их жизнедеятельности. Более формально биотехнологию можно определить как «применение научных и инженерных принципов к переработке материалов живыми организмами с целью создания товаров и услуг». В историческом смысле биотехнология возникла тогда, когда дрожжи были оперные использованы при производстве пива, а бактерии — для получения йогурта.

Термин «биотехнология» был придуман в 1917 г. венгерским инженером Карлом Эреки для описания процесса крупномасштабного выращивания свиней с использованием в качестве корма сахарной свеклы. По определению Эреки, биотехнология — это «все виды работ, при которых из сырьевых материалов с помощью живых организмов производятся те или иные продукты». Однако это совершенно точное определение не получило широкого распространения. Долгое время термин «биотехнология» относился к двум очень разным дисциплинам. С одной стороны, его употребляли, говоря о промышленной ферментации, с другой — применительно к той области, которая сейчас называется эргономикой. Такой двойственности пришел конец в 1961 г., когда шведский микробиолог Карл Гёрен Хеден порекомендовала изменить название научного журнала "Journal of Microbiological and Biochemical Engineering and Technology" («Журнал микробиологической и химической инженерии и технологии»), специализирующегося на публикации работ по прикладной микробиологии и промышленной ферментации, на "Biotechnology and Bioengineering" («Биотехнология и биоинженерия»). С этого момента биотехнология оказалась четко и необратимо связана с исследованиями в области «промышленного производства товаров и услуг при участии живых организмов, биологических систем и процессов»



Рис. 1.1. Основные этапы биотехнологического процесса. Термин был введен Карлом Эреки и относился к крупномасштабному получению свинины (конечный продукт) с использованием дешевой сахарной свеклы (сырье) в качестве корма для свиней (биотрансформация).

и встала на прочный фундамент микробиологии, биохимии и химической инженерии.

Промышленный биотехнологический процесс, в котором для производства коммерческих продуктов используются микроорганизмы, обычно состоит из трех ключевых этапов (рис. 1.1.).

1. Исходная обработка: обработка сырья таким образом, чтобы его можно было использовать как источник питательных веществ для микроорганизма-мишени.

2. Ферментация и биотрансформация; рост микроорганизма-мишени в большом (обычно более 100 л) биореакторе (ферментация) с последующим образованием нужного метаболита, например антибиотика, аминокислоты или белка (биотрансформация).

3. Конечная обработка: очистка нужного вещества от компонентов культуральной среды или от клеточной массы.

Целью биотехнологических исследований является максимальное повышение эффективности каждого из этих этапов и поиск микроорганизмов, с помощью которых можно получить нужные вещества (пищевые добавки, антибиотики и т. д.). В 60—70-е годы все эти исследования касались только исходной обработки, устройства биореакторов и получения конечного продукта. Благодаря этому был усовершенствован инструментальный контроль процесса ферментации и значительно расширены возможности крупномасштабного культивирования, что позволило повысить эффективность производства некоторых продуктов.

Наиболее трудным для оптимизации был этап биотрансформации. Когда использовались природные микробные штаммы, выход конечного продукта часто оказывался намного ниже оптимального. Поэтому предпринимались попытки изменить генетическую конституцию существующих штаммов-продуцентов с помощью химического мутагенеза или ультрафиолетового облучения. При таком подходе уровень повышения продукции обычно лимитировался чисто биологическими факторами. Например, если мутантный штамм синтезировал слишком много того или иного вещества, часто это отрицательно влияло на прочие метаболические процессы и приводило к угнетению роста культуры при крупномасштабном культивировании. Несмотря на это традиционные стратегии «индуцированного мутагенеза и селекции», направленные на усовершенствование штамма-продуцента, были исключительно плодотворны для многих процессов, например для производства антибиотиков.

Традиционные схемы генетического усовершенствования бактерий включают скрининг, отбор и тестирование огромного количества колоний, поэтому такие схемы высокочувствительны и занимают много времени. Более того, при этом можно рассчитывать только на усовершенствование уже существующих, переливаемых по наследству свойств штамма, а не на расширение его генетических возможностей. И все же к концу 70-х годов таким образом были усовершенствованы производственные процессы получения целого ряда продуктов.

С развитием технологии рекомбинантных ДН К природа биотехнологии изменилась окончательно и бесповоротно. Появилась возможность оптимизировать этап биотрансформации более прямым путем, создавать, а не просто отбирать высокопродуктивные штаммы, использовать микроорганизмы и эукариотические клетки как «биологические фабрики" для производства инсулина, интерферона, гормона роста, вирусных антигенов и множества других белков. Технология рекомбинантных ДНК позволяет получать в больших ко-личествах ценные низкомолекулярные вещества и макромолекулы, которые в естественных условиях синтезируются в минимальных количествах. Растения и животные стали естественными биореакторами, продуцирующими новые или изме-

ненные генные продукты, которые никогда не могли бы быть созданы методами мутагенеза и селекции или скрещивания. Наконец, эта новая технология способствует развитию принципиально новых методов диагностики и лечения различных заболеваний.

На стыке технологии рекомбинантных ДНК и биотехнологии возникла новая область исследований, динамичная и высококонкурентоспособная, - молекулярная биотехнология. Эта молодая дисциплина, как и молекулярная биология в период своего становления, весьма амбициозна, заявляемые ею притязания не всегда соответствуют реальным возможностям. Ее стратегия и экспериментальная база претерпевают быстрое изменение, одни подходы все время вытесня-

Таблица 1.1. История развития молекулярной биотехнологии

| Дата      | Событие  |
|-----------|--|
| 1917      | Карл Эреки ввел термин «биотехнология"   |
| 1943      | Произведен пенициллин в промышленном масштабе  |
| 1944      | Эвери. МакЛеод и МакКарти показали, что генетический материал представляет собой ДНК   |
| 1953      | Уотсон и Крик определили структуру молекулы ДНК  |
| 1961      | Учрежден журнал "Biotechnology and Bioengineering"   |
| 1961-1966 | Расшифрован генетический код   |
| 1970      | Выделена первая рестрицирующая эндонуклеаза  |
| 1972      | Корана и др. синтезировали полноразмерный ген тРНК   |
| 1973      | Бойери Коэн положили начало технологии рекомбинантных ДНК  |
| 1975      | Колер и Мильштейн описали получение моноклональных антител   |
| 1976      | Изданы первые руководства, регламентирующие работы с рекомбинантными ДНК   |
| 1976      | Разработаны методы определения нуклеотидной последовательности ДНК   |
| 1978      | Фирма Genentech выпустила человеческий инсулин, полученный с помощью <i>E. coli</i>  |
| 1980      | Верховный суд США, слушая дело <i>Даймонд против Чакрабартти</i> , вынес вердикт, что микроорганизмы, полученные генноинженерными методами, могут быть запатентованы |
| 1981      | Поступили в продажу первые автоматические синтезаторы ДНК  |
| 1981      | Разрешен к применению в США первый диагностический набор моноклональных антител  |
| 1982      | Разрешена к применению в Европе первая вакцина для животных, полученная по технологии рекомбинантных ДНК   |
| 1983      | Для трансформации растений применены гибридные Ti-плазмиды   |
| 1988      | Выдан патент США на линию мышей с повышенной частотой возникновения опухолей, полученную генноинженерными методами   |
| 1988      | Создан метод полимеразной цепной реакции (ПЦР)   |
| 1990      | В США утвержден план испытаний генной терапии с использованием соматических клеток человека  |
| 1990      | Официально начаты работы над проектом «Геном человека»   |
| 1994-1995 | Опубликоованы подробные генетические и физические карты хромосом человека  |
| 1996      | Ежегодный объем продаж первого рекомбинантного белка (эритропоэтина) превысил 1 млрд. долларов   |
| 1996      | Определена нуклеотидная последовательность всех хромосом эукаристического микроорганизма ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )   |
| 1997      | Клонировано млекопитающее из дифференцированной соматической клетки  |



Рис. 1.2. Молекулярная биотехнология использует достижения многих областей науки и позволяет создавать широкий ассортимент коммерческих продуктов и методов.

ются другими. Но несомненно одно: в будущем молекулярная биотехнология станет рутинным методом создания живых систем, обладающих новыми функциями и возможностями.

Очень редко новые научные дисциплины возникают «на пустом месте»; как правило, их фундаментом служат различные области науки. Что касается молекулярной биотехнологии, то ее биотехнологическая составляющая относится к сфере промышленной микробиологии и химической инженерии, а молекулярная — к областям молекулярной биологии, молекулярной генетики бактерий и энзимологии нуклеиновых кислот (табл. 1.1). В широком смысле молекулярная биотехнология пользуется достижениями самых разных областей науки и применяет их для создания самых разных коммерческих продуктов (рис. 1.2).

**Коммерциализация молекулярной биотехнологии**

Конечной целью всех биотехнологических исследований является создание коммерческого продукта. Следовательно, молекулярная биотехнология тесно связана с экономикой. Конечно, сейчас ее развитие обусловливается не только экономическими факторами, однако на первых порах ажиотаж вокруг этой молодой науки был связан с возможностью получения прибыли. К вечеру 15 октября 1980 г. основные держатели акций фирмы Genentech стали обладателями миллионных состояний, и это побудило очень многих людей к энергичным действиям. В период 1980—1983 гг. в Соединенных Штатах было создано около 200 мелких биотехнологических компаний; этому способствовали введение налоговых льгот, высокие прибыли от операций с ценными бумагами и заинтересованность частных вкладчиков. Вслед за Гербертом Бойером, который вначале был научным сотрудником Калифорнийского университета в Сан-Франциско, а затем стал вице-президентом фирмы Genentech, многие университетские профессора открыли собственные компании.

К 1985 г. в Соединенных Штатах было уже более 400 биотехнологических фирм; многие из них включили в свое название слово «ген», чтобы заявить о принадлежности к генноинженерному «цеху»: Biogen, Amgen, Calgene, Engenics, Genex, Cangene. На сегодняшний день в США свыше 1500 биотехнологических компаний, а во



всем мире их более 3000. Кроме того, большой вклад в развитие молекулярной биотехнологии внесли все крупные международные химические и фармацевтические компании, в том числе Monsanto, Du Pont, Upjohn, American Cyanamid, Eli Lilly, SmithKline Beecham, Merck, Novartis, Hoffman-LaRoche. В период бурного развития биотехнологического бизнеса в 80-е годы мелкие компании поглощались крупными, образовывались совместные предприятия. Например, в 1991 г. 60% акций компании Genentech было продано фирме Hoffmann-LaRoche за 2,1 млрд. долларов. В то же время многие компании обанкротились. Такая мобильность — характерная особенность биотехнологической индустрии.

К середине 90-х годов на рынке появилось более десятка новых биотехнологических лекарственных препаратов, более 100 препаратов сейчас проходят клинические испытания, еще свыше 500 находятся на стадии разработки. Создано и выпущено на рынок множество новых молекулярно-биотехнологических продуктов, повышающих урожайность сельскохозяйственных культур и продуктивность сельскохозяйственных животных. Ежегодный доход молекулярно-биотехнологической индустрии увеличился с 6 млн. долларов в 1986 г. до примерно 30 млрд. в 1996 г. По оценкам, к 2000 г. объем продаж продуктов, изготовленных с применением молекулярной биотехнологии, превысит 60 млрд. долларов в год. И хотя в целом доходность биотехнологического бизнеса оказалась не такой высокой, как ожидалось, энтузиазм инвесторов не ослабевает и свидетельствует о том, что молекулярная биотехнология — по крайней мере по их представлениям — имеет блестящие перспективы.

Все новые независимые молекулярно-биотехнологические компании узкоспециализированы, что часто находит отражение в их названии. Например, вслед за компаниями, занимающимися клонированием генов, в США появились компании, выпускающие полученные генноинженерными методами антитела, которые предназначены для лечения инфекционных заболеваний, рака и других болезней человека: Immunex, ImmuLogic, ImmunoGen, Immunomedics, MedImmune, Immune Response.

Большая часть коммерческих разработок в области молекулярной биотехнологии приходится на Соединенные Штаты. В других странах, где инвестиционный климат не столь благоприятен и бизнес менее активен, главную роль в создании молекулярно-биотехнологических предприятий играют крупные корпорации и государство. Так, правительство Японии объявило биотехнологию «стратегической индустрией» и национальным приоритетом. За дело взялись крупные японские корпорации. Вначале им не хватало собственных кадров, и первые исследования проводились в сотрудничестве с американскими университетами и компаниями. Сейчас эти корпорации приобрели необходимый опыт и сами проводят молекулярно-биотехнологические разработки и создают генноинженерные продукты.

Европейская биотехнологическая индустрия тоже неуклонно развивается: к 1995 г. в странах Европы было создано более 600 биотехнологических компаний. В экономически менее развитых странах роль «локомотива» в развитии национальной молекулярно-биотехнологической индустрии взяло на себя государство. Стимулом здесь служила уверенность в том, что молекулярная биотехнология — «самая революционная из всех технологий XX века». Ни одна страна не хотела оказаться лишенной всех тех благ, которые сулило ее развитие.

Сейчас, в конце второго десятилетия своего развития, молекулярная биотехнология фактически стала одной из отраслей промышленности, хотя вначале некоторые ученые считали ее чисто эзотерическим направлением. Без сомнения, в ближайшие десять лет коммерческую молекулярную биотехнологию ожидает бурный рост, но именно поэтому давать какие-то конкретные прогнозы здесь весьма рискованно,

## Надежды и опасения

С молекулярной биотехнологией человечество связывают самые большие надежды:

- возможность точной диагностики, профилактики и лечения множества инфекционных и генетических заболеваний
- значительное повышение урожайности сельскохозяйственных культур путем создания



## ВАЖНАЯ ВЕХА

**Создание функциональных бактериальных плазмид *in vitro*****S.N. Cohen, A.C.Y. Chang, H.W. Boyer, R.B. Helling*****Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 3240-3244, 1973**

Отсчет истории технологии рекомбинантных ДНК ведется с работы Коэна и др., которые показали, как, объединив генетические элементы из разных источников, можно создать новую реплицирующуюся генетическую структуру. Эту структуру Коэн и др. получили из автономно существующих в бактериальной клетке внехромосомных генетических элементов, называемых плазмидами. В своей предыдущей работе (Cohen, Chang. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 1293-1297, 1973) авторы получили маленькую плазмиду из более крупной природной, отрезал от последней случайные фрагменты и вводя их смесь в клетки *E. coli*. Один из таких фрагментов размером около 1/10 размера исходной плазмиды «прижился» в бактериальной клетке как функционирующая плазмида. Чтобы исключить фактор случайности, присущий подобному подходу, и сделать процесс манипулирования генетическим материалом более управляемым, Коэн и др. решили использовать фермент (рестрицирующую эндонуклеазу), который расщепляет молекулу ДНК в строго определенном месте с образованием фрагментов с выступающими концами (липкими концами). Фрагменты разных молекул ДНК, обработанных одним и тем же ферментом, имели одинаковые липкие концы и при отжиге соединялись. Таким образом, если расщепить ДНК из разных источников одной и той же рестрицирующей эндонуклеазой, а затем смешать фрагменты, то образуются новые комбинированные молекулы ДНК, не существовавшие прежде. Коэн и др. не только смогли перенести ген из одной плазмиды в другую, но и показали, что этот ген остается биологически активным. К их чести, они в полной мере осознали, что данная стратегия «позволяет внедрять специфические нуклеотидные последовательности прокариотической или эукариотической хромосомы или внехромосомной ДНК в независимо реплицирующуюся бактериальную плазмиду. Другими словами, любой ген, взятый из любого организма, теоретически можно встроить в плазмиду, которая будет размножаться в клетке-хозяине, и при этом, возможно, будет синтезироваться белок, кодируемый клонированным геном. Проиллюстрировав возможность клонирования генов, Коэн и др. создали экспериментальную базу для технологии рекомбинантных ДНК, показали, что плазмиды могут служить носителями и векторами клонированных генов. Последующие работы очень скоро привели к созданию более сложных векторов и стратегий клонирования. Все это вызвало серьезную озабоченность относительно безопасности и этичности подобных экспериментов, и чтобы снять обеспокоенность общественности, были разработаны официальные инструкции и созданы правительственные органы, регламентирующие работы с рекомбинантными ДНК. Завершал перечень тех последствий, к которым привела публикация работы Коэна и др., отметим, что она самым непосредственным образом повлияла на становление молекулярно-биотехнологической индустрии.

растений, устойчивых к вредителям, грибковым и вирусным инфекциям и вредным воздействиям окружающей среды

- создание микроорганизмов, продуцирующих различные химические соединения, антибиотики, полимеры, аминокислоты, ферменты
- создание пород сельскохозяйственных и других животных с улучшенными наследуемыми признаками
- переработка отходов, загрязняющих окружающую среду.

Обсуждать все блага, которые нас ожидают, легко и приятно, но одновременно нельзя забывать о последствиях, к которым может привести столь бурное развитие молекулярной биотехнологии. Эта новая отрасль раскинула свои сети так широко, что общество вправе получить ответы на свои вопросы:

- не будут ли организмы, полученные методами генной инженерии, оказывать вредное воздействие на другие живые организмы или на окружающую среду?
- не приведет ли создание и распространение генетически модифицированных организмов к уменьшению природного генетического разнообразия?
- правомочно ли, используя генноинженерные методы, изменять генетическую природу человека?

- не нарушит ли применение новых диагностических методов прав человека на неприкосновенность частной жизни?
- следует ли патентовать животных, полученных генноинженерными методами?
- не будет ли активное финансирование молекулярной биотехнологии сдерживать развитие других важных технологий?
- не приведет ли стремление к получению максимальной прибыли к тому, что преимуществами молекулярной биотехнологии смогут воспользоваться только состоятельные люди?
- не нанесет ли молекулярная биотехнология ущерб традиционному сельскому хозяйству?
- не вытеснят ли подходы к лечению, основанные на достижениях молекулярной биотехнологии, традиционные, столь же эффективные методы лечения?
- не помешает ли борьба за приоритеты свободному обмену идеями между учеными?

Эти и многие другие вопросы рассматривают правительственные комиссии, активно обсуждают на конференциях и в научных публикациях ученые, о них глубокомысленно рассуждают авторы популярных изданий. На этой широчайшей основе были сформулированы соответствующие правила и инструкции, написаны руководства и выработаны политические решения. В этом принимали участие и ученые, и общественность, но некоторые противоречия все же остались.

За рекордно короткое время молекулярная биотехнология превратилась в многопрофильное научное предприятие, в равной степени коммерческое и академическое. Ей посвящено огромное количество научных и деловых публикаций, в университетах всего мира студентам и аспирантам читают учебные курсы по молекулярной биотехнологии. Об энтузиазме, с которым написан отчет Отдела по оценкам новых технологий США за 1987 г., свидетельствует следующее заявление: «Молекулярная биотехнология знаменовала собой еще одну революцию в науке, которая могла бы изменить жизнь и будущее... людей так же радикально, как это сделала Промышленная революция два века назад и компьютерная революция в наши дни. Возможность целенаправленного манипулирования генетическим материалом... обещает великие перемены в нашей жизни».

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В 1973 г. Стэнли Козн и Герберт Бойер с сотрудниками разработали способ переноса генетической информации из одного организма в другой. Этот метод, получивший название технологии рекомбинантных ДНК, позволил ученым выделять конкретные гены и вводить их в организм нового хозяина. Технология рекомбинантных ДНК стимулировала развитие различных областей науки, но прежде всего она создала необходимые предпосылки для появления биотехнологии.

Биотехнология в значительной мере нацелена на получение с помощью микроорганизмов продуктов, имеющих коммерческую ценность. До эпохи рекомбинантных ДНК самым эффективным методом повышения продуктивности организмов был мутагенез с последующей селекцией оптимального штамма продуцента. Это длительный, трудоемкий, высокочувствительный и небезошибочный процесс, позволяющий улучшить лишь немногие из присущих природному организму свойств. В то же время технология рекомбинантных ДНК — это быстродействующий, эффективный, мощный инструмент, обеспечивающий создание микроорганизмов с заранее заданными генетическими характеристиками. Более того, этот инструмент может работать не только с микроорганизмами, но также с растениями и животными. Союз технологии рекомбинантных ДНК и биотехнологии породил очень динамичную, исключительно интересную дисциплину — молекулярную биотехнологию.

Молекулярная биотехнология сразу захватила воображение общества. При участии частного капитала было создано много мелких компаний, занимающихся геномным клонированием (технологией рекомбинантных ДНК). Правда, на то, чтобы предложить свою продукцию рынку, этим компаниям потребовалось времени несколько больше, чем ожидалось, но уже сейчас множество биотехнологических продуктов имеется в продаже и еще больше появится в ближайшем будущем.

Молекулярная биотехнология скрупулезно изучалась на предмет возможных негативных последствий ее распространения для человечества, поскольку спектр ее воздействия неограниченно широк. Рассматривались такие волнующие об-

## ЛИТЕРАТУРА

**Anonymous.** 1987. *New Developments in Biotechnology — Background Paper Public Perceptions of Biotechnology.* Office of Technology Assessment, U.S. Congress, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C,

Bud R. 1991. Biotechnology in the **twentieth** century. *Soc. Stud.Sci.*21:415-457.

**Bud R.** 1993. *The Uses of Life: a History of Biotechnology.* Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom,

**Busch L., W.B. Lacy, J. Burkhardt, L. R, Lacy.** 1992. *Plants, Power, and Profit: Social, Economic and Ethical Consequences of the New Biotechnologies.* Blackwell Publishers, Cambridge, Mass.

**Cohen S., A.C.Y. Chang, H.W. Boyer, R.B. Helling.** 1973. Construction of biologically functional bacterial plasmids in **vitro.** *Proc. Natl. Acad. Sei. USA* 70: 3240-3244.

**Davis B.[].** (ed.). 1991. *The Genetic Revolution: Scientific Prospects and Public Perceptions.* The Johns Hopkins University Press, Baltimore, Md.

**Grace E.S.** 1997, *Biotechnology Unzipped: Promises and Realities.* Trifolium Press, Inc., Toronto, Canada.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Укажите недостатки метода «мутагенез и селекция» для получения имеющих коммерческую ценность организмов с улучшенными свойствами.
2. В чем состоит революционность работы Коэна, Бойера и др., опубликованной в 1973 г.?
3. Какое отношение к биотехнологии имеет Карл Эреки?
4. Опишите основные этапы биотехнологического процесса.
5. Сравните биотехнологию и молекулярную биотехнологию.
6. Какие опасения связаны с развитием молекулярной биотехнологии?
7. Раскройте смысл утверждения, что «молекулярная биотехнология является многопрофильной наукой».
8. Назовите некоторые из потенциальных возможностей, предоставляемых молекулярной биотехнологией.
9. Опишите историю развития биотехнологической индустрии за последние 30 лет.
10. Прочтите рубрику «Новости» в последних номерах журнала "Nature Biotechnology", которые вы можете найти в научной библиотеке или в Интернете (<http://biotech.nature.com>), и детально рассмотрите пару сообщений.

## ГЛАВА 2.

# Биологические системы, использующиеся в молекулярной биотехнологии

Объектами молекулярной биотехнологии являются самые разнообразные биологические системы: микроорганизмы, клеточные линии насекомых, растений и млекопитающих, вирусы насекомых, растений и млекопитающих, многоклеточные организмы (растения, мыши, домашние животные и т. д.) — выбор системы зависит от целей эксперимента. Характер биологической системы исключительно важен для биотехнологического процесса. Во многих случаях именно генетически модифицированная самовоспроизводящая биологическая единица — микроорганизм, вирус, растение или животное — является конечным коммерческим продуктом. Среди множества биологических объектов, используемых в молекулярной биотехнологии, основными «рабочими лошадками» являются бактерии *Escherichia coli*, одноклеточные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* и различные клеточные линии животного происхождения. Все они играют важную роль в получении белков, кодируемых клонированными генами.

В последующих главах мы детально опишем различные высокоспециализированные биологические системы. В частности, в гл. 7 будет рассмотрена система «вирус насекомых—клетки насекомых», которая используется для продукции аутентичных белков, кодируемых клонированными генами, а в гл. 19 — генетическая модификация домашних животных (коров, овец, свиней). В настоящей главе мы дадим краткое описание наиболее значимых для молекулярной биотехнологии систем, которые также будут рассматриваться в последующих главах.

## Прокариоты и эукариоты

Все живые организмы делятся на две основные группы: прокариоты и эукариоты. В основе этой классификации лежат многочисленные структурные различия, на которых мы остановимся более детально в последующих главах, а здесь укажем лишь основные из них: 1) наличие или отсутствие ядра, содержащего хромосомную ДНК; 2) строение и химический состав клеточной стенки и 3) наличие или отсутствие субклеточных цитоплазматических органелл. В прокариотической клетке, например бактериальной, хромосомная ДНК находится непосредственно в цитоплазме, клетка окружена ригидной клеточной стенкой, в состав которой часто входит пептидогликан, но не хитин или целлюлоза; в клетке нет субклеточных цитоплазматических органелл. В эукариотической клетке имеется ядро, отделенное от цитоплазмы ядерной мембраной, хромосомная ДНК находится в ядре; клеточная стенка, если она есть, может содержать хитин или целлюлозу, но не пептидогликан; в цитоплазме содержатся различные субклеточные органеллы (митохондрии, аппарат Гольджи, хлоропласт в клетках растений) (рис. 2.1).

### *Escherichia coli*

Бактерия *Escherichia coli* — один из наиболее хорошо изученных организмов. За последние пятьдесят лет удалось получить исчерпывающую информацию о ее генетике, молекулярной биологии, биохимии, физиологии и общей биологии. Это граммотрицательная непатогенная подвижная палочка длиной менее 1 мкм. Ее средой обитания является кишечник человека, но она также может высеваться из почвы и воды. Благодаря способности размножаться простым делением на средах, содержащих только ионы  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$  и  $\text{SO}_4^{2-}$ , микроэлементы и источник углерода (например, глюкозу), *E. coli* ста-

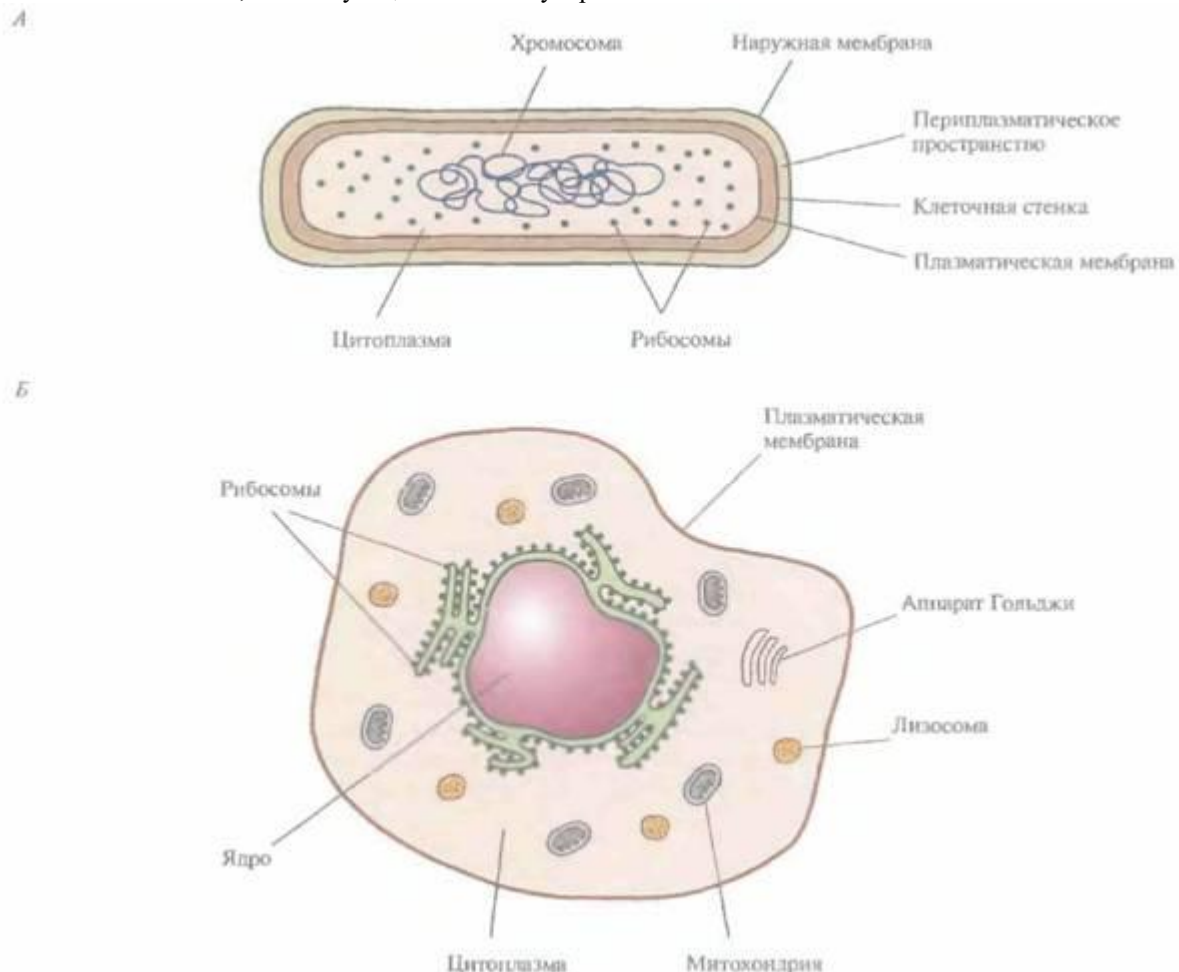


Рис. 2.1. Схематическое представление прокариотической бактериальной клетки (А) и эукариотической животной клетки (Б).

ла излюбленным объектом научных исследований. При культивировании *E.coli* на обогащенных жидких питательных средах, содержащих аминокислоты, витамины, соли, микроэлементы и источник углерода, время генерации (т. е. время между образованием бактерии и ее делением) в логарифмической фазе роста при температуре 37 °С составляет примерно 22 мин.

Для каждого живого организма существует определенный температурный интервал, оптимальный для его роста и размножения. При слишком высоких температурах происходит денатурация белков и разрушение других важных клеточных компонентов, что ведет к гибели клетки. При низких температурах биологические процессы существенно замедляются или останавливаются совсем вследствие структурных изменений, которые претерпевают белковые молекулы. Исходя из температурного режима, который предпочитают те или иные микроорганизмы, их можно подразделить на термофилы (от 45 до 90 °С и выше), мезофилы (от 10 до 47 °С) и психрофилы, или психротрофы (от —5 до 35 °С). Микроорганизмы, активно размножающиеся лишь в определенном диапазоне температур, могут быть полезным инструментом для решения различных биотехнологических задач. Например, термофилы часто служат источником генов, кодирующих



## Появление новых генотипов в смешанной культуре биохимических мутантов бактерий

J. Lederberg, E.L. Tatum *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 11: 113-114, 1946.

Почти до середины XX в. В 1946 г. Ледерберг и Татум исключив остальные среди бактериологов продемонстрировали, что между возможные причины господствовало мнение, что в членами генетически неоднородной образования комбинации отличие от других живых популяции *E. coli* может ABCDE, Ледерберг и Татум организмов бактерии при происходить обмен генетической пришли к выводу, что она неблагоприятных внешних информацией и что при этом, как и у возникает в результате воздействия выживают не двуполых организмов, в результате физического обмена благодаря случайным физического обмена между генетическим материалом генетическим изменения хромосомами могут возникать новые между двумя хромосомами. (мутациям), а вследствие того, что генетические комбинации Другими словами, у *E. coli* именно эти воздействия в (генетическая рекомбинация). существует некое подобие большинстве случаев запускают Обнаружение этого замечательного аппарата полового размножения, физиологические процессы, феномена выдвинуло *E. coli* на который, как и у других которые и позволяют бактериям передний фронт генетических организмов, обеспечивает выжить. Эта теория была исследований. Ледерберг и Татум создание новых комбинаций опровергнута исследованиями С.Е. создали различные штаммы *E. coli*, генов. Как заявил Лурия, это Лурия и М. Дельбрюка (Luria индуцируя те или иные мутации и открытие может стать «одним из S. E., Delbruck M., *Genetics* 28: 491- отбирая клетки с разнообразными наиболее великих достижений за 51 1, 1943), которые доказали, что наследуемыми дефектами всю историю развития устойчивость *E. coli* к метаболизма. Например, одна чистая бактериологии», что бактериальным вирусам культура могла синтезировать впоследствии и подтвердилось. (бактериофагам) обусловлена вещества А, В и С, но не D или Е (ее Вскоре появилась целая именно произошедшими в них обозначили ABCde). Параллельно серия блестящих работ мутациями, а не реакцией бактерий создали другую чистую культуру, самого Ледерберга и других на воздействие со стороны abcDE. Смешав эта культуры, авторов, которые позволили бактериофага. Эти данные нашли получили бактерии ABCDE. Ни в установить, как работает подтверждение в работах других одной из чистых культур тип ABCDE генетическая система *E. coli*. авторов, изучавших последствие не возникал спонтанно. Этот микроорганизм широко других неблагоприятных внешних Экспериментально использовался как модельная воздействия. Исследования система для изучения Лурия— Дельбрюка положили молекулярных основ синтеза начало современной генетике нуклеиновых кислот и белков, а также других важнейших микроорганизмов. биологических процессов.

термостабильные ферменты, которые применяются в промышленных или в лабораторных процессах, а генетически видоизмененные психротрофы используют для биodeградации токсичных отходов, содержащихся в почве и воде, при пониженных температурах.

*E. coli* можно культивировать как в аэробных (в присутствии кислорода), так и в анаэробных (без кислорода) условиях. Однако для оптимальной продукции рекомбинантных белков *E. coli* и другие микроорганизмы обычно выращивают в аэробных условиях. Если целью культивирования бактерий в лаборатории является синтез и выделение определенного белка, то культуры выращивают на сложных жидких питательных средах в колбах. Для поддержания нужной температуры и обеспечения достаточной аэрации культуральной среды колбы помещают в водяную баню или термостатируемую комнату и непрерывно встряхивают. Такой аэрации достаточно для размножения клеток, но не всегда — для синтеза белка. Рост клеточной массы и продукция белка лимитируются не содержанием в питательной среде источников углерода или азота, а содержанием растворенного кислорода: при 20 °С оно равно примерно девяти миллионным долям. Это становится особенно важно при промышленном получении рекомбинантных белков с помощью микроорганизмов. Для обеспечения условий, оптимальных для максимальной продукции белков, конструируют специальные ферментеры и создают системы аэрации.

Таблица 2.1. Некоторые генетически модифицированные микроорганизмы, использующиеся в биотехнологии

*Acremonium chrysogenum*  
*Bacillus brevis*  
*Bacillus subtilis*  
*Bacillus thuringiensis*  
*Corynebacterium glutamicum*  
*Erwmia herbicola*  
*Escherichia coli*  
*Pseudomonas* spp.  
*Rhizobium* spp.  
*Streptomyces* spp.  
*Trichoderma reesei*  
*Xanthomonas campestris*  
*Zymomonas mobilis*

Помимо *E. coli*, в молекулярной биотехнологии используют множество других микроорганизмов (табл. 2.1). Их можно разделить на две группы: микроорганизмы как источники специфических генов и микроорганизмы, созданные генноинженерными методами для решения определенных задач. К специфическим генам относится, например, ген, кодирующий термостабильную ДНК-полимеразу, которая используется в широко применяемой полимеразной цепной реакции (ПЦР). Этот ген был выделен из термофильных бактерий и клонирован в *E. coli*. Ко второй группе микроорганизмов относятся, например, различные штаммы *Corynebacterium glutamicum*, которые были генетически модифицированы с целью повышения продукции промышленно важных аминокислот.

### *Saccharomyces cerevisiae*

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* — это непатогенные одноклеточные микроорганизмы с диаметром клетки примерно 5 мкм, которые во многих отношениях представляют собой эукариотический аналог *E. coli*. Их генетика, молекулярная биология и метаболизм детально изучены. *S. cerevisiae* размножаются почкованием и хорошо растут на такой же простой среде, как и *E. coli*. Их способность к превращению сахара в этанол и углекислый газ издавна использовалась для изготовления алкогольных напитков и хлеба. В настоящее время ежегодно во всем мире расходуется более

1 млн. тонн *S. cerevisiae*. Дрожжи *S. cerevisiae* представляют также большой научный интерес. В частности, они являются наиболее удобной моделью для исследования других эукариот, в том числе человека, поскольку многие гены, ответственные за регуляцию клеточного деления *S. cerevisiae*, сходны с таковыми у человека. Это открытие способствовало идентификации и характеристике генов человека, отвечающих за развитие новообразований. Широко используемая генетическая система дрожжей (искусственная хромосома) является неперменным участником всех исследований по изучению ДНК человека. В 19% г. была определена полная нуклеотидная последовательность всего набора хромосом *S. cerevisiae*, что еще более повысило ценность этого микроорганизма для научных исследований. Такая работа на эукариотах была выполнена впервые.

Синтезированный бактериальной клеткой эукариотический белок часто приходится подвергать ферментативной модификации, присоединяя к белковой молекуле низкомолекулярные соединения — во многих случаях это необходимо для правильного функционирования белка. К сожалению, *E. coli* и другие прокариоты не способны осуществлять эти модификации, поэтому для получения полноценных эукариотических белков используют *S. cerevisiae*, а также другие виды дрожжей: *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces diastaticus*, *Schizisaccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia postons*, *Hansenula pofymorpha*. Наиболее эффективными продуцентами полноценных рекомбинантных белков являются *P. pastoris* и *H. polymorpha*.

## Культуры эукариотических клеток

При всех различиях между типами эукариот методические подходы к культивированию клеток насекомых, растений и млекопитающих имеют много общего. Сначала берут небольшой кусочек ткани данного организма и обрабатывают его протеолитическими ферментами, расщепляющими белки межклеточного материала (при работе с растительными клетками добавляют специальные ферменты, разрушающие клеточную стенку). Высвободившиеся клетки помещают в сложную питательную среду, содержащую аминокислоты, антибиотики, витамины, соли,

глюкозу и факторы роста. В этих условиях клетки делятся до тех пор, пока на стенках емкости с культурой не образуется клеточный монослой. Если после этого не перенести клетки в емкость со свежей питательной средой, то рост прекратится. Обычно удается переносить (перевивать, субкультивировать) и поддерживать до 50-100 клеточных генераций исходной (первичной) клеточной культуры, затем клетки начинают терять способность к делению и гибнут. Культивируемые клетки сохраняют некоторые свойства исходного клеточного материала, поэтому их можно использовать для изучения биохимических свойств различных тканей.

Часто некоторые клетки перевиваемых первичных клеточных культур претерпевают генетические изменения, в результате которых ускоряется их рост. Культуры клеток, которые при этом приобретают селективные преимущества, оказываются способными к неограниченному росту *in vitro* и называются устойчивыми клеточными линиями. Одни клеточные линии сохраняют основные биохимические свойства исходных клеток, другие нет. У большинства клеток, способных к неограниченному росту, имеются значительные хромосомные изменения, в частности отмечается увеличение числа одних хромосом и потеря других. В молекулярной биотехнологии устойчивые клеточные линии иногда используют для размножения вирусов и для выявления белков, которые кодируются клонированными последовательностями ДНК. Кроме того, они применяются для крупномасштабного производства вакцин и рекомбинантных белков.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В молекулярной биотехнологии используется множество различных биологических систем - как для осуществления генетических манипу-

ляций, так и для производства важных в коммерческом отношении продуктов. Наиболее значимыми из них являются бактерия *Escherichia coli*, дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* и клеточные культуры насекомых, растений и млекопитающих.

## ЛИТЕРАТУРА

**Demain A.L., N.A. Solomon (ed.).** 1985. *Biology of Industrial Organisms*. Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc., Menlo Park, Calif.

**Dujon B.** 1996. The yeast genome project: what did we learn? *Trends Genet.* **12**: 263-270.

**Lodish H., D. Baltimore, A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matsudaira, J. Darnell** 1995. *Molecular Cell Biology*, 3rd ed. Scientific American Books, New York, N.Y.

**O'Leary W. M. (ed.).** 1989. *Practical Handbook of Microbiology*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Почему в молекулярной биотехнологии применяется так много разных биологических систем?
2. Кто такие прокариоты?
3. Кто такие эукариоты?
4. Перечислите основные свойства *Escherichia coli*.
5. Что означает термин «грамотрицательный»?
6. Перечислите основные свойства *S. cerevisiae*.
7. Каковы основные компоненты простой жидкой питательной среды?
8. Каковы основные компоненты сложной жидкой питательной среды?
9. Что такое первичная клеточная культура? 10. Что такое устойчивая клеточная линия?



# ГЛАВА 3.

## ДНК, РНК и синтез белка

Вся информация о строении и функционировании любого живого организма содержится в закодированном виде в его генетическом материале, основу которого составляет дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК). ДНК большинства организмов — это длинная двухцепочечная полимерная молекула. Последовательность мономерных единиц (дезоксирибонуклеотидов) в одной ее цепи соответствует (комплементарна) последовательности дезоксирибонуклеотидов в другой. Принцип комплементарности обеспечивает идентичность новосинтезированных молекул ДНК, образующихся при их удвоении (репликации), исходным молекулам. Индивидуальными генетическими элементами со строго специфичной нуклеотидной последовательностью, кодирующими определенные продукты, являются гены. Одни из них кодируют белки, другие — только молекулы РНК. Информация, содержащаяся в генах, которые кодируют белки (структурных генах), расшифровывается в ходе двух последовательных процессов: синтеза РНК (транскрипции) и синтеза белка (трансляции). Сначала на определенном участке ДНК как на матрице синтезируется матричная РНК (мРНК). Затем в ходе согласованной работы многокомпонентной системы при участии транспортных РНК (тРНК), мРНК, ферментов и различных белковых факторов осуществляется синтез белковой молекулы. Все эти процессы обеспечивают правильный перевод зашифрованной в ДНК генетической информации с языка нуклеотидов на язык аминокислот. Аминокислотная последовательность белковой молекулы однозначно задает ее структуру и функции.

Для получения ценных биотехнологических продуктов используют гены самых разнообразных организмов. Чтобы лучше понять, как работают биотехнологические системы, рассмотрим строение молекулы ДНК и процессы репликации, транскрипции и трансляции.

### Структура ДНК

Первые данные о химических свойствах ДНК появились в 1868 г. К началу 40-х годов XX в.

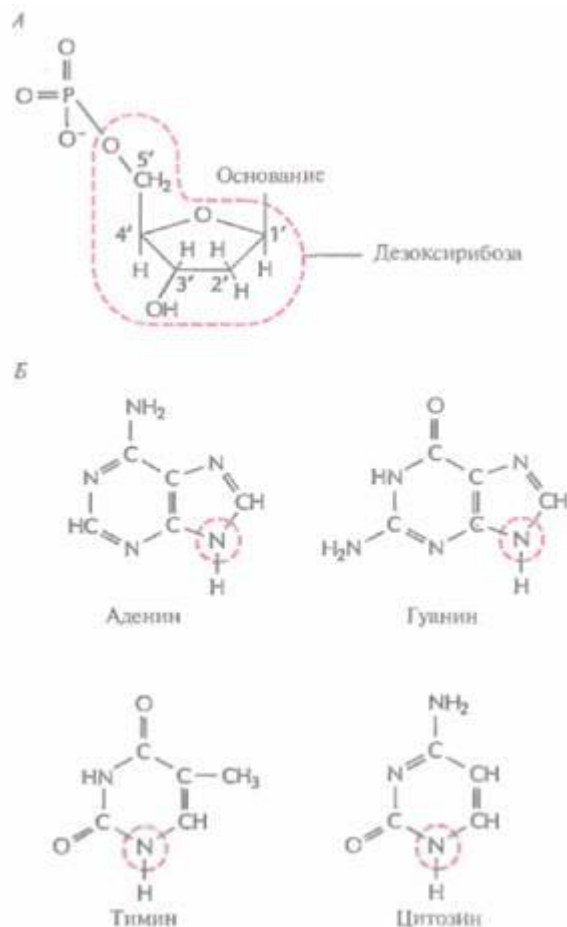


Рис. 3.1. Структурные формулы компонентов ДНК. А. Нуклеотид. Основанием может быть аденин, гуанин, цитозин или тимин. Цветной штриховой линией обведен сахарный остаток (дезоксирибоза): цифрами указаны его углеродные атомы. Б. Основания. Цветной штриховой линией обведен атом азота, по которому к основанию присоединяется дезоксирибоза.

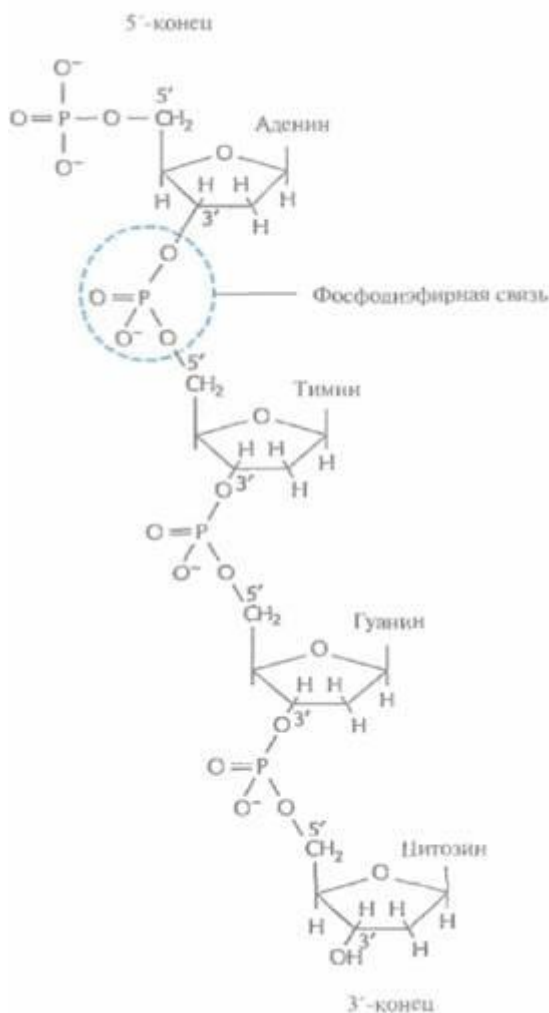


Рис. 3.2. Одна из цепей молекулы ДНК.

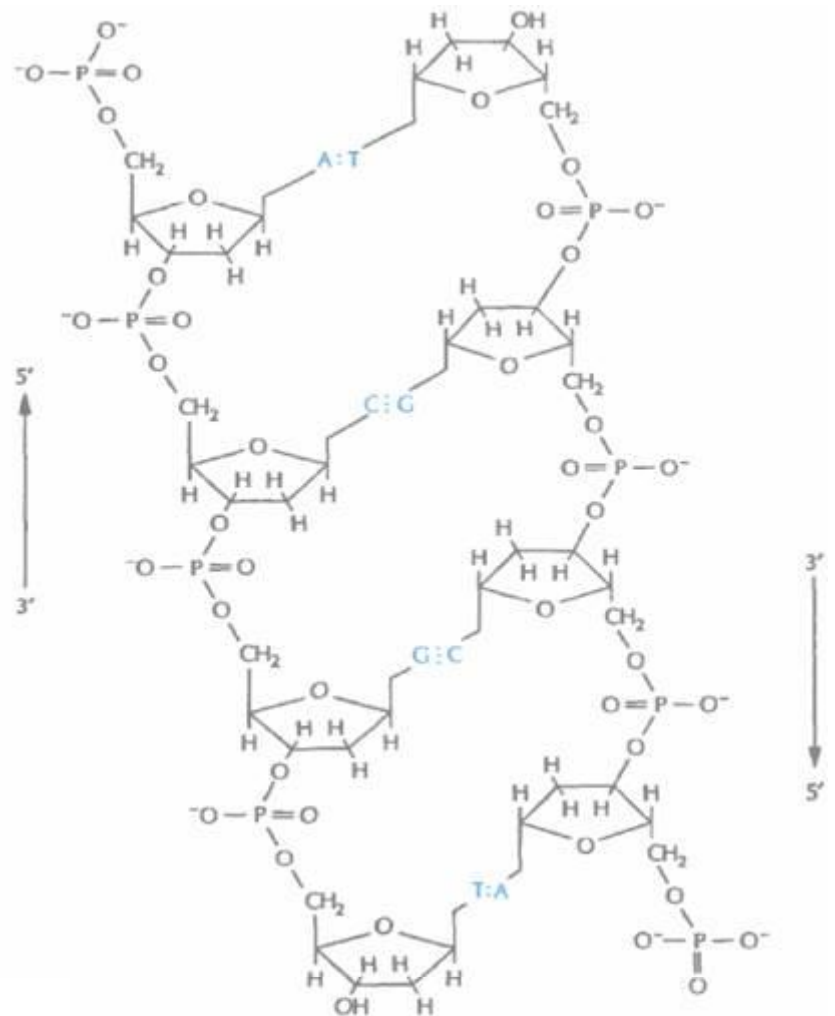


Рис. 3.3. Модель двойной спирали ДНК, Поперечные перекладины — комплементарные пары оснований, «боковины» - сахарофосфатный остов.

было установлено, что молекула ДНК — это линейный полимер. Его мономерными единицами являются нуклеотиды, состоящие из азотистого основания, пятиуглеродного сахара (пентозы) и фосфатной группы (рис. 3.1, А). Фосфатная группа присоединена к 5'-атому углерода моносахаридного остатка, а органическое основание — к 1'-атому. Основания в ДНК бывают двух типов: пуриновые [аденин (А) и гуанин (G)] и пиримидиновые [цитозин (C) и тимин (Т)] (рис. 3.1, Б). В ДНК моносахарид представлен 2'-дезоксирибозой, содержащей только одну гидроксильную группу (ОН), а в РНК — рибозой, имеющей две гидроксильные группы. Нуклеотиды соединены друг с другом фосфодиэфирными связями, при этом фосфатная группа 5'-углеродного атома одного нуклеотида связана с 3'-ОН-группой дезоксирибозы соседнего нуклеотида (рис. 3.2). На одном конце полинуклеотидной цепи находится 3'-ОН-группа (3'-конец), а на другом — 5'-фосфатная группа (5'-конец).

В 1953 г. Джеймс Уотсон и Фрэнсис Крик, основываясь на данных рентгеноструктурного анализа кристаллов ДНК, пришли к выводу, что нативная ДНК состоит из двух полимерных цепей, образующих двойную спираль (рис. 3.3). Навитые одна на другую полинуклеотидные цепи удерживаются вместе водородными связями, образующимися между комплементарными основаниями противоположных цепей (рис. 3.4). При этом аденин образует пару только с тимином, а гуанин — с цитозином. Пара оснований А—Т стабилизируется двумя водородными свя-

Рис. 3.4. Фрагмент двухцепочечной ДНК.



зями, а пара G—C — тремя. Длина двухцепочечной ДНК обычно измеряется числом пар комплементарных нуклеотидов (п.н.). Для молекул ДНК, состоящих из тысяч или миллионов пар нуклеотидов, приняты единицы т.п.н. и м.п.н. соответственно. Например, ДНК хромосомы 1 человека представляет собой одну двойную спираль длиной 263 м.п.н.

Сахарофосфатный остов молекулы, который состоит из фосфатных групп и дезоксирибозных остатков, соединенных 5'—3'-фосфодиэфирными связями, образует как бы боковины винтовой лестницы, а пары оснований А—Т и G—C — ее ступеньки (рис. 3.4). Цепи молекулы ДНК антипараллельны: одна из них имеет направление 3'→-5', другая 5' --> 3'. В соответствии с принципом комплементарности, если в одной из цепей имеется нуклеотидная последовательность 5'-TAGGCAT-3', то в комплементарной цепи в этом месте должна находиться последовательность 3'-ATCCGTA-5'. В этом случае двухцепочечная форма будет выглядеть следующим образом:

**5'-TAGGCAT-3'**

**3'-ATCCGTA-5'**

В такой записи 5'-конец верхней цепи всегда располагают слева, а 3'-конец — справа.

Носитель генетической информации должен удовлетворять двум основным требованиям: воспроизводиться (реплицироваться) с высокой точностью и детерминировать (кодировать) синтез

белковых молекул. Модель ДНК Уотсона—Крика полностью отвечает этим требованиям. Во-первых, согласно принципу комплементарности, каждая цепь ДНК может служить матрицей для образования новой комплементарной цепи. Следовательно, после одного раунда репликации образуются две дочерние молекулы, каждая из которых имеет такую же нуклеотидную последовательность, как исходная молекула ДНК. Во-вторых, нуклеотидная последовательность структурного гена однозначно задает аминокислотную последовательность кодируемого ею белка.

Репликация

Согласно модели Уотсона—Крика, каждая цепь ДНК служит матрицей при синтезе новой комплементарной цепи, а последовательность оснований в синтезируемой (растущей) цепи задается последовательностью комплементарных оснований цепи-матрицы. Каждая мономерная единица, присоединяющаяся к растущей цепи, находится в форме дезоксирибонуклеозид-5'-

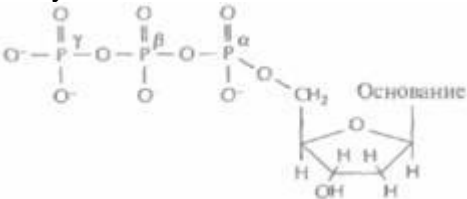


Рис. 3.5. Структурная формула дезоксирибонуклеозидтрифосфата. Фосфатные группы обозначаются буквами,  $\alpha$ ,  $\beta$ , и  $\gamma$ .  $\alpha$ -Фосфат связан с 5'-атомом углерода дезоксирибозы и при репликации участвует в образовании фосфодиэфирной связи;  $\beta$ - и  $\gamma$ -фосфатные группы отщепляются в виде пирофосфата.

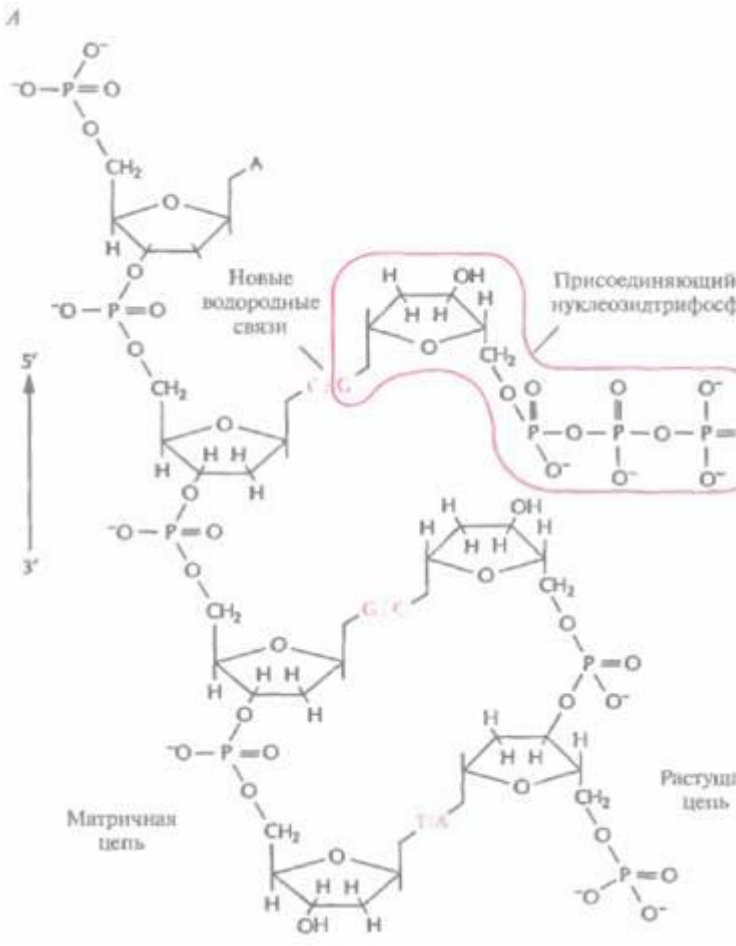


Рис. 3.6. Репликация ДНК. А. Спаривание очередного дезоксирибонуклеозидтрифосфата с комплементарным основанием ДНК-матрицы.

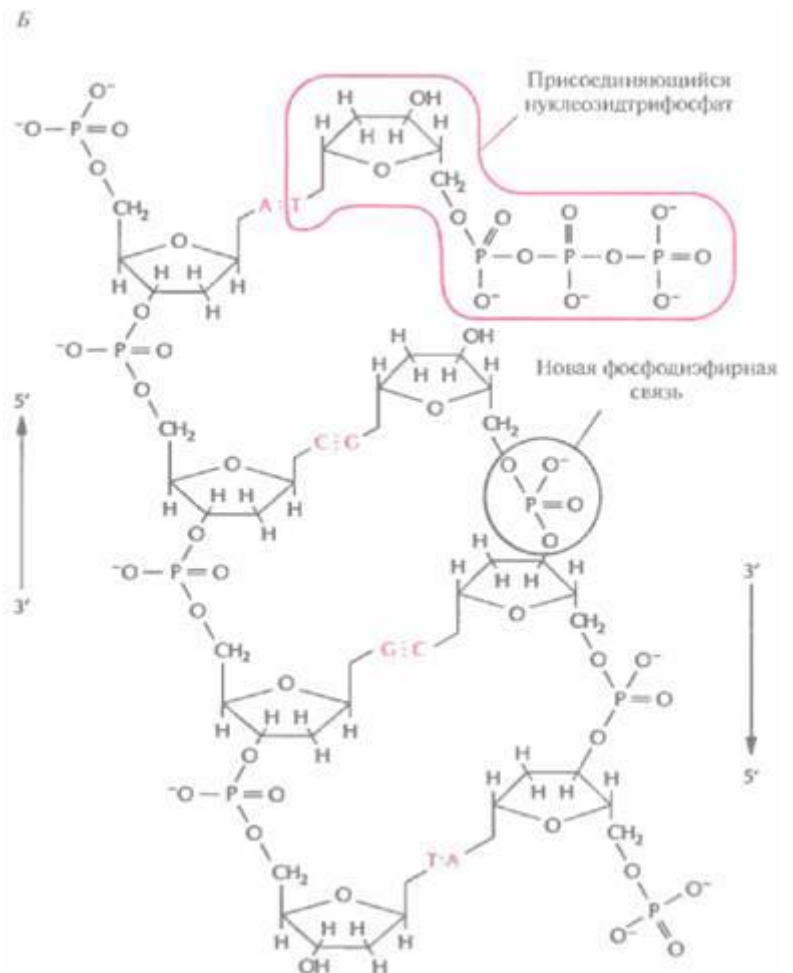
трифосфата (рис. 3.5); фосфатная группа, связанная с 5'-углеродным атомом дезоксирибозы, обозначается буквой  $\alpha$ , к ней присоединены  $\beta$ -фосфат и далее —  $\gamma$ -фосфат. В ходе репликации  $\beta$ - и  $\gamma$ -фосфатные группы отщепляются в виде пирогосфата, а  $\alpha$ -фосфатная группа связывается с 3'-ОН-группой последнего нуклеотида растущей цепи (рис. 3.6). Синтез ДНК как у про-, так и у эукариот осуществляется при участии множества разных ферментов. Основную роль играет ДНК-полимераза, которая последовательно присоединяет новые звенья к растущей полинуклеотидной цепи в соответствии с принципом комплементарности и катализирует образование фосфодиэфирных связей.

У бактерий репликация ДНК начинается в особой точке молекулы, которая называется точкой начала (или сайтом инициации) репликации (*ori*, от англ. origin). В ДНК эукариот имеется несколько таких сайтов, и репликация может начинаться в каждом из них. Образующиеся при этом сегменты эукариотической ДНК сшиваются друг с другом с помощью особых ферментов. Кроме того, у эукариот есть специальный фермент теломераза, который достраивает концы (теломеры) хромосом.

## Расшифровка генетической информации: РНК и белок

Подавляющее большинство генов содержит в закодированном виде информацию о синтезе белков. Белки — это биологические молекулы, участвующие практически во всех процессах, протекающих в живых системах. Они служат катализаторами разнообразных биохимических ре-

Рис. 3.6. (Продолжение) Б. Между (X-фосфатной группой присоединяемого нуклеотида и 3'-гидроксильной группой растущей цепи образуется фосфодиэфирная связь. К комплементарному спариванию готов следующий дезоксирибонуклеозидтрифосфат.



акции, осуществляют транспорт веществ внутри клеток и между клетками, регулируют проницаемость клеточных мембран, из них строятся различные структурные элементы. Белки участвуют в осуществлении двигательных функций, обеспечивают защиту от инфекций и токсинов, регулируют синтез остальных генных продуктов. Основной структурной единицей белков являются аминокислоты. Все аминокислоты имеют сходное химическое строение, К центральному атому углерода (α-углерод) присоединены атом водорода (H), аминогруппа (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), карбоксильная группа (COO<sup>−</sup>) и R-группа (боковая цепь) (рис. 3.7, А). Существует 20 разных боковых групп и соответственно 20 аминокислот. Например, в аминокислоте аланине R-группой является метальная группа (CH<sub>3</sub>). В табл. 3.1 даны одно- и трехбуквенные обозначения аминокислот. Соединяясь друг с другом пептидными связями, аминокислоты образуют полипептидную цепь. Пептидная связь образуется между карбоксильной группой одной аминокислоты и аминогруппой другой (рис. 3.7, Б). Первая аминокислота белковой молекулы имеет свободную аминогруппу (N-конец), а последняя — свободную карбоксильную группу (С-конец).

Длина белковых молекул варьирует от 40 до более 1000 аминокислотных остатков, при этом

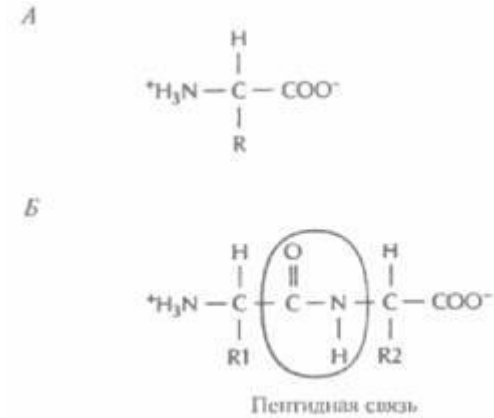


Рис. 3.7.    Обобщенная структурная формула аминокислоты и образование пептидной связи. А. Аминокислота. R — боковая группа. Б. Образование пептидной связи между двумя аминокислотными остатками с боковыми группами R1 и R2,

Таблица 3. 1. Аминокислоты и их обозначения

| Аминокислота             | Трехбуквенн<br>ое обозначение | Однобуквенно<br>е обозначение |
|--------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Аланин                   | Ala                           | A                             |
| Аргинин                  | Arg                           | R                             |
| Аспарагин                | Asn                           | N                             |
| Аспарагиновая<br>кислота | Asp                           | D                             |
| Валин                    | Val                           | V                             |
| Гистидин                 | His                           | H                             |
| Глицин                   | Gly                           | G                             |
| Глутамин                 | Gln                           | Q                             |
| Глутаминовая<br>кислота  | Glu                           | E                             |
| Изолейцин                | Iso                           | I                             |
| Лейцин                   | Leu                           | L                             |
| Лизин                    | Lys                           | K                             |
| Метионин                 | Met                           | M                             |
| Пролин                   | Pro                           | P                             |
| Серин                    | Ser                           | S                             |
| Тирозин                  | Tyr                           | Y                             |
| Треонин                  | Thr                           | T                             |
| Триптофан                | Trp                           | W                             |
| Фенилаланин              | Phe                           | F                             |
| Цистеин                  | Cys                           | C                             |

в зависимости от их последовательности и от аминокислотного состава молекулы белков принимают разную форму (конфигурацию, конформацию). Многие функционально активные белки состоят из двух и более полипептидных цепей (субъединиц), как идентичных, так и несколько различающихся. Кроме того, многие белки, выполняющие ключевые функции, представляют собой сложные белковые комплексы, состоящие из множества разных субъединиц.

Важным «передаточным звеном» при переводе генетической информации с языка нуклеотидов на язык аминокислот являются рибонуклеиновые кислоты (РНК), которые синтезируются на определенных участках ДНК как на матрицах в соответствии с их нуклеотидной последовательностью. РНК — это линейная полинуклеотидная молекула, отличающаяся от ДНК в двух отношениях. Во-первых, моносахаридом в РНК является рибоза, содержащая не одну, а две гидроксильные группы; они связаны с 2'- и 3'-атомами углерода. Во-вторых, одним из четырех оснований в РНК является урацил (U), занимающий место тимина. Большинство молекул РНК одноцепочечные, хотя часто в них имеются вза-

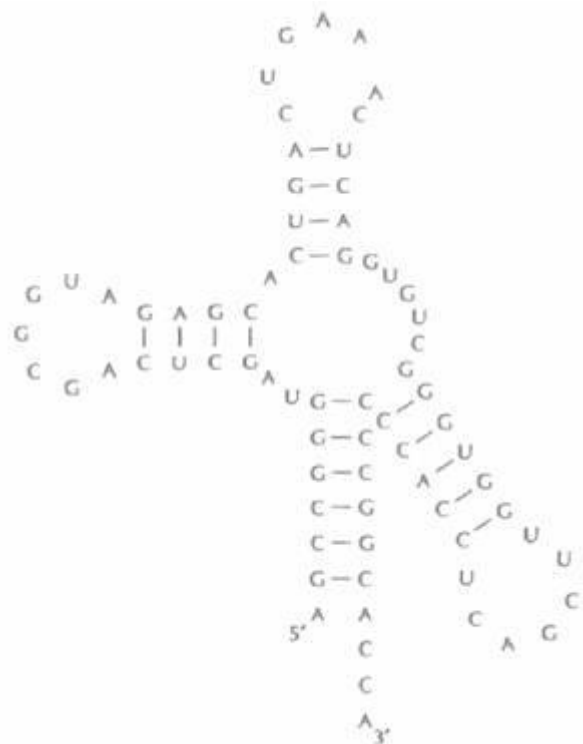


Рис. 3.8. Вторичная структура гипотетической молекулы РНК. Комплементарные основания соединены между собой водородными связями. Сахарофосфатный остов не изображен.

имнокомплементарные участки, образующие двухцепочечные структуры — «шпильки» (рис. 3.8). Спаривание оснований происходит таким же образом, как и в ДНК, за исключением того, что вместо пары А—Т образуются А—U.

Существуют три основных типа РНК: информационная (мРНК), рибосомная (рРНК) и транспортная (тРНК). Все они играют важную роль в процессе расшифровки генетической информации. Синтез РНК на ДНК-матрице называется транскрипцией. У большинства прокариот транскрипция всех РНК осуществляется с помощью одной и той же РНК-полимеразы. У эукариот мРНК, рРНК и тРНК транскрибируются разными РНК-полимеразами.

Транскрипция во многом сходна с репликацией. Матрицей при синтезе РНК служит определенный участок одной из цепей ДНК. РНК-полимераза копирует этот участок, последовательно соединяя друг с другом с помощью 3'—5'-фосфодиэфирных связей рибонуклеотиды в соответствии с правилом комплементарности (рис. 3.9). В ходе транскрипции новосинтезированная молекула РНК отсоединяется от ДНК, и двойная спираль ДНК восстанавливается. Чтобы обеспечить транскрипцию только отдельных сегментов ДНК, должны существовать некие сигнальные последовательности, указывающие, где начинается (инициируется) транскрипция и где она останавливается (терминируется). Сигнал инициации обычно располагается перед кодирующей последовательностью, а сигнал терминирования — вслед за ней. Участок ДНК, предшествующий транскрибируемому гену, называется 5'-фланкирующей последовательностью, а расположенный за ним — 3'-фланкирующей.

С молекулярной точки зрения ген представляет собой специфическую нуклеотидную последовательность, транскрибируемую в РНК. Подавляющее большинство транскрибируемых последовательностей ДНК составляют так называемые структурные гены, на которых синтезируются мРНК. Конечным продуктом структурного гена является белок, у прокариот структурный ген представляет собой непрерывный участок молекулы ДНК. Транскрипция начинается со связывания РНК-полимеразы с промотором, и далее последовательно копируется весь структурный ген (кодирующая область) от первого нуклеотида до последнего с образованием функциональной мРНК (рис. 3.10). У эукари-

Рис. 3.9. Схематическое изображение транскрипции. Стрелкой указано ее направление.





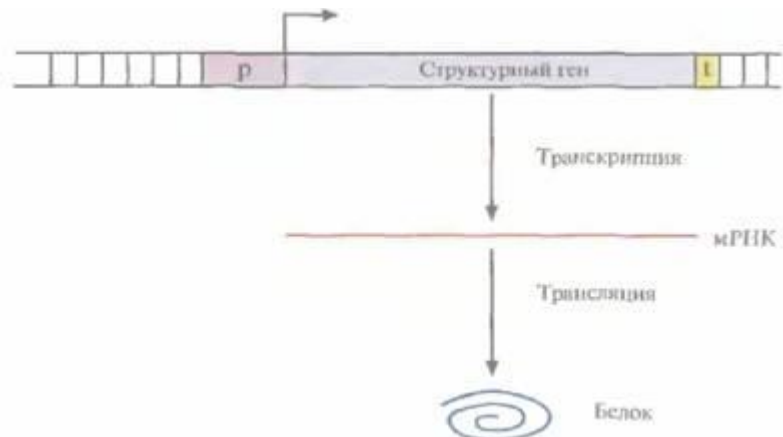


Рис. 3.10. Схематическое изображение прокариотического структурного гена. Указаны промотор (р), сайт инициации транскрипции и ее направление (горизонтальная стрелка), область терминации транскрипции, узнаваемая РНК-полимеразой (t). Сначала на ДНК как на матрице синтезируется мРНК (транскрипция), а затем осуществляется синтез белковой цепи (трансляция).

от большинство структурных генов состоит из нескольких дискретных кодирующих областей (экзонов), разделенных некодирующими областями (интронами). По завершении транскрипции эукариотического структурного гена интроны вырезаются из первичного продукта транскрипции с помощью ферментов, а экзоны сшиваются друг с другом «торец в торец» (сплайсинг) с образованием функциональной мРНК (рис. 3.11 и 3.12). Обычно длина экзонов составляет от 150 до 200 нуклеотидов, а длина интронов варьирует от 40 до 10 000 нуклеотидов. Очень немногие эукариотические структурные гены вообще не имеют интронов. Иногда сплайсинг мРНК может проходить по альтернативному варианту. Например, в одной ткани функциональная мРНК может образовываться в результате соединения всех экзонов первичного транскрипта, а в другой какой-то экзон будет вырезан вместе с фланкирующими его интронами и образуется другая функциональная мРНК. Благодаря альтернативному сплайсингу в разных тканях могут образовываться разные продукты одного и того же структурного гена (рис. 3.13).

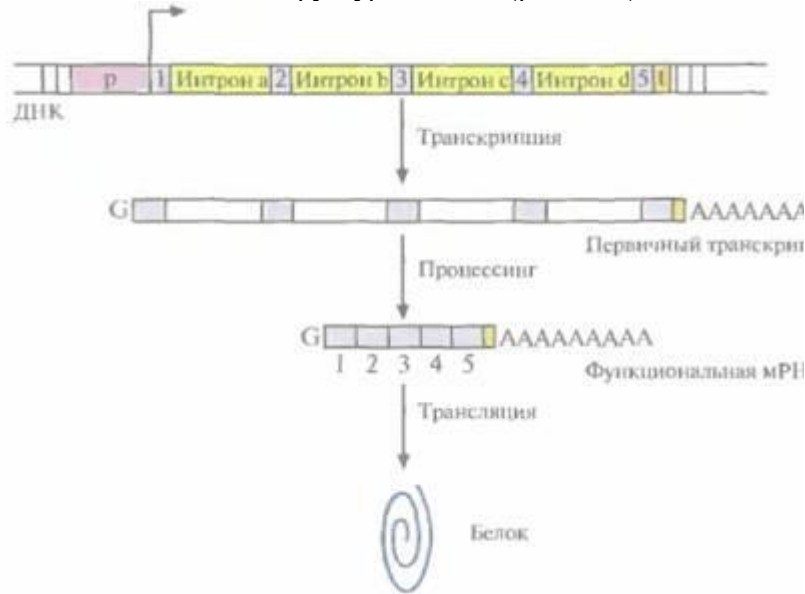


Рис. 3.11. Схематическое изображение эукариотического структурного гена. Указаны промотор (р), сайт инициации транскрипции и ее направление (горизонтальная стрелка), область терминации транскрипции, узнаваемая РНК-полимеразой (t). 1—5 - экзоны, а— d - интроны. Первичный транскрипт содержит poly(A)-«хвост» на 3'-конце и метилированный нуклеотид G («кэп») на 5'-конце. После транскрипции интроны из первичного транскрипта вырезаются (процессинг) и на образовавшейся функциональной РНК синтезируется белковая молекула (трансляция).



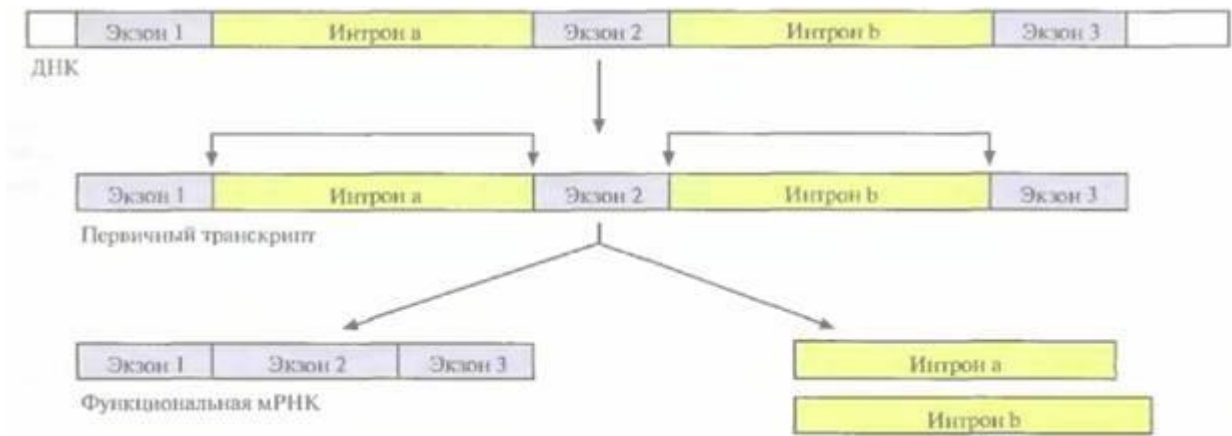


Рис. 3.12. Сплайсинг первичного транскрипта у эукариот. Угловыми стрелками указаны места соединения экзонов 1, 2 и 3 после удаления интронов а и б,

В активно функционирующей клетке примерно 3—5% суммарной РНК приходится на долю мРНК, 90% - на долю рРНК и 4% — на долю тРНК. мРНК может быть представлена десятками различных типов молекул, а рРНК — всего двумя типами. Более крупная рРНК образует с белками рибонуклеопротеидный комплекс, называемый большой рибосомной субъединицей, а рРНК меньшего размера комплекс, называемый малой рибосомной субъединицей. Во время синтеза белков субъединицы объединяются с образованием рибосомы. У эукариот обе рибосомные субъединицы крупнее, чем у прокариот.

Помимо тысяч рибосом, в клетке, активно синтезирующей белки, содержатся до 60 различных видов тРНК. тРНК — это линейная одноцепочечная молекула длиной от 75 до 93 нуклеотидов. В ней имеется несколько взаимнокомплементарных участков, спаривающихся между собой (рис. 3.8), а вся молекула укладывается в пространстве с образованием структуры, напоминающей букву L (рис. 3.14). С помощью специфических ферментов (аминоацил-тРНК—синтаз) к 3'-концу тРНК

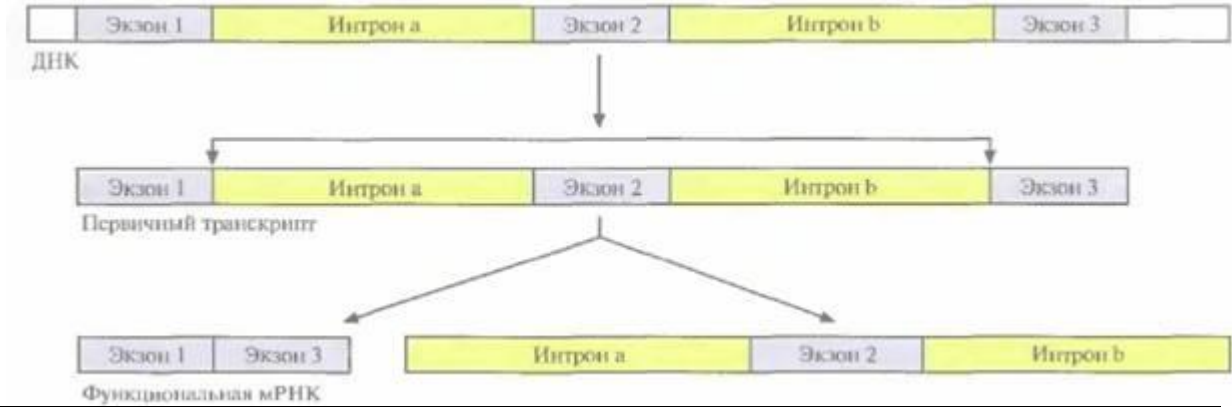


Рис. 3.13. Альтернативный сплайсинг первичного транскрипта у эукариот. Стрелками указаны места соединения экзонов после удаления интронов. Экзон 2, фланкируемый интронами 1 и 2, вырезается из первичного транскрипта, а экзоны 1 и 3 соединяются с образованием функционально активной мРНК.

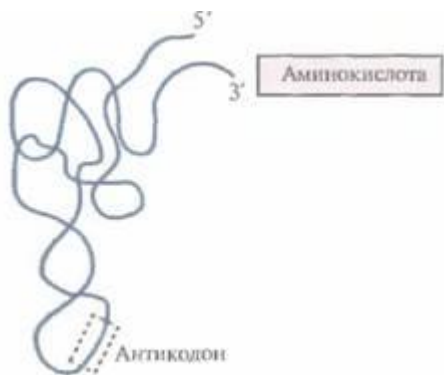


Рис.3.14. Конформация тРНК, «нагруженной» аминокислотой. Штриховой прямоугольник — антикодон.

присоединяется соответствующая аминокислота. Так, фермент аргинил-тРНК—синтетаза присоединяет к молекуле тРНК<sup>Arg</sup> аминокислоту аргинин. Для каждой из двадцати аминокислот, из которых состоят все белки, существует по крайней мере одна специфическая тРНК. На другом конце молекулы тРНК расположена последовательность из трех нуклеотидов, которая называется антикодоном. Она распознает специфический кодон в мРНК и определяет, какая именно аминокислота будет присоединена к растущей полипептидной цепи.

Трансляция

Трансляция осуществляется при участии мРНК, разных тРНК, «нагруженных» соответствующими аминокислотами, рибосом и множества белковых факторов, обеспечивающих инициацию, элонгацию и терминацию синтеза полипептидной цепи. Трансляция в прокариотических клетках иницируется формилметиониновой тРНК, которая так и называется — инициаторная тРНК. При участии белковых факторов антикодон 3'-UAC-5' инициаторной тРНК<sup>fMet</sup> (fMet - модифицированный метионин, аминогруппа которого формилирована) связывается с кодоном 5'-AUG-3' мРНК, образуя комплекс с малой рибосомной субъединицей. Никакая другая тРНК соединиться с этим комплексом не может. В свою очередь связывание мРНК с малой рибосомной субъединицей осуществляется посредством образования нуклеотидных пар между последовательностью примерно из восьми нуклеотидов (последовательность Шайна—Дальгарно), которая расположена вблизи 5'-конца мРНК, и комплементарной 3'-концевой последовательностью рРНК, связанной с малой рибосомной субъединицей. К комплексу fMet-тРНК<sup>fMet</sup>-мРНК-малая

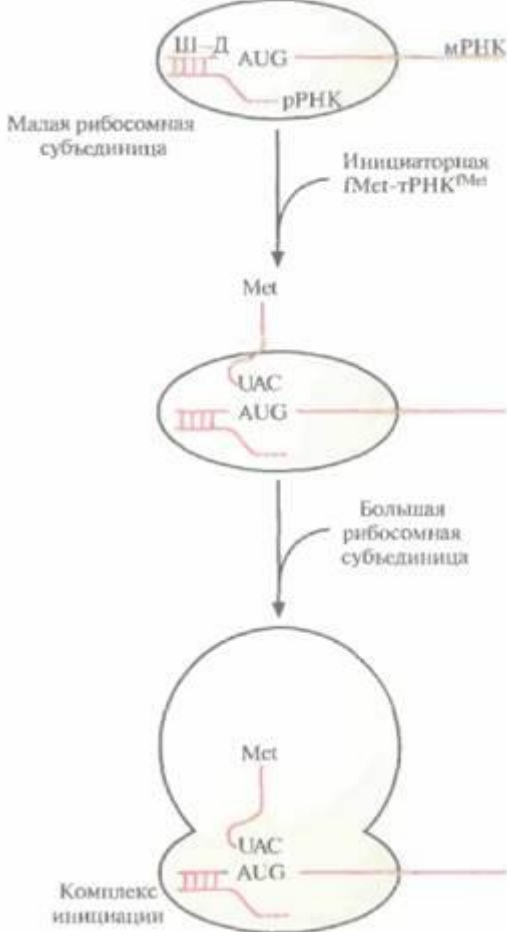


Рис. 3.15. Инициация трансляции в прокариотической клетке. Последовательность Шайна—Дальгарно (Ш—Д), находящаяся вблизи 5'-конца мРНК, связывается с комплементарной 3'-концевой последовательностью рРНК, образующей комплекс с малой рибосомной субъединицей. Антикодон (UAC) инициаторной fMet-тРНК<sup>fMet</sup> спаривается со старт-кодоном (AUG) мРНК. К образовавшемуся комплексу присоединяется большая рибосомная субъединица, и образуется комплекс инициации. Аминогруппа метионина, связанного с инициаторной тРНК, формилирована (СНО) (на рисунке не изображено). После трансляции формилметионин отщепляется от белковой цепи.

субъединица присоединяется большая субъединица, и образуется инициаторный комплекс (комплекс инициации) (рис. 3.15).

У эукариот трансляция иницируется связыванием специфической «нагруженной» инициаторной тРНК ( $\text{Met-tRNA}^{\text{Met}}$ ) и факторов инициации с малой рибосомной субъединицей. Затем мРНК присоединяется своим 5'-концом к комплексу тРНК—малая рибосомная субъединица, и комплекс продвигается по мРНК до старт-кодона (AUG). Далее антикодон UAC инициаторной  $\text{Met-tRNA}^{\text{Met}}$  спаривается с кодоном AUG мРНК. К комплексу присоединяется большая рибосомная субъединица, и образуется инициаторный комплекс (рис. 3.16.)

Этапы элонгации и терминации у про- и эукариот во многом сходны. Процесс элонгации включает образование пептидных связей между соседними аминокислотами, при этом очередность присоединяемых аминокислот определяется очередностью кодонов в мРНК (рис. 3.17). Рассмотрим процесс более подробно. После образования инициаторного комплекса кодон в молекуле мРНК, следующий за кодоном AUG, спаривается с комплементарным ему антикодомом соответствующей тРНК, определяя таким образом, какая из нагруженных тРНК присоединится к рибосоме (ненагруженные тРНК не связываются с рибосомами). Если вторым триплетом в мРНК оказывается CUG, то следующей к рибосомному комплексу присоединяется несущая лейцин тРНК с антикодомом 3'-GAC-5'. Когда эта тРНК оказывается на месте, между карбоксильной группой метионина и аминогруппой лейцина с помощью ферментативной активности, присущей большой субъединице, образуется пептидная связь, при этом лейцин остается связанным со своей тРНК, а метионин отсоединяется от инициаторной тРНК, и последняя отделяется от рибосомы. Комплекс метионин—лейцин— $\text{tRNA}^{\text{Leu}}$ —мРНК «протягивается» через рибосому (транслокация), так что следующий кодон мРНК может связаться с нагруженной тРНК, несущей соответствующий антикодон. Если третьим кодоном мРНК является UUU, то следующей аминокислотой в растущей полипептидной цепи будет фенилаланин; его доставит к рибосоме тРНК с антикодомом AAA. Когда эта тРНК окажется на месте, между карбоксильной группой лейцина и аминогруппой фенилаланина образуется пептидная связь.  $\text{tRNA}^{\text{Leu}}$  отделится от рибосомы, произойдет транслокация пептидил- $\text{tRNA}^{\text{Phe}}$  (тРНК с присоединенной к ней растущей полипептидной цепью), и следующий кодон мРНК сможет связаться с антикодомом соответствующей нагруженной тРНК.

Эти события — связывание нагруженной тРНК с мРНК благодаря комплементарному спарива-

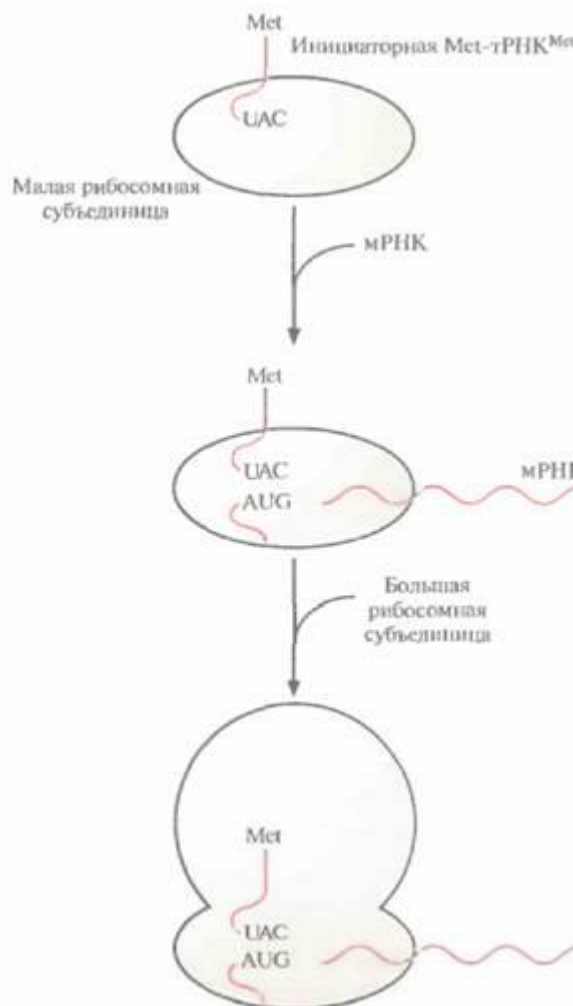


Рис. 3.16. Инициация трансляции в эукариотической клетке. Малая рибосомная субъединица связывается с инициаторной тРНК, «нагруженной» метионином ( $\text{Met-tRNA}^{\text{Met}}$ ), комплекс продвигается по мРНК, пока антикодон UAC инициаторной тРНК не спарится со старт-кодом AUG мРНК. Далее к комплексу мРНК—тРНК—малая субъединица присоединяется большая субъединица и образуется комплекс инициации.

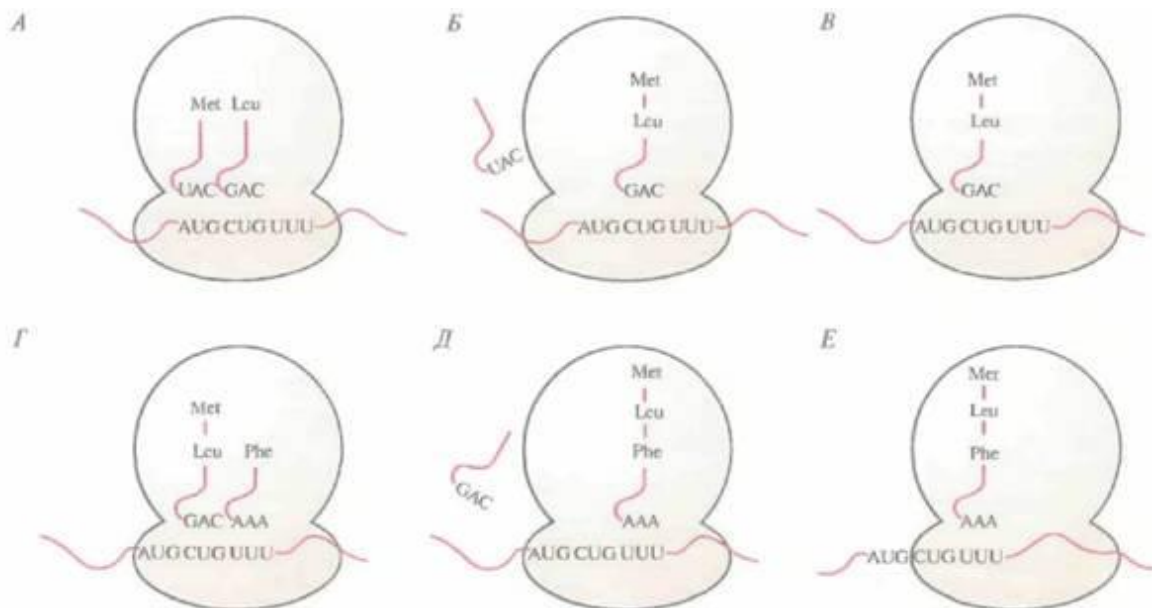


Рис. 3.17. Элонгация полипептидной цепи. *А.* Второй кодон (CUG) в мРНК связывается с антикодоном (GAC) Leu-тРНК<sup>Leu</sup>. *Б.* Метионин образует пептидную связь с лейцином, доставленным тРНК<sup>Leu</sup>, освободившаяся от аминокислоты инициаторная тРНК отсоединяется. *В.* Транслокация комплекса пептидил-тРНК-мРНК с экспонированием следующего кодона (UUU). *Г.* Третий кодон (UUU) спаривается с антикодоном AAA Phe-тРНК<sup>Phe</sup>. *Д.* Лейцин образует пептидную связь с фенилаланином, доставленным тРНК<sup>Phe</sup>, освободившаяся от аминокислоты тРНК<sup>Leu</sup> отсоединяется от рибосомы. *Е.* Транслокация комплекса пептидил-тРНК-мРНК с экспонированием следующего кодона, и т. д.

нию кодона с антикодоном, образование пептидной связи, отсоединение «разгруженной» тРНК, транслокация — продолжают до тех пор, пока не соединятся друг с другом все аминокислоты, закодированные в мРНК. Трансляция происходит в направлении 5'—3' со скоростью примерно 15 аминокислот в секунду. Когда 5'-конец мРНК высвобождается из рибосомного комплекса, он может связаться с другим таким же комплексом, так что одна молекула мРНК может одновременно транслироваться множеством рибосом.

Элонгация продолжается до тех пор, пока рибосома не дойдет до кодона UAA, UAG или UGA (стоп-кодон, терминирующий кодон) (рис. 3.18). В норме в клетках отсутствуют тРНК с антикодонами, комплементарными сигналам терминации. Их узнают белковые факторы освобождения (терминации). При связывании фактора освобождения с рибосомой происходит гидролиз связи между последней тРНК и полипептидом, свободная тРНК, полипептидная цепь и мРНК отсоединяются от рибосомы. Рибосома диссоциирует на субъединицы, которые могут вновь участвовать в трансляции.

После трансляции многие полипептиды подвергаются различным модификациям. У большинства из них отщепляется N-концевой метионин, так что N-концевым остатком становится вторая аминокислота. У эукариот происходит так называемый процессинг некоторых белков, когда полипептидная цепь расщепляется в определенных сайтах с образованием более коротких белковых молекул со специфическими функциями. В некоторых случаях, особенно в эукариотических клетках, к определенным аминокислотам ферментативным путем присоединяются фосфатные группы, липиды, углеводы или другие низкомолекулярные соединения. В результате этих химических модификаций образуются белки, выполняющие в клетке специфические функции.

Генетический словарь состоит из 64 кодонов. Три из них — это стоп-кодона, а один (AUG) - старт-кодон (табл. 3.2), кодирующий еще и аминокислоту метионин. Когда кодон AUG находится не на 5'-конце молекулы мРНК, а в ее внутренней области, то он распознается другой тРНК (Met-тРНК<sup>Met</sup>), к которой присоединен немоди-

Таблица 3.2. Генетический код и частота использования разных кодонов в геноме *E. coli* и человека

| Кодон | Аминокислота          | Частота использования |         | Кодон | Аминокислота | Частота использования |         |
|-------|-----------------------|-----------------------|---------|-------|--------------|-----------------------|---------|
|       |                       | <i>E. coli</i>        | человек |       |              | <i>E. coli</i>        | человек |
| GGG   | Глицин                | 13                    | 0, 0,23 | UAG   | Стоп         | 0,09                  | 0,17    |
| GGA   | Глицин                | 09                    | 0, 0 26 | UAA   | Стоп         | 0,62                  | 0,22    |
| GGU   | Глицин                | 38                    | 0, 0,18 | UAU   | Тирозин      | 0,53                  | 0,42    |
| GGC   | Глицин                | 40                    | 0, 0,33 | UAC   | Тирозин      | 0,47                  | 0,58    |
| GAG   | Глутаминовая кислота  | 30                    | 0, 0,59 | UUU   | Фенилаланин  | 0,51                  | 0,43    |
| GAA   | Глутаминовая кислота  | 70                    | 0, 0,41 | UUC   | Фенилаланин  | 0,49                  | 0,57    |
| GAU   | Аспарагиновая кислота | 59                    | 0, 0,44 | UCG   | Серин        | 0,13                  | 0,06    |
| GAC   | Аспарагиновая кислота | 41                    | 0, 0,56 | UCA   | Серин        | 0,12                  | 0,15    |
| GUG   | Валин                 | 34                    | 0, 0,48 | UCU   | Серин        | 0,19                  | 0,17    |
| GUA   | Валин                 | 17                    | 0, 0,10 | UCC   | Серин        | 0,17                  | 0,23    |
| GUU   | Валин                 | 29                    | 0, 0,17 | AGU   | Серин        | 0,13                  | 0,14    |
| GUC   | Валин                 | 20                    | 0, 0,25 | AGC   | Серин        | 0,27                  | 0,25    |
| GCG   | Аланин                | 34                    | 0, 0,10 | CGG   | Аргинин      | 0,08                  | 0,19    |
| GCA   | Аланин                | 22                    | 0, 0,22 | CGA   | Аргинин      | 0,05                  | 0,10    |
| GCU   | Аланин                | 19                    | 0, 0,28 | CGU   | Аргинин      | 0,42                  | 0,09    |
| GCC   | Аланин                | 25                    | 0, 0,40 | CGC   | Аргинин      | 0,37                  | 0,19    |
| AAG   | Лизин                 | 74                    | 0 0,60  | AGG   | Аргинин      | 0,03                  | 0,22    |
| AAA   | Лизин                 | ,76                   | 0 0,40  | AGA   | Аргинин      | 0,04                  | 0,21    |
| AAU   | Аспарагин             | 39                    | 0, 0,44 | CAG   | Глутамин     | 0,69                  | 0,73    |
| AAC   | Аспарагин             | 61                    | 0, 0,56 | CAA   | Глутамин     | 0,31                  | 0,27    |
| AUG   | Метионин, старт       | 00                    | 1, 1,00 | CAU   | Гистидин     | 0,52                  | 0,41    |
| AUA   | Изолейцин             | ,07                   | 0 0,14  | CAC   | Гистидин     | 0,48                  | 0,59    |
| AU U  | Изолейцин             | 47                    | 0, 0,35 | CUG   | Лейцин       | 0,55                  | 0,43    |
| AUC   | Изолейцин             | 46                    | 0, 0,51 | CUA   | Лейцин       | 0,03                  | 0,07    |
| ACG   | Треонин               | 23                    | 0, 0,12 | CUU   | Лейцин       | 0,10                  | 0,12    |
| ACA   | Треонин               | 12                    | 0, 0,27 | CUC   | Лейцин       | 0,10                  | 0,20    |
| ACU   | Треонин               | 21                    | 0, 0,23 | UUG   | Лейцин       | 0,11                  | 0,12    |
| ACC   | Треонин               | 43                    | 0, 0,38 | UUA   | Лейцин       | 0,11                  | 0,06    |
| UGG   | Триптофан             | 00                    | 1, 1,00 | CCG   | Пролин       | 0,55                  | 0,11    |
| UGU   | Цистеин               | 43                    | 0, 0,42 | CCA   | Пролин       | 0,20                  | 0,27    |
| UGC   | Цистеин               | 57                    | 0, 0,58 | CCU   | Пролин       | 0,16                  | 0,29    |
| UGA   | Стоп                  | 30                    | 0, 0,61 | CCC   | Пролин       | 0,10                  | 0,33    |

фицированный метионин. Аминокислота триптофан кодируется всего одним кодоном (UGG), остальные аминокислоты, из которых состоят белки, — по крайней мере двумя, чаще четырьмя, а иногда и шестью кодонами. Например, для лейцина существует шесть кодонов: (UUA, UUG, CUU, CUC, CUA и CUG. Синонимичные кодоны используются различными организмами с разной частотой. Из четырех кодонов для глицина GGA используется в структурных генах человека в 26% случаев, а в *Escherichia coli* — в 9%. Такая же ситуация наблюдается и для стоп-кодонов. Так, у человека частота использования кодонов UAA, UAG и UGA составляет 0,22, 0,17 и 0,61 соответственно, а у *E. coli* — 0,62,0,09 и 0,30. Несмотря на все эти различия, генетический код у всех организмов, за редким исключением, одинаков.

Регуляция транскрипции у бактерий

Все процессы, протекающие в бактериальной клетке, — образование аминокислот, нуклеотидов и других важных метаболитов, репликация, транскрипция, трансляция, катаболизм, высвобождение энергии, реакции на внешние воздействия — требуют участия белков. Однако энергетических ресурсов клетки не хватает для одновременного осуществления транскрипции и трансляции (экспрессии) всех структурных генов. Поэтому постоянно экспрессируются толь-



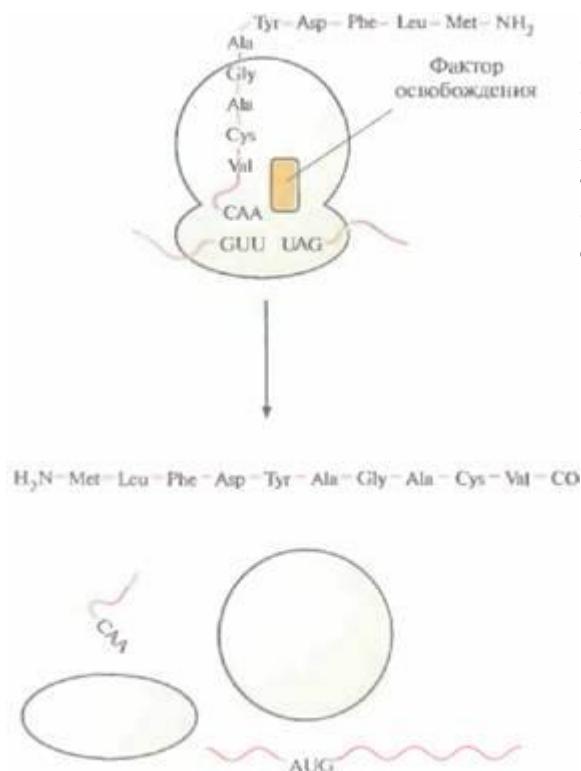


Рис. 3.18. Терминация трансляции. Со стоп-кодоном (UAG) связывается фактор освобождения, и трансляция завершается. Химическая связь между последней тРНК и полипептидной цепью разрывается, свободная тРНК, мРНК и готовая белковая цепь отсоединяются от рибосомы, и последняя диссоциирует на субъединицы.

ко те гены, которые кодируют белки, поддерживающие основные клеточные функции, а транскрипция остальных структурных генов регулируется. Когда у клетки возникает потребность в каком-то белке (белках), то инициируется (включается) транскрипция соответствующего структурного гена (генов), а когда такая потребность исчезает, транскрипция выключается.

Часто у бактерий белки одного метаболического пути кодируются смежными структурными генами. Нуклеотидная последовательность, в которой закодировано более одного белка, называется опероном. Обычно оперон находится под контролем единственного промотора, и при его транскрипции образуется одна длинная молекула мРНК, кодирующая несколько белков. При трансляции такой мРНК, в которой стоп-кодон последовательности, кодирующей один белок, соседствует со старт-кодоном гена следующего белка, синтезируется набор дискретных белков.

В большинстве структурных генов *E. coli* имеются два сайта связывания для РНК-полимеразы. Один из них обычно представляет собой нуклеотидную последовательность

TATAAT

АТАТТА (ТАТА-бокс, или бокс Прибнова), а другой -

TTGAC

ААСТГ.

ТАТА-бокс и последовательность TTGAC расположены за 10 (область —10) и 35 (область —35) нуклеотидов до сайта инициации транскрипции соответственно (нуклеотид +1) (рис. 3.19). Обычно от участка между ТАТА-боксом и нуклеотидом +1 во многом зависит, будет ли происходить транскрипция данного оперона. В зависимости от способа регуляции транскрипции оперона этот участок называется оператором или активатором.

Для включения и выключения разных оперонов в ходе эволюции сформировалось множество регуляторных систем. Например, с операторной областью может быть связан регуляторный белок, называемый репрессором; он мешает перемещению РНК-полимеразы вдоль молекулы ДНК, и транскрипция блокируется (рис. 3.20). Однако если с репрессором свяжется некое низкомолекулярное вещество (эффе́ктор), то его конформация изменится таким образом, что его связывание с операторной областью станет невозможным, и транскрипция возобновится. Обычно эффе́ктор разрушается клеточными ферментами. Когда его концентрация снижается, репрессор связывается с операторным участком, и транскрипция вновь прекращается. Операторный участок специфичен для каждого оперона, а эффе́ктор взаимодействует только с определенным репрессором.

В качестве иллюстрации рассмотрим такой пример. Предположим, что клетка способна метаболизировать определенный сахар. Тогда синтез ферментов, расщепляющих этот сахар, будет бесполезной тратой клеточных ресурсов, если он отсутствует в среде. С другой стороны, если этот сахар имеется в достаточном количестве и является единственным источником углерода, то ферменты, отвечающие за его утилизацию

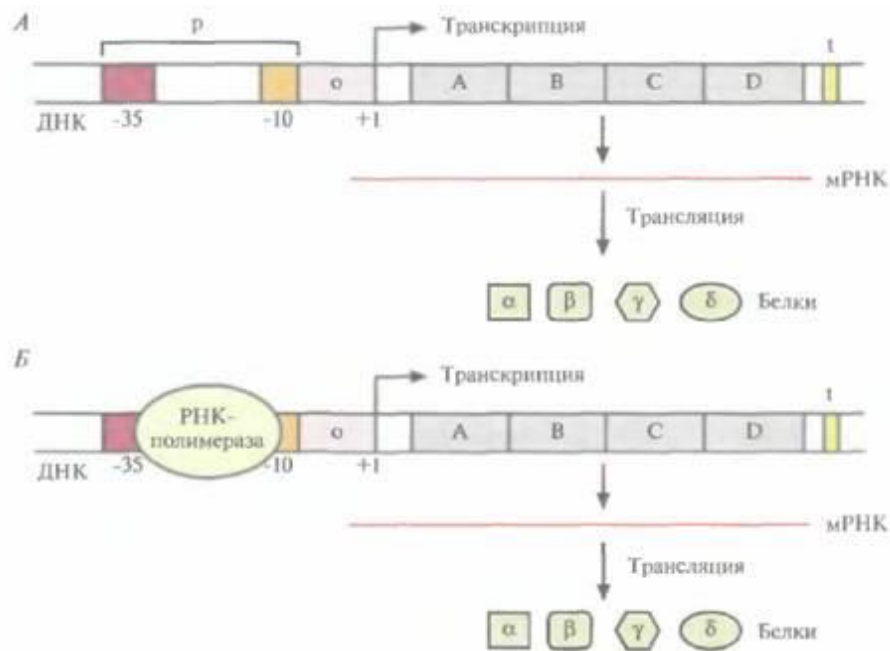


Рис. 3.19. Транскрипция в бактериальной клетке. *А*, Структурные гены (А, В, С и D) оперона находятся под транскрипционным контролем оператора (о) и промотора (р). РНК-полимераза связывается с участками, находящимися на расстоянии 10 (-10) и 35 (-35) пар оснований от сайта инициации транскрипции (+1). t- Стоп-сигнал, ответственный за остановку транскрипции,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  и S - белки, продукты генов А, В, С, D. *Б*. То же, что и на рис. *А*, но показано связывание РНК-полимеразы с промоторной областью.

клеткой, становятся совершенно необходимыми. В этом случае сахар действует как эффектор, препятствуя связыванию репрессора с операторным участком и таким образом обеспечивая транскрипцию оперона и синтез ферментов.

При истощении запасов сахара в среде репрессор связывается с операторным участком, и транскрипция оперона прекращается.

Нормальным состоянием других оперонов может быть состояние, при котором осуществ-

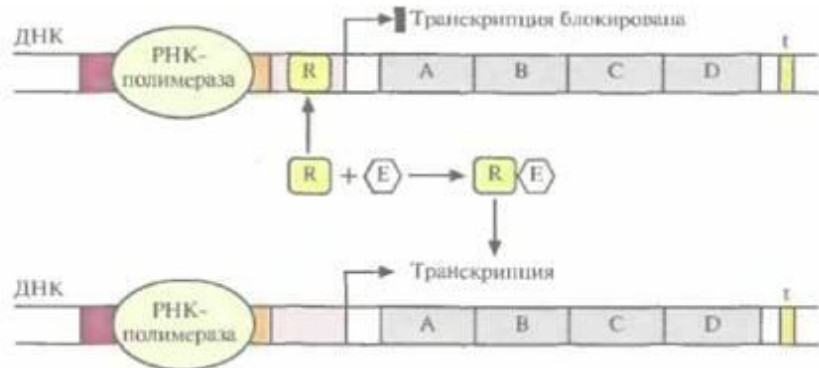


Рис. 3.20. Включение транскрипции бактериального оперона. Репрессор (R) связывается с оператором и блокирует транскрипцию. Связывание эффектора (E) с репрессором изменяет его конформацию, и он не может связаться с оператором. РНК-полимераза беспрепятственно перемещается вдоль молекулы ДНК, осуществляя транскрипцию.

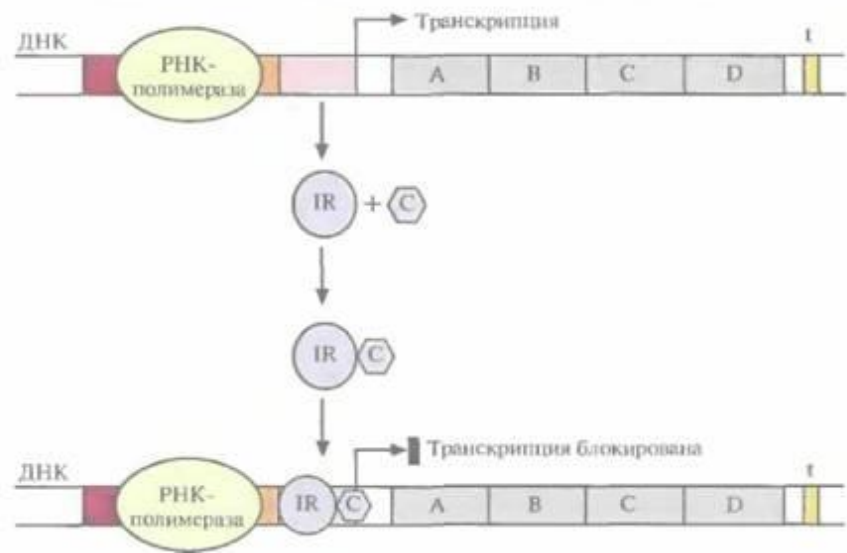


Рис. 3.21. Выключение транскрипции бактериального оперона. Связывание корепрессора (C) с неактивным репрессором (OR) изменяет конформацию последнего. Комплекс корепрессор— репрессор (C—IR) связывается с оператором и блокирует транскрипцию.

ляется их транскрипция, поскольку репрессорный белок неактивен. В этом случае специфический эффектор (корепрессор), связываясь с неактивным репрессором, вызывает в нем такие конформационные изменения, которые обеспечивают связывание комплекса с операторным участком, и транскрипция оперона выключается (рис. 3.21). Сам по себе репрессор не способен связываться с оператором, поэтому при уменьшении концентрации корепрессора транскрипция возобновляется.

Регуляция транскрипции с помощью репрессора называется отрицательной. Если же система регуляции направлена на повышение скорости транскрипции, то она называется положительной. Рассмотрим вкратце этот процесс. Белок-активатор связывается с участком между ТАТА-боксом и сайтом инициации транскрипции. При этом он не



Рис. 3.22. Изменение скорости транскрипции. Активатор (Act) связан с участком между ТАТА-боксом и сайтом инициации транскрипции, скорость транскрипции повышена. Эффектор (E) связывается с активатором и препятствует его соединению с ДНК; скорость транскрипции уменьшается.



Структура дезоксирибонуклеиновой кислоты

J.D. Watson, F.H.C. Crick  
Nature 171; 737-738, 1953

|   |   |  |
|---|---|--|
| Выяснение молекулярной структуры генетического материала -ДНК — без сомнения стало одним из самых замечательных научных достижений XX в. Уотсон и Крик описали свое открытие так: «Мы хотим предложить структуру соли дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). Эта структура обладает весьма необычными свойствами, представляющими большой био-логический интерес... Она образована двумя спиральными цепочками, закрученными вокруг общей оси... Обе спирали правые, но... последовательности атомов в них взаимно противоположны... Весьма интересен способ, с помощью которого цепочки удерживаются вместе... Пуриновые и пиримидиновые основания образуют пары, при этом пуриновое основание одной цели соединяется водородными связями с пиримидиновым основанием другой... Если одно из оснований пары — это аденин, то... вторым основанием должен | быть тимин; то же самое относится к гуанину и цитозину. Последовательность оснований в полинуклеотидной цепи может быть любой... Очень важно, что из предложенного нами механизма специфического спаривания непосредственно вытекает возможность копирования генетического материала». В следующей статье, опубликованной несколькими месяцами позже (Nature 171: 964, 1953), Уотсон и Крик уточняют: «Сахарофосфатный остов в нашей модели абсолютно постоянен, но в эту структуру может вписаться любая последовательность пар нуклеотидов... В длинной молекуле возможно безграничное число перестановок, и нам кажется вполне вероятным, что точная последовательность оснований содержит в закодированном виде генетическую информацию... Наша модель дает объяснение многим феноменам. Например, спонтанная | мутация может возникнуть в результате случайного перехода одного из оснований в редкую таутомерную форму, а образование пар гомологичных хромосом при мейозе может обуславливаться специфическим спариванием оснований». За десять лет, прошедших после обнародования теории двойной спирали ДНК и принципа комплементарности, раскрыты молекулярные механизмы репликации ДНК; установлены процессы, отвечающие за расшифровку генетической информации и регуляцию синтеза генных продуктов; выяснены многие причины, по которым эти продукты синтезируются в измененном виде. Со времени выхода в свет этой публикации и до наших дней открытие Уотсона и Крика нисколько не утратило своего значения. В частности, если бы не была установлена структура ДНК, сейчас не существовало бы технологии рекомбинантных ДНК. |
|---|---|--|

только не блокирует перемещение РНК-полимеразы вдоль молекулы ДНК, а напротив, ускоряет его, действуя как своего рода «смазка». Активаторы специфичны для определенных сайтов активации. Иногда с работающим активатором связывается эффектор, переводящий его в неактивную форму; тогда скорость транскрипции уменьшается (рис. 3.22). В других случаях эффектор, напротив, активирует неработающий активатор. Чтобы понять детали регуляции транскрипции у бактерий, необходимо провести тщательный анализ мутаций, которые влияют на данную регуляторную систему, и исследовать in vitro различные сайты связывания белков и ДНК.

Регуляция транскрипции у эукариот

Некий набор основных структурных генов, обеспечивающих жизнедеятельность клетки, — генов «домашнего хозяйства» — транскрибируется в большинстве активно функционирующих эукариотических клеток. В отличие от этого специфические гены, которые отвечают за уникальность тех или иных тканей или органов, транскрибируются и транслируются только в определенных клетках. Так, гены, кодирующие α- и β-субъединицы гемоглобина взрослого человека, экспрессируются исключительно в клетках — предшественниках эритроцитов. Число разных мРНК, специфичных для разных клеток, варьирует от единиц до десятков. Способность клеток включать (активировать) или выключать (ингибировать) структурные гены крайне важна для поддержания клеточной специфичности и экономного расходования энергетических ресурсов.

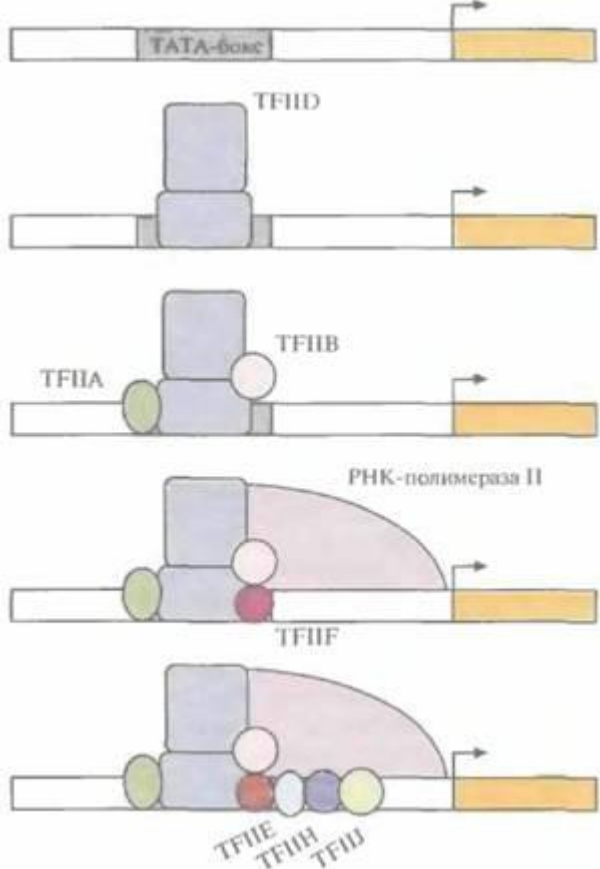
Для включения и выключения транскрипции различных эукариотических структурных генов используется множество разнообразных высоко-



Рис. 3.23. Регуляторные элементы структурных генов эукариот. Знаки «—» при числах означают, что эти элементы находятся в молекуле ДНК слева от сайта инициации транскрипции (+1). Стрелка — направление транскрипции. Положение регуляторных элементов и их размер даны без соблюдения масштаба.

специфичных процессов. Но так или иначе регуляция транскрипции у эукариот осуществляется с помощью специфических белков -- факторов транскрипции. Многие из них связываются непосредственно с нуклеотидной последовательностью длиной менее 10 п.н., называемой по-разному: боксом, модулем, элементом инициации, регуляторным элементом. В отличие от прокариот у эукариот опероны в большинстве своем отсутствуют, т. е. каждый эукариотический структурный ген имеет свой собственный набор регуляторных элементов. Существенную роль в регуляции транскрипции у эукариот, помимо опосредованной взаимодействием между ДНК и белками, играют также белок-белковые взаимодействия.

Несмотря на индивидуальность набора регуляторных элементов у структурных генов эукариот, каждый из них имеет промоторный участок (ТАТА-бокс, или бокс Хогнесса) из восьми нуклеотидов, включающий последовательность ТАТА; последовательность ССААТ (САТ-бокс); участок из повторяющихся динуклеотидов GC (GC-бокс). Эти элементы находятся на расстоянии 25, 75 и 90 п.н. от сайта инициации соответственно (рис. 3.23). Транскрипция структурного гена эукариот начинается со связывания с ТАТА-боксом фактора транскрипции HD (TFIID), который представляет собой комплекс по крайней мере из 14 белков. Затем с TFIID и участками ДНК, примыкающими к ТАТА-бок-су, связываются другие факторы транскрипции, и, наконец, со всем этим транскрипционным комплексом связывается РНК-полимераза II. Затем при участии дополнительных факторов происходит инициация транскрипции в точке + 1 (рис. 3.24). Ясно, что если последовательность ТАТА отсутствует или существенно изменена,



Рис, 3.24. Инициация транскрипции структурного гена эукариот. Сначала фактор транскрипции TFIID связывается с ТАТА-боксом, затем происходит присоединение других факторов транскрипции и РНК-полимеразы II и, наконец, вспомогательных факторов, запускающих транскрипцию. Стрелка направление транскрипции.

то транскрипция структурного гена становится невозможной. Идентифицированы также факторы транскрипции, специфичные для регуляторных элементов ССААТ и GC, но пока неясно, как ДНК-белковые взаимодействия могут влиять в этом случае на эффективность транскрипции, если элементы расположены на расстоянии более 75 п.н. от сайта инициации. Кроме того, на расстоянии сотен и даже тысяч пар оснований от сайта инициации находится так называемая энхансерная последовательность, которая многократно повышает скорость транскрипции структурных генов. По-видимому,

сближение удаленных регуляторных элементов и соответствующего структурного гена происходит при укладке хромосомной ДНК. Кроме того, факторы транскрипции, которые связываются с определенными энхансерами и регуляторными элементами, могут образовывать цепочку, соединяющую удаленные друг от друга сайты.

Некоторые репрессированные (неэкспрессирующиеся) гены активируются каскадом событий, который запускается каким-либо специфическим внеклеточным сигналом, например повышением температуры или синтезом гормона. Гормон, поступив в кровоток, связывается с рецепторами специфических клеток, облегчающими его проникновение в клетку. Оказавшись в клетке, гормон вступает во взаимодействие с одним из клеточных белков и изменяет его конформацию. В таком измененном состоянии белок проникает в ядро и связывается со специфическим регуляторным элементом, который инициирует транскрипцию соответствующего гена.

Существуют также белки, которые, взаимодействуя с регуляторными элементами, блокируют транскрипцию. Например, известен класс генов позвоночных (примерно 18), активно транскрибирующихся только в нервных клетках. Каждый из этих генов имеет регуляторный элемент из 24 п.н., находящийся «левее» (upstream) сайта +1; он обозначается NRSE (от англ. *neuron-restrictive silencer element*). Во всех клетках, кроме нейронов, синтезируется NRSF-фактор (от англ. *neuron-restrictive silencer factor*), который связывается с NRSE и блокирует транскрипцию соответствующих генов. В нейронах NRSF не синтезируется, и упомянутые гены активно транскрибируются.

Итак, регуляция транскрипции у эукариот — это очень сложный процесс. Структурный ген может иметь множество регуляторных элементов, которые активируются специфическими сигналами в клетках разного типа в разное время клеточного цикла. Однако некоторые структурные гены находятся под контролем уникального фактора транскрипции. Специфические белки могут взаимодействовать с определенными регуляторными элементами и блокировать транскрипцию или связываться со всем транскрипционным комплексом еще до инициации транскрипции или во время элонгации.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Молекула ДНК состоит из двух антипараллельных полинуклеотидных цепей, образующих двойную спираль. Их мономерной единицей является нуклеотид, который состоит из азотистого основания, дезоксирибозы и фосфатной группы. Соседние нуклеотиды в цепи связаны фосфодиэфирными связями, а цепи удерживаются вместе с помощью водородных связей, образующихся между комплементарными основаниями. При этом аденин образует водородные связи только с тиминном, гуанин — только с цитозином. Процесс удвоения ДНК называется репликацией. В нем участвует множество различных белков, прежде всего ДНК-полимеразы. Каждая из цепей ДНК служит матрицей для синтеза комплементарной цепи. Комплементарность оснований противоположных цепей гарантирует идентичность новосинтезированной и исходной ДНК.

Ключевую роль в осуществлении всех биологических функций играют белки. Белковая молекула — это полипептид, состоящий из аминокислот, которые соединены друг с другом пептидными связями. Последовательность аминокислот в белке определяется последовательностью нуклеотидов в ДНК. В синтезе белков участвуют молекулы РНК (мРНК, рРНК и тРНК), различные ферменты и белковые факторы. Все РНК синтезируются на ДНК как на матрице; этот процесс называется транскрипцией. Правильность транскрипции, т. е. ее начало и завершение в нужных сайтах, обеспечивают специфические нуклеотидные последовательности в ДНК и белковые факторы. У эукариот большинство структурных генов состоит из кодирующих (экзоны) и не кодирующих (интроны) участков. Первичные транскрипты содержат как те, так и другие. Однако по окончании транскрипции интроны вырезаются, а экзоны сшиваются с образованием функциональной мРНК. В мРНК содержится в закодированном виде информация о последовательности аминокислот в молекуле соответствующего белка.

Синтез белка называется трансляцией. Важную роль в нем играют молекулы тРНК и рРНК. В клетке присутствует более 50 разных тРНК.

Каждая из них строго специфически связывается своим 3'-концом с одной из 20 аминокислот. На 5'-конце тРНК находится последовательность из трех нуклеотидов (антикодон), обеспечивающая связывание тРНК с комплементарным участком из трех нуклеотидов в молекуле мРНК. Существуют две основные разновидности рРНК: малая и большая. Они объединяются соответственно с малой и большой субъединицами рибосомы — особой структуры, в которой и протекает синтез белка. У прокариот молекулы рРНК имеют меньший размер, чем у эукариот.

У прокариот трансляция начинается со связывания мРНК с малой рибосомной субъединицей. Затем происходит комплементарное спаривание первого кодона мРНК с антикодоном инициаторной тРНК (fMet-тРНК), к образовавшемуся комплексу присоединяется большая рибосомная субъединица, и образуется комплекс инициации (инициаторный комплекс), готовый к синтезу полипептидной цепи.

У эукариот трансляция начинается с присоединения инициаторной тРНК, которая несет остаток метионина (Met-тРНК<sup>Met</sup>), к малой рибосомной субъединице; с этой же субъединицей связывается своим 5'-концом мРНК. Малая субъединица перемещается вдоль мРНК до тех пор, пока не дойдет до первого AUG-кодона. Этот кодон образует комплементарную пару с антикодоном УАС инициаторной тРНК. Далее к этому комплексу присоединяется большая субъединица, и образуется рибосома, готовая к синтезу белка.

Элонгация и терминация трансляции у про-и эукариот во многом сходны. После образования инициаторного комплекса следующий кодон мРНК спаривается с антикодоном тРНК, несущей соответствующую аминокислоту (обозначим ее АК2). Первая аминокислота в полипептидной цепи, метионин, отщепляется от тРНК и соединяется с АК2 с помощью пептидной связи. Свободная тРНК<sup>Met</sup> покидает рибосому. Рибосомный комплекс перемещается вдоль молекулы мРНК, и пептидил-тРНК, т. е. комплекс Met-АК2-тРНК<sup>АК2</sup>, занимает место, освобожденное отделившейся тРНК. Следующий кодон мРНК спаривается с соответствующим антикодоном тРНК, несущим аминокислоту АК3. АК2 отщепляется от своей тРНК и соединяется с АК3 с помощью пептидной связи, образуя комплекс Met-АК2-АК3-тРНК<sup>АК3</sup>. Освободившаяся от аминокислоты тРНК покидает рибосому. Рибосомный комплекс опять перемещается вдоль молекулы мРНК, и Met-АК2-АК3-тРНК<sup>АК3</sup> занимает вакантное место, занимаемое прежде предыдущей пептидил-тРНК. Эти события повторяются до тех пор, пока рибосома не дойдет до стоп-кодона. Антикодона, который был бы комплементарен стоп-кодону, нет ни у одной из тРНК. Однако стоп-кодон распознается неким белковым фактором освобождения; после присоединения этого фактора к рибосоме связь между последней тРНК и синтезированным полипептидом гидролизует, тРНК, мРНК и полипептид высвобождаются, а рибосома диссоциирует на субъединицы.

Синтез мРНК и соответственно синтез белка должны строго регулироваться, поскольку у клетки недостаточно ресурсов для одновременной транскрипции и трансляции всех структурных генов. И про-, и эукариоты постоянно синтезируют только те мРНК, которые необходимы для выполнения основных клеточных функций. Экспрессия остальных структурных генов осуществляется под строгим контролем регуляторных систем, запускающих транскрипцию только в том случае, когда возникает потребность в определенном белке (белках). У прокариот транскрипция иницируется связыванием РНК-полимеразы с последовательностями ТАТА и TTGAC промоторной области структурного гена или оперона. Включение или выключение некоторых оперонов осуществляется при участии эффектора, который изменяет конформацию белка-репрессора и препятствует блокированию транскрипции. При уменьшении концентрации эффектора в клетке репрессор связывается с участком ДНК, примыкающим к сайту инициации транскрипции, и препятствует перемещению РНК-полимеразы вдоль молекулы ДНК, блокируя таким образом транскрипцию. В других оперонах с участком ДНК, соседствующим с сайтом инициации транскрипции, связывается белок-активатор, который увеличивает скорость транскрипции. Связывание эффектора с активатором может снижать скорость транскрипции, ДНК-белковые взаимодействия, ответственные за регуляцию транскрипции,

строго специфичны в отношении определенных структурных генов или оперонов. У эукариот РНК-полимераза II, которая транскрибирует структурные гены, связывается с целым набором белков — факторов транскрипции, которые последовательно присоединяются к ТАТА-последовательности промоторной области. За включение и выключение транскрипции отвечают дополнительные факторы транскрипции, которые связываются с соответствующими участками ДНК.

## ЛИТЕРАТУРА

- Buratowski S.** 1994. The basics of basal transcription by RNA polymerase II. *Cell* 77: 1-3.
- Kozak M.** 1991. Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J. Biol. Chem.* **266**:19867-19870.
- Lodish H., D. Baltimore, A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matsudaira, J. Darnell.** 1995. *Molecular Cell Biology*. 3rd ed. Scientific American Books, Inc., New York, N.Y.
- Nakamura Y., K. Ito, L.A. Isaksson.** 1996. Emerging understanding of translation termination. *Cell* 87: 147-150.
- Schoenherr C.J., D.J. Anderson.** 1995. The neuron-restrictive silencer factor (NRSF): a coordinate repressor of multiple neuron-specific genes. *Science* 267: 1360-1363.
- Tate W.P., C.M. Brown.** 1992. Translational termination: "stop" for protein synthesis or "pause" for regulation of gene expression. *Biochemistry* **31**: 2443-2450.
- Tjian R., T. Maniatis.** 1994. Transcriptional activation: a complex puzzle with few easy pieces. *Cell* 77: 5-8.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Опишите в общих чертах процесс репликации ДНК.
2. Чем различаются ДНК и РНК?
3. Опишите сходство и различие структурных генов про- и эукариот.
4. Опишите процесс элонгации полипептидной цепи.
5. Какова наиболее вероятная нуклеотидная последовательность, кодирующая следующую аминокислотную последовательность: MAGGTWYQLFPRKMWNDSLHPFILPMNVAG.
6. Какой аминокислотной последовательности отвечает следующая нуклеотидная последовательность: GCGAUCGACGAUGUUUCUAAAAGUAU CUCAUCGAAAUG AGGGUUCG UAAUAGCGACCCGGGCGG.
7. Что такое ТАТА-бокс?
8. Что такое оперон? В чем заключается его биологическая роль?
9. Расскажите о трех разных способах регуляции транскрипции у прокариот.
10. Опишите основные элементы ДНК, ответственные за транскрипцию эукариотических структурных генов.

## ГЛАВА 4.

# Технология рекомбинантных ДНК

Технология рекомбинантных ДНК (ее называют также молекулярным клонированием или генной инженерией) — это совокупность экспериментальных процедур, позволяющая осуществлять перенос генетического материала (дезоксирибонуклеиновой кислоты, ДНК) из одного организма в другой. Никакого единого, универсального набора методик здесь не существует, но чаще всего эксперименты с рекомбинантной ДНК проводят по следующей схеме (рис. 4.1).

\* Из организма — донора нужных генов — экстрагируют нативную ДНК (клонлируемая ДНК, встраиваемая ДНК, ДНК-мишень, чужеродная ДНК), подвергают ее ферментативному гидролизу (расщепляют, разрезают) и соединяют (лигируют, сшивают) с другой ДНК (вектор для клонирования, клонирующий вектор) с образованием новой, рекомбинантной молекулы (конструкция «клонлирующий вектор—встроенная ДНК»).

\* Эту конструкцию вводят в клетку-хозяина (реципиент), где она реплицируется и передается потомкам. Этот процесс называется трансформацией.

- Идентифицируют и отбирают клетки, несущие рекомбинантную ДНК (трансформированные клетки).

- Получают специфический белковый продукт, синтезированный клетками-хозяевами, что служит подтверждением клонирования искомого гена.

Предпосылками к созданию технологии рекомбинантных ДНК послужили многие открытия в области молекулярной биологии, энзимологии нуклеиновых кислот и молекулярной генетики бактериальных вирусов и внехромосомных элементов бактерий (плазмид). Конструирование рекомбинантных молекул осуществляется с помощью целого арсенала ферментов — обязательного и незаменимого инструмента практически всех этапов этого сложнейшего процесса. Речь идет прежде всего о ферментах рестрикции (рестрицирующих эндонуклеазах, рестриктазах), которые узнают и расщепляют специфические нуклеотидные последовательности в двухцепочечной молекуле ДНК.

### Рестрицирующие эндонуклеазы

При молекулярном клонировании важно, чтобы расщепление донорной и векторной ДНК происходило в строго определенных участках (сайтах) с образованием дискретного и воспроизводимого набора фрагментов. Если пропустить хромосомную ДНК через шприц с иглой малого диаметра или обработать ее ультразвуком, то мы получим фрагменты длиной от 0,3 до 5 т.п.н. К сожалению, в ходе этих простых операций разрывы двухцепочечных молекул происходят случайным образом, так что при каждой обработке препарата ДНК получается совершенно новый набор фрагментов. Молекулярное клонирование стало возможным только после выделения высокоспецифичных бактериальных ферментов, которые узнают определенные последовательности оснований в двухцепочечной молекуле ДНК и расщепляют обе цепи. Эти ферменты называются рестрицирующими эндонуклеазами типа II.

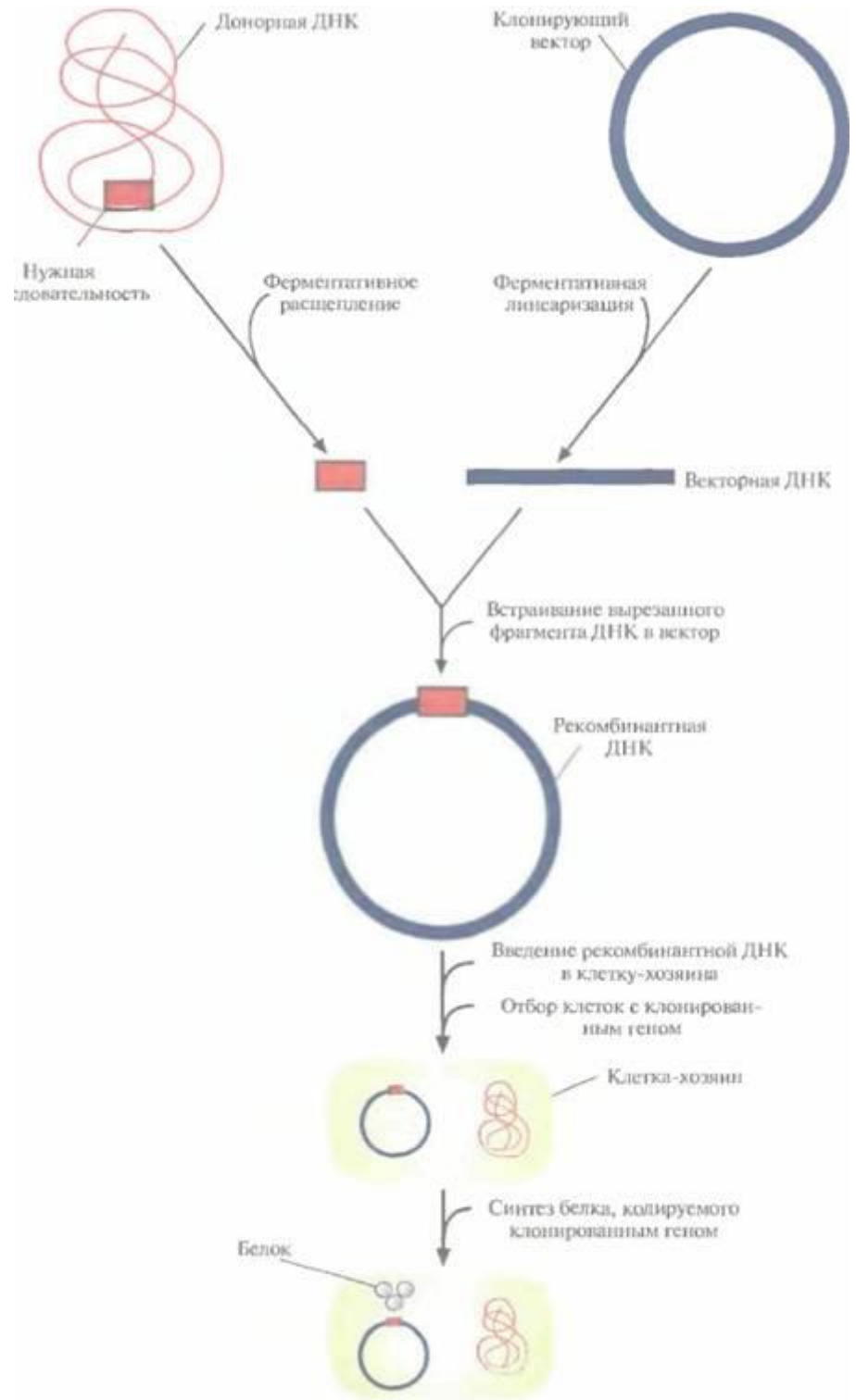
Одна из первых рестрицирующих эндонуклеаз типа II была выделена из бактерии *Escherichia coli*



Нужная последовательность

Рис. 4.1.

Клонирование рекомбинантной ДНК. Донорную ДНК расщепляют рестрицирующей эндонуклеазой и встраивают в клонирующий вектор. Полученную конструкцию вводят в популяцию клеток-хозяев, идентифицируют те клетки, которые содержат рекомбинантную ДНК, и культивируют их. При необходимости можно индуцировать экспрессию клонированного гена в клетках-хозяевах и получить кодируемый белок



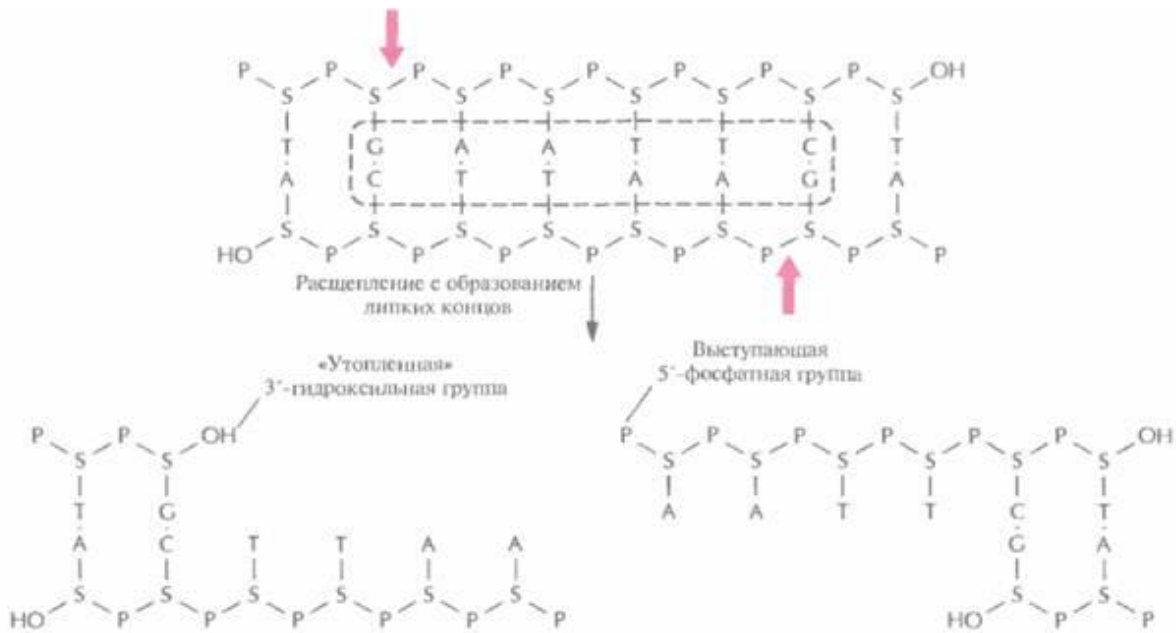


Рис. 4.2. Расщепление короткого фрагмента ДНК рестрицирующей эндонуклеазой типа II *EcoRI* с образованием липких концов. Стрелки — связи, по которым происходит расщепление в сахарофосфатном остове. S — дезоксирибоза, P — фосфатная группа, OH — гидроксильная группа. Последовательность, распознаваемая *EcoRI*, выделена штриховой линией.

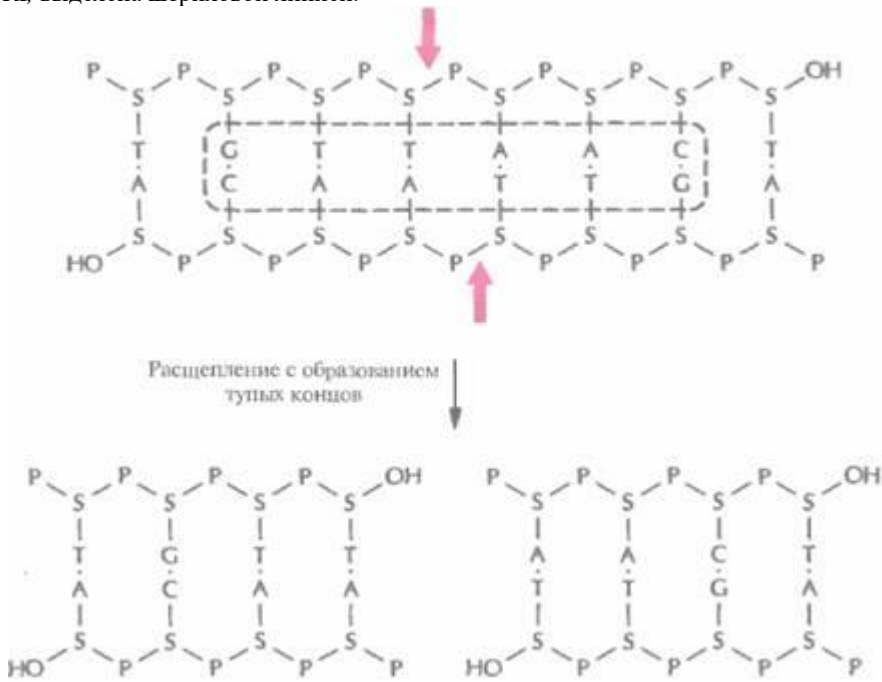


Рис. 4.3. Расщепление короткого фрагмента ДНК рестриктазой типа II *HindIII* с образованием тупых концов. Стрелки — связи, по которым происходит расщепление в сахарофосфатном остове. Буквенные обозначения - те же, что и на рис. 4.2. Последовательность, распознаваемая рестриктазой *HindIII*, выделена штриховой линией.



и получила название *EcoRI*. Этот фермент узнает участок ДНК, содержащий специфическую палиндромную последовательность (последовательность-перевертыш, идентичную в обеих цепях при прочтении в направлении 5'-->3') из шести пар оснований и вносит разрыв между остатками гуанина и аденина в каждой цепи (рис. 4.2), расщепляя связь между атомом кислорода при 3'-атоме углерода сахарного остатка одного нуклеотида и фосфатной группой, присоединенной к 5'-углеродному атому сахарного остатка соседнего нуклеотида. Разрывы в цепи ДНК располагаются наискось друг от друга, в результате чего образуются одноцепочечные комплементарные концы с «хвостами» из четырех нуклеотидов в каждом (липкие концы). Каждый одноцепочечный «хвост» заканчивается 5'-фосфатной группой, а 3'-гидроксильная группа противоположной цепи как бы утоплена.

Помимо *EcoRI*, из бактериальных клеток были получены сотни рестрицирующих эндонуклеаз типа II. Названия этим эндонуклеазам даются по такому же принципу, как и *EcoRI*: род микроорганизма обозначается прописной буквой, а вид — двумя строчными; штамм обычно не указывается. Римские цифры — порядковый номер данной эндонуклеазы в ряду прочих рестриктаз, выделенных из данного микроорганизма. Например, *HpaI* и *HpaII* — это соответственно первая и вторая рестрицирующие эндонуклеазы типа II, выделенные из *Haemophilus parainfluenzae*.

Палиндромные последовательности, которые распознаются рестрицирующими эндонуклеазами типа II и в которых происходит расщепление молекулы ДНК, называются сайтами узнавания. Помимо рестриктаз, гидролизующих (расщепляющих) полинуклеотидную цепь с образованием липких концов, существуют рестриктазы, которые вносят разрывы в цепи строго друг против друга с образованием фрагментов ДНК с «тупыми» концами (рис. 4.3). Сайты узнавания могут состоять из четырех, пяти, шести, восьми или более пар нуклеотидов (табл. 4.1). От длины сайта узнавания зависит частота его распространения в молекуле ДНК; в большинстве случаев используют рестриктазы, узнающие тетра- и гексануклеотиды.

Рестрицирующие эндонуклеазы типа II играют ключевую роль при генном клонировании.

Таблица 4.1. Нуклеотидные последовательности, распознаваемые некоторыми ферментами рестрикции

| Фермент      | Сайт узнавания                                       | Характер образуемых концов                   |
|--------------|--|--|
| <i>EcoR</i>  | G <sup>1</sup> A-A-T-T-C<br>C-T-T-A-A <sub>1</sub> G | Выступающие концы с 5'-фосфатной группой     |
| <i>BamI</i>  | G <sup>1</sup> G-A-T-C-C<br>C-C-T-A-G <sub>1</sub> G | Выступающие концы с 5'-фосфатной группой     |
| <i>PstI</i>  | C-T-G-C-A <sup>1</sup> G<br>G <sub>1</sub> A-C-G-T-C | Выступающие концы с 3'-гидроксильной группой |
| <i>Sau3</i>  | <sup>1</sup> G-A-T-C<br>C-T-A-G <sub>1</sub>         | Выступающие концы с 5'-фосфатной группой     |
| <i>PvuII</i> | C-A-G <sup>1</sup> C-T-G<br>G-T-C <sub>1</sub> G-A-C | Тупые концы                                  |
| <i>HpaI</i>  | G-T-T <sup>1</sup> A-A-C<br>C-A-A <sub>1</sub> T-T-G | Тупые концы                                  |
| <i>HaeI</i>  | G-G <sup>1</sup> C-C<br>C-C <sub>1</sub> G-G         | Тупые концы                                  |
| <i>NotI</i>  | G <sup>1</sup> C-G-G-C-C-G<br>C-G-C-C-G-G-C          | Выступающие концы с 5'-фосфатной группой     |

Обработка образца ДНК определенной рестриктазой всегда дает один и тот же набор фрагментов — при условии, что расщепление происходит по всем сайтам узнавания. Если использовать несколько ферментов рестрикции и сначала обработать ДНК каждой из рестриктаз в отдельности, а затем их комбинациями, можно построить физическую карту данной ДНК, т. е. установить порядок следования сайтов рестрикции вдоль молекулы. Определив размер полученных фрагментов с помощью гель-электрофореза, можно найти положение рестрикционных сайтов (дополнение 4.1). На рис. 4.4,А указаны размеры фрагментов, полученных в результате расщепления ДНК разными рестриктазами и их смесью. Из этих данных следует, что данный участок ДНК имеет по два сайта для *BamHI* и *EcoRI*.

Чтобы построить рестрикционную карту, следует сравнить размеры фрагментов, полученных при раздельной рестрикции и при рестрикции смесью ферментов. Результат такого сравнения представлен на рис. 4.4,Б. Если при гидролизе ДНК каждой из двух рестриктаз (*EcoRI* и *BamHI*) образуются три фрагмента, значит, в исходном фрагменте ДНК было два сайта узнавания для каждой из использованных рестриктаз. Фрагмент размером 300 п. н., который образуется в результате гидролиза *EcoRI*, не расщепляется

при гидролизе смесью *EcoRI* и *BamHI* в отличие от *EcoRI*-фрагментов размером 850 и 500 п. н. Значит, два *EcoRI*-сайта находятся на расстоянии 300 п. н. друг от друга и между ними нет *BamHI*-сайта, а в *EcoRI*-фрагментах длиной 850 и 500 п.н. есть по одному *BamHI*-сайту. Фрагмент размером 950 п. н., который образуется при обработке ДНК рестриктазой *BamHI*, при двойном гидролизе расщепляется *EcoRI* на три фрагмента (250+300+400 - 950 п.н.). Значит, два *BamHI*-сайта находятся на расстоянии 250 и 400 п. н. по разные стороны от сайтов для *EcoRI*. *BamHI* расщепляет *EcoRI*-фрагмент длиной 850 п. н. на фрагменты длиной 250 и 600 п, н., а один из сайтов для *EcoRI* находится на расстоянии 250 п. н. от сайта для *BamHI*, значит, фрагмент 600 п. н.

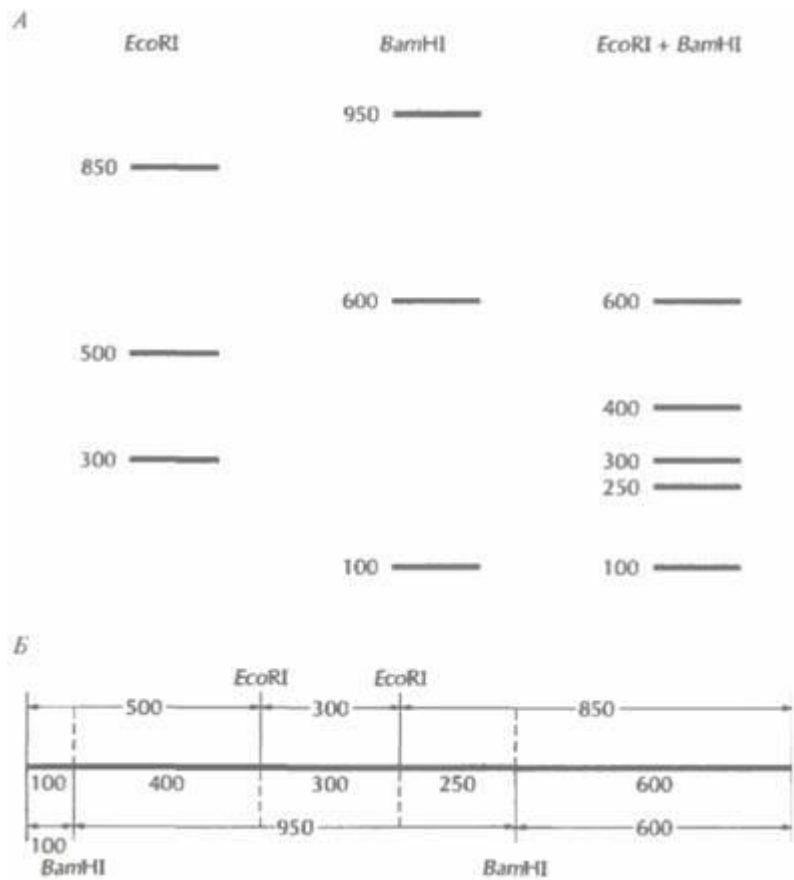
**ДОПОЛНЕНИЕ 4.1**

**Гель-электрофорез**

Для разделения белков и нуклеиновых кислот широко применяется метод гель-электрофореза. Его принцип заключается в следующем. Исследуемый препарат (раствор белка, ДНК или РНК) вносят в лунку, расположенную у края геля - полужидкой среды с сетчатой пространственной структурой (обычно для электрофореза используют тонкие пластины геля). Находящиеся в буферном растворе макромолекулы обладают некоторым суммарным электрическим зарядом, и когда через гель пропускают электрический ток, они перемещаются в электрическом поле. Молекулы одинакового размера (и одинакового заряда) движутся единым фронтом, образуя в геле дискретные невидимые полосы. Чем меньше размер молекул, тем быстрее они движутся. Постепенно исходный препарат, состоящий из разных макромолекул, разделяется на зоны, распределенные по длине пластинки. За ходом электрофореза следят по перемещению в геле красителя - заряженного низкомолекулярного вещества, которое вносят в каждую лунку перед началом электрофореза. Когда краситель достигает конца пластины, электрофорез останавливают, а гель окрашивают красителем, прочно связывающимся с белками или нуклеиновыми кислотами. Если образец представляет собой дискретный набор макромолекул разного размера, то после электрофореза получается набор четких полос, рас-

положенных одна под да и бисакриламида, другой. Если же распределение использующегося в качестве молекул по размеру более или сшивки линейных полимеров менее непрерывно, то акриламида. Размер ячеек в получается смазанная картина. полиакриламидной «сетке» По интенсивности окраски зависит от концентрации полос можно судить о акриламида и соотношения концентрации макромолекул в между количеством акриламида и образце. Чтобы определить бисакриламида. Белок перед относительную электрофорезом часто молекулярную массу обрабатывают анионным разделенных фрагментов, детергентом додецилсульфатом одновременно проводят натрия (ДСН), что позволяет электрофорез маркерных проводить фракционирование в макромолекул с известными зависимости только от одного молекулярными массами. параметра — молекулярной Набор маркеров должен массы, а зависимость от охватывать весь диапазон конформации, плотности молекулярных масс в данной упаковки полипептидной цепи и системе. Образец маркерных др. исключается. Электрофорез в молекул вносят в отдельную ПААГ-ДСН позволяет разделять лунку, расположенную вблизи белки с мол. массой от 20 до 200 одного из краев пластинки (или кДа. Для в две лунки у двух разных электрофоретического краев). Логарифм разделения нуклеиновых кислот относительной молекулярной среднего размера обычно массы маркера линейно связан с применяют агарозные гели. его электрофоретической Агароза -это особо чистая подвижностью  $R_f$  — величиной, фракция, получаемая из агара равной отношению расстояний, или непосредственно из пройденных маркерной агарообразующих морских молекулой и красителем водорослей. В 1,0% агарозном (фронтом растворителя). геле можно разделять молекулы Построив график зависимости ДНК размером от 600 до 20 000 логарифма относительных п. н. Для фракционирования молекулярных масс маркеров от более крупных молекул ДНК  $R_f$ , можно найти относительную (миллионы пар оснований), молекулярную массу каждого денатурированной ДНК и РНК компонента образца. приходится использовать Относительная мол. масса специальные системы белков измеряется в дальтонах, электрофореза. Иногда для двухцепочечных нуклеиновых решения специальных задач для кислот - в числе пар разделения ДНК применяют поли нуклеотидов, одноцепочечных акриламидные гели. Так, в 20% — в числе нуклеотидов. Для полиакриламидном геле можно разделения белков обычно разделить фрагменты ДНК, используют полиакриламидный состоящие всего из шести оснований и различающиеся сополимеризации акрилами- лишь одним нуклеотидом.

Рис. 4.4. Картирование сайтов рестрикции. А. Результаты гель-электрофореза фрагментов ДНК, полученных ее расщеплением указанными ферментами. Очищенную ДНК гидролизовали рестриктазами *EcoRI* и *BamHI* отдельно, а затем их смесью, проводили гель-электрофорез и визуализировали продукты окрашиванием бромистым этидием. Числа слева от горизонтальных полос -длина фрагментов в парах оснований. Б. Рестрикционная карта, построенная по электрофоретическим данным. Числа — расстояние между сайтами узнавания соответствующих ферментов.



должен содержать один из концов исходной молекулы ДНК. Далее, мы видим, что *BamHI* расщепляет *EcoRI*-фрагмент длиной 500 п. н. на два фрагмента размером 100 и 400 п. н. и что один из *EcoRI*-сайтов отделен от *BamHI*-сайта 400 п. н.; значит, фрагмент длиной 100 п. н. должен содержать другой конец исходной молекулы. Карта на рис. 4.4,Б иллюстрирует четкое соответствие между положением сайтов рестрикции и размерами фрагментов, получающихся при каждом гидролизе.

Расщепление рестрицирующими эндонуклеазами имеет еще одно применение. Когда два разных образца ДНК обрабатывают одной и той же рестриктазой с образованием фрагментов с липкими концами, а затем смешивают эти образцы, то благодаря комплементарному спариванию липких концов фрагментов разных образцов могут образовываться новые комбинации генов -рекомбинантные ДНК (рис. 4.5).

Для осуществления молекулярного клонирования недостаточно одних только ферментов рестрикции. Во-первых, водородные связи между теми четырьмя основаниями, которые образуют липкие концы, недостаточно прочны, чтобы удержать два объединившихся фрагмента ДНК. Необходим какой-то инструмент для устранения разрыва в сахарофосфатном остове молекулы, т. е. для восстановления связи между 3'-гидроксильной концевой группой одной цепи и 5'-фосфатной группой другой. Таким инструментом является ДНК-лигаза бактериофага Т4. Этот фермент катализирует образование фосфодиэфирных связей между концами полинуклеотидных цепей, которые уже удерживаются вместе благодаря спариванию липких концов. Кроме того, ДНК-лигаза Т4 «сшивает» тупые концы, которые сближаются друг с другом после того, как объединяемые фрагменты связываются с ферментом (рис. 4,6). Во-вторых, объеди-

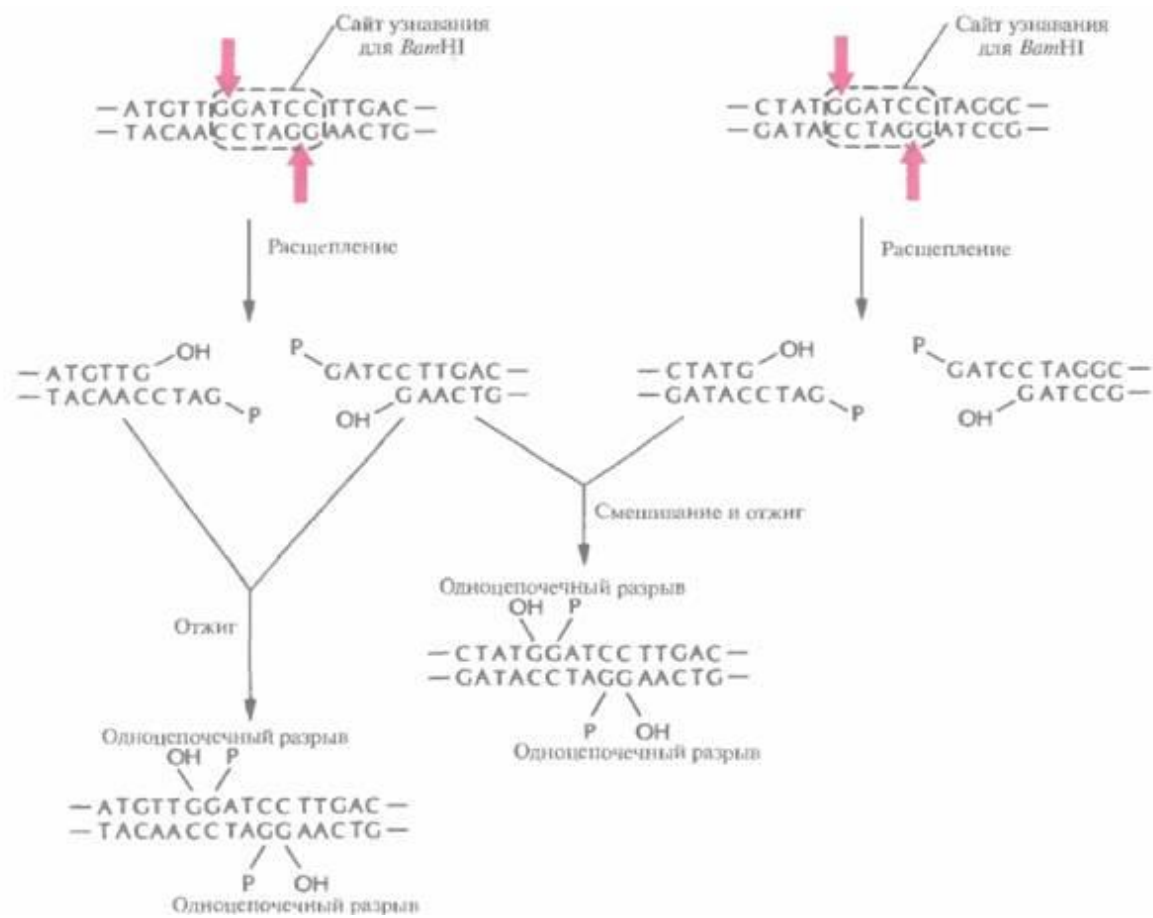


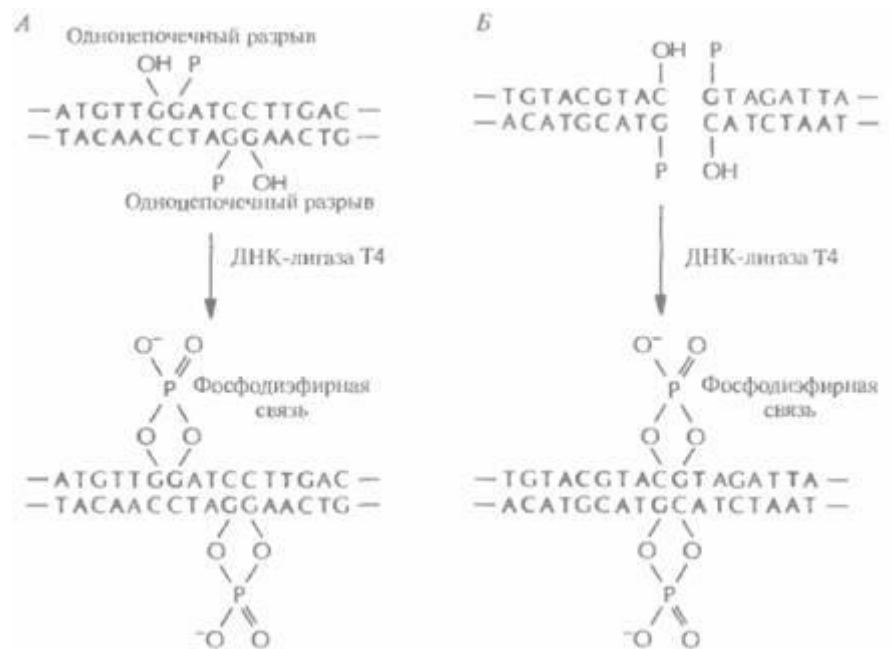
Рис. 4.5, Отжиг комплементарных липких концов фрагментов, образующихся при расщеплении двух разных образцов ДНК рестрицирующей эндонуклеазой *Bam*HI. Четыре фрагмента, представленных на рисунке, могут соединиться друг с другом с образованием шести разных молекул ДНК (на рисунке показаны не все возможные комбинации). Фрагменты удерживаются вместе водородными связями, образующимися между четырьмя основаниями липких концов, но эти связи недостаточно прочны, чтобы молекулы в растворе оставались стабильными длительное время.

нение разных молекул ДНК само по себе бесполезно, если вновь образованные комбинации (рекомбинантные ДНК) не будут реплицироваться в клетке-хозяине. Таким образом, если одна часть рекомбинантной молекулы ДНК несет нужный ген, который предполагается клонировать, то другая должна содержать информацию, необходимую для репликации в клетке рекомбинантной ДНК. Чтобы решить эту проблему, используют клонирующие векторы. В-третьих, при рестрикции ДНК образуется смесь разнообразных фрагментов, и после их лигирования с векторной ДНК образуется множество различных комбинаций. Необходимо уметь распознавать те реципиентные клетки, которые содержат ДНК с нужной нуклеотидной последовательностью. Для этого используют различные системы скрининга.

**Плазмидные векторы**

Плазмиды -- это внехромосомные автономно реплицирующиеся двухцепочечные кольцевые молекулы ДНК. Плазмиды есть практически у

Рис. 4.6. ДНК-лигаза Т4 образует фосфодиэфирные связи между 5'-фосфатными и 3'-гидроксильными группами в месте разрыва в остоле двухцепочечной ДНК. А. Лигирование липких концов, Б. Нитрование тупых концов.



всех бактерий. Одни из них содержат информацию, обеспечивающую их собственный перенос из одной клетки в другую (F-плазмиды), другие несут гены устойчивости к антибиотикам (R-плазмиды) или специфические наборы генов, ответственных за утилизацию необычных метаболитов (плазмиды деградации). Есть плазмиды, в которых не обнаружены гены, выполняющие какие-то определенные функции (критические плазмиды; от англ. *cryptic* — скрытый, латентный). Размеры плазмид варьируют от менее 1 до более 500 т.п.н. Каждая из них содержит сайт начала репликации (*ori*), без которого репликация плазмиды в клетке-хозяине была бы невозможна.

Некоторые плазмиды представлены в клетке 10—100 копиями; они называются высококопийными. Низкокопийные плазмиды присутствуют в клетке в числе 1—4 копий. На долю плазмидной ДНК обычно приходится 0,1—5,0% суммарной клеточной ДНК. Если две или более плазмиды не могут сосуществовать в одной и той же клетке, то говорят, что они принадлежат к одной группе несовместимости. Плазмиды, относящиеся к разным группам несовместимости, беспрепятственно существуют в одной клетке, независимо от числа копий. У некоторых микроорганизмов в одной клетке было обнаружено до 8—10 разных плазмид, при этом каждая из них выполняла свои функции, была представлена характерным для нее числом копий и относилась к своей собственной группе несовместимости. Одни плазмиды несут специфичный сайт инициации репликации и могут реплицироваться только в клетках одного вида. У других плазмид этот сайт менее специфичен, и они реплицируются в самых разных бактериальных клетках. Соответственно различают плазмиды с узким и с широким спектром хозяев.

Как автономно реплицирующиеся генетические элементы плазмиды обладают всеми основными свойствами, которые позволяют использовать их в качестве вектора для переноса клонируемой ДНК. Но довольно часто природные (немодифицированные, несеконструированные) плазмиды бывают лишены некоторых обязательных для «высококачественного» вектора свойств. К таким важным свойствам относятся: 1) небольшой размер, поскольку эффективность переноса экзогенной ДНК в *E. coli* значительно снижается при длине плазмиды более 15 т. п. н.; 2) наличие уникального сайта рестрикции, в который может быть осуществлена вставка; 3) наличие одного или более селективных генетиче-



ских маркеров для идентификации реципиентных клеток, несущих рекомбинантную ДНК. Поэтому плазмидные векторы приходится создавать с помощью генной инженерии.

### Плазмидный вектор pBR322

В 80-е годы плазмидный вектор pBR322 был одним из самых популярных универсальных векторов. Обычно обозначение плазмидного вектора включает строчную букву p (от англ. *plasmid*) и еще несколько букв, имеющих отношение к описанию вектора или к истории его создания. Так, буквы BR в обозначении плазмиды pBR322 указывают на авторство Ф. Боливара и Р. Родригеса, сконструировавших эту плазмиду, а число 322 — цифровое обозначение, взятое из их исследовательских протоколов. Длина плазмиды pBR322 — 4361 п. н. Она несет два гена устойчивости к антибиотикам (рис. 4.7), ампициллину ( $Amp^r$ ) и тетрациклину ( $Tet^r$ ), а также уникальные сайты для *Bam*HI, *Hind*III и *Sal*I в гене  $Tet^r$ , один *Pst*I-сайт в гене  $Amp^r$ , один сайт для *Eco*RI, находящийся за пределами кодирующих последовательностей, и сигнал начала репликации, обеспечивающий репликацию исключительно в *E. coli*. Плазмида реплицируется с образованием большого числа копий, в другие бактериальные клетки переносится с трудом.

Как работает клонирующий вектор pBR322? Если очищенную кольцевую плазмиду pBR322



Рис. 4.7. Генетическая карта плазмидного вектора pBR322. Гены устойчивости к тетрациклину ( $Tet^r$ ) и ампициллину ( $Amp^r$ ) содержат уникальные сайты узнавания для *Hind*III, *Sal*I, *Bam*HI и *Pst*I. *Eco*RI-сайт расположен вне этих генов. Длина вектора — 4361 п. н.

обработать рестриктазой, расщепляющей ее в единственном сайте, расположенном в одном из генов устойчивости к тому или другому антибиотику, то образуется линейная молекула с липкими концами. Такие молекулы смешивают с донорной ДНК, содержащей нужный ген и предварительно обработанной такой же рестриктазой. Поскольку липкие концы этих двух ДНК взаимно комплементарны, они спариваются с образованием гибридных молекул. Далее смесь обрабатывают ДНК-лигазой фага Т4 в присутствии АТР, в результате чего образуется множество разных комбинаций фрагментов, а также нежелательные продукты, в частности объединившиеся между собой фрагменты до-норной ДНК и исходные плазмидные ДНК. Чтобы уменьшить количество последних, обрабатывают рестрицированную плазмидную ДНК щелочной фосфатазой, отщепляющей от линеаризованной молекулы 5'-фосфатные группы: ДНК-лигаза не может сшить концы дефосфорилированной линейной плазмидной ДНК (рис. 4.8). Что касается собственно рекомбинантных молекул ДНК, то хотя в них и имеются два одноцепочечных разрыва, ее фрагменты удерживаются вместе двумя фосфодиэфирными связями, образовавшимися с помощью ДНК-лигазы между дефосфорилированной плазмидной ДНК и рестрицированной донорной ДНК (рис. 4.8). После репликации в трансформированной клетке одноцепочечные разрывы устраняются системой лигирования клетки-хозяина.

### Трансформация и отбор

Теперь необходимо ввести рекомбинантную ДНК в клетку-хозяина. Этот процесс называется трансформацией. Для его осуществления используют специально разработанные приемы, например подвергают клетки высокотемпературному воздействию и обрабатывают их хлористым кальцием ( $CaCl_2$ ). Однако эффективность трансформации все же остается невысокой, обычно трансформируется не более одной клетки из тысячи. Таким образом, большинство клеток после проведения трансформации не содержат рекомбинантной ДНК. В некоторых из них появляется воссоединившаяся кольцевая плазмидная ДНК, избежавшая дефосфорилирования щелочной фосфатазой, в других — неплаз-

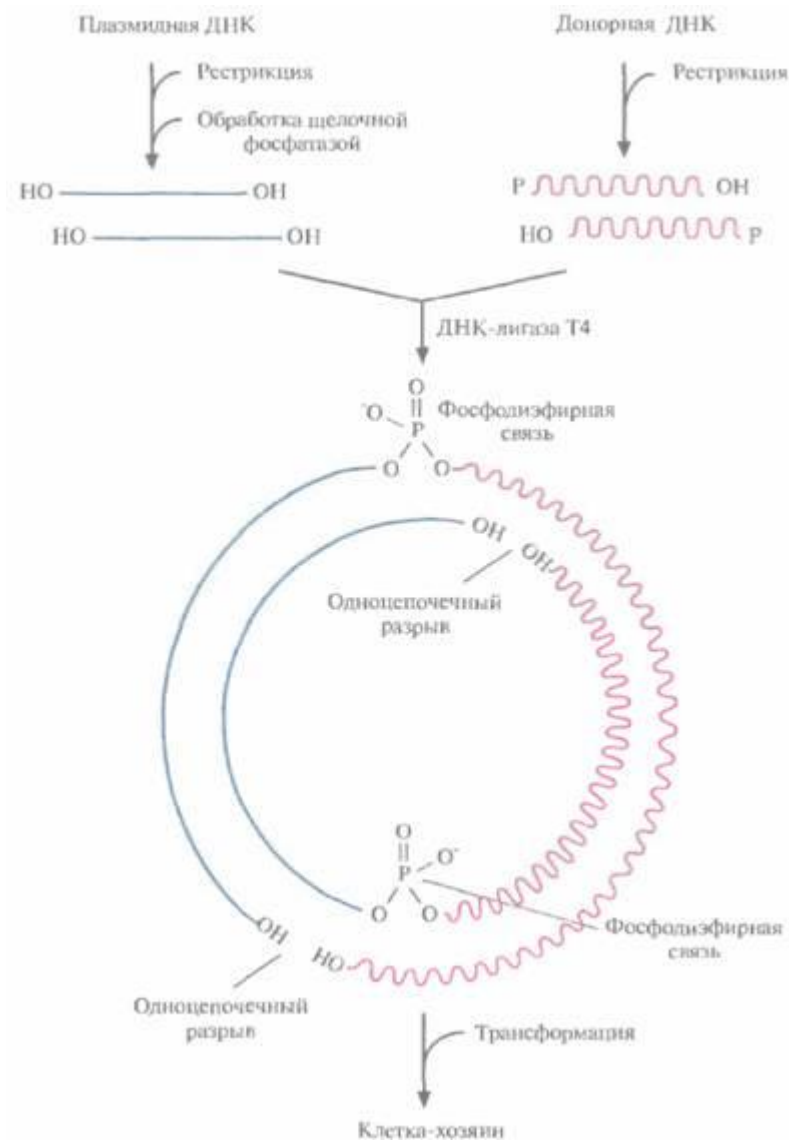


Рис. 4.8. Встраивание чужеродной ДНК в плазмидный вектор. Плазмидную ДНК, обработанную рестриктазой и щелочной фосфатазой, смешивают с рестрицированной донорной ДНК, содержащей нужный ген, и добавляют ДНК-лигазу. Два из четырех одно цепочечных разрыва при этом устраняются, и конструкция оказывается стабильной благодаря образовавшимся фосфодиэфирным связям. После введения гибридной ДНК в клетку-хозяина происходит ее репликация и образуются новые кольцевые молекулы уже без разрывов.

мидная ДНК и лишь в некоторых — плазида со встроенным фрагментом чужеродной ДНК (гибридная плазида).

Как мы уже говорили, внехромосомная ДНК, не содержащая точки начала репликации, не может реплицироваться в бактериальной клетке. Таким образом, проникновение в клетку экзогенной ДНК, еще не означает, что она будет поддерживаться в хозяйской клетке. Далее, для сохранения рекомбинантной ДНК в клетке-хо-

зине в первоначальном виде необходимо, чтобы в клетке отсутствовали гены, кодирующие синтез рестриктаз, которые могут привести к ее деградации, и чтобы клетка имела фенотип  $\text{RecA}^-$  (такие клетки неспособны к общей рекомбинации, так что экзогенная ДНК не будет модифицироваться в результате гомологичной рекомбинации).

Затем необходимо идентифицировать клетки, содержащие рекомбинантную ДНК. Способ идентификации должен быть как можно более простым, поскольку приходится проверять огромное число клеток. В системе pBR322, в которой чужеродная ДНК встраивается в сайт *Bam*HI, специфическая идентификация состоит из двух этапов. Сначала клетки после трансформации высевают на питательную среду, содержащую ампициллин. В таких условиях могут вырасти только те клетки, в которых присутствует интактный ген  $\text{Amp}^r$  — или в составе интактной плазмиды pBR322, или в составе гибридной плазмиды; нетрансформированные клетки чувствительны к ампициллину. Сайт *Bam*HI расположен в гене  $\text{Tet}^r$  плазмиды pBR322 (рис. 4.7); встраивание в этот ген фрагмента ДНК прерывает кодирующую последовательность, и устойчивость к тетрациклину утрачивается. Таким образом, клетки, несущие гибридную плазмиду, устойчивы к ампициллину, но чувствительны к тетрациклину, а клетки, получившие интактную плазмиду pBR322, несут ген  $\text{Tet}^r$  и устойчивы как к ампициллину, так и к тетрациклину.

На втором этапе проводят разделение этих двух вариантов. Клетки, выросшие на среде с ампициллином, переносят на среду с тетрациклином методом перепечатки. Клетки, образующие колонии на чашках с тетрациклином, содержат интактную плазмиду pBR322, поскольку, как мы уже говорили, они устойчивы и к ампициллину, и к тетрациклину. Клетки, не выросшие на чашках с тетрациклином, чувствительны к этому антибиотику, значит, они содержат гибридную плазмиду pBR322.

Среди колоний, выросших на среде с ампициллином, выделяют те, которые оказались чувствительны к тетрациклину, и из каждой колонии получают индивидуальные клеточные клоны или (чаще делают именно так) объединяют все колонии, устойчивые к ампициллину и чувствительные к тетрациклину, и культивируют их вместе. Далее можно провести дополнительный скрининг и идентифицировать те клетки, которые несут гибридную плазмиду pBR322 со специфической вставкой. Присутствие сайтов *Hind*III и *Sall* в гене  $\text{Tet}^r$  и сайта *Pst*I в гене  $\text{Amp}^r$  плазмиды pBR322 позволяет изменить локализацию клонированных фрагментов чужеродной ДНК. Если для встраивания используется сайт *Pst*I, то отбор проводится по той же схеме, но в другом порядке, т. е. сначала высевают клетки на среду с тетрациклином, а затем — с ампициллином.

### Другие плазмидные векторы

Идея использовать pBR322 как вектор для клонирования была вполне удачной, но эта плаزمида содержит лишь несколько сайтов рестрикции, а отбор трансформированных клеток занимает много времени. Это привело к необходимости разработки альтернативных систем клонирования. Например, плазмида pUC19 длиной 2686 п. н. содержит: ген устойчивости к ампициллину; регулируемый сегмент гена  $\beta$ -галактозидазы (*lacZ'*) лактозного оперона *E. coli*, ген *lacI*, кодирующий репрессор, который контролирует экспрессию гена *lacZ'*; полилинкер — короткую последовательность с множеством уникальных сайтов узнавания для эндонуклеаз (*Eco*RI, *Sac*I, *Kpn*I, *Xma*I, *Sma*I, *Bam*HI, *Xba*I, *Sall*, *Hinc*II, *Acc*I, *Bsp*MI, *Pst*I, *Sph*I и *Hind*III); точку начала репликации плазмиды pBR322 (рис. 4.9).

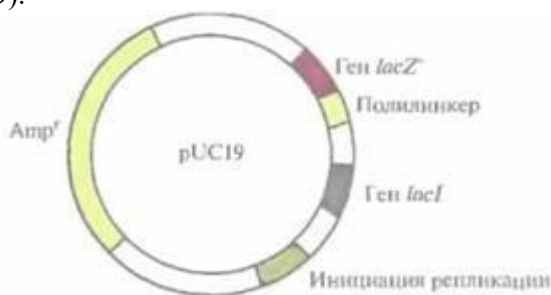


Рис. 4.9. Генетическая карта плазмидного вектора pUC19. Плазмида состоит из 2686 пар нуклеотидов и содержит уникальные сайты узнавания для *Eco*RI, *Sac*I, *Kpn*I, *Xma*I, *Sma*I, *Bam*HI, *Xba*I, *Sall*, *Hinc*II, *Acc*I, *Pst*I, *Bsp*MI, *Sph*I и *Hind*III, локализованные в полилинкере; ген устойчивости к ампициллину; сайт инициации репликации, функционирующий в *E. coli*; ген *lacI*, контролирующий синтез репрессора, который блокирует транскрипцию гена *lacZ'* в отсутствие индуктора ИПТГ.



## При расщеплении ДНК рестриктазой *R*I образуются фрагменты с липкими концами

J.E. Mertz, R. W. Davis

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**: 3370-3374, 1972

Технология рекомбинантных ДНК включает создание вектора (бактериофага) циркулирующего его вируса лигазу, в результате чего ДНК включает создание вектора (бактериофага) обусловливается получится кольцевая, ковалентно — «переносчика» наличием в клетке фермента, замкнутая молекула. У всех молекул клонируемой ДНК, специфическое который расщепляет фаговую ДНК, расщепленных одной встраивание в него этой ДНК с ДНК. Позже Мерц и Дэвис эндонуклеазой, имеются одинаковые образованием химерной установили, что этот фермент, концы из 4—6 нуклеотидов, а сайт конструкции, введение рестриктаза *R*I узнавания состоит из шести конструкции в клетку-хозяина и (получившая название нуклеотидных пар. Мерц и Дэвис идентификацию клеток, несущих *EcoRI*), расщепляет молекулу сделали вывод, что рекомбинантную ДНК. ДНК в специфическом сайте с «...последовательно используя два Незаменимым рабочим образованием фермента — рестриктазу *R*I и ДНК-инструментом в этих комплементарных («липких») лигазу, можно «перекombинировать» манипуляциях являются концов. Линейные молекулы, любые две молекулы ДНК с *R*I-рестрицирующие эндонуклеазы образовавшиеся при сайтами и получить гибридную типа 11. Их применяют как при расщеплении кольцевой ДНК молекулу». Это открытие стало создании векторов (см., например, рестриктазой *EcoRI*, часто вновь ключевым в развитии технологии Bolivar et al., *Gene* 2: 95—113, замыкаются в кольцо благодаря рекомбинантных ДНК, поскольку, 1977), так и при встраивании в них спариванию комплементарных по словам этих же ученых, указало нужных генов, В 1968 г. М. концов. Объединившиеся «простой путь ...создания Мезелсон и др. (*Nature* 217: фрагменты удерживаются специфических рекомбинантных 1110— 1114) показали, что вместе водородными связями; молекул ДНК *in vitro*». способность одного из штаммов *E. coli* их концы можно ковалентно сшивать размножение сшить, добавив фермент ДНК-инфи-

При отборе трансформированных клеток руководствуются следующими соображениями. Если клетки, содержащие немодифицированную плазмиду *pUC19*, выращивать в присутствии изопропил- $\beta$ -D-тиогалактопиранозид (ИПТГ), который является индуктором *lac*-оперона, то продукт гена *lacI* не сможет связаться с промоторно-операторной областью гена *lacZ'*, и как следствие будут происходить транскрипция и трансляция плазмидного фрагмента гена *lacZ'*. Продукт этого фрагмента свяжется с белком, кодируемым хромосомной ДНК, и в результате образуется активная  $\beta$ -галактозидаза. Последовательность с множеством сайтов рестрикции (полилинкер) встроена в ген *lacZ'* так, что она не влияет на продукцию функциональной  $\beta$ -галактозидазы, и если в среде присутствует ее субстрат 5-бром-4-хлор-3-индолил- $\beta$ -D-галактопиранозид (X-Gal), то он будет гидролизироваться под действием этого фермента с образованием продукта синего цвета, окрашивающего колонии клеток, содержащих немодифицированную плазмиду *pUC19*.

Для клонирования в *pUC19* донорную ДНК расщепляют одной из рестриктаз, чей сайт находится в полилинкере; плазмидную ДНК гидролизуют такой же рестриктазой, а затем обрабатывают щелочной фосфатазой. Обе ДНК смешивают в присутствии ДНК-лигазы *T4* и используют образовавшийся продукт для трансформации клеток, которые могут синтезировать ту часть  $\beta$ -галактозидазы (*LacZ $\alpha$* ), которая соединяется с продуктом гена *lacZ'* с образованием активного фермента. Обработанные клетки высевает на питательную среду с ампициллином, ИПТГ и субстратом для  $\beta$ -галактозидазы. Нетрансформированные клетки не могут расти в присутствии ампициллина, а клетки, несущие интактную плазмиду, образуют на среде с ампициллином колонии синего цвета. Клетки-хозяева, несущие гибридную плазмиду, образуют на той же самой среде белые колонии, поскольку обычно при встраивании в полилинкер чужеродной ДНК

ПРОПУЩЕНА СТР. 62



последовательности ДНК. Эту проблему можно решить, используя другую рестриктазу.

Следующий после создания библиотеки этап — это поиск клона (клонов), несущего искомую последовательность ДНК. Для этого используют три широко известных метода: гибридизацию с меченым ДНК-зондом с последующим радиоавтографическим анализом, иммунологический скрининг и скрининг по активности белка, кодируемого геном-мишенью.

### *Скрининг с помощью гибридизации*

Нужную нуклеотидную последовательность в образце ДНК можно обнаружить с помощью ДНК-зонда, спаривающегося только с искомой последовательностью. Для этого ДНК сначала переводят в одноцепочечную форму, подвергнув ее тепловой обработке или воздействию щелочи. В этих условиях водородные связи между основаниями разрываются и цепи расходятся

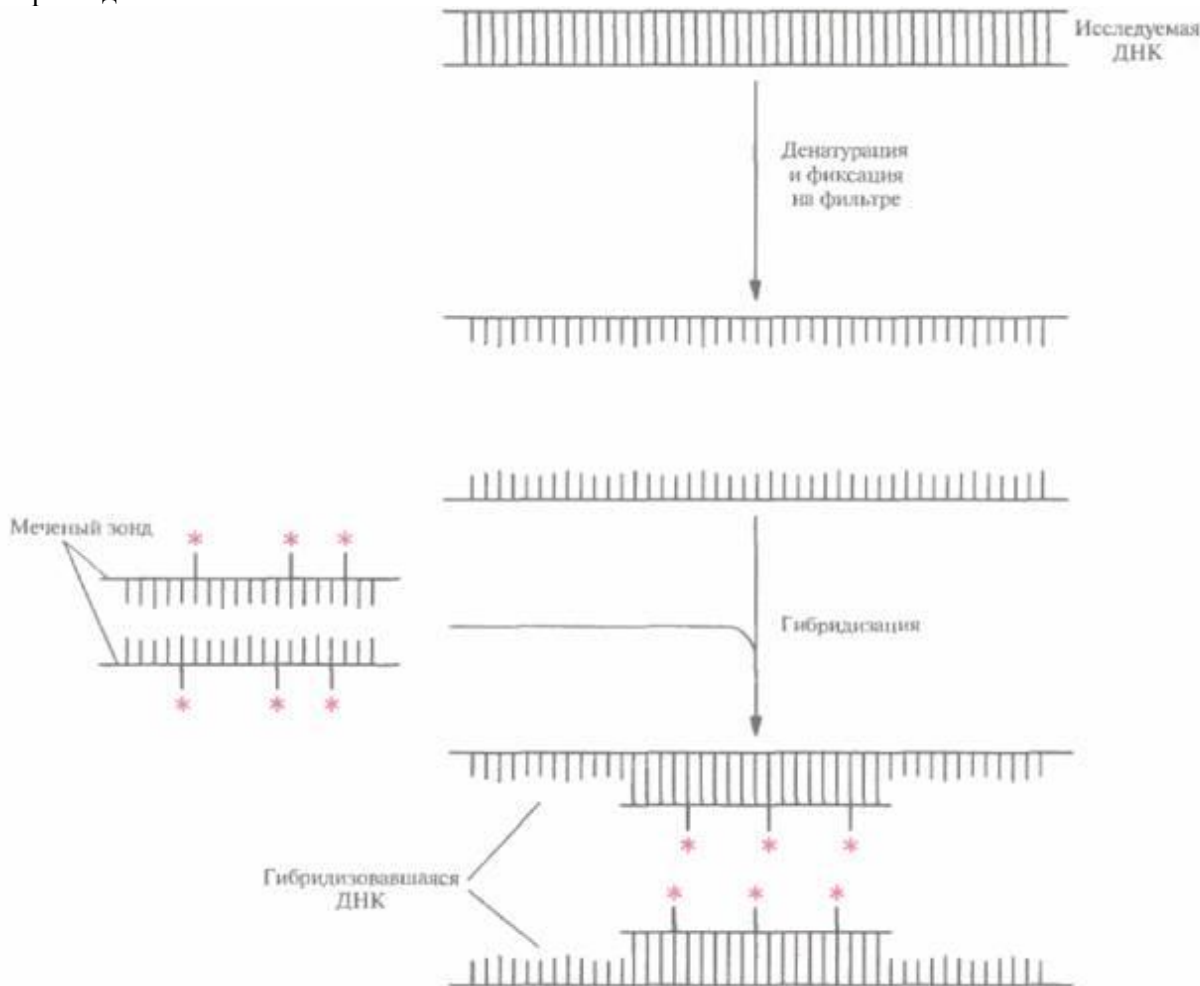


Рис. 4.11. ДНК-гибридизация. Исследуемую ДНК подвергают денатурации и фиксируют на твердой подложке, например на нитроцеллюлозном или найлоновом фильтре. Меченый ДНК-зонд (обычно длиной от 100 до 1000 п. н.) тоже денатурируют, наносят на фильтр с исследуемой ДНК и проводят их отжиг. Для удаления негибридизовавшегося ДНК-зонда фильтр промывают и визуализируют метку. Если гибридизация между зондом и исследуемой ДНК не произошла, то никакой метки на фильтре не обнаруживается. (Метка на рисунке обозначена цветной звездочкой.)

## ДОПОЛНЕНИЕ 4.2

### Радиоавтография

Этот метод широко применяется для локализации радиоактивного материала в клетке, срезе ткани или на пластине геля после электрофореза смеси макромолекул. Для регистрации радиоактивных зон на исследуемый образец накладывают рентгеновскую пленку, в которой поддействием радиоактивного излучения из бромида серебра образуется металлическое серебро. «Засвеченные» участки, соответствующие радиоактивным зонам, наблюдаются визуально после проявления пленки. Одним из вариантов радиоавтографии является флюорография. В этом случае в исследуемый образец импрегнируют сцинтиллятор и вновь накладывают рентгеновскую пленку. Метод основан на том, что низкоэнергетические  $\beta$ -частицы, образующиеся при распаде изотопа (например, трития), взаимодействуют с молекулами сцинтиллятора, при этом радиоактивного преобразуется в световую энергию, которая регистрируется рентгеновской пленкой, чувствительной к синей области спектра. Все операции при радиоавтографии необходимо проводить в темноте, чтобы не засветить пленку. Очень важной областью применения радиоавтографии является обнаружение ДНК-зонда после его гибридизации с препаратом ДНК, подвергнутым электрофоретическому разделению. К сожалению, провести гибридизацию в самом геле невозможно, поскольку зонд не может в него проникнуть. Поэтому ДНК после электрофореза переносят на нитроцеллюлозный или найлоновый фильтр по методу Саузерна (Саузерн-блоттинг) или с помощью элюции. Расположение молекул ДНК на фильтре в соответствии с таковым в геле. Перенесенную на фильтр ДНК подвергают денатурации и фиксируют, а затем проводят гибридизацию с радиоактивным ДНК-зондом, и Гибридизационный сигнал регистрируют методами. Перенос ДНК из геля на фильтр носит название Саузерн-блоттинга в честь Эдвина Саузерна, который изобрел этот метод. Используемые в литературе термины «Нозерн-блоттинг» и «Вестерн-блоттинг» относятся к переносу РНК и белков соответственно. Эти названия — в переводе «северный» и «западный» — не имеют никакого отношения к сторонам света и были придуманы остроумными коллегами Саузерна (Southern — южный). Тем самым они как бы напутствовали Саузерна на разработку новых методов переноса макромолекул, а также четко обозначили, о каких макромолекулах идет речь. Кроме того, все увидели, что шутить умеют не только физики, но и биологи.

(происходит денатурация). Если теперь медленно снизить температуру, то произойдет их воссоединение (ренатурация). При этом, если в растворе присутствует одноцепочечный ДНК-зонд, он тоже будет ренатурировать с ДНК, специфически спариваясь с комплементарными участками. В результате образуется гибридная ДНК, т. е. двухцепочечная молекула, цепи которой принадлежат двум разным ДНК.

Процедура ДНК-гибридизации состоит в следующем. ДНК-мишень подвергают денатурации и одноцепочечные молекулы необратимо «пришивают» к твердой подложке (нитроцеллюлозному или найлоновому фильтру). Эту процедуру обычно проводят при высокой температуре. Затем фильтр инкубируют с одноцепочечным ДНК-зондом, меченным радиоизотопом или другой меткой. Если нуклеотидные последовательности зонда и ДНК-мишени комплементарны, то происходит их спаривание (т. е. гибридизация) (рис. 4.11). Гибридные молекулы можно визуализировать радиоавтографическим (дополнение 4.2) или другим методом, зависящим от природы метки. Если комплементарность между зондом и ДНК-мишенью отсутствует, то гибридизации не происходит, и мы получаем отрицательный результат. Обычно размер зонда варьирует от 100 до 1000 п. н. и более, хотя можно использовать как более крупные зонды, так и зонды меньшего размера. Для гибридизации, т. е. для образования стабильного комплекса, необходимо, чтобы на участке длиной 50 нуклеотидов совпадало более 80% из них, но это зависит от условий реакции.

Меченые ДНК-зонды можно получить разными способами. Один из них, называемый методом случайных праймеров, основан на применении смеси синтетических олигонуклеотидов (олигомеров), содержащих все возможные комбинации из шести нуклеотидов. Некоторые из этих олигонуклеотидов оказываются комплементарными последовательностям ДНК-мише-

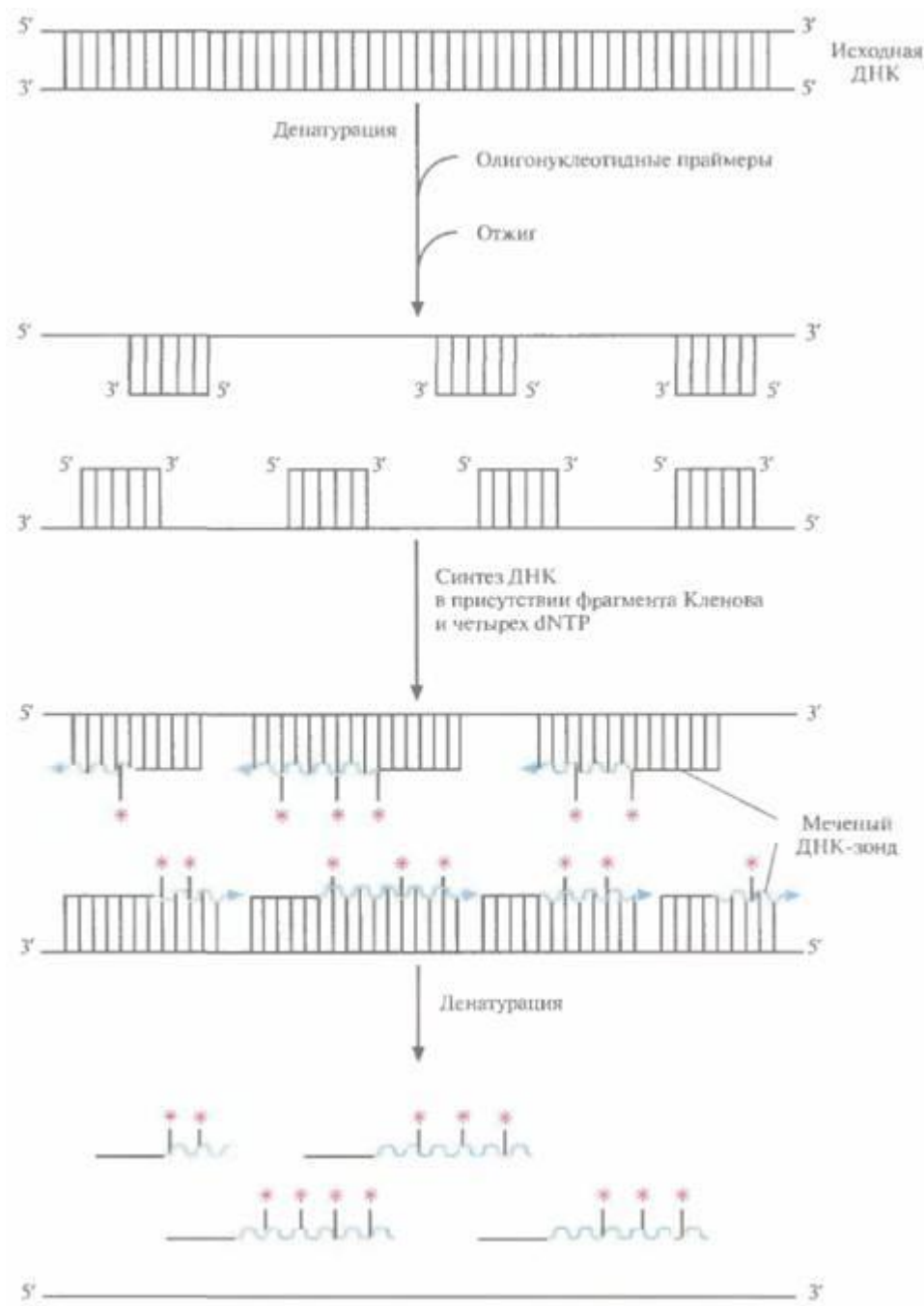


Рис. 4.12. Получение меченого ДНК-зонда методом случайных праймеров. К денатурированной двухцепочечной ДНК, содержащей нуклеотидную последовательность, которую предполагается использовать в качестве зонда, добавляют гексануклеотиды (смесь всех возможных комбинаций из шести нуклеотидов) и отжигают смесь. Некоторые из олигонуклеотидов гибридизуются с немеченой денатурированной ДНК, и в присутствии фрагмента Кленова и четырех dNTP (один из которых меченый [\*]) служат затравкой для синтеза комплементарной цепи. После денатурации синтезированной ДНК получают смесь меченых фрагментов ДНК, которые вместе составляют практически полноразмерную исходную ДНК-матрицу.

ни и гибридизуются с ними, если ДНК предварительно денатурировать (рис. 4.12). После отжига олигонуклеотидов с денатурированной ДНК-матрицей в реакционную смесь добавляют четыре дезоксирибонуклеотида (дезоксирибонуклеозидтрифосфаты; dNTP), один из них — меченый, и фрагмент ДНК-полимеразы I *E. coli* (фрагмент Кленова). Фрагмент Кленова обладает ДНК-полимеразной и 3'-экзонуклеазной активностями, но не 5'-экзонуклеазной активностью, присущей ДНК-полимеразе I *E. coli*, которая могла бы расщепить новосинтезированные молекулы ДНК. Одиночные цепи ДНК-мишени служат матрицами для синтеза новых молекул ДНК, а связанные с ними случайным образом олигонуклеотиды — затравками (рис. 4.12). При радиоактивном мечении один из dNTP содержит  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ , так что  $^{32}\text{P}$ -меченым оказывается и сам зонд. Радиоактивную метку выявляют с помощью радиоавтографии,

В качестве нерадиоизотопной метки часто используют биотин, который присоединяют к одному из четырех dNTP. Для выявления гибридизовавшегося биотинилированного зонда на фильтр наносят конъюгат стрептавидина с соответствующим ферментом (например, щелочной фосфатазой). Стрептавидин образует комплекс с биотином, который обнаруживается благодаря тому, что под действием фермента образуется окрашенное или люминесцирующее вещество — продукт превращения нанесенного на фильтр субстрата.

Зонды для скрининга геномной библиотеки можно получить по крайней мере двумя способами. Во-первых, можно использовать клонированную ДНК близкородственного организма (гетерологичный зонд). В этом случае условия гибридизации нужно подбирать таким образом, чтобы она могла происходить при существенном расхождении между нуклеотидными последовательностями зонда и искомой ДНК; это позволяет решить проблемы, связанные с заведомым различием между ДНК — источником зонда и исследуемой ДНК. Во-вторых, зонд можно получить методом химического синтеза, основываясь на известной аминокислотной последовательности белкового продукта искомого гена.

Скрининг библиотек геномных ДНК обычно проводят по следующей схеме. После трансформации высевают клетки на чашки с питательной средой и переносят выросшие колонии на твердую подложку (например, на нитроцеллюлозный или нейлоновый фильтр); проводят лизис клеток, затем депротеинизацию и денатурацию ДНК; фиксируют ДНК на подложке. Наносят на фильтр меченый зонд и проводят отжиг, а затем радиоавтографию. Колонии на исходной чашке, которые содержат гибридизовавшуюся ДНК, выделяют и культивируют (рис. 4.13). Поскольку большинство библиотек получается в результате частичного гидролиза, положительный гибридизационный сигнал может быть получен для нескольких колоний (клонов). Теперь необходимо определить, какой именно клон (если таковой имеется) содержит искомый ген целиком. С помощью гель-электрофореза и картирования определяют размер каждого фрагмента (вставки) и идентифицируют аналогичные фрагменты или фрагменты с перекрывающимися последовательностями. Можно также провести дополнительное клонирование с тем, чтобы составить полный ген из перекрывающихся фрагментов. Или, если вставка в каком-либо из клонов достаточно велика и вполне может содержать весь ген, провести ее секвенирование и убедиться в наличии старт- и стоп-кодона и полноразмерной нуклеотидной последовательности, кодирующей искомый белок.

К сожалению, никто не может дать гарантии, что в библиотеке представлена вся нуклеотидная последовательность нужного гена. Если поиск полноразмерного гена оказался безрезультатным, можно создать другую библиотеку, используя другую рестриктазу, и провести скрининг с помощью исходного зонда или зондов, созданных на основе предыдущей библиотеки. Чтобы повысить вероятность присутствия в библиотеке полной версии искомого гена, можно также создать библиотеки, содержащие фрагменты ДНК заведомо большего размера, чем средний размер прокариотического гена (этот вариант мы рассмотрим в данной главе позже).

### **Иммунологический скрининг**

В отсутствие ДНК-зонда для скрининга геномной библиотеки можно использовать другие методы. Например, если клонированный ген экс-прессируется, то его продукт — весь белок или его часть — можно обнаружить иммунологиче-



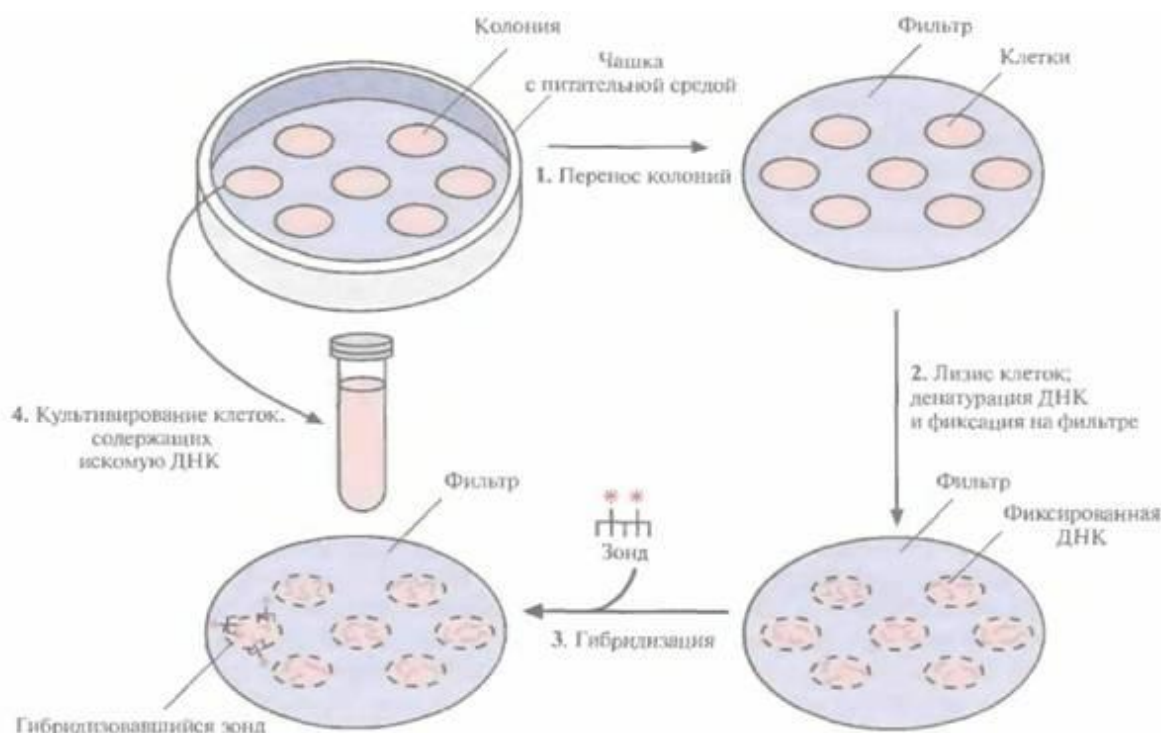


Рис. 4.13. Скрининг библиотеки геномной ДНК с применением меченого зонда. Клетки после трансформации высевает на твердую питательную среду, обеспечивающую рост только трансформированных клеток. 1. Переносят клетки из каждой выросшей колонии на твердую подложку (например, нитроцеллюлозный или нейлоновый фильтр) так, чтобы их расположение соответствовало таковому на чашке. 2. Клетки лизируют, высвободившуюся ДНК подвергают денатурации и депотеинизации и фиксируют на фильтре. 3. На фильтр наносят меченый ДНК-зонд и проводят гибридизацию. Смывают с фильтра негибридизовавшийся зонд и проводят радиоавтографию с тем чтобы определить, какие клетки содержат меченый ДНК-зонд. 4. Идентифицируют на чашке колонии, содержащие искомую ДНК (положительный гибридационный сигнал), отбирают из них материал и культивируют.

скими методами. Технически эта процедура имеет много общего с гибридизацией. Все клеточные линии (клоны) библиотеки высевает на чашки с питательной средой. Выросшие колонии переносят на фильтр, клетки лизируют, а высвободившиеся белки фиксируют на фильтре. Затем на фильтр наносят первые антитела, которые специфически связываются с данным белком (антигеном), все несвязавшиеся антитела удаляют, а фильтр помещают в раствор вторых антител, специфичных в отношении первых антител. Во многих тест-системах используют конъюгаты вторых антител с ферментом, например с щелочной фосфатазой. После отмывания фильтра добавляют бесцветный субстрат. Если вторые антитела связываются с первыми, то под действием фермента происходит гидролиз субстрата с образованием окрашенного вещества в том месте, где идет реакция (рис. 4.14).

Те клетки на чашке, которые соответствуют окрашенным пятнам на фильтре, содержат или полноразмерный ген, или достаточно протяженный его участок, обеспечивающий синтез белкового продукта, узнаваемого первыми антителами. По окончании иммунологического скрининга геномной библиотеки необходимо определить, какой именно из отобранных клонов содержит полноразмерный ген.



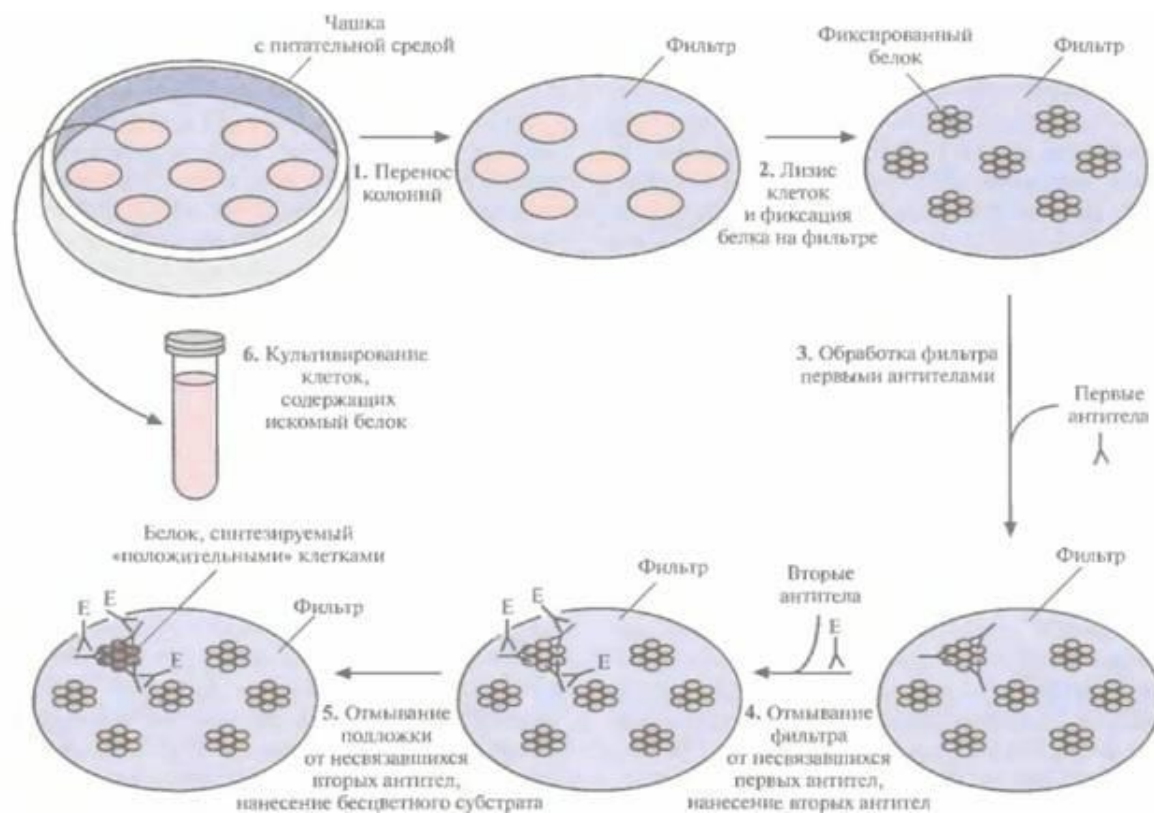


Рис. 4.14. Иммунологический скрининг геномной библиотеки (иммунологическое тестирование колоний). Клетки после трансформации высевают на твердую питательную среду, обеспечивающую рост только трансформированных клеток. 1. Переносят клетки из каждой выросшей колонии на твердую подложку (например, нитроцеллюлозный или нейлоновый фильтр) так, чтобы их расположение в точности соответствовало таковому на чашке. 2. Клетки подвергают лизису, белки фиксируют на фильтре. 3. Наносят на фильтр первые антитела, которые связываются только с искомым белком. 4. Несвязавшиеся первые антитела удаляют, наносят на фильтр вторые антитела, специфичные в отношении первых антител, связанные с ферментом (например, щелочной фосфатазой). 5. Смывают с фильтра все несвязавшиеся вторые антитела и наносят на него бесцветный субстрат, при гидролизе которого образуется окрашенный продукт. Гидролиз может произойти только в присутствии вторых антител. 6. Отбирают колонии на чашке, соответствующие окрашенным пятнам на фильтре, и культивируют их. В них может содержаться рекомбинантная ДНК, кодирующая белок, гомологичный первым антителам.

### Скрининг по активности белка

Метод гибридизации ДНК и иммунологические методы позволяют идентифицировать многие гены и их продукты. Если при этом искомый ген кодирует фермент, не синтезируемый клеткой-хозяином, то для обнаружения клонов, содержащих данный ген, можно использовать метод идентификации на чашках. Так были идентифицированы гены  $\alpha$ -амилазы, эндоглюканазы и  $\beta$ -галактозидазы различных организмов. Для этого клоны *E. coli*, составляющие геномную библиотеку данных организмов, высевали на чашках с питательной средой, содержащей специфический субстрат. После окрашивания селективным красителем клетки, способные утилизировать этот субстрат, приобретали характерную окраску.

Если искомый ген кодирует продукт, без которого мутантная клетка-хозяин не может расти на минимальной среде, то библиотеку можно создать методом трансформации мутантных клеток. Клетки, выросшие в отсутствие необходимого субстрата на минимальной среде, обязательно содержат функциональный искомый ген, попавший в клетку в составе плазмидного вектора. В разных вариантах этот подход использовали для выделения многих важных генов, в частности генов, ответственных за синтез антибиотиков и образование азотфиксирующих клубеньков на корнях некоторых растений,

### Клонирование структурных генов эукариот

Для клонирования эукариотических структурных генов необходимы специальные методики. Прокариоты не способны удалять интроны из первичных РНК-транскриптов, поэтому правильная трансляция эукариотических мРНК в бактериальной клетке невозможна. Более того, экспрессия эукариотической ДНК может осуществляться только при наличии прокариотических сигнальных последовательностей, регулирующих транскрипцию и трансляцию. Концевые участки эукариотических мРНК особым образом модифицированы: их 5'-концы экспонированы (содержат «кэш из остатка G, часто метилированного»), а 3'-концы полиаденилированы (содержат poly(A)-«хвост» из примерно 200 остатков аденозина).

Наличие poly(A)-хвоста позволяет отделить мРНК от рибосомной и транспортной РНК. Для этого суммарную эукариотическую РНК пропускают через колонку, заполненную целлюлозой, к которой «пришиты» короткие олигонуклеотидные цепочки из тимидиновых остатков длиной примерно 15 звеньев, oligo(dT). Poly(A)-хвосты молекул мРНК спариваются с oligo(dT) и задерживаются в колонке, а молекулы тРНК и рРНК свободно проходят через нее. Затем колонку промывают буфером, в котором происходит разрыв водородных связей между А и Т, и мРНК высвобождается.

Саму мРНК нельзя встроить в ДНК-вектор, сначала на ней необходимо синтезировать двухцепочечную ДНК. Для этого последовательно используют две разные полимеразы: обратную транскриптазу и фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I (рис. 4.15). Вначале в реакционную смесь с очищенной мРНК добавляют короткие oligo(dT), обратную транскриптазу и четыре dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP). Poly(A)-хвост мРНК спаривается с oligo(dT), несущим свободную 3'-ОН-группу, которая инициирует синтез комплементарной цепи. Матрицей в этом синтезе служит молекула мРНК, а катализирует его обратная транскриптаза, продуцируемая некоторыми РНК-вирусами. Она последовательно присоединяет к растущей цепи остатки Т, С, G или А, комплементарные А, G, С или U мРНК. In vitro синтез ДНК идет не до конца, при этом обратная транскриптаза перед остановкой обычно «поворачивает вспять» и присоединяет несколько нуклеотидов в обратном направлении (рис. 4.15), так что в результате образуется «шпилька».

В реакционную смесь добавляют фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*, который достраивает вторую цепь ДНК, используя первую цепь как матрицу. Он присоединяет дезоксирибонуклеотиды к растущей цепи, начиная с 3'-ОН-конца шпильки. По окончании синтеза препарат обрабатывают ферментом РНКазой Н, которая разрушает молекулы мРНК, и нуклеазой SI, отщепляющей одноцепочечные концы ДНК. Полученный препарат представляет собой смесь частично и полностью двухцепочечных комплементарных ДНК-копий (кДНК) мРНК, преобладающей в исходном образце.

Разные кДНК можно встроить в плазмидный вектор и получить кДНК-библиотеку. Для скрининга кДНК-библиотеки с целью идентификации клонов, несущих специфические гибридные плазмиды, можно использовать метод гибридизации или иммунологические методы. В последнем случае кДНК должна быть встроена в сайт, находящийся под контролем бактериального промотора, обеспечивающего транскрипцию. Однако практически ни один вектор не гарантирует, что во встроенной кДНК сохранится правильная рамка считывания и синтезируется правильная полипептидная цепь. Тем не менее все положительные клоны, выявленные тем или иным методом, необходимо подвергнуть дальнейшей проверке и идентифицировать те из них, ко-

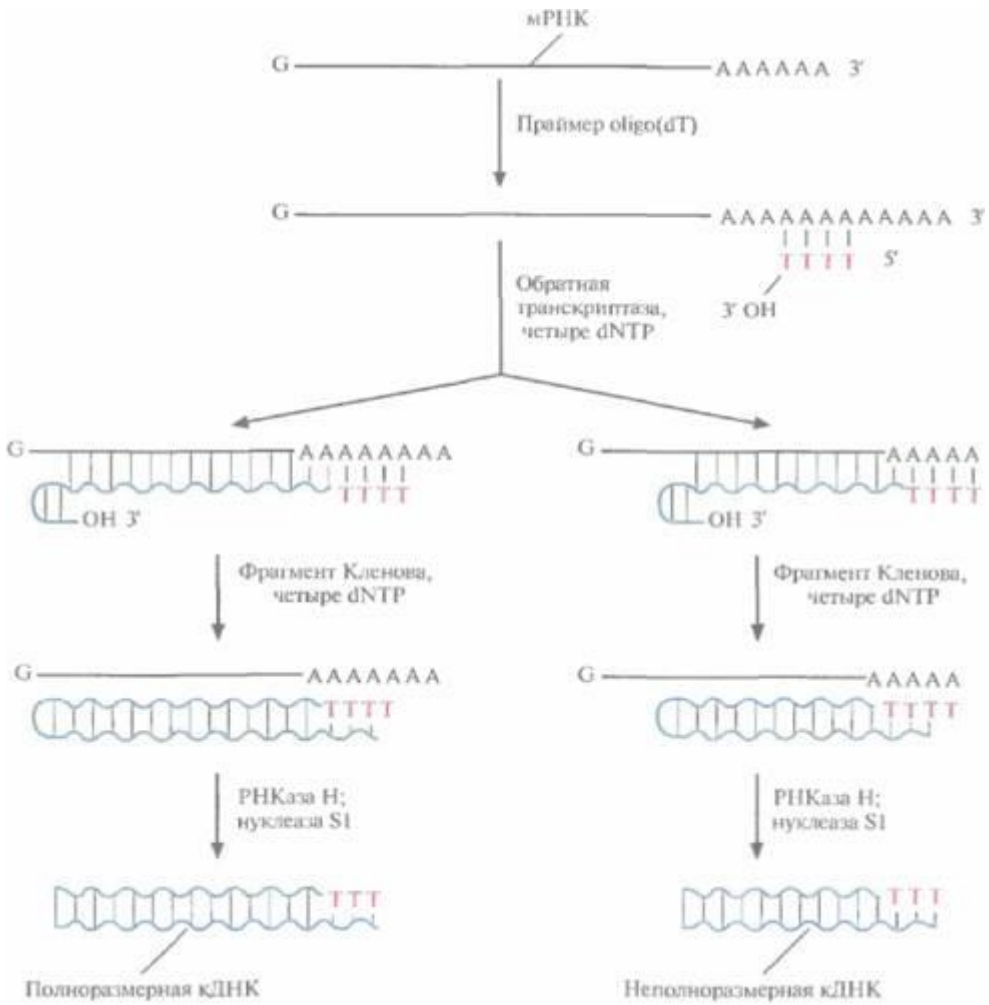


Рис. 4.15. Синтез кДНК. К препарату очищенной мРНК добавляют праймер oligo(dT). Для синтеза ДНК на РНК-матрице используют фермент обратную транскриптазу и четыре dNTP. In vitro обратная транскриптаза не обеспечивает синтез полноразмерных кДНК-коп и на всех матрицах и образует на конце растущей цепи шпильку со свободной 3'-ОН-группой. Эта группа инициирует синтез второй цепи ДНК при участии фрагмента Кленова. После завершения синтеза молекулы мРНК гидролизуют РНКазой H, а ДНК обрабатывают нуклеазой S1, в результате чего получают линейные молекулы ДНК с тупыми концами без шпилек.

которые несут полноразмерную нуклеотидную последовательность, кодирующую белок-мишень.

## Векторы для клонирования крупных фрагментов ДНК

### Векторы на основе бактериофага λ

С помощью плазмидных векторов можно клонировать фрагменты ДНК длиной до 10 т. п. н. Однако при создании геномных библиотек часто приходится работать с более крупными фрагментами. Для этого были разработаны векторы на основе бактериофага λ *E. coli*.

После проникновения фага λ в клетку *E. coli* события могут развиваться по двум сценариям. Если реализуется литический цикл, то фаг начинает интенсивно размножаться и примерно через 20 мин клетка разрушается (лизует) с высвобождением до 100 новых фаговых частиц. При альтернативном варианте развития событий фаговая

ДНК включается в хромосому *E. coli* как профаг и реплицируется в клетке вместе с нормальными бактериальными генами (состояние лизогении). Однако при недостатке питательных веществ или иных неблагоприятных обстоятельствах интегрированная фаговая ДНК высвобождается, и запускается литический цикл развития. Размер ДНК фага  $\lambda$  составляет примерно 50 т. п. н., причем значительная ее часть (около 20 т. п. н.) несущественна для размножения фага и отвечает за его встраивание в хозяйскую ДНК. В связи с этим возникла идея, что ее можно заменить фрагментом другой ДНК эквивалентного размера. Образующаяся ре-комбинантная молекула будет реплицироваться в клетке как ДНК «рекомбинантного» фага  $\lambda$ , «вставшего» на литический путь развития.

Чтобы понять, как функционирует векторная система на основе фага  $\lambda$ , необходимо рассмотреть молекулярные аспекты литического цикла развития. Инфекционная фаговая частица имеет головку, в которой заключена плотно упакованная ДНК длиной примерно 50 т. п. н., и отросток с отходящими от него тонкими белковыми нитями (фибриллами). Сборка головки и отростка и упаковка ДНК четко скоординированы. ДНК фага  $\lambda$  — это линейная двухцепочечная молекула длиной 50 т. п. н. с одноцепочечными 5'-«хвостами» из 12 нуклеотидов. Их называют липкими (cos) концами, поскольку они взаимно комплементарны и могут спариваться друг с другом. После того как фаговая ДНК проходит через отросток и попадает в *E. coli*, cos-концы соединяются с образованием кольцевой молекулы. На раннем этапе литического цикла в результате репликации кольцевой молекулы ДНК образуется линейная молекула, состоящая из нескольких сегментов длиной 50 т. п. н. (рис. 4.16, А). Каждый из таких сегментов упаковывается в белковую головку, к последней присоединяется уже собранный отросток и образуется новая фаговая частица (рис. 4.16, Б). При упаковке молекулы ДНК длиной менее 38 т. п. н. получается неинфекционная фаговая частица, а фрагменты длиной более 52 т. п. н. не умещаются в головку. Сегменты длиной 50 т. п. н. в линейной молекуле ДНК разделены сос-сайтами, и именно по этим сайтам разрезается молекула, когда очередной сегмент заполняет головку. Разрезание осуществляет фермент, находящийся у входа в головку.

В результате исследований по изучению сборки фага  $\lambda$  была разработана система упаковки молекул ДНК *in vitro* с образованием инфекционных фаговых частиц. Смешав в пробирке очищенные пустые головки, фаговую ДНК и собранные отростки, можно получить инфекционные фаговые частицы.

Один из множества  $\lambda$ -векторов для клонирования имеет два *Bam*HI-сайта, фланкирующих участок длиной 20 т. п. н. При гидролизе очищенной фаговой ДНК рестриктазой *Bam*HI образует-

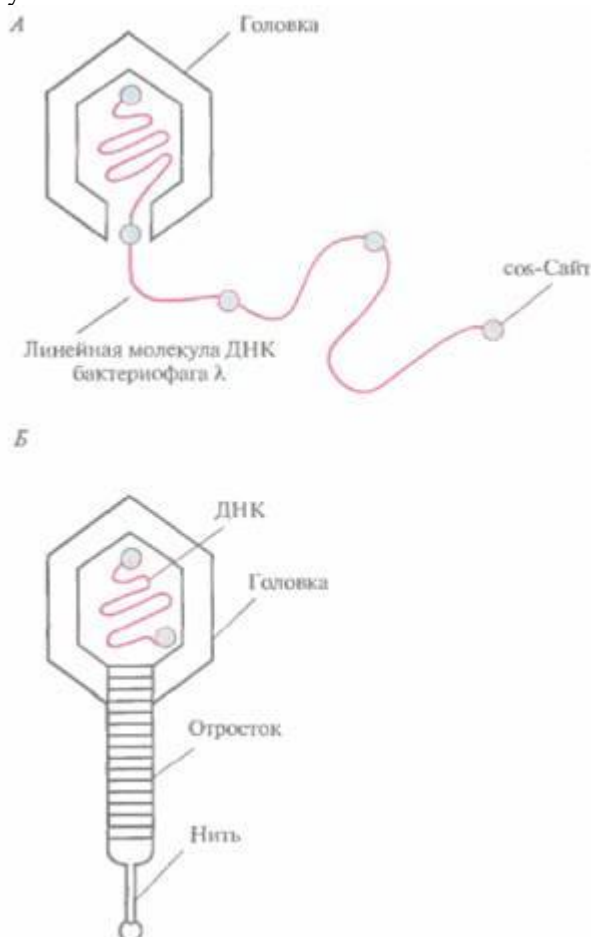


Рис. 4.16. Литический путь развития бактериофага  $\lambda$ . А. При репликации кольцевой ДНК бактериофага  $\lambda$  образуется линейная молекула, состоящая из повторяющихся сегментов длиной примерно 50 т. п. н. Каждый из этих сегментов представляет собой полноразмерную фаговую ДНК. Б. Фаговая головка вмещает один такой сегмент, затем к головке присоединяется уже собранный отросток.

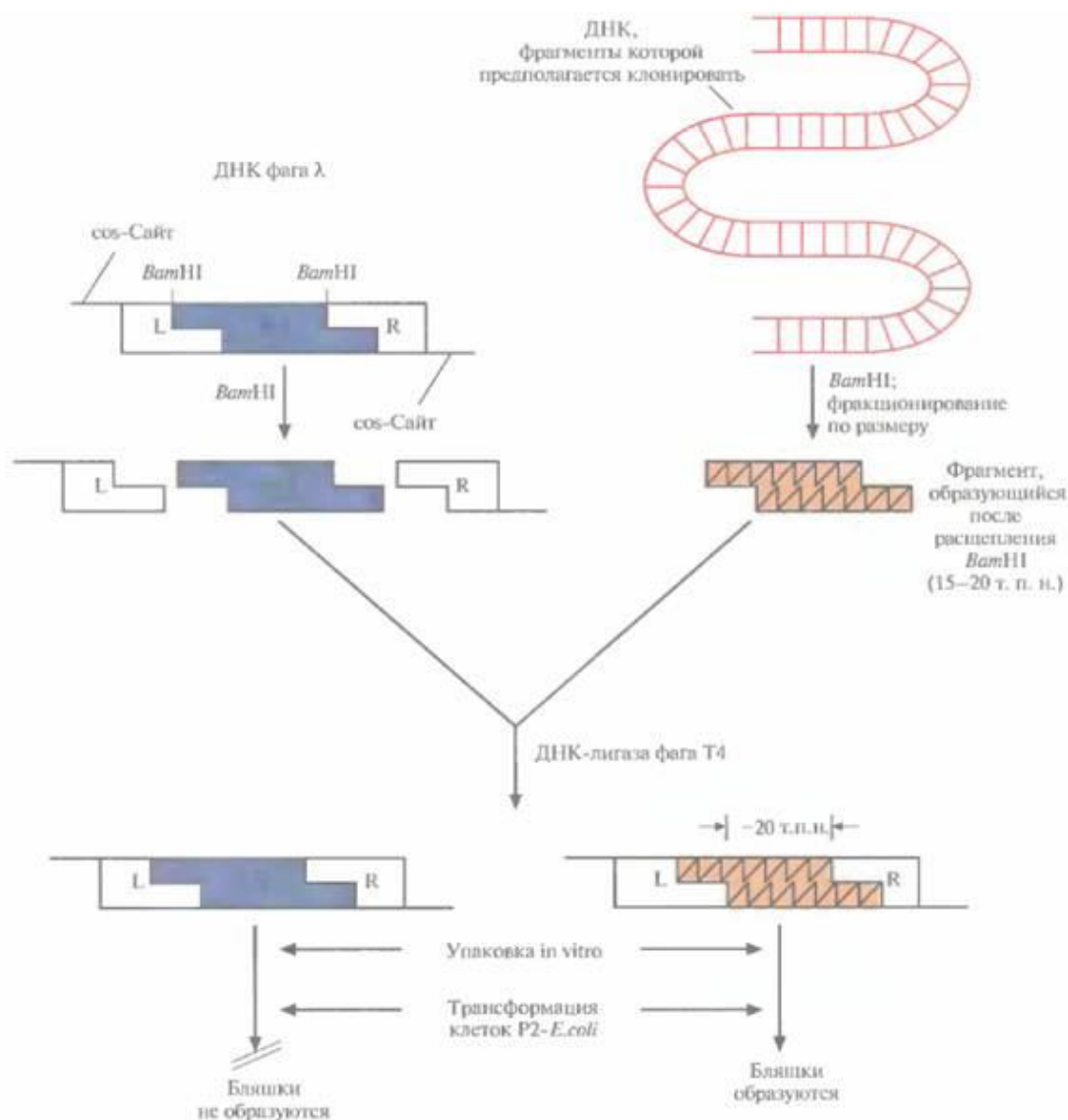


Рис. 4.17. Клонировальная система на основе бактериофага  $\lambda$ . Фаговая ДНК имеет два *Bam*HI-сайта, фланкирующих ее I/E-сегмент. Клонированную ДНК расщепляют с помощью *Bam*HI, фракционируют полученные фрагменты по размеру и выделяют те из них, которые имеют размер от 15 до 20 т.п.н. Фаговую ДНК обрабатывают этим же ферментом. Оба препарата ДНК смешивают и обрабатывают ДНК-лигазой фага T4. Лигированная смесь содержит самые разные комбинации ДНК, в том числе 1) восстановленную ДНК фага  $\lambda$  и 2) рекомбинантные молекулы, содержащие R- и L-области фаговой ДНК и вставку клонируемой ДНК размером ~20 т. п. н., занявшую место области I/E фагового генома. Рекомбинантные молекулы упаковывают в головки бактериофага  $\lambda$  in vitro, и после добавления отростков получают инфекционные фаговые частицы. В инфицированных рекомбинантным фагом клетках *E. coli*, в хромосому которых интегрирована ДНК бактериофага P2, могут реплицироваться и образовывать инфекционные частицы только молекулы ДНК, составленные из R- и L-областей фаговой ДНК и клонированной вставки размером ~20 т.п.н.



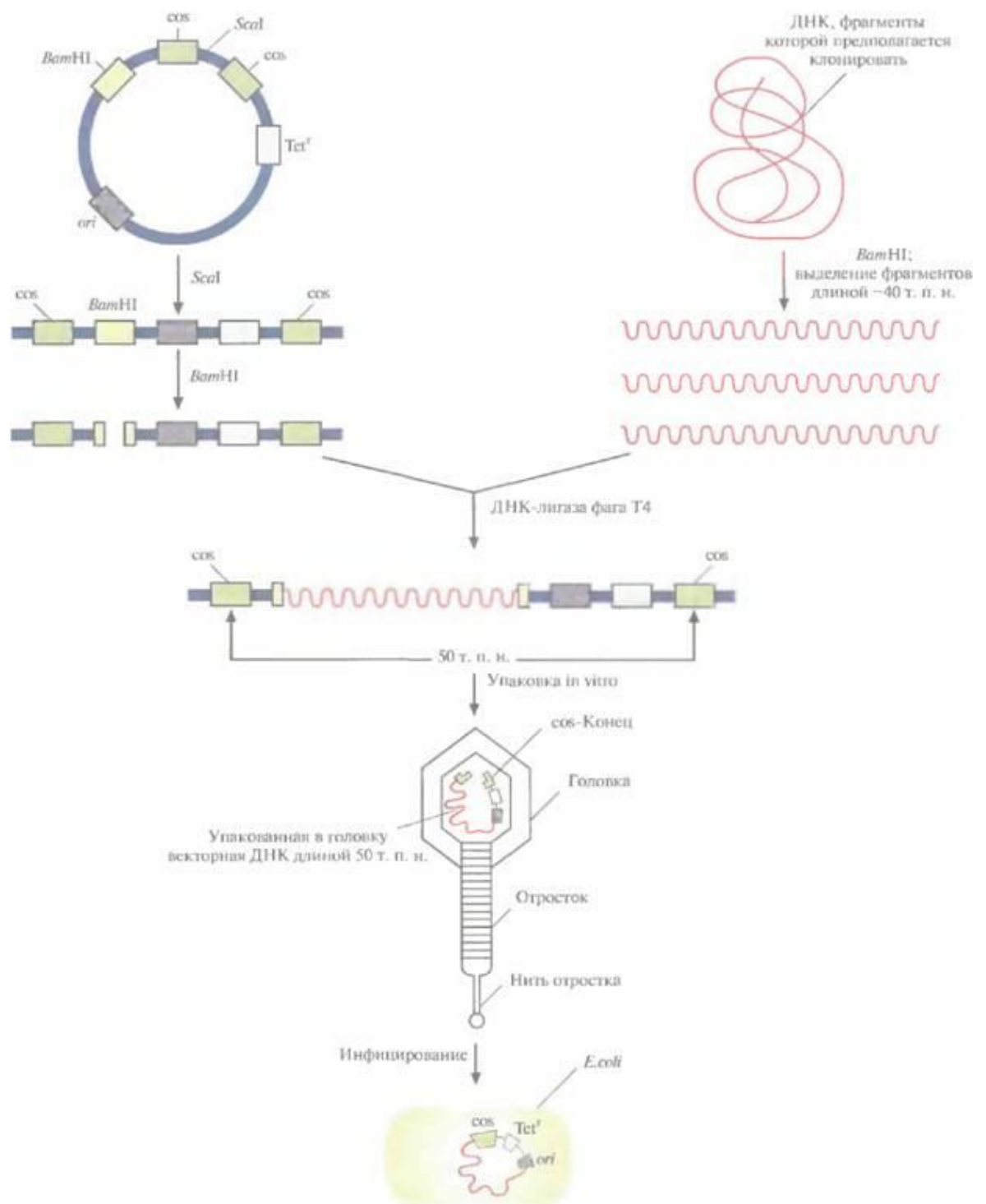
ся три фрагмента. Так называемое левое плечо (область L) содержит генетическую информацию о головке и отростке фага, правое плечо (область R) ведает репликацией ДНК и лизисом, а средний сегмент имеет гены, ответственные за процессы интеграции и исключения (сегмент I/E, от англ. integration/excision). Задача исследователя состоит в том, чтобы заменить этот центральный участок нуклеотидной последовательностью длиной примерно 20 т. п. н. (рис. 4.17) нужной ДНК. ДНК, предназначенную для клонирования, тоже расщепляют с помощью *Bam*HI и выделяют фрагменты размером от 15 до 20 т. п. н. Оба препарата — фаговую и чужеродную ДНК — объединяют и добавляют ДНК-лигазу фага T4, а затем — пустые головки и уже собранные отростки. Фрагменты ДНК длиной 50 т. п. н. упаковываются в головки, к ним присоединяются отростки и образуются инфекционные фаговые частицы. Фрагменты большего (>52 т. п. н.) или меньшего (<38 т. п. н.) размера упаковываться не могут. Рекомбинантный фаг  $\lambda$  может размножаться только в тех штаммах *E. coli*, которые не обеспечивают размножения фага  $\lambda$  с интактной областью I/E. Для сохранения рекомбинантного фага  $\lambda$  его периодически пересевают на свежую культуру *E. coli*.

Для скрининга библиотек на основе фага  $\lambda$  можно использовать ДНК-зонды или иммунологические методы. Зоны лизиса (бляшки) переносят на фильтр и соответствующим образом тестируют. Если используется ДНК-гибридизация, то вначале удаляют фаговые белки, затем ДНК денатурируют и фиксируют на фильтре. При тестировании иммунологическим методом белки, кодируемые клонированными генами, переносят и фиксируют на фильтре вместе с бляшкой. Сопоставив пятна на фильтре, дающие положительную реакцию, с бляшками на исходной чашке, отбирают позитивные бляшки и проводят субкультивирование. Субкультуры служат источником рекомбинантных бактериофагов, которые можно по отдельности культивировать в *E. coli*.

### Космиды

Векторы, называемые космидами, могут включать до 40 т. п. н. чужеродной ДНК и при этом активно амплифицироваться в *E. coli* как плазмиды. Космиды объединяют в себе свойства плазмидных векторов и векторов на основе фага  $\lambda$ . Например, широко применяемая космида pLFR-5 (приблизительно 6 т. п. н.) имеет два *cos*-сайта фага  $\lambda$ , разделенных сайтом рестрикции для *Sca*I, полилинкер с шестью уникальными сайтами рестрикции (*Hind*III, *Pst*I, *Sall*, *Bam*HI, *Sma*I и *Eco*RI), точку начала репликации ДНК (*ori*) и ген устойчивости к тетрациклину (*Tet*<sup>r</sup>). Эта космида может интегрировать чужеродную ДНК длиной до 40 т. п. н. (рис. 4.18). Предназначенные для клонирования фрагменты ДНК длиной около 40 т. п. н. очищают центрифугированием в градиенте плотности сахарозы от продуктов частичного гидролиза донорной ДНК рестриктазой *Bam*HI (рис. 4.18), а pLFR-5 сначала подвергают гидролизу с помощью *Sca*I, а затем *Bam*HI. Препараты ДНК смешивают и лигируют. Те продукты лигирования, которые содержат вставку длиной 40 т. п. н., имеют суммарный размер, близкий к 50 т. п. н., и следовательно, могут упаковываться *in vitro* в головки фага  $\lambda$ . Реассоциировавшие молекулы pLFR-5,

**Рис. 4.18.** Клонирование с помощью космидного вектора. Космида имеет точку начала репликации (*ori*), обеспечивающую ее существование в *E. coli* в виде плазмиды; два интактных *cos*-конца, разделенных уникальным сайтом для *Sca*I: *Bam*HI-сайт вблизи одного из *cos*-сайтов и ген устойчивости к тетрациклину (*Tet*<sup>r</sup>). ДНК, которую хотят клонировать, расщепляют рестриктазой *Bam*HI и фракционируют по размеру, чтобы выделить молекулы длиной примерно 40 т. п. н. Плазмидную ДНК расщепляют с помощью *Sca*I и *Bam*III. Оба препарата ДНК смешивают и обрабатывают ДНК-лигазой фага T4. Некоторые из гибридных молекул, образовавшихся после лигирования, содержат вставку размером около 40 т. п. н., так что их суммарная длина составляет примерно 50 т. п. н. Эти молекулы упаковываются *in vitro* в головки бактериофага  $\lambda$ , затем к головкам прикрепляются отростки, и образуются инфекционные частицы. При инфицировании этим «фагом» *E. coli* в бактериальной клетке оказывается линейная молекула ДНК с *cos*-концами, которые спариваются друг с другом. ДНК-лигаза клетки-хозяина зашивает одноцепочечные разрывы, и образовавшаяся кольцевая молекула существует в клетке-хозяине как автономно реплицирующаяся единица. Трансформированные клетки можно идентифицировать по признаку устойчивости к тетрациклину.





не содержащие вставок, упакованы не будут. После сборки фаговых частиц инфицируют ими *E. coli* (рис. 4.18).

Оказавшись в бактериальной клетке, линейная молекула pLFR-5 со вставкой замыкается в кольцо благодаря спариванию *cos*-сайтов. В такой стабильной конфигурации она может долгое время существовать в клетке и реплицироваться как гибридная плазмида, поскольку содержит все необходимые для этого элементы. Более того, ген устойчивости к тетрациклину обеспечивает рост колоний, несущих данную космиду, на среде с этим антибиотиком; нетрансформированные клетки при этом погибают. Существуют и другие космидные векторы на основе фага  $\lambda$ .

Космиды имеют большое преимущество по сравнению с плазмидами: в них можно встраивать более протяженные фрагменты ДНК, а это означает, что для создания геномной библиотеки нужно меньшее число клонов и потребуется меньше времени на их скрининг.

### **Векторные системы для клонирования очень крупных фрагментов ДНК**

Векторные системы, способные интегрировать крупные вставки ( $>100$  т. п. н.), имеют большую ценность при анализе сложных эукариотических геномов. Без таких векторов не обойтись, например, при картировании генома человека или при идентификации отдельных генов. В отличие от библиотек с небольшими вставками, в геномной библиотеке с крупными вставками скорее всего будет представлен весь генетический материал организма. Кроме того, в этом случае уменьшается число клонов, которые нужно поддерживать, и увеличивается вероятность того, что каждый из генов будет присутствовать в «своем» клоне. Для клонирования фрагментов ДНК размером от 100 до 300 т. п. н. был сконструирован низкокопийный плазмидный вектор на основе бактериофага P1 — химерная конструкция, называемая искусственной хромосомой на основе фага P1. Был создан также очень стабильный вектор, способный интегрировать вставки длиной от 150 до 300 т. п. н., на основе F-плазмиды (F-фактора, или фактора фертильности) *E. coli*, которая представлена в клетке одной или двумя копиями, с селекционной системой *lacZ'* векторов pUC. Эта конструкция называется бактериальной искусственной хромосомой (BAC, от англ. *bacterial artificial chromosomes*).

## **Генетическая трансформация прокариот**

### **Перенос ДНК в *E. coli***

Трансформация — это процесс введения свободной ДНК в бактериальную клетку. *E. coli* используется в качестве организма-хозяина при работе со многими рекомбинантными ДНК, и чтобы обеспечить проникновение в клетки плазмидной ДНК, их обрабатывают ледяным раствором  $\text{CaCl}_2$ , а затем выдерживают при 42 °C в течение 1,5 мин. По-видимому, в результате такой обработки происходит локальное разрушение клеточной стенки. Этот метод дает максимальную частоту трансформации, примерно  $10^{-3}$ , т. е. на каждую 1000 клеток приходится одна трансформированная. Эффективность трансформации, которая определяется как число трансформантов на 1 мкг добавленной ДНК, составляет примерно  $10^7$ — $10^8$ . Частота трансформации никогда не бывает 100-процентной, но этот недостаток компенсируется применением схем отбора, позволяющих быстро идентифицировать трансформированные клетки.

Клетки, способные поглощать чужеродную ДНК, называются компетентными. Компетентность *E. coli* необходимо индуцировать, а некоторые другие бактерии обладают этим свойством изначально. Долю компетентных клеток можно повысить, используя специальную питательную среду или условия культивирования. Для бактерий, устойчивых к химическим индукторам компетентности или не обладающих природной компетентностью, применяются другие системы доставки ДНК.

### **Электропорация**

Для увеличения проницаемости клеточных мембран на них воздействуют электрическим током. Эта процедура называется электропорацией. Условия ее проведения различаются для разных видов бактерий. При работе с *E. coli* клеточную суспензию (~50 мкл) и ДНК помещают в сосуд с погруженными в него электродами и подают единичный импульс тока длительностью ~4,5 мс (емкость конденсатора 25 мкФ,

напряжение 2,5 кВ, сопротивление 200 Ом). После такой обработки эффективность трансформации повышается до  $10^9$  для коротких плазмид (примерно 3 т. п. н.) и до  $10^6$  для больших (примерно 135 т. п. н.). Аналогичные условия можно использовать для введения в *E. coli* вектора ВАС. Таким образом, электропорация является эффективным методом трансформации *E. coli* плазмидами, содержащими вставки длиннее 100 т. п. н. Есть основания полагать, что подходящие условия электропорации будут разработаны для всех видов бактерий, так что эта процедура может стать стандартным методом трансформации.

О механизме проникновения в клетку ДНК в процессе электропорации известно очень мало. По-видимому, как и при химически индуцированной трансформации, в результате электрошока в клеточной стенке образуются временные поры, через которые ДНК и проходит в клетку.

### Конъюгация

Рекомбинантная ДНК проникает в клетки бактерий, характеризующихся низкой частотой трансформации, таким же образом, как плазмидная ДНК из донорской клетки в реципиентную в естественных условиях. Некоторые плазмиды обладают способностью создавать межклеточные контакты, через которые они и переходят из одной клетки в другую. Образование контактов между донорной и реципиентной клетками обеспечивается конъюгативными свойствами плазмид, а сам перенос ДНК — мобилизационными. Большинство плазмид, которые используются в работах с рекомбинантными ДНК, не обладают конъюгативными функциями и поэтому не могут переходить в реципиентные клетки путем конъюгации. Однако проникновение в клетку некоторых плазмидных векторов все-таки происходит при наличии в этой клетке второй плазмиды, обладающей конъюгативными свойствами. Таким образом, введя в клетку, несущую мобилизуемый плазмидный вектор, плазмиду с конъюгативными функциями, можно трансформировать клетки-реципиенты, с трудом поддающиеся трансформации другими способами.

Опишем в общих чертах используемую для этого стандартную экспериментальную процедуру. Смешивают клетки трех разных штаммов. Когда клетки оказываются в непосредственной близости друг от друга, конъюгативная плазмида, которая в данном случае обладает также мобилизационными свойствами, сама переходит в клетку, содержащую мобилизуемый плазмидный вектор, а затем обеспечивает перенос векторной ДНК в реципиентную клетку. В такой системе реализуются все возможные пути переноса, но подобные штаммы и плазмиды обладают такими генетическими свойствами, чтобы можно было отобрать реципиентную клетку, получившую данный плазмидный вектор. Предположим, что мы имеем три штамма: 1) штамм А, который несет конъюгативную мобилизуемую плазмиду, но не может расти на минимальной питательной среде и чувствителен к антибиотику Х; 2) штамм В, который также не может расти на минимальной питательной среде и несет неконъюгативный плазмидный вектор, который имеет ген резистентности<sup>TM</sup> к антибиотику Х; 3) штамм С — реципиентная клетка-мишень, которая может расти на минимальной среде, не имеет несовместимых плазмид и чувствительна к антибиотику Х. После конъюгации клетки непродолжительное время выращивают на полноценной среде без антибиотика Х, а затем переносят их на минимальную среду с антибиотиком. В этих условиях могут расти только реципиентные клетки-мишени, которые приобрели плазмидный вектор. Иногда клетка-мишень получает обе плазмиды, однако этот редкий случай можно выявить, если перенести клетки путем перепечатки на минимальную среду и отобрать трансконъюганты, которые способны расти в присутствии антибиотика Х, но не могут расти при наличии гена резистентности к другому антибиотику (например, к антибиотику Y), который имеется в конъюгативной плазмиде штамма А. Поскольку для переноса плазмидной ДНК должна произойти конъюгация между тремя бактериальными штаммами, эта процедура получила название тройного скрещивания.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Технология рекомбинантных ДНК включает целый набор экспериментальных процедур, благодаря которым удастся выделить (клонировать) фрагменты ДНК, содержащие специфические гены. Успех клонирования зависит от возможности воспроизводимо разрезать молекулу ДНК на фрагменты определенного размера. Для точного расщепления ДНК используют рестрицирующие эндонуклеазы типа II. Эти ферменты узнают специфические нуклеотидные последовательности и симметрично разрезают фосфодиэфирные связи в каждой цепи.

Типичный эксперимент по клонированию генов включает следующие этапы. 1. Рестриктазное расщепление ДНК, выделенной из организма, который содержит искомый ген. 2. Обработка вектора для клонирования (обычно плазмидного), который может реплицироваться в клетке-хозяине, теми же рестриктазами, которые использовались для расщепления донорной ДНК. 3. Смешивание этих двух образцов ДНК и сшивание фрагментов ДНК-лигазой фага T4. 4. Трансформация сшитыми молекулами клеток-хозяев. Амплификация рекомбинантной ДНК в трансформированных клетках.

Для отбора клеток, содержащих рекомбинантную ДНК, используют специальные приемы. Чтобы уменьшить количество кольцевых плазмидных молекул, образующихся при сшивании фрагментов ДНК-лигазой T4, рестрицированную плазмидную ДНК обрабатывают щелочной фосфатазой, удаляющей 5'-концевые фосфатные группы. Для отбора трансформированных клеток, содержащих гибридные плазмиды, проводят: 1) тестирование на резистентность к определенным антибиотикам или колориметрическую реакцию; 2) иммунологические тесты или выявление специфического белка — продукта клонированного гена; 3) гибридизацию с зондом, комплементарным какому-либо участку искомого гена.

Чтобы иметь возможность клонировать целый ген, донорную ДНК расщепляют лишь частично. При этом получают фрагменты разной длины, из которых затем создают геномную библиотеку. Для клонирования крупных фрагментов ДНК были сконструированы векторы на основе бактериофагов  $\lambda$  и P1, а также плазмиды F.

Для получения фрагментов ДНК, кодирующих эукариотические белки, на очищенной мРНК как на матрице синтезируют комплементарную цепь ДНК с помощью обратной транскриптазы; эта цепь в свою очередь используется в качестве матрицы для синтеза второй цепи. После ферментативной обработки эту двухцепочечную комплементарную ДНК встраивают в вектор.

Независимо от того. Какая именно стратегия клонирования используется, после идентификации клонированной последовательности необходимо показать, что она представляет собой нативный структурный ген.

## ЛИТЕРАТУРА

- Berger S. L., A. R. Kimmel** (ed.). 1987. *Methods in Enzymology*, vol. 152. *Guide to Molecular Cloning Techniques*. Academic Press, London, United Kingdom.
- Garfin D. E. 1995. Electrophoretic methods, p. 53-109. In J. A. Glasel and M. P. Deutscher (ed.), *Introduction to Biophysical Methods for Protein and Nucleic Acid Research*. Academic Press, San Diego, Calif.
- Grinstead J., P. M. Bennett** (ed.). 1988. *Methods in Microbiology*, vol. 21, *Plasmid Technology*. Academic Press, London, United Kingdom.
- Ioannou A. P., C. T. Amemiya, J. Games, P. M. Kroisel, H. Shizuya, C. Chen, M. A. Batzer, P. J. de Jong**. 1994. A new bacteriophage-derived vector for the propagation of large human DNA fragments. *Nat. Genet.* 6: 84-89.
- Kim U.-J., B. W. Birren, T. Slepak, V. Mancino, C. Boysen, H.-L. Kang, M. I. Simon, H. Shizuya**. 1996. Construction and characterization of a human bacterial artificial chromosome library. *Genomics* 34: 213—218.
- Leonardo E. D., J. M. Sedivy**. 1990. A new vector for cloning large eukaryotic DNA segments in *Escherichia coli*. *Bio/Technology* 8: 841 —844.
- Martin C., L. Bresnick, R.-R. Juo, J. C. Voyta, L. Bronstein**. 1991. Improved chemiluminescent DNA sequencing, *BtoTechniques* 11: 110-114.
- Old R. W., S. B. Primrose**, 1985. *Principles of Gene Manipulation*, 3rd ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, United Kingdom.
- Sambrook J., E. F. Fritsch, T. Maniatis**. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

**Slightom J. L., R. F. Drong, P. P. Chee.** 1993. Construction of  $\lambda$  clone banks, p. 121—146. In B. R. Click and J. E. Thompson (éd.), *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*. CRC Press, Boca Raton, Fla.

**Southern E.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-507.

**Winnacker E.-L.** 1987. *From Genes to Clones: Introduction to Gene Technology*. VCH, New York, N.Y.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Что такое эндонуклеазы рестрикции типа II и почему они так важны для технологии рекомбинантных ДНК?

2. При обработке кольцевой двухцепочечной плазмиды pCEL1 различными рестриктазами и их комбинациями получают следующие фрагменты (размеры указаны в парах нуклеотидов): EcoRI - 6,0; BamHI - 6,0; HindIII - 6,0; HaeII - 3,0; 2,0 и 1,0; EcoRI и HaeII - 2,0 и 1,0; EcoRI и HindIII - 3,5 и 2,5; EcoRI и BamHI - 4,5 и 1,5; BamHI и HindIII - 5,0 и

1,0; BamHI и HaeII - 3,0; 1,5 и 0,5; HindIII и HaeII — 3,0; 1,5; 1,0 и 0,5. Используя эти данные, постройте рестрикционную карту pCEL1.

3. Опишите применение плазмиды pBR322 в качестве вектора. Какими особенностями она обладает?

4. Опишите основные свойства системы клонирования pUC.

5. Обычно банк клонов создают лигированием плазмидного вектора, подвергнутого исчерпывающему гидролизу с помощью BamHI, с хромосомной ДНК, частично гидролизованной рестриктазой Sau3AI.

а. Почему в этом эксперименте используется два разных фермента?

б. Что такое частичный гидролиз и как его проводят?

в. Почему к нему часто прибегают для создания банков клонов?

6. Зачем рестрицированную плазмидную ДНК перед лигированием часто обрабатывают щелочной фосфатазой?

7. Опишите способы введения рекомбинантных плазмид в грамотрицательную бактерию, например в *E. coli*.

## ГЛАВА 5

# Химический синтез, определение нуклеотидной последовательности и амплификация ДНК

Технологический прогресс в любой области науки всегда стимулирует ее дальнейшее развитие. С появлением новых технологий появляется возможность ставить новые эксперименты и облегчается проведение старых. Становление молекулярной биотехнологии как науки обязано целому ряду технологических разработок; многие из них ныне широко применяются как в крупных исследовательских центрах, так и небольших научных коллективах. Теперь не составляет особого труда химически синтезировать одну молекулу ДНК, определить нуклеотидную последовательность другой и амплифицировать с помощью полимеразной цепной реакции третью. Все это стало возможным благодаря той информации, которая была получена в ходе основополагающих исследований как самой ДНК, так и механизма ее репликации. Эти экспериментальные подходы стали неотъемлемой частью молекулярного клонирования -- процедуры, позволяющей выделять из ДНК нужные фрагменты, охарактеризовывать их и производить с ними разнообразные манипуляции.

### Химический синтез ДНК

С разработкой быстрых и недорогих методов химического синтеза одноцепочечных ДНК-фрагментов с заданной нуклеотидной последовательностью методология молекулярного клонирования и характеристики ДНК существенно изменилась. Химически синтезированные олигонуклеотиды можно использовать для конструирования целых генов или их фрагментов, для амплификации специфических фрагментов ДНК, для направленных мутаций изолированных ДНК, а также в качестве зондов при гибридизации и в качестве линкеров, облегчающих клонирование.

С появлением приборов для автоматического химического синтеза ДНК (ДНК-синтезаторов) получение одноцепочечных олигонуклеотидов длиной <50 звеньев стало более или менее рутинной процедурой. Основным компонентом любого ДНК-синтезатора является система клапанов и насосов, с помощью которых в реакционную смесь по строго заданной программе вводятся нуклеотиды и реагенты, обеспечивающие присоединение нужных мономерных единиц к растущей цепи. В отличие от биологического, в ходе химического синтеза ДНК каждый новый нуклеотид можно присоединять к 5'-гидроксильному концу цепи. Все реакции осуществляются последовательно в одной реакционной колонке, а продолжительность каждой из них и время отмыwania контролируются с помощью компьютера.

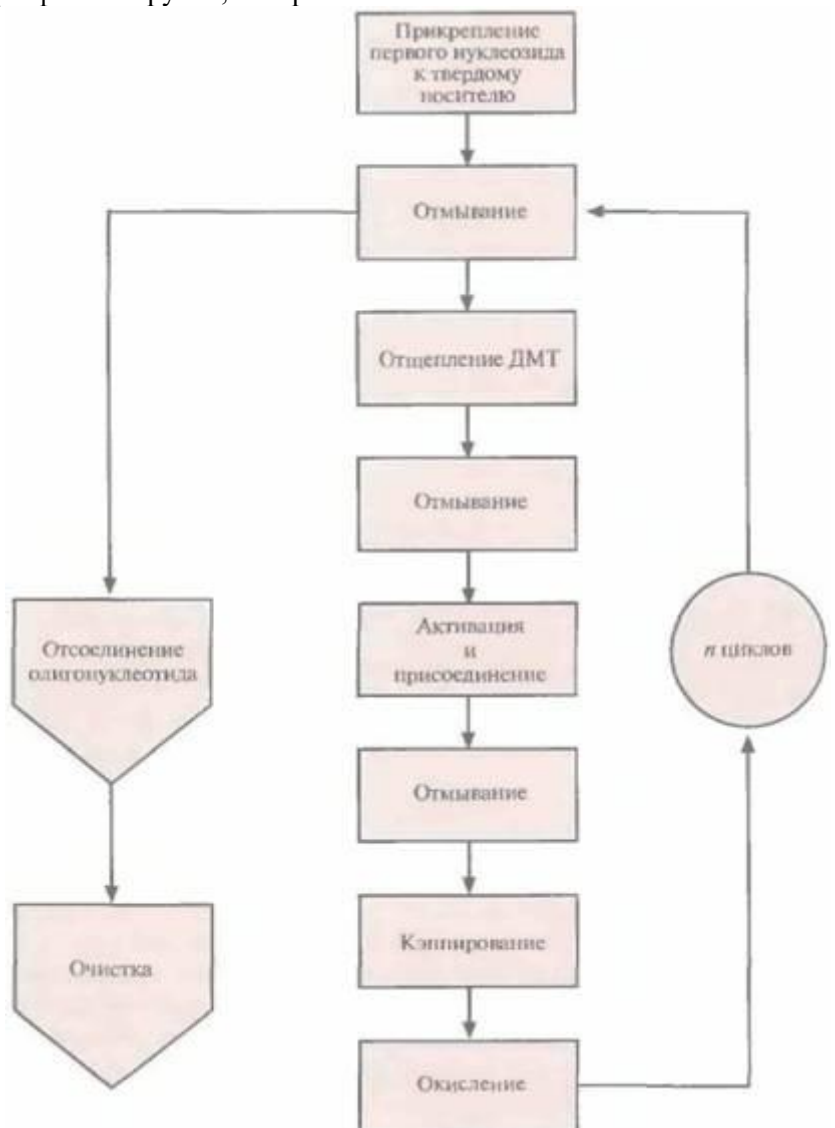
### Фосфорамидитный метод

В настоящее время это наиболее распространенный метод химического синтеза ДНК. Исходными строительными блоками в нем являются модифицированные дезоксирибонуклеозиды. Модификация состоит в присоединении к аминогруппам дезоксиаденозина и дезоксицитидина бензольной группы, а к аминогруппе дезоксигуанозина — изобутирильной. Тимидин, у которого отсутствует аминогруппа, не модифицируют. Такая модификация необходима для защиты нуклеозидов от нежелательных побочных реакций при росте цепи. Синтез осуществляют в

твёрдой фазе (растущая цепь ДНК фиксируется на твёрдом носителе), что позволяет проводить все реакции в одной емкости, легко отмывать после каждого этапа ненужные реагенты и добавлять новые в количестве, обеспечивающем возможно полное протекание реакции.

Этапы многоступенчатого синтеза представлены на рис. 5.1. Первый нуклеозид (азотистое основание + сахар) фиксируют на инертном твёрдом носителе, обычно это пористые стеклянные шарики с порами одинакового размера. 3'-гидроксильная группа первого нуклеозида, который будет 3'-концевым нуклеотидом синтезируемой цепи, прикрепляется к спейсерной молекуле, ковалентно связанной с носителем. Чтобы предотвратить неспецифическое взаимодействие 5'-гидроксильной группы первого нуклеотида до добавления в реакционную смесь второго нуклеотида, ее защищают с помощью диметокситритильной (ДМТ) группы (рис. 5.2). Такую группу содержит каждый присоединяемый к растущей цепи нуклеотид, а кроме того, он несет диизопропиламинную группу, присоединенную к 3'-фосфитной группе, которая в

Рис. 5.1. Химический синтез олигонуклеотида. После  $n$  циклов образуется одноцепочечный фрагмент ДНК из  $n + 1$  нуклеотида.





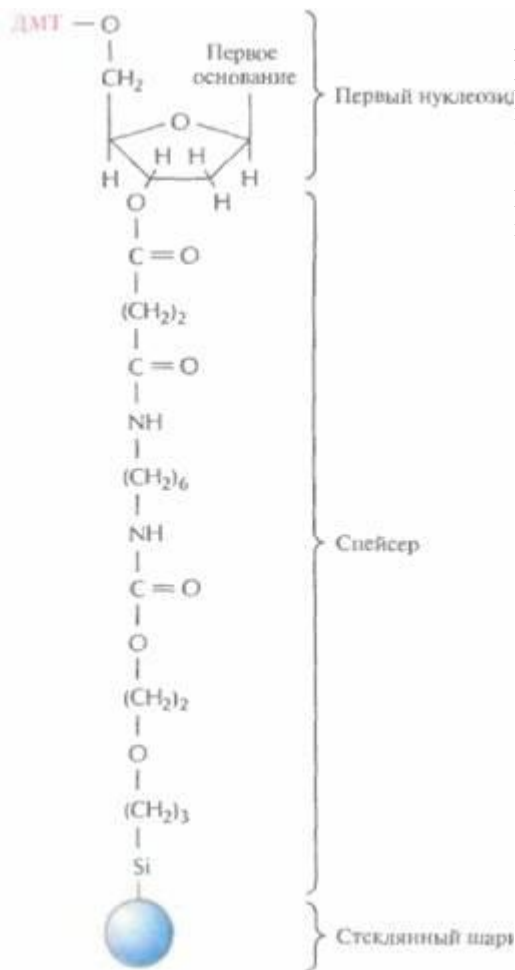


Рис. 5.2. Комплекс, с которого начинается химический синтез цепи ДНК. К 5'-гидроксильной группе дезоксирибозы первого нуклеотида присоединена ди-метокситритильная (ДМТ) группа, а к 3'-гидроксильной группе — спейсерная молекула. Последняя в свою очередь связана с твердым носителем (пористым стеклянным шариком).

свою очередь защищена металльным остатком (рис. 5.3). Такая молекулярная конфигурация и называется фосфорамидитом.

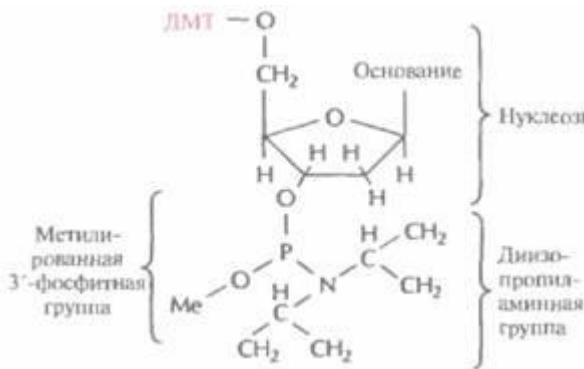


Рис. 5.3. Структурная формула фосфорамидита. Такие производные всех четырех оснований - А, Т, Г и С — используются для химического синтеза ДНК ДМТ — диметокситритил, Me — металльная группа.

Цикл начинается после присоединения первого нуклеотида к стекляному шарикю. Далее колонку обильно промывают каким-либо безводным реагентом (например, ацетонитрилом), чтобы удалить воду и другие нуклеофильные вещества, и продувают через нее аргон для вытеснения ацетонитрила. Затем с помощью трихлоруксусной кислоты (ТХУ) отщепляют 5'-ДМТ (детритилирование) от присоединенного нуклеотида, с тем чтобы высвободить (экспонировать) реакционноспособную 5'-гидроксильную группу (рис. 5.4). Колонку вновь промывают ацетонитрилом для удаления ТХУ и продувают через нее аргон для удаления ацетонитрила. Процесс запрограммирован таким образом, чтобы на втором этапе в колонку одновременно вводились следующий нуклеозид (в виде фосфорамидита) и тетразол (активация и присоединение). Тетразол активирует фосфорамидит, так что 3'-фосфитная группа образует ковалентную связь с 5'-гидроксильной группой первого нуклеотида (рис. 5.5). Невключившийся фосфорамидит и тетразол удаляют продуванием аргона.

Поскольку по окончании первого этапа не все фиксированные на носителе нуклеозиды оказываются связанными с фосфорамидитом, необходимо предотвратить их взаимодействие с нуклеозидом, добавленным на втором этапе. Для этого непрореагировавшую 5'-гидроксильную группу ацетируют с помощью уксусного ангидрида и диметиламинопиридина (кэпирование) (рис. 5.6). Если этого не сделать, то уже после нескольких циклов синтезируемые олигонуклеотиды будут различаться как по длине, так и по нуклеотидной последовательности.

Фосфиттриэфирная связь, образовавшаяся на втором этапе между нуклеотидами, нестабильна и может разорваться в присутствии кис-



Рис. 5.4. Детритилирование — отщепление 5'-диметокситритильной (DMT) группы с помощью трихлоруксусной кислоты (ТХУ).

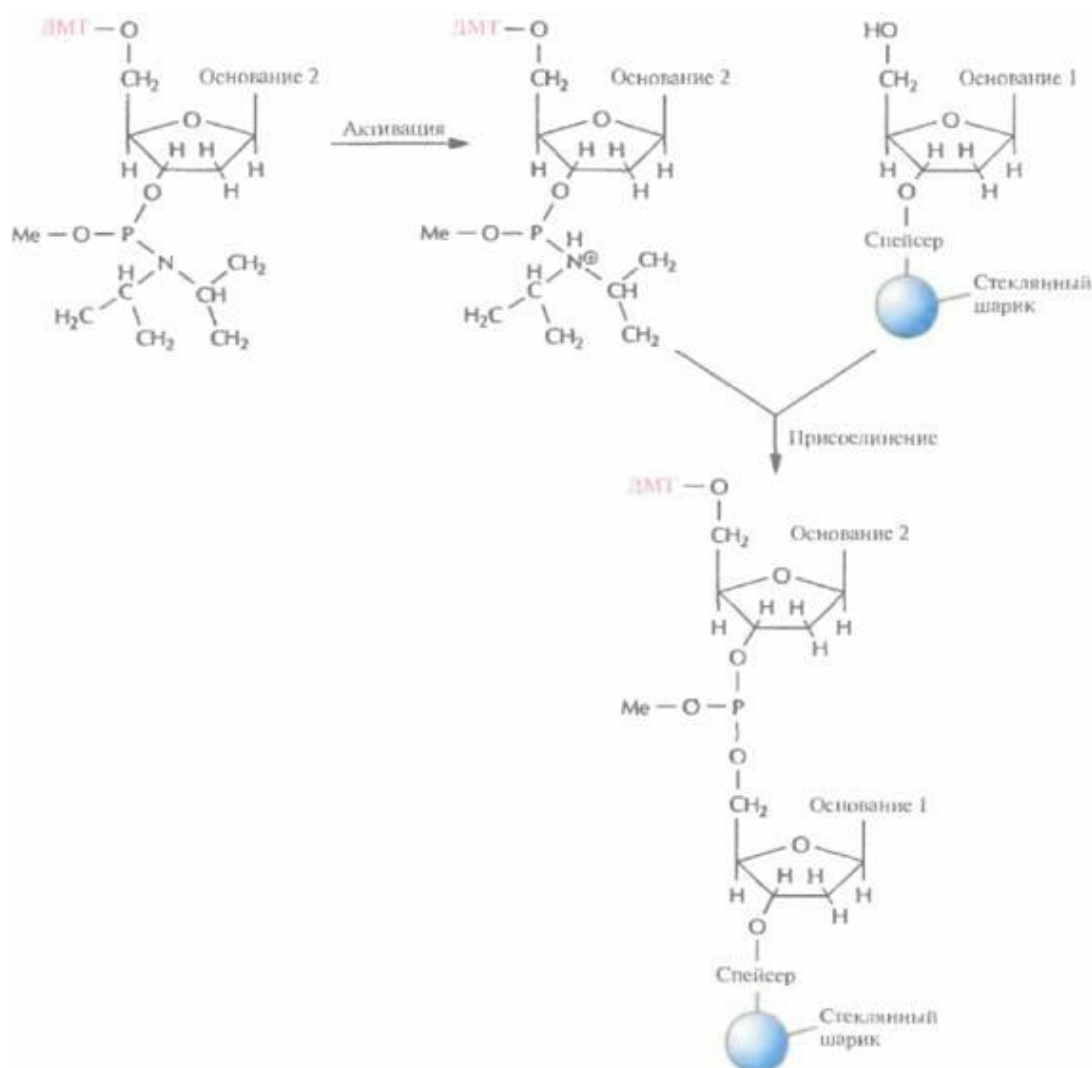


Рис. 5.5. Активация и присоединение, 3'-фосфитная группа активированного фосфорамидита образует ковалентную связь с 5'-гидроксильной группой фиксированного на стеклянном шарике детритилированного нуклеозида. ДMT — диметокситритильная группа, Me - метильная группа.

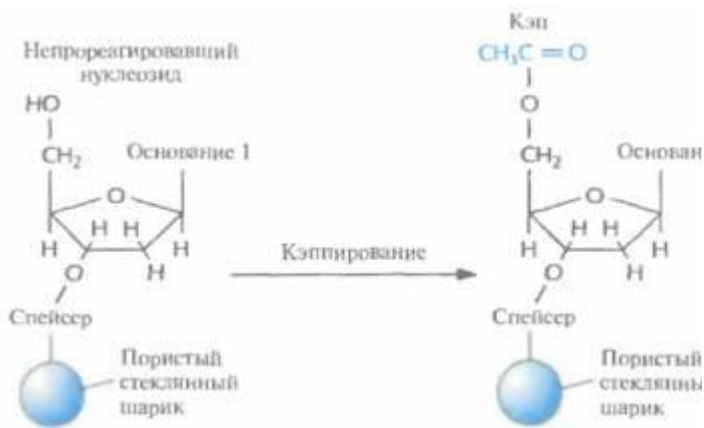


Рис. 5.6. Кэпирование. Свободные 5'-гидроксильные группы непрореагировавших в первом цикле детритилированных нуклеозидов ацетилюют, чтобы предотвратить их участие в следующем цикле.

лоты или щелочи. Поэтому фосфиттриэфир окисляют с помощью йодной смеси до более стабильного пентавалентного фосфаттриэфира (рис. 5.7). Затем промывают колонку и повторяют весь цикл (детритилирование, активация и присоединение, кэпирование, окисление; рис. 5.1). Все описанные операции проводят до тех пор, пока к растущей цепи в соответствии с программой не присоединится последний нуклеозид. Синтезированные олигонуклеотиды связаны со стеклянными шариками; каждый фосфаттриэфир несет метильную группу; каждый гуанин, цитозин и аденин содержит защищенную аминогруппу, а на 5'-конце последнего нуклеотида находится ДМТ - группа.

Метильные группы удаляют с помощью химической обработки непосредственно в реакционной колонке. Затем отсоединяют олигонуклеотиды от спейсерной молекулы вместе с 3'-гидроксильным концом и элюируют их из колонки; далее последовательно удаляют бензоильные, изобутирильные и ДМТ-группы. 5'-конец цепи фосфорилируют ферментативным (полинуклеотидкиназа T4+АТР) или химиче-

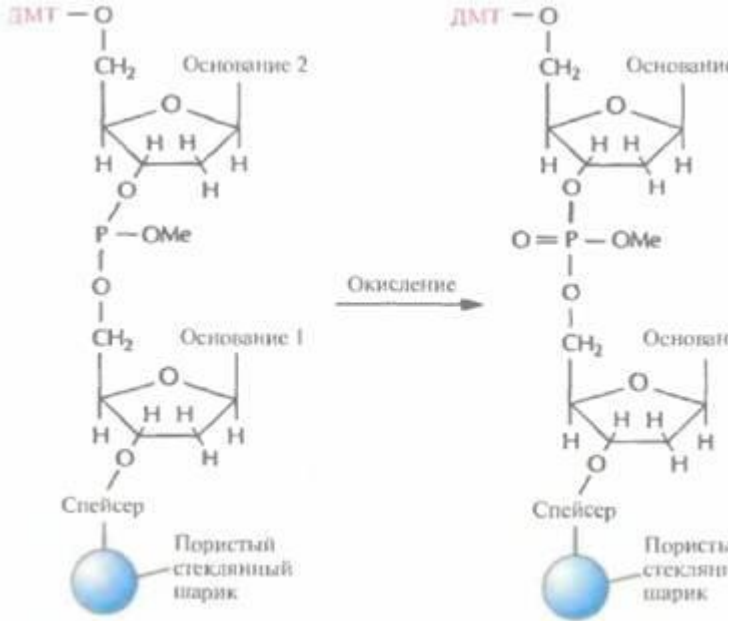


Рис. 5.7. Окисление. Фосфиттриэфир окисляется до пентавалентного фосфаттриэфира, что приводит к стабилизации фосфодиэфирной связи и делает ее более устойчивой к действию кислот и щелочей. ДМТ - диметокситритильная группа, Me — метильная группа.

ским методом. Эту реакцию можно проводить и тогда, когда олигонуклеотид еще связан с носителем, но после детритилирования.

Чтобы выход продукта был достаточно высок, эффективность присоединения нуклеотидов на каждом этапе должна быть не ниже 98%, Эффективность контролируют спектрофотометрическими методами, определяя количество удаляемых тритильных групп. Если, например, при синтезе 20-членного олигонуклеотида эффективность каждого цикла равна 99%, то 82% (т. е.  $0,99^{20} \cdot 100$ ) олигонуклеотидов будут иметь именно такую длину. Если же синтезируется 60-членный олигонуклеотид, то при той же эффективности только 55% олигонуклеотидов будут содержать по 60 нуклеотидов. А если средняя эффективность цикла не превышает 98%, то доля олигонуклеотидов заданной длины будет гораздо ниже (табл. 5.1). Фирмы — изготовители коммерческих ДНК-синтезаторов обычно гарантируют среднее значение эффективности присоединения 98%. Но для этого необходимо использовать реагенты и химикаты очень высокой степени чистоты, что не всегда удастся выполнить. Как правило, реальная эффективность присоединения составляет 95%, хотя иногда удается достичь и 99%-ной эффективности. Чтобы получить олигонуклеотиды заданной длины, первичные продукты большинства химических синтезов необходимо очистить с помощью либо высокоэффективной жидкостной хроматографии под высоким давлением с обращенной фазой, либо электрофореза в полиакриламидном геле. Поскольку все «неудачные» последовательности короче, чем тот олигонуклеотид, который хотят получить, сделать это нетрудно.

Таблица. 5.1. Средний выход олигонуклеотидов заданной длины (л) при разных значениях средней эффективности цикла

| Эффективность, % | Средний выход, % |        |        |        |         |
|------------------|------------------|--------|--------|--------|---------|
|                  | n = 20           | n = 40 | n = 60 | n = 80 | n = 100 |
| 90               | 12               | 1,5    | 0,18   | 0,02   | 0,003   |
| 95               | 36               | 13     | 4,6    | 1,7    | 0,6     |
| 98               | 67               | 45     | 30     | 20     | 13      |
| 99               | 82               | 67     | 55     | 45     | 37      |
| 99,5             | 90               | 82     | 74     | 67     | 61      |

Применение синтезированных олигонуклеотидов

Олигонуклеотиды, синтезированные химическими методами, находят широкое применение в молекулярной биотехнологии. Их используют в качестве зондов при ДНК-гибридизации, линкеров, соединяющих разные молекулы ДНК в экспериментах по клонированию, праймеров при секвенировании ДНК или осуществлении сайт-специфического мутагенеза клонированных генов-мишеней,

1. Нуклеотидную последовательность специфических олигонуклеотидных зондов (длиной 20—40 звеньев) находят из данных об аминокислотной последовательности соответствующих белков.

2. Для получения линкеров синтезируют олигомеры, которые представляют собой палиндромные одноцепочечные нуклеотидные последовательности, спаривающиеся (гибридизующиеся) между собой. Линкеры содержат сайты узнавания для рестрицирующих эндонуклеаз, что позволяет осуществлять с их помощью клонирование фрагментов ДНК (рис. 5.8, А и Б). Короткий дуплекс длиной 6—12 пар нуклеотидов лигируют по тупым концам с ДНК-мишенью (обычно кДНК). Разрезают новую молекулу нужной рестрицирующей эндонуклеазой и получают фрагменты с выступающими одноцепочечными концами (липкими концами), с помощью которых встраивают ДНК-мишень в соответствующий вектор. Прежде чем проводить встраивание, рестрицированную смесь фракционируют для отделения ДНК с липкими концами от лишних линкерных молекул. Вектор тоже обрабатывают рестриктазой, отжигают его с фрагментами ДНК с липкими концами и сшивают с помощью ДНК-лигазы фага Т4. ДНК-мишень не должна содержать сайтов рестрикции, присутствующих в линкерной последовательности, в противном случае она также будет расщепляться ферментом.

3. Один из вариантов линкерных последовательностей, так называемые «адаптеры», час-

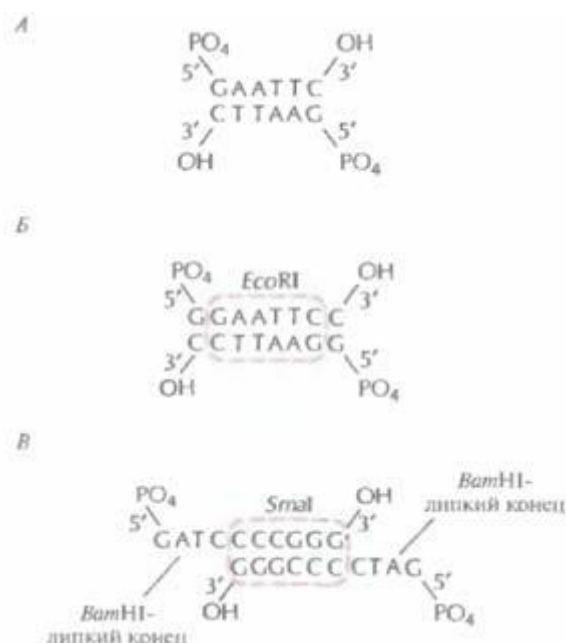


Рис. 5.8. Типичные линкеры и адаптер. А, *Eco*RI-линкер, состоящий из 6 пар нуклеотидов. Б. *Eco*RI-линкер из 8 пар нуклеотидов. В. *Bam*HI-*Sma*I - адаптер с *Bam*HI-липкими концами и сайтом узнавания для *Sma*I.

то содержат сайты для двух и более рестрицирующих эндонуклеаз (рис. 5,8, В). С их помощью можно встраивать кДНК в вектор лигированием по тупым концам, а затем вырезать, используя другую рестриктазу. Адаптор, изображенный на рис. 5,8, В, встраивают в *Bam*HI-сайт вектора перед включением ДНК-мишени в *Sma*I-сайт по тупым концам. После клонирования кДНК вырезают из вектора с помощью рестриктазы *Bam*HI. В этом случае вектор не должен содержать *Sma*I-сайтов, и ни вектор, ни кДНК не должны нести *Bam*HI-сайтов,

4. Одноцепочечные олигонуклеотиды из -17—24 звеньев используют в качестве праймеров при секвенировании ДНК и проведении ПЦР.

5. Одноцепочечные олигонуклеотиды используют в качестве праймеров для сайт-специфического мутагенеза *in vitro*.

6. Необходимость в химическом синтезе нуклеотидной последовательности, кодирующей какой-то конкретный белок, может возникнуть тогда, когда клонирование соответствующего гена затруднено. При этом нуклеотидную последовательность гена находят из данных об аминокислотной последовательности белка. К химическому синтезу прибегают и тогда, когда кодоны, из которых состоит данный ген, плохо считываются организмом-хозяином, и уровень трансляции оказывается очень низким. В таком случае можно синтезировать ген с таким набором кодонов (оптимизация кодонов), при котором аминокислотная последовательность кодируемого белка остается прежней, а кодоны считываются хозяйским организмом более эффективно.

### Синтез генов

Если химически синтезированную двухцепочечную ДНК предполагается использовать в качестве гена или его фрагмента, то каждую из ее цепей синтезируют отдельно. Получить короткие гены (60—80 п. н.) технически несложно: для этого синтезируют комплементарные цепи и затем отжигают их. В случае крупных генов (>300 п. н.) приходится применять специальные стратегии, поскольку эффективность каждого цикла химического синтеза никогда не достигает 100%. Например, если ген состоит из 999 пар нуклеотидов, а эффективность каждого цикла равна 99%, то доля полноразмерных одноцепочечных ДНК по окончании процесса составит не более 0,004%. Чтобы решить эту проблему, синтетические (двухцепочечные) гены собирают из модулей — (одноцепочечных) фрагментов длиной от 20 до 100 нуклеотидов.

Один из способов конструирования синтетического гена заключается в получении набора олигонуклеотидов длиной 20—60 нуклеотидов каждый с перекрывающимися концами. Нуклеотидные последовательности цепей задают так, чтобы после отжига концевые сегменты гена имели тупые концы. Каждый внутренний сегмент имеет выступающие 3'- и 5'-концы, комплементарные таковым соседнего сегмента (рис. 5.9). После сборки гена остается сшить од-

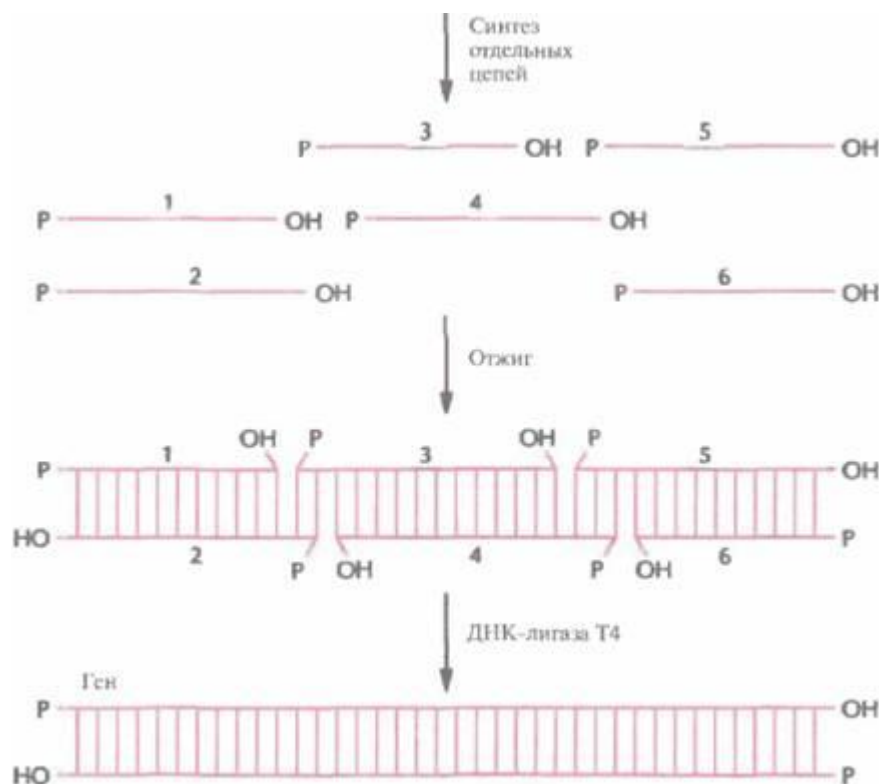


Рис. 5.9. Сборка синтетического гена из коротких олигонуклеотидов. Синтезируют отдельные олигонуклеотиды длиной от 20 до 60 звеньев каждый с такими нуклеотидными последовательностями, чтобы при отжиге из них образовалась двуцепочечная молекула. Оставшиеся одноцепочечные разрывы сшивают с помощью ДНК-лигазы T4.

ноцепочечные разрывы с помощью ДНК-лигазы T4. Синтетические гены могут быть сконструированы так, чтобы помимо белок-кодирующих последовательностей они содержали концевые участки, обеспечивающие их встраивание в клонирующий вектор (сайты для рестрицирующих эндонуклеаз), а также, если это необходимо, сигнальные последовательности для правильной инициации и терминции транскрипции и трансляции.

Для получения полноразмерных генов другим способом тоже вначале синтезируют специфический набор перекрывающихся олигонуклеотидов длиной от 40 до 100 звеньев. При их отжиге происходит спаривание 6—10 3'- и 5'-концевых взаимно комплементарных нуклеотидов, а между ними остаются большие бреши. Протяженность спаренных участков достаточно велика, чтобы стабилизировать всю структуру. Бреши заполняют ферментативным путем с помощью ДНК-полимеразы I *Escherichia coli*, использующей 3'-гидроксильные группы для инициации репликации и одноцепочечные участки в качестве матрицы. Оставшиеся одноцепочечные разрывы сшивают с помощью ДНК-лигазы T4 (рис. 5.10).

Более протяженные гены (>1000 п. н.) обычно собирают из двухцепочечных фрагментов, каждый из которых в свою очередь состоит из 4-6 перекрывающихся олигонуклеотидов (от 20 до 60 п. н, каждый). Если после синтеза и отжига образуется достаточное количество фрагментов, то их просто соединяют друг с другом. В противном случае каждый фрагмент клонируют и амплифицируют. Двуцепочечные фрагменты последовательно соединяют друг с другом до образования полноразмерного гена. Чтобы гарантировать

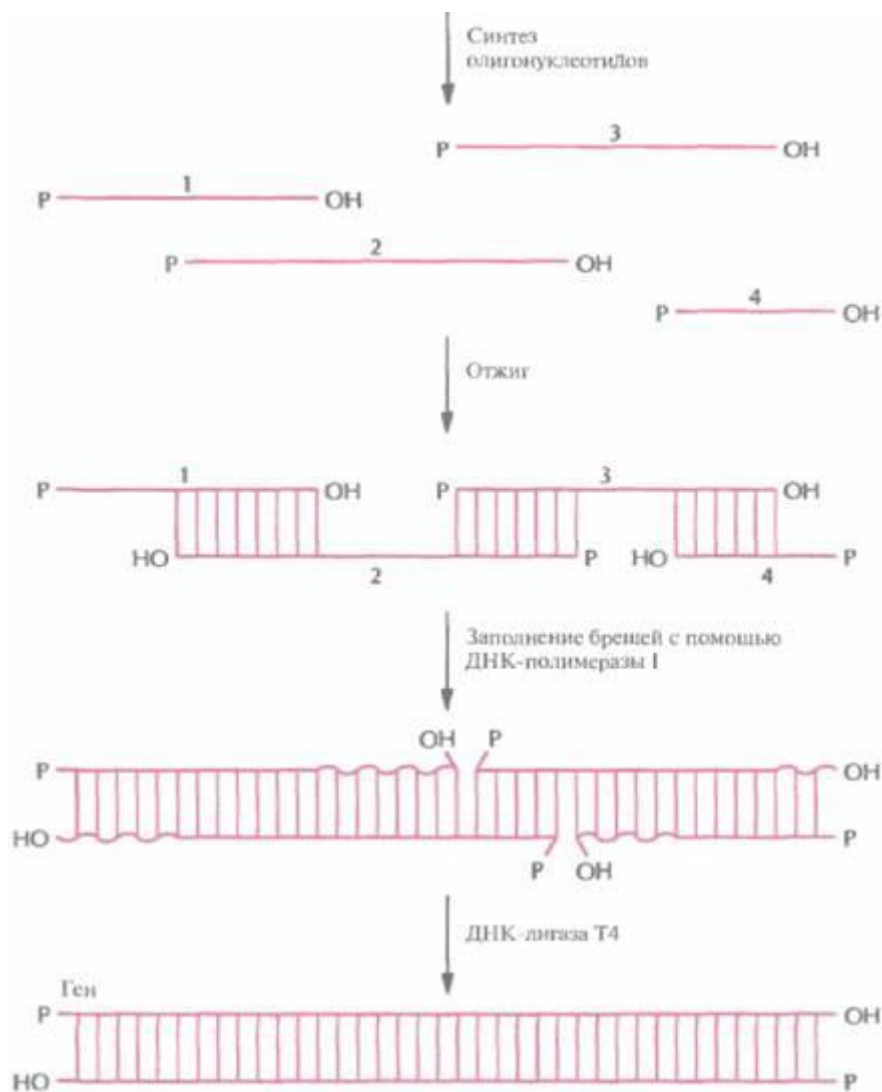


Рис. 5.10. Сборка протяженного гена *in vitro* с участием ферментов. Вначале химическими методами синтезируют отдельные олигонуклеотиды с такими нуклеотидными последовательностями, чтобы при отжиге между ними образовывались спаренные участки длиной 6—10 пар нуклеотидов. Оставшиеся между ними бреши заполняют с помощью ДНК-полимеразы I *E. coli*, а одноцепочечные разрывы сшивают ДНК-лигазой T4.

правильность нуклеотидной последовательности химически синтезированного гена, секвенируют каждый двухцепочечный фрагмент, а затем и весь ген.

## Методы секвенирования ДНК

Исчерпывающую информацию о молекуле ДНК можно получить, только определив ее нуклеотидную последовательность. Так, секвенировав ген, часто удается установить его функцию, сравнив его нуклеотидную последовательность с таковыми для генов, функция которых уже известна. Без данных о нуклеотидной последовательности невозможно проводить исследования по молекулярному клонированию. Секвенирование того или иного фрагмента ДНК можно провести либо химическим методом, разработанным А. Максамом и В. Гилбертом, либо ферментативным, предложенным Ф. Сангером, но в



ВАЖНАЯ ВЕХА

Секвенирование ДНК с помощью терминирующих дидезоксинуклеотидов

F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467, 1977

Специфическая ферментативная амплификация ДНК in vitro: полимеразная цепная реакция

K. B. Mullis, F. A. Faloona, S. J. Scharf, R. K. Saiki, G. T. Horn, H. A. Erlich Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51: 263-273, 1986

Создание новых методов раньше секвенирование создана система — это необходимая нуклеиновых кислот сводилось к клонирования на основе фага предпосылка развития любой определению нуклеотидных M13. Возможность прямого отрасли науки. Они последовательностей РНК. Для секвенирования ДНК позволяют получать этого нужный фрагмент ДНК произвела настоящую недоступную прежде сначала транскрибировали в революцию в исследовании информацию, что в свою РНК с помощью РНК-пол молекулярных основ очередь приводит к более имеразы, а затем определяли различных болезней человека и глубокому пониманию сути нуклеотидную в разработке методов их наблюдаемых явлений и последовательность последней. диагностики и лечения. стимулирует дальнейшие Процедура была весьма сложной Огромное влияние на многие исследования, порождающие и длительной и состояла в области исследований, в том новые открытия. Что касается следующем: радиоактивно числе и на молекулярную молекулярной биотехнологии, меченную РНК обрабатывали биотехнологию, оказала то ее основой стали такие различными рибонуклеазами, разработка метода ПЦР (Kary мощные методы, как затем осуществляли Mullis; U.S. patent 4,683,202), секвенирование ДНК и ПЦР. хроматографическое разделение С возможностью получения Определение нуклеотидной образовавшихся продуктов, больших количеств ДНК последовательности ДНК повторно обрабатывали их амплификацией сегментов методом ферментативного ферментами, проводили клонированной или геномной копирования с остановкой щелочной гидролиз продуктов ДНК была решена проблема удлинения цепи, второго расщепления, клонирования ДНК-копий осуществляемого ДНК- осуществляли редких молекул мРНК, полимеразой, — быстрый, хроматографическое скрининга геномных относительно простой, разделение продуктов библиотек, выявления генных недорогой и надежный метод. гидролиза, определяли мутаций, физического Помимо того что очередность олигонуклеотидов, картирования хромосом и т. д. нуклеотидная основываясь на перекрывании Первым практически последовательность их концевых участков, и применением ПЦР было фрагмента ДНК является его воссоздавали исходную создание тест-системы для исчерпывающей молекулу. С появлением диагностики характеристикой на дидезокси-метода эта процедура серповидноклеточной анемии молекулярном уровне, она практически перестала (Saiki et al., Science 230: 1350-1354, 1985). ПЦР — это позволяет также использоваться. Теперь 1354, 1985). ПЦР — это идентифицировать его секвенируют не саму РНК, а уникальная методика, равных кодирующую область, ДНК, синтезированную на которой нет среди других подобрать потенциальные РНК как на матрице с помощью хорошо известных методов. праймеры для ПЦР, выявить обратной транскриптазы, и Начиная с 1986 г. с ее мутационные изменения в применяют не метод Максама и помощью выполнено более 10 г. До появления в 1977 г. Гилберта, а метод Сангера, 000 исследований, и несмотря дидезоксиметода Сангера для появившийся после того, как на их огромное разнообразие, секвенирования ДНК была перспективы использования использовали метод сайт- ПЦР представляются еще более специфического химического расщепления цепы (A. M. Maxani, W. Gilbert, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 560-564, 1977). А еще

настоящее время наиболее широко используется так называемый дидезоксинуклеотидный метод.

Дидезоксинуклеотидный метод секвенирования ДНК

Дидезоксинуклеотид — это полученный искусственным путем нуклеотид, лишенный 2'- и 3'-гидроксильных групп при углеродных атомах сахарного кольца (рис. 5.11, А). У дезоксинуклеотида, входящего в норме в состав ДНК, отсутствует только 2'-гидроксильная группа (рис. 5.11,Б). Удлинение цепи во время репликации ДНК происходит в результате присоединения очередного нуклеозидтрифосфата к 3'-гидроксильной груп-



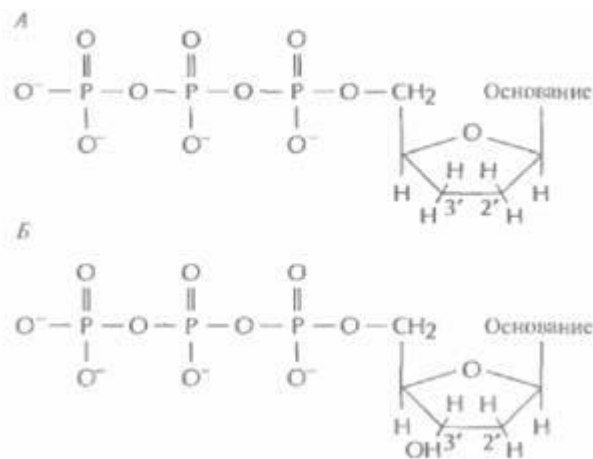


Рис. 5.11. А. Дидезоксинуклеотид (отсутствуют 2'- и 3'-гидроксильные группы в кольце). Б. Дезоксинуклеотид (отсутствует только 2'-гидроксильная группа).

не последнего нуклеотида растущей цепи (рис. 5.12). И если таким очередным присоединяемым звеном является Дидезоксинуклеотид, то синтез ДНК останавливается, поскольку следующий нуклеотид не может образовать фосфодиэфирную связь (рис. 5.13). Остановка синтеза ДНК — это ключевой этап дидезоксиметода, но чтобы осуществить секвенирование в полном объеме, необходимо выполнить целый ряд условий.

Первый шаг стандартной процедуры дидезоксисеквенирования состоит в гибридизации синтетического олигонуклеотида длиной 17—20 звеньев со специфическим участком одной из цепей клонирующего вектора, соседствующим со вставкой. Этот олигонуклеотид является праймером, поставляющим 3'-гидроксильную группу для инициации синтеза. Раствор с праймером распределяют по четырем пробиркам, в каждой из которых находятся четыре дезоксинуклеотида, dATP, dCTP, dGTP и dTTP (один из них — изотопно меченный), и один из четырех дидезоксинуклеотидов (ddATP, ddCTP, ddGTP или ddTTP). Концентрацию каждого дидезоксинуклеотида подбирают таким образом, чтобы он оказался включенным по всем позициям в смеси растущих цепей, а не только в первой встретившейся ему позиции. (Напомним, что после присоединения дидезоксинуклеотида рост цепи сразу останавливается,

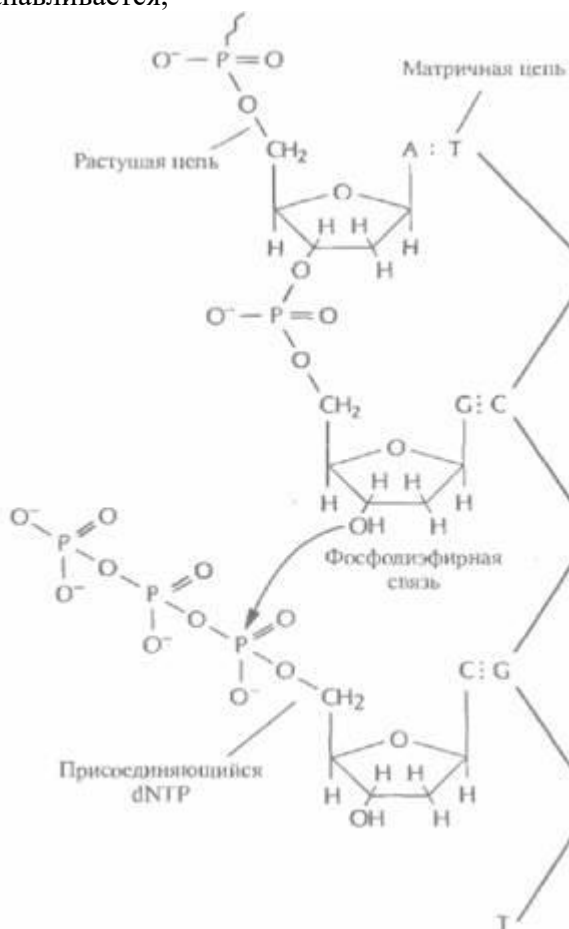


Рис. 5.12. Синтез ДНК в обычных условиях. Очередной дезоксирибонуклеотид (дезоксирибонуклеозидтрифосфат; dNTP) спаривается с комплементарным нуклеотидом матричной цепи. Между 3'-гидроксильной группой последнего нуклеотида в растущей цепи и α-фосфатной группой присоединяемого нуклеотида образуется фосфодиэфирная связь.

поэтому каждая цепь оканчивается 3'-дидезоксинуклеотидом.) По окончании ферментативного синтеза при участии ДНК-полимеразы в каждой пробирке оказывается уникальный набор олигонуклеотидов, каждый из которых содержит праймерную последовательность (рис. 5.14).

Далее в пробирки добавляют формамид, чтобы обеспечить расхождение цепей, и проводят электрофорез в полиакриламидном геле на четырех дорожках (по числу пробирок). Это поз-

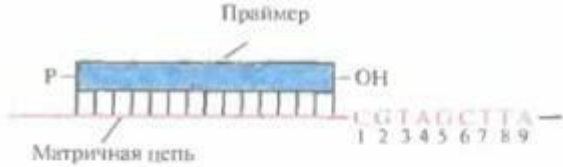


Рис. 5.13. Остановка синтеза ДНК после присоединения дидезоксинуклеотида к концу растущей цепи. Фоофодиэфирная связь между концевым дидезоксинуклеотидом и следующим нуклеотидом не может образоваться из-за отсутствия 3'-гидроксильной группы.

воляет разделить одноцепочечные фрагменты ДНК, даже если они различаются по длине всего на один нуклеотид. На радиоавтографе обнаруживается набор полос, отвечающих меченым фрагментам ДНК, сопоставление которых позволяет прямо «прочитать» нуклеотидную последовательность секвенируемого сегмента ДНК. В примере, приведенном на рис. 5.15, первые шесть нуклеотидов этого сегмента, начиная с 5'-конца, — это AGCTGC. Самая «быстрая» полоса (радиоактивно меченный фрагмент в самом низу геля) соответствует самому короткому фрагменту и находится в дорожке ddATP; следующие полосы располагаются соответственно в дорожках ddGTP, ddCTP, ddTTP и т. д. На большинстве радиоавтографов четко различаются от 250 до 350 полос. Праймерная последовательность находится на фиксированном расстоянии (10—20 нуклеотидов) оттого сайта, по которому встроена клонированная ДНК, что позволяет легко распознать начало клонированного фрагмента.

Секвенирование ДНК с помощью вектора на основе фага M13

Для определения нуклеотидной последовательности клонированных ДНК используются разные подходы. Один из первых основывался на



| Реакционная смесь     | Праймер и длина достроенной последовательности | Праймер и достроенная последовательность |
|-----------------------|--|--|
| ddATP+<br>четыре dNTP | Праймер +3                                     | Праймер-dGdCddA                          |
|                       | Праймер +7                                     | Праймер-dGdCdAdTdCdGddA                  |
|                       | Праймер +8                                     | Праймер-dGdCdAdTdCdGdAddA                |
| ddCTP+<br>четыре dNTP | Праймер +2                                     | Праймер-dGddC                            |
|                       | Праймер +5                                     | Праймер-dGdCdAdTddC                      |
| ddGTP+<br>четыре dNTP | Праймер +1                                     | Праймер-ddG                              |
|                       | Праймер +6                                     | Праймер-dGdCdAdTdCdGddG                  |
| ddTTP+<br>четыре dNTP | Праймер +4                                     | Праймер-dGdCdAddT                        |
|                       | Праймер +9                                     | Праймер-dGdCdAdTdCdGdAdAdA               |

Рис. 5.14. Удлинение праймера при синтезе цепи в присутствии дидезоксинуклеотидов. В каждой из четырех пробирок образуется уникальный набор олигонуклеотидов разной длины, включающих праймерную последовательность. При этом образуется и какое-то число полноразмерных молекул ДНК. dNTP — дезоксинуклеозидтрифосфат



Рис. 5.15. Схематическое изображение радиоавтографа, получающегося при секвенировании ДНК с помощью дидезокси-метода. В каждую из лунок вносили содержимое одной из четырех пробирок, в которых находился один из дидезоксинуклеотидов: ddATP, ddCTP, ddGTP или ddTTP. Нуклеотидная последовательность считывается с радиоавтографа снизу вверх. На рисунке она приведена справа.

применении фага M13 *E. coli* в качестве вектора. ДНК этого фага представляет собой одноцепочечную кольцевую молекулу. Когда им инфицируют *E. coli*, сначала образуется двухцепочечная репликативная форма фаговой ДНК, а одноцепочечные кольцевые молекулы, которые затем упаковываются в вирионы, синтезируются на этой двухцепочечной молекуле как на матрице. Клетки, инфицированные M13, не подвергаются лизису; в них непрерывно образуются новые одноцепочечные молекулы ДНК M13, которые, проходя через клеточную мембрану, одеваются белковой оболочкой и выходят в окружающую среду. ДНК M13 содержит несущественную часть, которую можно заменить нужным фрагментом ДНК; при этом инфекционность рекомбинантных вирусных частиц сохранится. МП-система имеет следующие преимущества: выделенная двухцепочечная репликативная форма может функционировать как плаزمид, а одноцепочечная фаговая ДНК — использоваться в качестве матрицы для секвенирования ДНК.

Все это позволяет использовать фаг M13 как комбинированную систему для клонирования и секвенирования ДНК. Обычно нужный фрагмент ДНК длиной примерно 500 п. н. встраивают в полилинкер, который является частью клонированного в РФ-ДНК фага M13 модифицированного гена *lacZ'*. Рекомбинантной вирусной ДНК трансформируют компетентные клетки *E. coli* и высевают их на чашки со средой, содержащей субстрат X-Gal. При его гидролизе β-галактозидазой образуется продукт, имеющий синюю окраску. На чашках появляются белые (бесцветные) и синие колонии. Первые отвечают клеткам, инфицированным фагом M13 со вставкой, нарушившей рамку считывания гена *lacZ'*, вторые — клеткам, инфицированным фагом M13 с функциональным геном *lacZ'*, не несущим вставки. Из белых колоний выделяют фаговые частицы, а из них — одноцепочечную ДНК со вставкой (рис. 5.16). Для секвенирования последней отжигают выделенную ДНК с праймером, который гибридизуется с последовательностью вблизи вставки, затем проводят дидезокси-секвенирование, электрофорез и радиоавтографию и «прочитывают» нуклеотидную последовательность вставки.

Для секвенирования крупных фрагментов ДНК (примерно 2000 п. н.) используют другие стратегии. Одна из них состоит в следующем. Встраивают этот фрагмент в соответствующий плазмидный вектор и строят его подробную рестрикционную карту. Идентифицируют перекрывающиеся фрагменты вставки длиной от 100 до 500 п. н., субклонируют каждый из них в ДНК M13, секвенируют и воссоздают нуклеотидную последовательность всего исходного фрагмента. Чтобы быть уверенным в правильности полученного результата и идентификации какого-либо нуклеотида, необходимо секвенировать обе цепи по несколько раз. Секвенирование обеих цепей облегчается тем, что каждый из субклонированных фрагментов исходной ДНК может быть встроен в ДНК M13 в противоположных

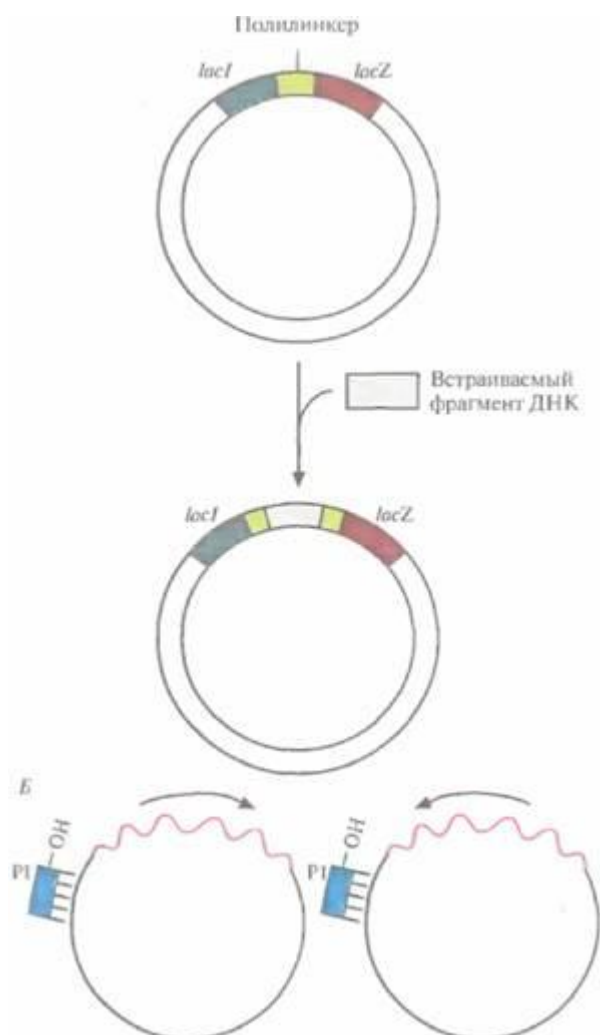


Рис. 5.16. Использование бактериофага M13 для клонирования и секвенирования. А. Встраивание фрагмента ДНК в двухцепочечную репликативную форму ДНК M13. Б. Секвенирование комплементарных цепей клонированного фрагмента ДНК с помощью одного и того же праймера (P1). Стрелками показана ориентация вставки в векторе.

ориентациях. В результате в одном случае праймер будет инициировать синтез первой цепи, а в другом — второй.

### **Праймер-опосредованная прогулка («Блуждающая заправка»)**

Для секвенирования очень длинных фрагментов ДНК (>5000 п. н.) описанный выше подход уже не может быть использован, поскольку число КПЗ-векторов, содержащих перекрывающиеся субклонированные последовательности, значительно увеличивается. Чтобы решить эту задачу, были разработаны методы секвенирования двухцепочечных плазмидных ДНК, не требующие субклонирования. Плазмидную ДНК, содержащую нужную вставку, выделяют и отжигают с синтетическим олигонуклеотидным праймером, который гибридизуется с последовательностью в одной из цепей векторной ДНК, находящейся вблизи вставки. Затем осуществляют дидезокси-секвенирование, позволяющее идентифицировать первые 250—350 нуклеотидов вставки. Исходя из этих данных синтезируют второй олигонуклеотидный праймер, комплементарный сегменту вставки, отстоящему примерно на 300 нуклеотидов от места связывания первого праймера, и секвенируют следующие 250—350 нуклеотидов. Аналогичным образом синтезируют третий праймер и определяют нуклеотидную последовательность следующих 250—350 нуклеотидов (рис. 5.17). Эту процедуру, называемую праймер-опосредованной прогулкой, продолжают до тех пор, пока не секвенируют весь фрагмент. Аналогичным образом секвенируют вторую цепь, начиная с праймера, который гибридизуется с этой цепью вблизи вставки.

К сожалению, в результате ошибочного спаривания праймера заданной длины с более чем одним участком внутри вставки могут быть получены неоднозначные результаты. Чтобы избежать этого, используют праймеры длиной не менее 24 нуклеотидов и стараются строго соблюдать условия отжига. Именно таким образом были секвенированы фрагменты ДНК, клонированные в бактериофаге  $\lambda$  (~20 т. п. н.) или в космидном векторе (~40 т. п. н.).

Некоторые этапы этого процесса недавно были автоматизированы. Это позволило проводить рутинное секвенирование фрагментов длиной несколько десятков тысяч пар нуклеотидов. Во многих случаях праймеры, добавляемые в реакционную смесь в разных пробирках, метят различными флуоресцентными красителями с разной длиной волны флуоресценции. Затем содержимое всех четырех пробирок соединяют и проводят электрофорез на одной дорожке. Дорожку сканируют в луче лазера и регистрируют

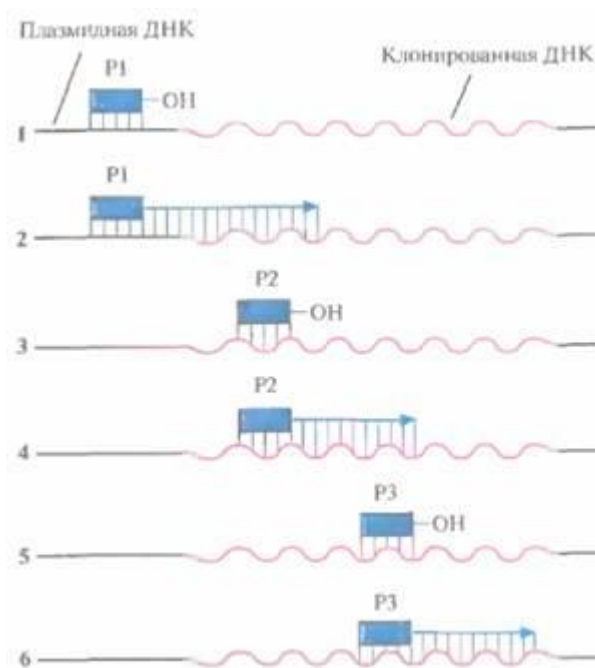


Рис. 5.17. Секвенирование ДНК методом праймер-опосредованной прогулки. 1. Инициация синтеза цепи ДНК с помощью праймера (P1), комплементарного участку плазмиды, находящемуся вблизи вставки. 2. Секвенирование фрагмента клонированной ДНК длиной 250-350 нуклеотидов. 3. Подбор второго праймера, комплементарного концевому участку уже секвенированной последовательности длиной примерно 20 нуклеотидов. 4. Секвенирование следующего сегмента клонированной ДНК с помощью второго праймера (P2). 5. Подбор третьего праймера, комплементарного концевому участку этого сегмента размером 20 нуклеотидов. 6. Третий праймер (P3) используется для секвенирования следующего сегмента клонированной ДНК. Эту процедуру продолжают до тех пор, пока не будет секвенирована вся вставка.

положение каждой флуоресцирующей полосы. Все данные вводят в компьютер, который сопоставляет их и выводит на дисплей нуклеотидную последовательность,

## Полимеразная цепная реакция

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — это эффективный способ получения *in vitro* большого числа копий специфических нуклеотидных последовательностей. Их амплификация — иногда в миллионы раз — осуществляется в ходе трехэтапного циклического процесса. Для ПЦР необходимы: 1) два синтетических олигонуклеотидных праймера (длиной примерно по 20 нуклеотидов), комплементарные участкам ДНК из противоположных цепей, фланкирующим последовательность-мишень; их 3'-гидроксильные концы после отжига с ДНК должны быть ориентированы навстречу друг другу; 2) ДНК-мишень длиной от 100 до - 35 000 п. н.; 3) термостабильная ДНК-полимераза, которая не теряет своей активности при температуре 95° и выше; 4) четыре дезоксирибонуклеотида.

Типичная ПЦР-амплификация состоит в многократном повторении следующих трех реакций.

1. *Денатурация*. Первый этап ПЦР состоит в тепловой денатурации образца ДНК выдерживанием его при температуре 95 °С в течение по крайней мере ) мин. Помимо ДНК, в реакционной смеси содержатся в избытке два праймера, термостабильная ДНК-полимераза *Taq*, выделенная из бактерий *Thermus aquaticus*, и четыре дезоксирибонуклеотида.

2. *Ренатурация*. Температуру смеси медленно понижают до ~55 °С, при этом праймеры спариваются с комплементарными последовательностями ДНК.

3. *Синтез*. Температуру повышают до ~75 °С - величины, оптимальной для ДНК-полимеразы *Taq*. Начинается синтез комплементарной цепи ДНК, иницируемый 3'-гидроксильной группой праймера (рис. 5.18),

Все реакции проводят в пробирках, погруженных в термостат. Смена температурного режима и его поддержание осуществляются автоматически. Каждый цикл обычно длится 3—5 мин.

Чтобы понять, как именно происходит амплификация определенного сегмента ДНК в ходе ПЦР, нужно четко представлять положение всех праймеров и комплементарных им последователь-

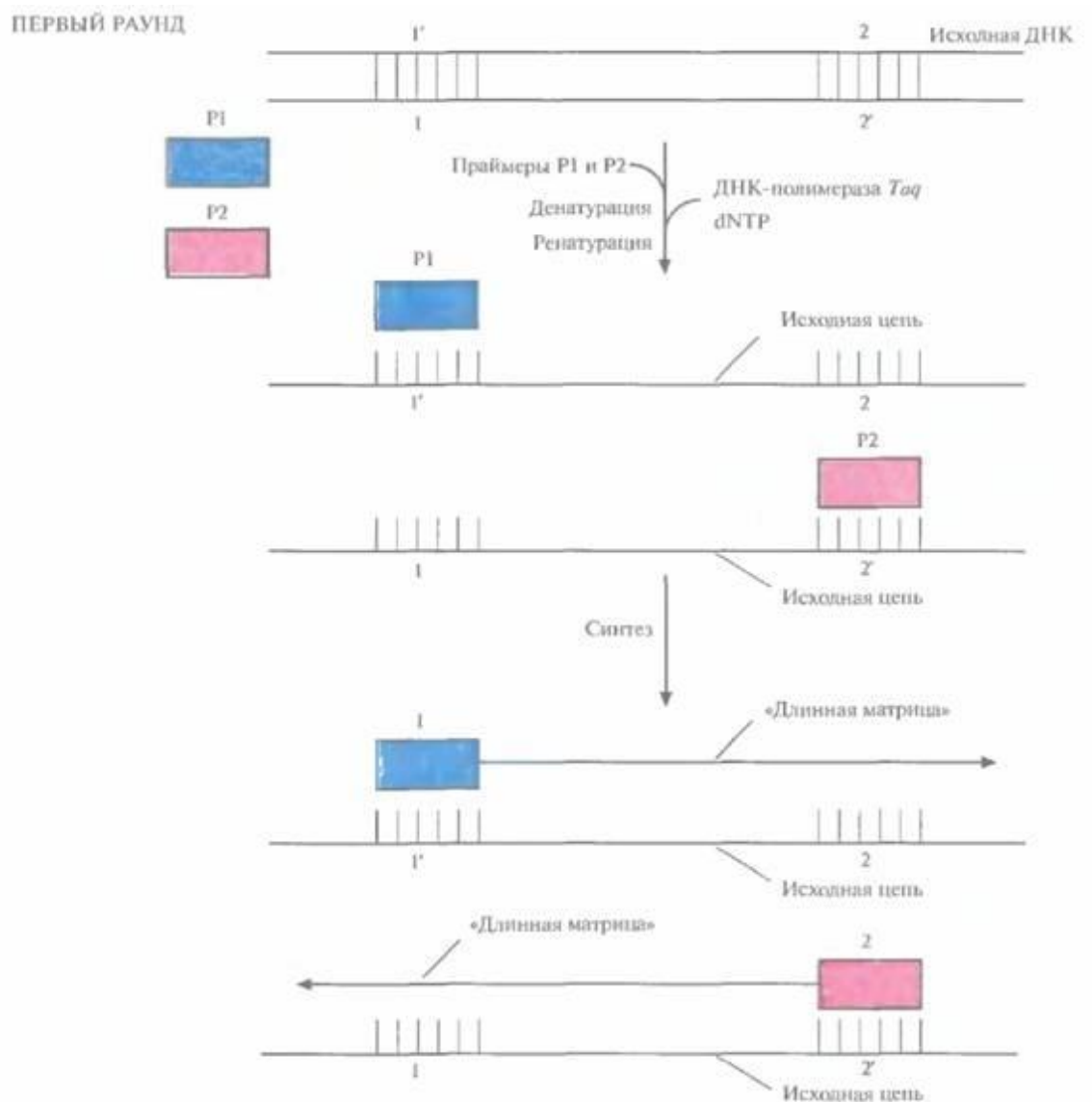


Рис. 5.18. Первый раунд ПЦР. ДНК-мишень фланкирована последовательностями 1'—2 в одной цепи и последовательностями 1—2' — в другой. К образцу ДНК добавляют праймеры (P1 и P2), ДНК-полимеразу *Taq* и четыре дезоксирибонуклеозидтри фосфата (dNTP). Смесь нагревают до 95 °С, инкубируют в течение 1 мин и медленно охлаждают до 55 °С. При этой температуре праймеры, добавленные в избытке, спариваются с разделенными цепями. Повышают температуру до 75 °С. В этих условиях происходит синтез обеих цепей ДНК, начинающийся с 3'-гидроксильных концов праймеров. Каждая из синтезированных цепей имеет гораздо большую длину, чем расстояние от 3'-гидроксильной группы «ее» праймера до конечного нуклеотида последовательности, комплементарной второму праймеру. Эти цепи служат матрицами во втором раунде ПЦР.

ностей в амплифицируемых цепях в каждом раунде. В первом раунде каждая из новосинтезированных цепей имеет гораздо большую длину, чем расстояние от 3'-гидроксильной группы «ее» праймера до конечного нуклеотида последовательности, комплементарной второму праймеру. Такие цепи называют «длинными матрицами», именно на них будет идти дальнейший синтез (рис. 5.18).



## ВТОРОЙ РАУНД

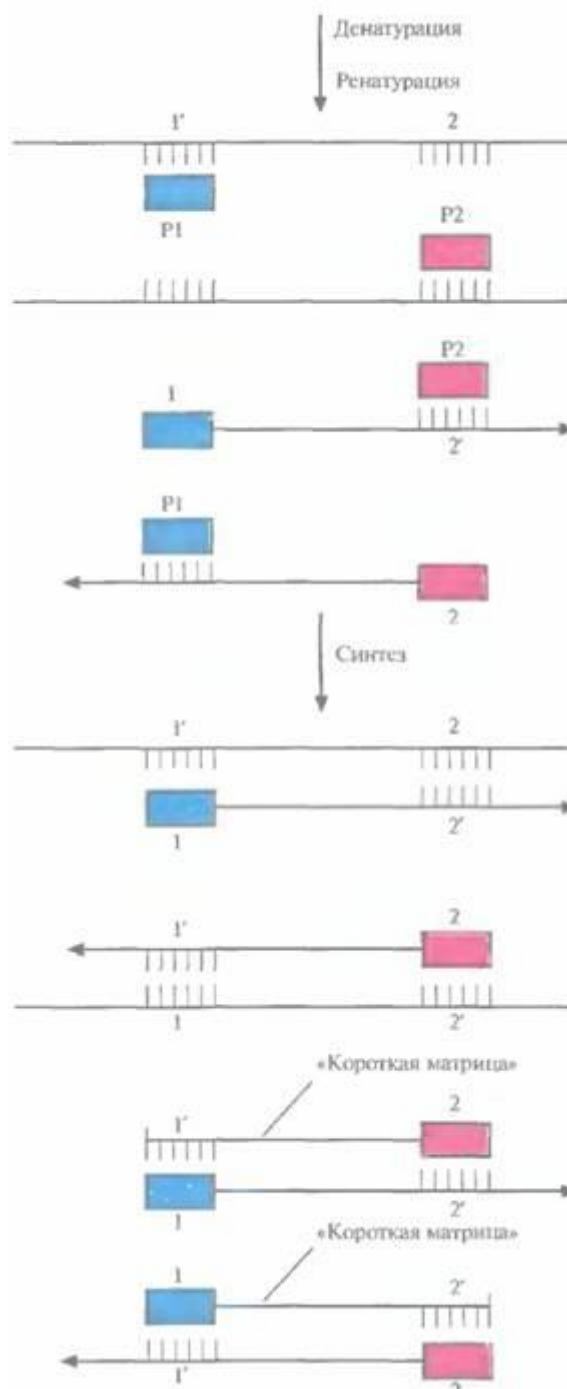


Рис. 5.19. Второй раунд ПЦР. Исходным материалом в этом случае является смесь молекул ДНК, образовавшихся в первом раунде (рис. 5.18). При отжиге праймеры гибридизуются с комплементарными им участками как исходных цепей, так и «длинных матриц», синтезированных в первом раунде. В результате ферментативного синтеза *in vitro* на исходных цепях синтезируются «длинные матрицы», а на «длинных матрицах» — «короткие». Последние начинаются с одного праймера, а заканчиваются последовательностью, комплементарной второму праймеру.

Во втором раунде двухцепочечную ДНК, состоящую из исходной и новосинтезированной («длинная матрица») цепей, опять подвергают денатурации, а затем отжигают с праймерами. Во время синтеза в этом раунде вновь синтезируются «длинные матрицы», а также некоторое количество цепей с праймером на одном конце и с последовательностью, комплементарной второму праймеру, на другом («короткие матрицы») (рис. 5.19). Во время третьего раунда все гетеродуплексы, образовавшиеся ранее, одновременно подвергаются денатурации и отжигу с праймерами, а затем реплицируются (рис. 5.20). В последующих раундах «коротких матриц» становится все больше, и к 30-му раунду их число уже в  $10^6$  раз превышает число исходных цепей или «длинных» матриц (рис. 5.21).

Метод ПЦР получил широкое распространение. Разнообразные случаи его применения мы рассмотрим в последующих главах. Здесь упомянем лишь некоторые из них. Один из важнейших - идентификация патогенных микроорганизмов, возбудителей заболеваний человека, животных и растений. С появлением ПЦР отпала необходимость в выделении и очистке ДНК-мишени; для анализа можно использовать очень небольшое количество неочищенного материала. Для синтеза праймеров, специфичных в отношении исключительно ДНК-мишени, нужно знать нуклеотидную последовательность ДНК предполагаемого патогенного микроорганизма. В этом случае в ходе ПЦР будет амплифицироваться только фрагмент ДНК, длина которого равна суммарной длине двух праймеров и фрагмента ДНК между ними.

ПЦР — высокочувствительный метод, поэтому при наличии в исследуемом образце даже ничтожного количества ДНК, случайно попавшей



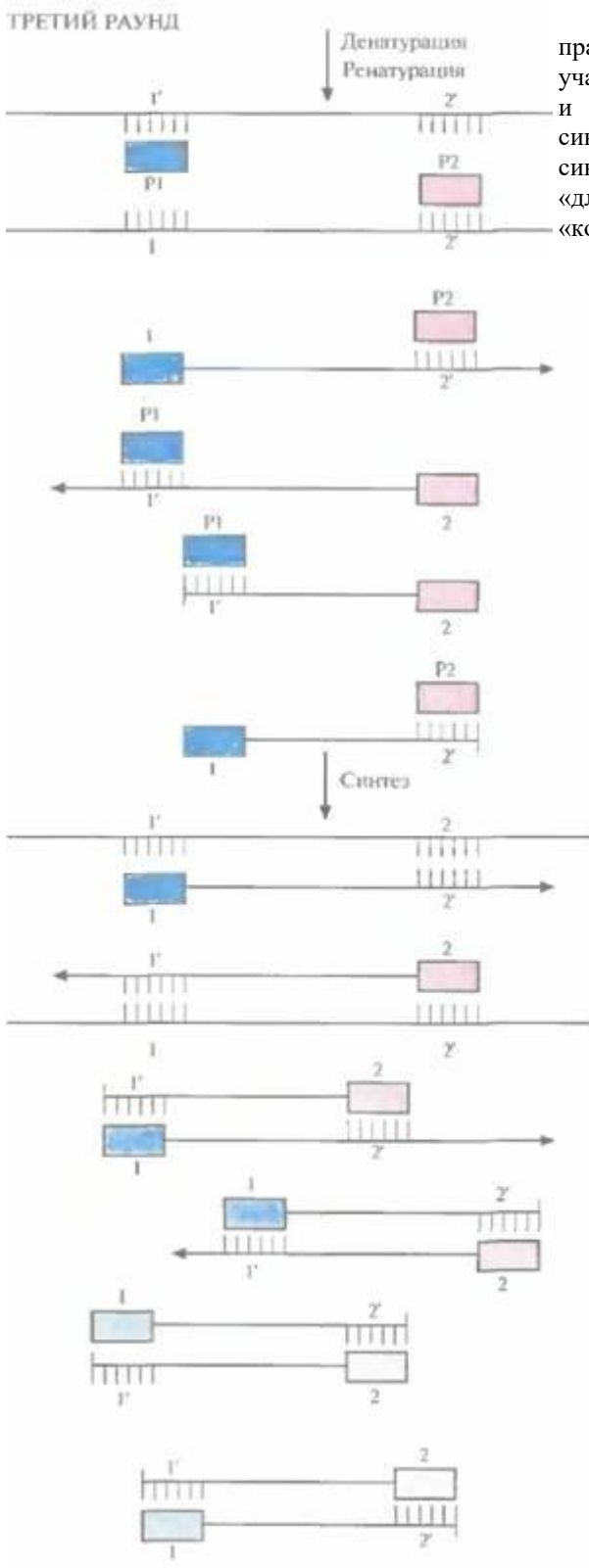


Рис. 5.20. Третий раунд ПЦР. При отжиге праймеры гибридизуются с комплементарными участками исходных цепей, а также «длинных» и «коротких» матриц. При ферментативном синтезе *in vitro* на исходных цепях синтезируются «длинные» матрицы, а на «длинных» и «коротких» матрицах — только «короткие матрицы».

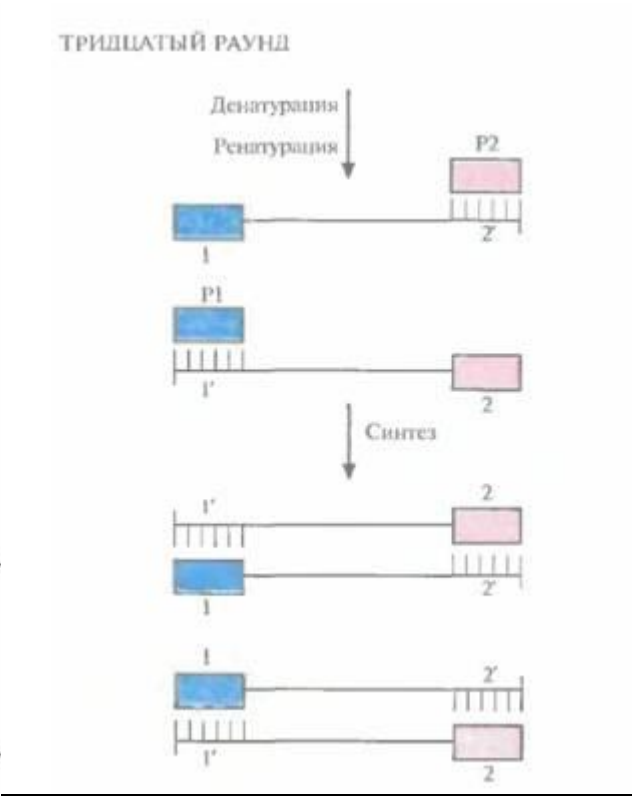


Рис. 5.21. Тридцатый раунд ПЦР. На этом этапе в реакционной смеси содержатся практически одни «короткие матрицы».

из одной реакционной смеси в другую, могут быть получены ложноположительные результаты. Это заставляет тщательно контролировать все используемые для ПЦР растворы и посуду. Метод ПЦР применяется также для выявления спонтанных мутаций, внесения специфических мутаций *in vitro*, сборки полноразмерных генов из синтетических олигонуклеотидов, секвенирования ДНК. Во многих случаях возникает необходимость в клонировании ПЦР-продукта. Однако прямое клонирование с помощью лигирования по тупым концам затруднено, по-

сколько полимеразы *Tag* присоединяет к 3'-концу синтезируемой цепи лишний адениннуклеотид, что снижает эффективность лигирования. Но если вектор для клонирования обработать рестрицирующей нуклеазой с образованием новых тупых концов и затем проинкубировать с полимеразой *Taq* в присутствии dTTP, то к обоим 3'-концам фрагментов добавится по одному тимидиннуклеотиду. Взаимной комплементарности концевых участков вектора и ПЦР-продукта протяженностью в один-единственный нуклеотид оказывается достаточно для спаривания молекул и их последующего лигирования.

**Получение с помощью ПЦР кДНК, отвечающих концам молекул мРНК**

С помощью ПЦР можно получать комплементарные ДНК (кДНК), отвечающие 3'- или 5'-концевым участкам специфических информационных РНК (мРНК). Для обозначения этого метода используется сокращение RACE — от англ. *rapid amplification of c DNA ends* (быстрая

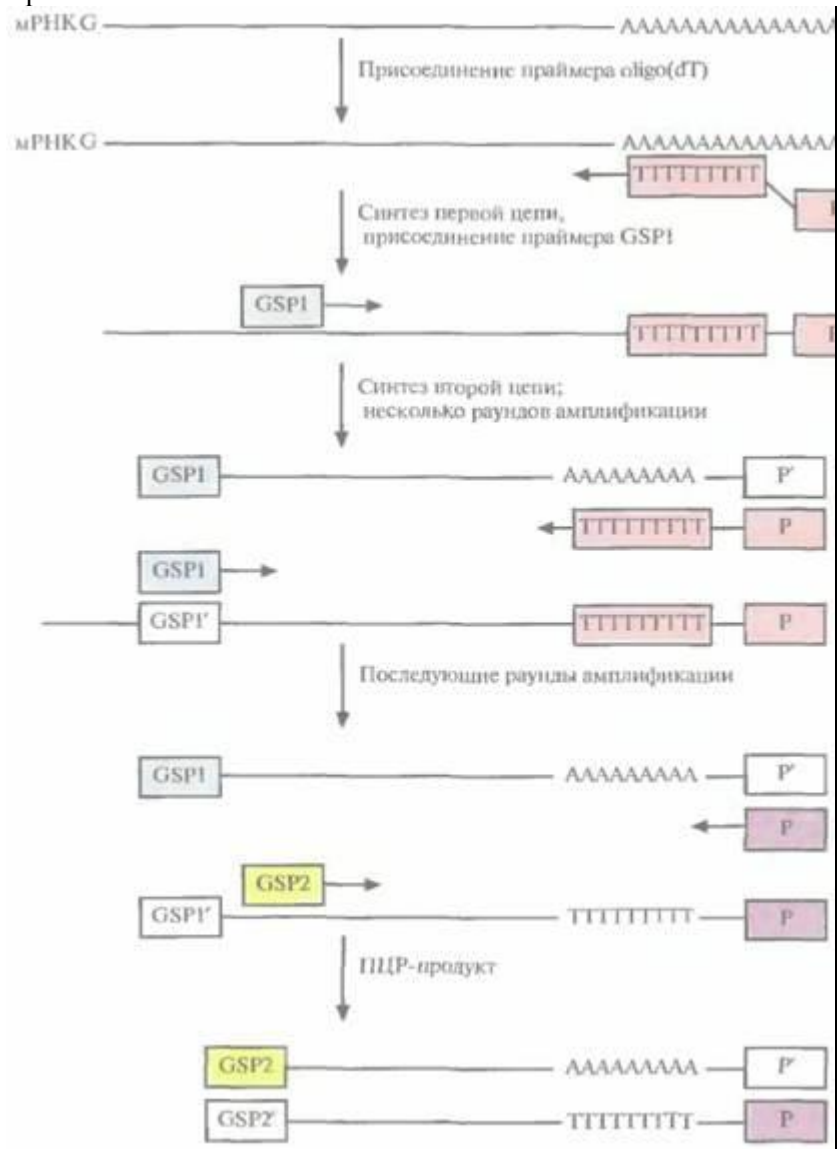
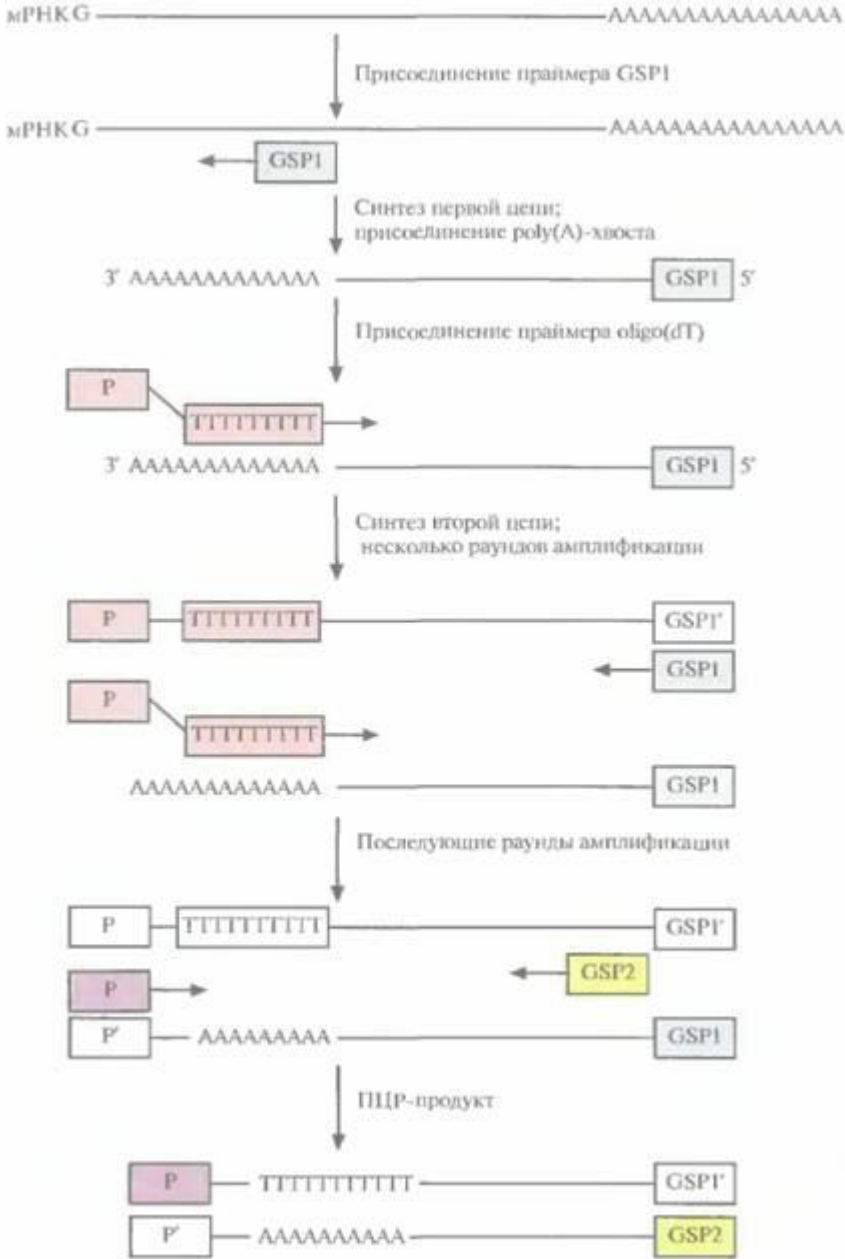


Рис. 5.22. ПЦР-амплификация кДНК, комплементарной 3'-концевой части мРНК. Первая цепь кДНК образуется в результате обратной транскрипции мРНК при участии oligo(dT) в качестве праймера. Вторая цепь синтезируется на первой цепи как на матрице с помощью полимеразы *Tag* и ген специфического праймера (GSP1). В последующих раундах ПЦР используются праймеры GSP2 и P.

амплификация концов кДНК). Обозначения 3' RACE и 5' RACE относятся к амплификации кДНК, отвечающих соответствующим концам мРНК. В обоих случаях для проведения ПЦР-амплификации нужно знать нуклеотидную последовательность кодирующей области мРНК-мишени, чтобы синтезировать генспецифичный праймер (GSP). В случае 3' RACE праймером для синтеза первой цепи кДНК служит oligo(dT) с присоединенным к нему вторым праймером (P) (рис. 5.22). Oligo(dT) спаривается с poly(A)-хвостом мРНК, и обратная транскриптаза синтезирует цепь, комплементарную мРНК. Вторая цепь кДНК синтезируется на первой при участии GSP, комплементарного кодирующей области данной мРНК, с помощью полимеразы

Рис. 5.23. ПЦР-амплификация кДНК, комплементарной 5'-концевой части мРНК первой цепи, осуществляемая обратной транскриптазой, иницируется праймером GSP. Затем к этой цепи с помощью концевой дезоксинуклеотидилтрансферазы присоединяется poly(A)-хвост. Для синтеза второй цепи в качестве праймера используется oligo(dT). Проводят несколько раундов амплификации при участии указанных праймеров, добавляют вторые праймеры (GSP2 и P) и получают кДНК, отвечающую 5'-концу мРНК.



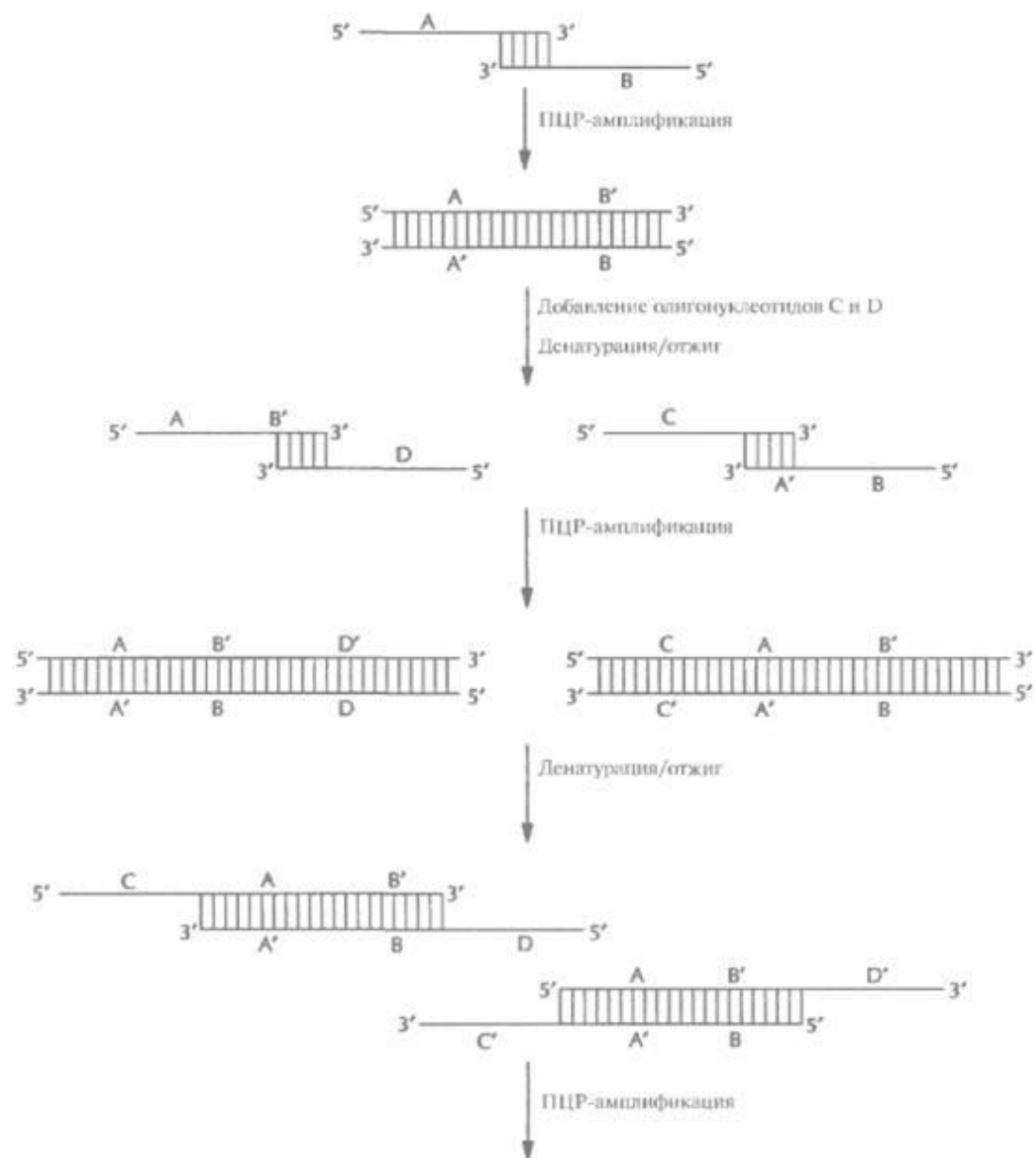


Рис. 5.24. Синтез генов с помощью ПЦР. Перекрывающиеся олигонуклеотиды (А и В) отжигают и достраивают образовавшийся дуплекс с заглубленными 3'-гидроксильными концами. Двухцепочечные молекулы денатурируют, добавляют в реакционную смесь вторую пару олигонуклеотидов (С и D), перекрывающихся с продуктами первого раунда ПЦР, и отжигают. Осуществляют второй раунд ПЦР, добавляют следующую пару олигонуклеотидов (Е и F), осуществляют третий раунд ПЦР и т. д. В результате образуется двухцепочечная ДНК, идентичная искомому гену. Одинаковыми буквами со штрихом или без (А' и А, В и В' и т. д.) обозначены комплементарные участки ДНК. Нуклеотидная последовательность каждого олигонуклеотида соответствует таковой определенных сегментов ДНК.

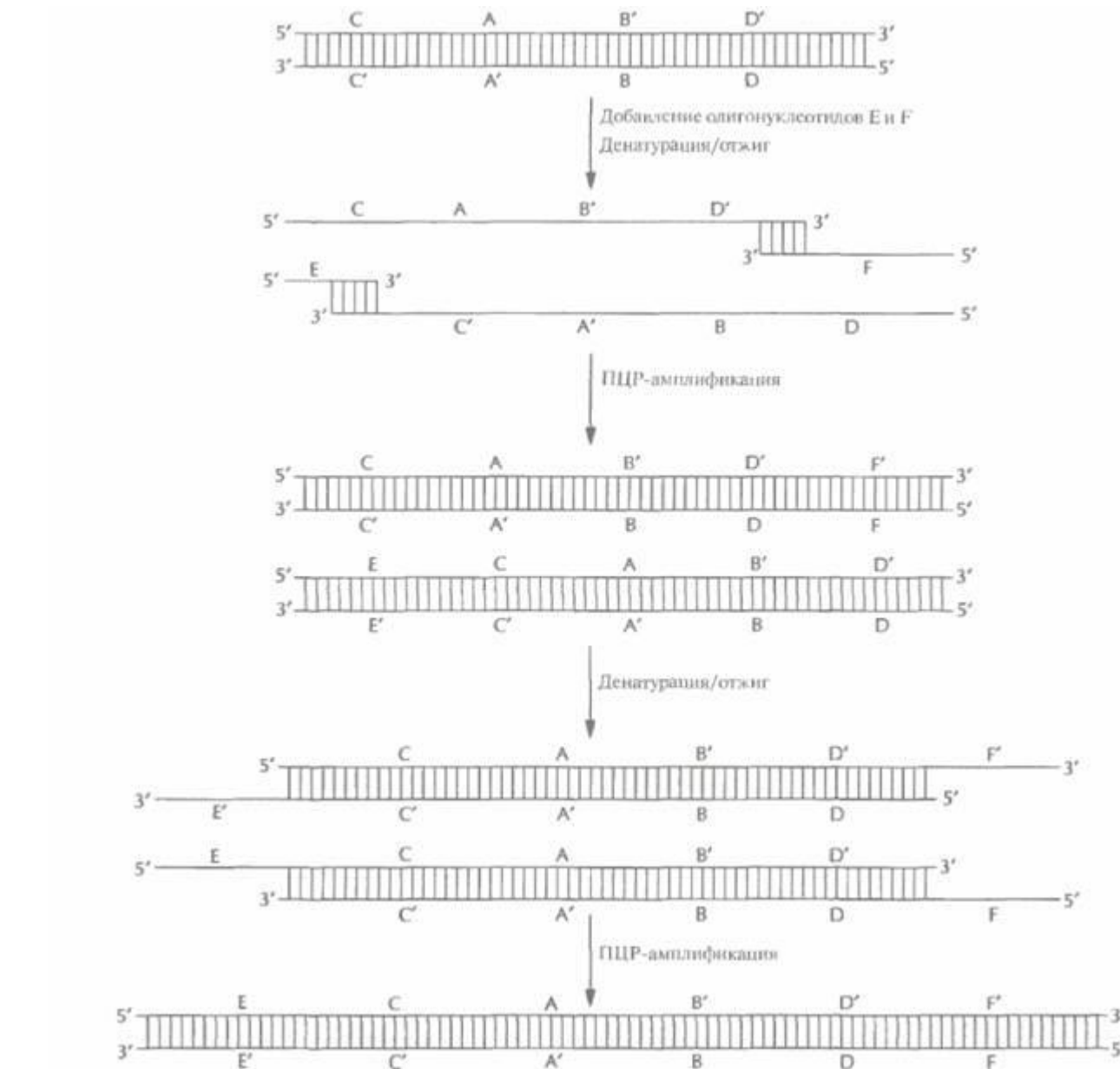


Рис. 5.24. (Продолжение)

*Tag.* По завершении нескольких раундов ПЦР, в которых использовались указанные выше праймеры, добавляют вторую пару праймеров, которые связываются по соседству с двумя первыми. Такие тесно расположенные праймеры называются внутренними. Вторая пара праймеров необходима, поскольку без них нельзя амплифицировать полноразмерную молекулу-мишень. Конечным ПЦР-продуктом является кДНК, соответствующая 3'-концу искомой мРНК.

В случае 5'RACE праймером для синтеза первой цепи кДНК служит GSP (рис. 5.23). Новосинтезированную цепь обрабатывают концевой дезоксинуклеотидилтрансферазой в присутст-

вии dATP. Этот фермент случайным образом присоединяет дезосирибонуклеотиды к 3'-концу цепи. Поскольку в данном случае в реакционной смеси присутствует только dATP, на этом конце появляется цепочка адениновых остатков — poly(A)-хвост. С ним спаривается праймер P-oligo(dT), инициирующий синтез второй цепи. Проводят ограниченное число раундов ПЦР с указанными праймерами, а затем добавляют вторые праймеры и амплифицируют кДНК, отвечающую 5'-концу мРНК.

RACE-метод широко применяется по ряду причин. Обычно бывает очень трудно обнаружить кДНК, соответствующую мРНК, которая присутствует в данной ткани в маленькой концентрации. С помощью RACE-метода можно быстро получить кДНК, отвечающие концевым участкам этой мРНК, и при необходимости использовать их в качестве зондов для скрининга кДНК- и геномных библиотек. Кроме того, поскольку неполноразмерные 3'-концевые фрагменты кДНК значительно преобладают над полноразмерными, 5'RACE может восполнить недостающие 5'-концевые сегменты.

### **Синтез генов с помощью ПЦР**

Получение генов с помощью ПЦР — гораздо более быстрый и экономичный метод, чем тот, который основан на отжиге олигонуклеотидов с перекрывающимися концами, заполнении брешей с помощью ДНК-полимеразы и сшивании разрывов ДНК-лигазой. В одной из методик конструирование гена начинается с отжига двух перекрывающихся олигонуклеотидов (А и В), отвечающих центральной части гена (рис. 5.24). После отжига образуется дуплекс с заглубленными 3'-гидроксильными группами, служащими точками инициации синтеза комплементарных цепей при ПЦР. Затем в реакционную смесь добавляют еще два олигонуклеотида, С и D. 3'-конец олигонуклеотида С идентичен 5'-концу олигонуклеотида А, а сам этот олигонуклеотид отвечает участку конструируемого гена, непосредственно примыкающему к его центральной части слева. Аналогично, 3'-конец олигонуклеотида D идентичен 5'-концу олигонуклеотида В и отвечает участку гена, примыкающему к его центральной части справа. После денатурации смеси и отжига образуются дуплексы с протяженными выступающими одноцепочечными сегментами, достраиваемыми с 3'-концов. В ходе последующих раундов ПЦР образуется двухцепочечный продукт, состоящий из указанных выше сегментов, расположенных в порядке CABD. Молекула ДНК с заглубленными 5'-концами не достраивается.

На следующем этапе в реакционную смесь добавляют еще два олигонуклеотида, Е и F. 3'-конец олигонуклеотида Е идентичен 5'-концу олигонуклеотида С, а сам он отвечает участку реконструируемого гена, примыкающему слева к сегменту С. Аналогичными свойствами обладает олигонуклеотид F, если его соотносить с олигонуклеотидом D. После денатурации и ренатурации смеси образовавшиеся дуплексы с выступающими одноцепочечными участками достраиваются с 3'-гидроксильных концов. В ходе последующих раундов ПЦР образуется двухцепочечный продукт ECABDF.

Следующие пары олигонуклеотидов — один «достраивающий» ген слева, другой справа — последовательно добавляют в смесь до тех пор, пока не будет синтезирован весь ген. Длина этих олигонуклеотидов обычно бывает равна 50 звеньям. Каждый «блок» ПЦР состоит из двадцати 4-минутных раундов. Для синтеза гена длиной 1000 п. н. нужно 10 «блоков», так что ген можно получить в течение одного дня. При этом, как и в случае синтеза генов другими методами, последнюю пару нуклеотидов (т. е. 5'- и 3'-концы) можно снабдить дополнительными последовательностями, фланкирующими кодирующий участок и облегчающими последующее встраивание гена в вектор.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

К числу наиболее важных для молекулярной биотехнологии методов, помимо клонирования генов, относятся методы химического синтеза ДНК, секвенирование ДНК и полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Целью химического синтеза является получение одноцепочечных молекул ДНК *in vitro*. Успеха здесь можно достичь только при высокой эффективности образования фосфодиэфирных связей. В противном случае по окончании



процесса будет получено очень небольшое число молекул нужного размера. Длина синтезированных *in vitro* молекул обычно составляет 20-30 нуклеотидов и редко превышает 100 нуклеотидов. Для получения двухцепочечных молекул комплементарные цепи синтезируют по отдельности и затем проводят отжиг. Полученную таким способом ДНК используют в качестве зондов для скрининга геномных библиотек; в качестве линкеров и адаптеров при клонировании генов; для мутагенеза *in vitro*; для конструирования генов с целью последующего клонирования.

Очень часто для решения биотехнологических и некоторых других задач бывает необходимо знать полную нуклеотидную последовательность клонированного гена. Для секвенирования используют несколько методов; один из них — дидезокси-метод, разработанный Сангером и др. В его основе лежит остановка синтеза цепи после присоединения к ней дидезоксинуклеотида. У такого нуклеотида отсутствует 3'-гидроксильная группа, и дальнейший рост цепи становится невозможным. Для секвенирования в разных пробирках одновременно проводят четыре реакции синтеза ДНК, каждая — в присутствии одного из четырех дидезоксинуклеотидов. Продукты реакций разделяют с помощью гель-электрофореза, проводят радиоавтографию и «считывают» с радиоавтографа нуклеотидную последовательность синтезированного фрагмента ДНК.

Для секвенирования используют также систему на основе фага M13. В ДНК фага встраивают фрагмент ДНК длиной до 500 нуклеотидов, который хотят секвенировать. Эту рекомбинантную ДНК легко получить в одноцепочечной форме и использовать ее в качестве матрицы для секвенирования вставки. Можно использовать также двухцепочечные плазмиды, содержащие клонированную ДНК.

Для определения нуклеотидной последовательности протяженных клонированных сегментов сначала подбирают синтетический олигонуклеотидный праймер, комплементарный участку, соседствующему со вставкой, и с помощью дидезокси-метода секвенируют первые 250—300 нуклеотидов. Затем по результатам секвенирования синтезируют второй праймер и определяют последовательность следующих 250—350 нуклеотидов клонированного участка, и т. д. Этот метод, называемый «праймер-опосредованной прогулкой» (или «блуждающей затравкой»), позволяет секвенировать протяженные фрагменты ДНК без их субклонирования, как в случае системы на основе фага M13.

Метод ПЦР произвел настоящую революцию в биотехнологии. Он позволяет в миллионы раз амплифицировать *in vitro* нужные сегменты ДНК. Процедура состоит в следующем. Подбирают два праймера, гибридизующиеся с участками ДНК, которые фланкируют искомую последовательность. Денатурируют ДНК, отжигают одноцепочечные молекулы с праймерами, добавленными в избытке, и осуществляют синтез ДНК *in vitro*. Для облегчения синтеза используют термостабильную ДНК-полимеразу, которая не разрушается при температуре денатурации (95 °C). Затем опять проводят денатурацию, отжиг с праймерами и синтез, и т. д. до примерно 30-го раунда. К этому времени в реакционной смеси преобладают фрагменты, на одном конце которых находится одна праймерная последовательность, а на другом — последовательность, комплементарная второму праймеру. ПЦР можно использовать для выявления патогенных микроорганизмов в том или ином биологическом материале; получения больших количеств специфических фрагментов ДНК с целью клонирования; амплификации 5'- и 3'-концов специфических мРНК; синтеза генов; выявления делеций или вставок в генах, ответственных за то или иное наследственное заболевание.

## ЛИТЕРАТУРА

- Chen E. Y., P. H. Seeburg. 1985. Supercoil sequencing: a fast and simple method for sequencing plasmid DNA. *DNA* 4: 165-170.
- Climie S., D. V. Santi. 1990. Chemical synthesis of the thymidylate synthase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 633-637.
- Di Donato A., M. de Nigris, N. Riiso, S. Di Biase, G. DAlessio. 1993. A method for synthesizing genes and cDNAs by the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 212: 291-293.
- Erlich H. A., D. Gelfand, J. J. Sninsky. 1991. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* 151: 1643-165].



**Fox D. K., B. Westfall, M. Nathan, A. J. Hughes, Jr., A. Rashtchian, D. M. Schuster.** 1996. Striding new distances with 5'RACE: long 5'RACE of human APC and TSC-2 cDNA. *Focus* 18: 33-37.

**Itakura K., J. J. Rossi, R. B. Wallace.** 1984. Synthesis and use of synthetic oligonucleotides. *Annu. Rev. Biochem.* 53: 323-356.

**Mullis K. B., F. Ferré, R. A. Gibbs (ed.).** 1994. *The Polymerase Chain Reaction*. Birkhäuser, Boston, Mass.

**Saiki R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. Scharf, R. Higuchi, G. T. Hörn, K. B. Mullis, H. A. Erlich.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.

**Sanger F., S. Nicklen, A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.

**Schuster D. M., G. W. Buchman, A. Rashtchian.** 1992. A simple and efficient method for amplification of cDNA ends using 5'RACE. *Focus* 14: 46-52.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Предположим, что ваш новый ДНК-синтезатор имеет среднюю эффективность присоединения нуклеотидов 98,5%. Каким будет выход продукта, если вы синтезируете гибридизационный зонд длиной 50 нуклеотидов?

2. Какие две стратегии химического синтеза гена длиной 0,5 т. п. н. вы можете предложить? Какую из них вы предпочтете?

3. Что такое линкер? Где его используют?

4. Что такое дидезоксинуклеотиды? Как с их помощью определяют нуклеотидную последовательность ДНК?

5. Почему можно определить нуклеотидную последовательность только одноцепочечной ДНК?

6. Как определяют нуклеотидную последовательность клонированной ДНК с помощью векторной системы на основе фага M13?

7. На месте преступления обнаружен один-единственный волос предполагаемого преступника. В нем содержится [0—20 пикограмм ( $10^{-12}$  г) ДНК. Чтобы охарактеризовать столь малое количество ДНК и определить, идентична ли ее нуклеотидная последовательность таковой у ДНК подозреваемого, нужно 10—100 нанограмм ( $10^{-9}$  г) ДНК. Как получить ее? Какую информацию вам нужно собрать, прежде чем предпринимать какие-то действия?

8. Что такое «длинная матрица», «короткая матрица», как меняется соотношение между ними с увеличением числа ПЦР-раундов?

9. Как синтезируют гены с помощью ПЦР?

10. Как «превратить» концы молекулы мРНК в кДНК?

# ГЛАВА 6.

## Оптимизация экспрессии генов, клонированных в прокариотических системах

Основная цель экспериментов по клонированию генов, которые предполагается использовать в биотехнологии, — подбор условий для эффективной экспрессии в нужном организме-хозяине. К сожалению, сам факт встраивания того или иного гена в клонирующий вектор еще не означает, что этот ген будет экспрессирован. В то же время, чтобы получение коммерческого продукта было экономически оправданным, уровень его синтеза должен быть достаточно высоким. Для достижения эффективной экспрессии уже сконструировано много специфических векторов; для этого проводились манипуляции с целым рядом генетических элементов, контролирующих процессы транскрипции и трансляции, стабильность белков, секрецию продуктов из хозяйской клетки и т. д. Среди молекулярно-биологических свойств систем экспрессии наиболее важны следующие: 1) тип промотора и терминатора транскрипции; 2) прочность связывания мРНК с рибосомой; 3) число копий клонированного гена и его локализация (в плазмиде или в хромосоме хозяйской клетки); 4) конечная локализация синтезируемого продукта; 5) эффективность трансляции в организме хозяина; 6) стабильность продукта в хозяйской клетке.

Никакой универсальной стратегии оптимизации экспрессии клонированных генов не существует. Большинство таких генов имеют уникальные молекулярные свойства, и оптимальные системы экспрессии для каждого из них приходится подбирать всякий раз заново. Эффективность экспрессии любого чужеродного гена зависит также от его родства с организмом-хозяином. Несмотря на то что многие представители как прокариотических, так и эукариотических организмов способны к экспрессии чужеродных генов, для получения важных в коммерческом отношении продуктов с помощью технологии рекомбинантных ДНК используют в основном *Escherichia coli*. Это связано прежде всего с тем, что генетические, молекулярно-биологические, биохимические и физиологические свойства этого микроорганизма детально изучены. Кроме того, это наиболее дешевый и быстрый способ получения многих белков. Но для экспрессии некоторых клонированных генов используются и другие организмы-хозяева: *B. subtilis*, дрожжи, животные, растения и т. д., хотя стратегии, разработанные для *E. coli*-систем, в принципе применимы и в этих случаях.

### Экспрессия генов при участии сильных регулируемых промоторов

Для эффективной экспрессии любого гена совершенно необходимо наличие сильного регулируемого промотора, расположенного перед данным геном. Такой промотор имеет высокое сродство к РНК-полимеразе, поэтому прилегающие к нему последовательности эффективно (с высокой частотой) транскрибируются. Регулируемость промотора позволяет клетке (и исследователю) осуществлять строгий контроль транскрипции. Для экспрессии клонированных генов широко используется промотор хорошо изученного *lac* (лактозного)-оперона *E. coli*. Однако есть и другие промоторы, обладающие полезными для контроля экспрессии свойствами. Для их идентификации перед так называемым геном-репортером, кодирующим легко регистрируемый продукт, но лишенным

промотора, встраивают случайные фрагменты ДНК (рис. 6.1), Если в результате такой вставки ген-репортер эффективно экспрессируется, то делают вывод, что клонированный фрагмент содержит функциональный промотор. Большинство генов-репортеров кодируют либо продукты, обуславливающие устойчивость к антибиотикам, либо фермент, который идентифицируется с помощью достаточно простого колориметрического теста.

Может показаться, что наиболее подходящим способом оптимизации экспрессии клонированного гена является встраивание его в плазмиду так, чтобы он находился под контролем постоянно функционирующего сильного промотора. Однако непрерывная экспрессия чужеродного гена может оказаться губительной для клетки-хозяина, поскольку приводит к истощению ее энергетических ресурсов и нарушению метаболизма. Кроме того, плазмиды, несущие постоянно (конститутивно) экспрессирующийся ген, нередко утрачиваются после нескольких клеточных циклов, поскольку не содержащие их клетки растут быстрее и со временем становятся

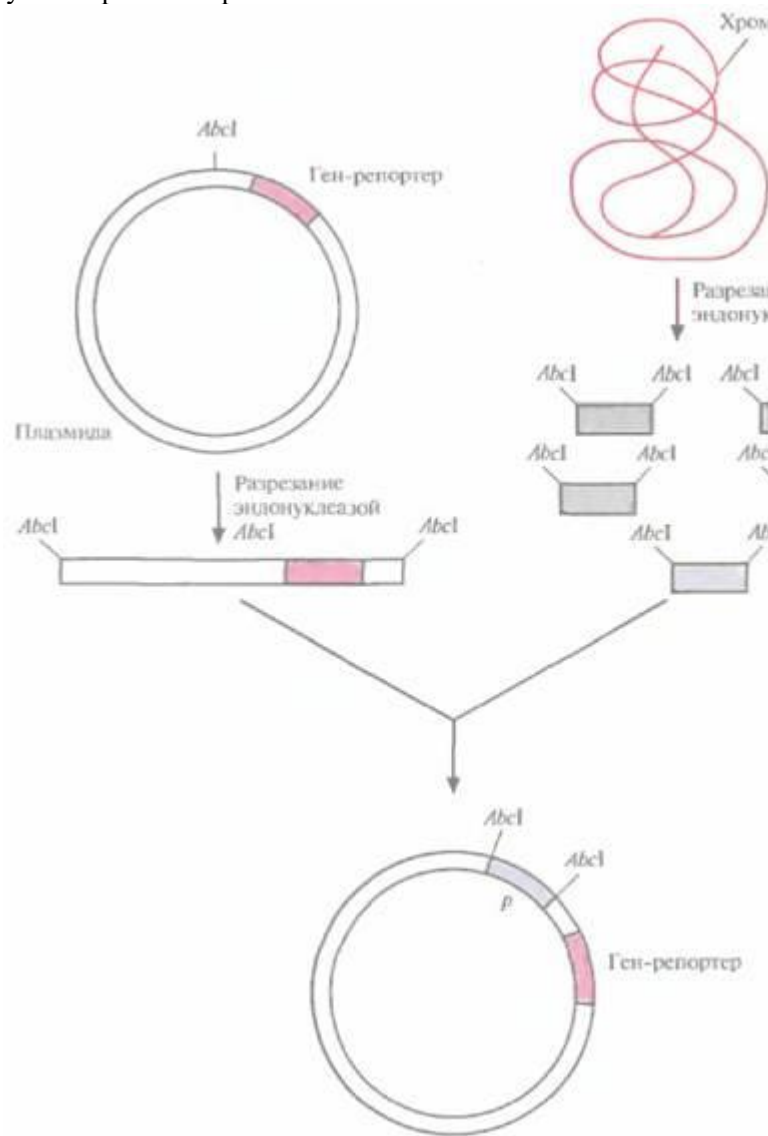


Рис. 6.1. Идентификация сильных регулируемых промоторов. В плазмиду встраивают ген-репортер без промотора. Хромосомную ДНК разрезают рестрицирующей эндонуклеазой *AbaI* и встраивают фрагменты в плазмиду. Если ген-репортер эффективно экспрессируется, значит, клонированный фрагмент содержит функциональный промотор.

в культуре преобладающими. Нестабильность плазмид — это основная проблема, мешающая получению продукта гена, локализованного в плазмиде, в промышленных масштабах. Для ее решения нужно научиться контролировать экспрессию таким образом, чтобы клонированный ген экспрессировался только в определенной фазе клеточного цикла и только в течение определенного времени, а для этого нужно использовать сильные регулируемые промоторы. Плазмиды, сконструированные для этих целей, называются экспрессирующими векторами.

Регулируемые промоторы

Наиболее широко используются следующие сильные регулируемые промоторы: промоторы *lac*- и *trp*-оперонов *E. coli*; специально сконструированный *tac*-промотор, включающий — 10-область *lac*-промотора и — 35-область *trp*-промотора (участки, находящиеся на расстоянии 10 и 35 п. н. до сайта инициации транскрипции); левый, или *p<sup>L</sup>*, промотор бактериофага  $\lambda$ ; промотор гена 10 бактериофага T7. С каждым из них связываются соответствующие репрессоры, которые опосредуют включение и выключение транскрипции специфических генов. Кроме того, каждый из этих промоторов узнается холо-ферментом РНК-полимеразой *E. coli*, в который входит основной сигма-фактор, присутствующий в клетке в значительно больших количествах, чем другие, минорные сигма-факторы. Благодаря этому транскрипция не останавливается по причине недостатка свободных сигмафакторов.

В отсутствие лактозы в среде *lac*-промотор *E. coli* находится в репрессированном состоянии, т. е. он выключен белком-репрессором, блокирующим транскрипцию *lac*-оперона. Индукция, или включение *lac*-оперона происходит при добавлении в среду лактозы или изопропил- $\beta$ -D-тиогалактопиранозида (ИПТГ). Оба этих соединения предотвращают связывание репрессора с *lac*-оператором, и транскрипция возобновляется.

Транскрипция, контролируемая *lac*-промотором, регулируется также с помощью белка - активатора катаболизма (CAP) (рис. 6.2). При связывании CAP с промотором повышается сродство последнего к РНК-полимеразе и усиливается транскрипция примыкающих к нему генов. В свою очередь сродство CAP к промотору повышается при его связывании с цикличе-



Рис. 6.2. Влияние глюкозы, лактозы и сАМР на транскрипцию, регулируемую *lac*-промотором *E. coli*. Стрелка указывает направление транскрипции. (По данным работы Abeles et al., 1992, *Biochemistry*, p. 383, Jones and Bariett Publishers, Boston, Mass.)

ским АМР (сАМР), уровень которого повышается при снижении концентрации глюкозы в среде. Таким образом, если репрессор не связан с оператором, то в присутствии индуктора при повышении внутриклеточной концентрации сАМР может произойти усиление транскрипции генов, регулируемых *lac*-промотором.

На самом деле в плазмидных экспрессирующих векторах используется один из вариантов *lac*-промотора — *lacUV5* с измененной -10-последовательностью, более сильный, чем *lac*-промотор дикого типа. Транскрипция с промотора *tac* также подавляется *lac*-репрессором и возобновляется при добавлении в среду лактозы или ИПТГ.

Промотор *trp* выключается под действием комплекса триптофан—*trp*-репрессор, который связывается с *trp*-оператором и предотвращает транскрипцию *trp*-оперона. Активация (включение) *trp*-промотора происходит либо при удалении из среды триптофана, либо при добавлении 3-индолилукриловой кислоты.

Работа промотора  $p^L$ - регулируется репрессорным белком cI бактериофага  $\lambda$ . На самом деле для регуляции транскрипции с  $p^L$ -промотора обычно используется термочувствительная му-тантная форма репрессора cI — белок cI<sub>857</sub>. Клетки, синтезирующие этот репрессор, сначала выращивают при температуре 28—30 °С; в этих условиях репрессор блокирует транскрипцию с  $p^L$ -промотора. Когда культура достигает нужной фазы (как правило, середины log-фазы), температуру повышают до 42 °С, при которой cI<sub>857</sub>-репрессор инактивируется и начинается транскрипция.

Для транскрипции с промотора бактериофага T7 нужна соответствующая РНК-полимераза. Чтобы можно было использовать этот промотор, ген РНК-полимеразы фага T7 встраивают в хромосому *E. coli* в составе профага  $\lambda$ , поместив его под контроль *lac*-промотора. Затем клетки трансформируют плазмидой, содержащей генмишень под контролем T7-промотора, и добавляют в среду ИПТГ. В этих условиях происходит индукция гена РНК-полимеразы T7, синтезируется РНК-полимераза и происходят транскрипция и трансляция клонированного гена. Часто между временем индукции гена РНК-полимеразы T7 и началом транскрипции гена-мишени проходит более часа. Для транскрипции с сильного T7-промотора создана целая серия плазмид, получивших название рЕТ-векторов.

Эффективность инактивации белка-репрессора и соответственно активации транскрипции зависит от соотношения между числом молекул репрессора и числом копий промотора. Если концентрация репрессора слишком велика, то транскрипция не иницируется, и наоборот, если молекул репрессора очень мало (даже при том, что их больше, чем копий промотора), то транскрипция может идти и в отсутствие индукции. Про такие промоторы говорят, что они «текут». Чтобы осуществлять строгий контроль таких регулируемых систем, разработаны разные стратегии. Например, ген репрессора и соответствующий промотор помещают в две разные плазмиды, присутствующие в клетке в разном числе копий; это позволяет поддерживать нужное соотношение между числом молекул репрессора и числом копий промотора. Обычно ген репрессора находится в малокопийной плазмиде, число ее копий в клетке не превышает 8, а промотор -- в мульткопийной плазмиде с 30—100 копиями на клетку. Ген репрессора может быть локализован и в хромосомной ДНК, находясь в ней в единственном числе, что позволяет поддерживать низкую концентрацию репрессора. В системах, использующих *lac*-промо-тор, можно получить *lac*-репрессор в значительно большем количестве, если заменить *lacI*-ген его мутантной формой *lacI<sup>q</sup>*, что приводит к уменьшению «протекания» промотора, т. е. к снижению уровня транскрипции клонированного гена без индуктора.

### **Получение больших количеств белковых продуктов**

Для получения больших количеств чужеродных белков с помощью рекомбинантных штаммов *E. coli* была сконструирована плаزمида рPLc2833. Она содержит сильный промотор, селективный маркерный ген и короткий участок с несколькими уникальными сайтами для рестрицирующих ферментов (полилинкер), следующий непосредственно за промотором. Эффективность этого экспрессирующего вектора в осуществлении синтеза чужеродных белков в *E. coli* можно еще

Таблица 6. 1. Зависимость числа копий трех плазмидных экспрессирующих векторов от температуры<sup>1)</sup>

| Плазмида | Число копий на клетку |       | Промотор <i>p<sup>L</sup></i> |
|----------|-----------------------|-------|-------------------------------|
|          | 28 °С                 | 24 °С |                               |
| pKN402   | 82                    | 521   | Нет                           |
| pPLc2833 | 38                    | 42    | Да                            |
| pCP3     | 60                    | 713   | Да                            |

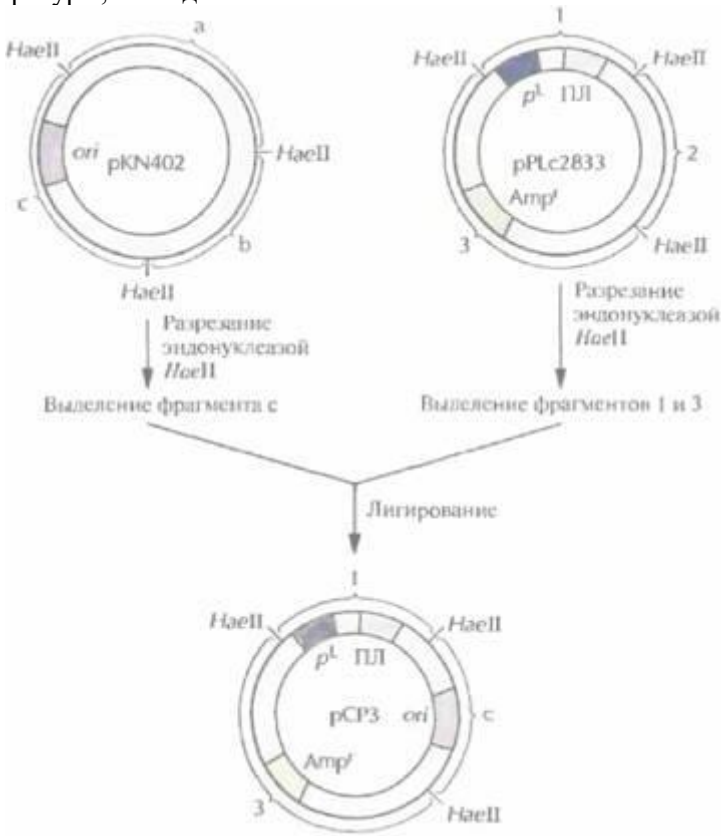
<sup>1)</sup>По данным работы Kestnut et al., 1983, *Gene* 22: 103–113.

больше повысить, заменив сайт инициации репликации плазмиды pPLc2833 аналогичным сайтом плазмиды pKM402. Это приводит к увеличению числа копий модифицированной плазмиды в 5-10 раз при температуре 42 °С (табл. 6.1), Полученная таким образом плазида pCP3 содержит *p<sup>L</sup>*-промотор и ген β-лактамазы (ген устойчивости к ампициллину) из pPLc2833, а сайт инициации репликации - из pKN402 (рис. 6.3). Несущие ее клетки сначала выращивают при температуре 28 °С, а затем — при 42 °С. При пониженной температуре ген cI-репрессора, интегрированный в ДНК *E. coli*, экспрессируется, *p<sup>L</sup>*-промотор не функционирует и образуется обычное число копий плазмиды (табл. 6.1). При повышении температуры cI-репрессор инактивируется, *p<sup>L</sup>*-промотор переходит в активное состояние, и число копий плазмиды увеличивается. Все это и делает плазмиду pCP3 эффективным экспрессирующим вектором. Когда ген ДНК-лигазы T4 был встроен в полилинкер pCP3, то выход его продукта составил примерно 20% от общего количества белка, синтезируемого *E. coli* при 42 °С. При этом на долю собственных, наиболее активно синтезируемых белков *E. coli*, например фактора элонгации EF-Tu, приходится примерно 2%.

Крупномасштабные системы

При культивировании в небольших объемах (от 1 до 5 л) индукцию экспрессии осуществляют либо изменением температуры, либо добавлени-

Рис. 6.3. Создание плазмиды pCP3. Из плазмиды pKN402 с помощью рестрицирующей эндонуклеазы *Hae*II вырезают фрагмент с, содержащий температурочувствительный сайт инициации репликации (*ori*), и сшивают его с *Hae*II-фрагментами 1 и 3 плазмиды pPLc2833. Фрагмент 1 содержит *p<sup>L</sup>*-промотор и полилинкер (ПЛ), а фрагмент 3 - селективный маркерный ген устойчивости к ампициллину (*Amp<sup>r</sup>*).





ем химического индуктора. Однако в опытных установках (20—100 л) и в промышленных биореакторах (>200 л) температуру нельзя изменить мгновенно, для этого требуется время от 30 до 60 мин; кроме того, на подъем температуры нужна энергия. И время, и энергия стоят дорого. Столь же дорого обходится и применение химического индуктора, например ИПТГ. Все это может сделать процесс неэкономичным. Для преодоления некоторых проблем, связанных с использованием  $p^L$ -промотора для крупномасштабного производства белковых продуктов, была разработана двухплазмидная система. Ген репрессора  $cI$  поместили под контроль  $trp$ -про-мотора и включили в малокопийную плазмиду (рис. 6.4), что обеспечило невысокий уровень синтеза репрессора. Вторая плазида содержала клонированный ген, находящийся под контролем  $p^L$ -промотора. Как видно из рис. 6.4, А, в отсутствие триптофана включается  $trp$ -промотор и синтезируется репрессор  $cI$ , выключающий  $p^L$ -промотор. И наоборот, как видно из рис. 6.4, Б, при наличии триптофана  $trp$ -промотор выключается, репрессор не синтезируется, а  $p^L$ -промотор активно работает.

Культуры с такими двухплазмидными системами можно выращивать на недорогих средах на основе гидролизатов мелассы или казеина, содержащих незначительное количество свободного триптофана, и индуцировать экспрессию клонированного гена добавлением в среду трип-тона. Последний содержит свободный триптофан в количестве, достаточном для эффективной индукции транскрипции. Пробные испытания этой системы показали, что на долю продуктов клонированных генов  $\beta$ -лактамазы и цитратсин-

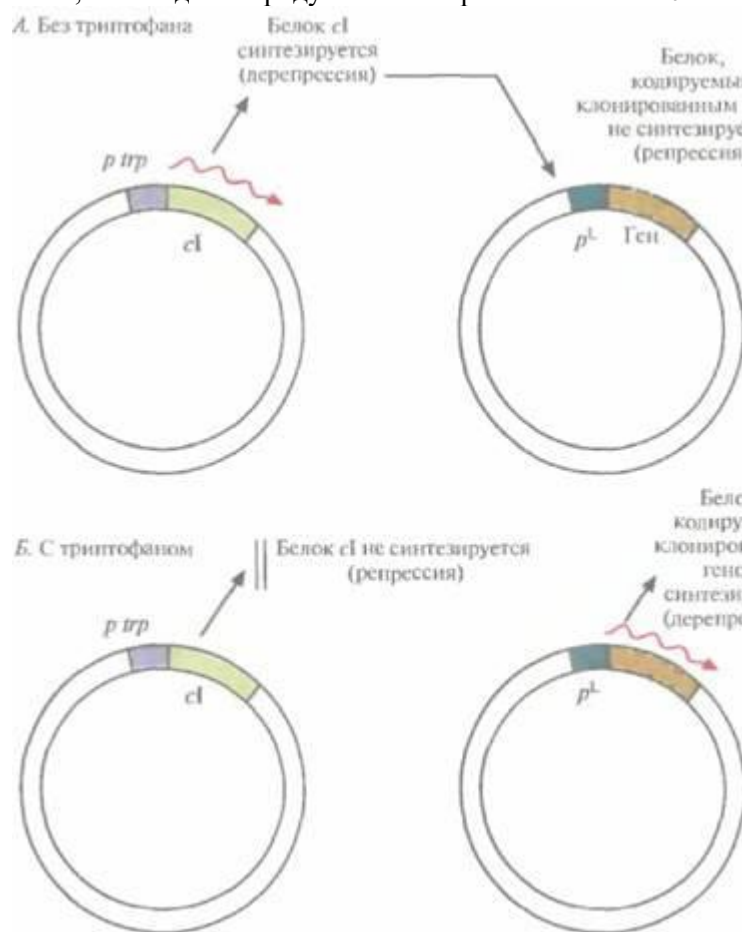


Рис. 6.4. Двухплазмидная система, позволяющая контролировать работу  $p^L$ -промотора фага  $\lambda$  путем регуляции синтеза  $cI$ -репрессора с помощью триптофана. Ген репрессора  $cI$  вместе с триптофанным промотором ( $p trp$ ) находятся в одной плазмиде, а  $p^L$ -промотор и клонированный ген — в другой. Стрелками указано направление транскрипции. А. В отсутствие триптофана в среде ген  $cI$  транскрибируется и транслируется, репрессор  $cI$  связывается с  $p^L$ -промотором и блокирует транскрипцию клонированного гена. Б. В присутствии триптофана ген  $cI$  репрессируется, его продукт не синтезируется, поэтому клонированный ген транскрибируется и транслируется.

тазы после индукции транскрипции добавлением триптона приходится соответственно 21 и 24% от общего количества синтезируемого белка. Таким образом, двухплазмидные системы позволяют получать белковые продукты с помощью реком-бинантных микроорганизмов в промышленных масштабах и относительно недорого.

Использование для экспрессии других микроорганизмов

*E. coll* — не единственный микроорганизм, который используется для синтеза чужеродных белков. К сожалению, генетические и молекулярно-биологические свойства большинства других микроорганизмов изучены не так хорошо. Кроме того, нет ни одного вектора или даже промо-торно-репрессор ной системы, которая обеспечивала бы оптимальный уровень экспрессии в клетках всех или хотя бы только граммотрицательных бактерий. К счастью, многие стратегии, разработанные для *E. coli*, пригодны и для множества других микроорганизмов, что позволило проверить различные промоторы на их способность обеспечивать транскрипцию в других гра-мотрицательных бактериях. Так, в одном из исследований был сконструирован набор плазмидных экспрессирующих векторов, содержащих промоторы *lac*, *tac*, Nm (гена устойчивости к неомицину) и S1 (гена рибосомного белка S1 *Rhisobium meliloti*), и определен уровень экспрессии гена β-лактамазы под контролем каждого из них (табл. 6.2). Обнаружилось, что: 1) указанные промоторы проявляют ту или иную активность во всех использованных бактериальных системах; 2) промотор *tac* наиболее активен в *E. coli* и гораздо менее — в других бактериях; 3) Nm — второй по активности промотор в *E. coli* и самый активный в других бактериях. Промоторные участки у всех граммотрицательных бактерий имеют сходную нуклеотидную последовательность, однако это не означает, что самым эффективным промотором для того или иного организма будет тот, который наиболее эффективен в *E. coli*. Тем не менее *E. coli*-промоторы могут оказаться вполне приемлемыми для регуляции экспрессии клонированных генов и в других граммотрицательных бактериях.

Попытки создания «универсального» экспрессирующего вектора для граммотрицательных бактерий были весьма многочисленными. В конце концов была выбрана следующая стратегия. Фрагмент ДНК размером 70 п. н., происходящий от одного из концевых инвертированных повторов в транспозоне 5 (Tn5), встроили вместе с соответствующим промотором в полилинкер малокопийной плазмиды pRK290 с широким спектром хозяев и получили плазмиду pAV10 (рис. 6.5). Клонированный сегмент ДНК из Tn5 содержал два независимых, но перекрывающихся промотора, каждый из которых необходим для транскрипции одного из ключевых Tn5-генов. Поскольку Tn5 эффективно экспрессируется в разных бактериях, его промоторы можно использовать для транскрипции различных генов. Чтобы проверить это, в полилинкер сразу за клонированными промоторами Tn5 встроили гены хлорамфеникол-ацетил-трансферазы и β-галактозидазы. Их эффективная экспрессия происходила в клетках *Alcaligenes* sp., *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas stuizeti*, *Pseudomonas fluorescens* и *Serratia marcescens*. Таким образом, есть реаль-

Таблица 6.2. Активность β-галактозидазы в граммотрицательных бактериях, несущих плазмидный вектор с геном *lacZ E.coli* и гетерологичным промотором<sup>1)</sup>

| Промотор    | Активность β-галактозидазы, ЕД |                           |                                |                           |
|-------------|--------------------------------|---------------------------|--------------------------------|---------------------------|
|             | <i>Escherichia coli</i>        | <i>Rhizobium meliloti</i> | <i>Rhizobium leguminosarum</i> | <i>Pseudomonas putida</i> |
| Отсутствует | 16                             | 110                       | 130                            | 150                       |
| Nm          | 1400                           | 21800                     | 13900                          | 16300                     |
| <i>lac</i>  | 2000                           | 9050                      | 6250                           | 9800                      |
| <i>tac</i>  | 11300                          | 2850                      | 1150                           | 2950                      |
| S1          | 40                             | 3300                      | 1200                           | 3350                      |

<sup>1)</sup> По данным Labes et al., 1990, *Gene* 89: 37—46.

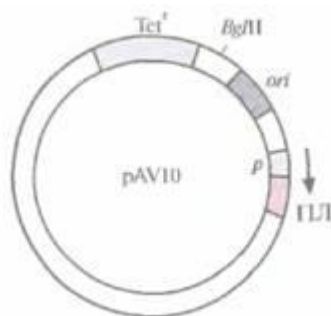


Рис. 6.5. Клонировующий вектор pAV10 (без соблюдения масштаба). Показано положение гена устойчивости к тетрациклину ( $Tet^r$ ), сайта рестрикции для эндонуклеазы *Bgl*II, сайта инициации репликации (*ori*), промотора (*p*) и полилинкера (ПЛ). Встраивание клонированного гена в полилинкер ставит его под контроль промотора Tn5 (*p*). Стрелка указывает направление транскрипции.

ная возможность использовать Tn5-промоторы для инициации транскрипции чужеродных генов в клетках различных бактерий.

## Химерные белки

Очень часто чужеродные белки, особенно небольшие, обнаруживаются в гетерологичных хозяйских клетках лишь в минимальных количествах. Такой кажущийся низкий уровень экспрессии кодирующих их генов во многих случаях объясняется деградацией чужеродных белков в хозяйских клетках. Один из способов решения этой проблемы состоит в ковалентном присоединении продукта клонированного гена к какому-нибудь стабильному белку клетки-хозяина. В составе подобной конструкции, получившей название «химерный белок», продукт клонированного гена оказывается защищенным от расщепления протеазами хозяйской клетки, что было показано в ходе экспериментов.

Слияние белков программируется на уровне ДНК лигированием кодирующих участков соответствующих генов. В самом простом виде векторная система слияния предусматривает включение гена-мишени или его сегмента в кодирующий участок клонированного гена-хозяина. Очень важно, чтобы РНК, транскрибируемая с клонированного гена-мишени, имела правильную нуклеотидную последовательность, обеспечивающую образование продукта клонированного гена. Если при объединении сегментов ДНК происходит изменение рамки считывания, т. е. последовательность кодонов детерминирует укороченный или неправильный трансляционный продукт, то не сможет образоваться и функционально активная форма белка. Убедиться в правильности рамки считывания можно разными способами. Как правило, для этого необходимо знать точную нуклеотидную последовательность лигируемых фрагментов ДНК,

## Расщепление химерных белков

В зависимости от предназначения белкового продукта клонированного гена он может использоваться как таковой или в составе химерного белка, причем последний вариант встречается нечасто. Например, из-за присутствия фрагмента хозяйского белка большинство химерных белков оказываются непригодными для применения в клинике, а сам продукт клонированного гена-мишени может оказаться неактивным. Кроме того, для химерных белков предусмотрена более сложная процедура тестирования, которую они должны пройти, чтобы получить разрешение к применению у соответствующих организаций. Все это заставляет искать способы удаления лишних аминокислотных последовательностей из молекулы получаемого продукта. Один из таких способов основан на присоединении белка, кодируемого геном-мишенью, к белку клетки-хозяина, содержащему короткий пептид, распознаваемый специфической протеазой небактериального происхождения. Такое присоединение тоже программируется на уровне ДНК. Олигонуклеотидные линкеры, несущие сайты для протеаз, можно пришить к клонированному гену до того, как такая конструкция будет введена в экспрессирующую векторную систему слияния. Линкером может служить, например, олигонуклеотид, кодирующий пептид Ile-Glu-Gly-Arg. После синтеза и очистки химерного белка для отделения белкового продукта, кодируемого клонированным геном, можно использовать фактор свертывания крови  $X_a$ , который является специфической протеиназой, разрывающей пептидные связи исключительно на С-конце последовательности Ile-Glu-Gly-Arg (рис. 6,6). Более того, поскольку такой пептид



Рис. 6.6. Протеолитическое расщепление химерного белка фактором свертывания крови  $X_a$ . Фактор  $X_a$  узнает аминокислотную последовательность, разделяющую два компонента химерного белка. После расщепления высвобождается функциональный белок, кодируемый клонированным геном.

встречается в природных белках довольно редко, этот подход можно использовать для отделения многих других продуктов, кодируемых клонированными генами.

Применение химерных белков

В некоторых случаях конечным продуктом, который предполагается использовать, является сам химерный белок. Например, нередко возникает необходимость в получении антител, узнающих конкретный участок белковой молекулы. Чтобы решить эту задачу, можно встроить в подходящий вектор сегмент ДНК, кодирующий белковый домен, к которому будут вырабатываться нужные антитела. Образующийся в результате химерный белок и будет служить антигеном. Антитела к стабилизирующему его белковому компоненту, происходящему от хозяйской клетки, можно удалить абсорбцией их на чистом стабилизирующем белке, и тогда останутся только антитела, связывающиеся с нужной аминокислотной последовательностью.

Один из клонирующих векторов системы слияния, сконструированных для получения специфических антител, содержит 5'-концевой сегмент гена *ompF* *E. coli*, кодирующего один из наружных мембранных белков, и прилегающую к нему часть гена *lacZ* ( $\beta$ -галактозидазы) *E. coli* (рис. 6.7). Этот сегмент содержит информацию, необходимую для инициации транскрипции и трансляции химерного гена, а также для секреции химерного белка. Несмотря на то что укороченный ген *lacZ*, лишен кодонов для первых восьми аминокислот, кодируемый им белок сохраняет ферментативную активность. В такой форме  $\beta$ -галактозидаза способна функционировать независимо от того, какие пептиды присоединены к ее N-концу. Ген *lacZ* встроен в вектор таким образом, что он попадает «не в ногу» с рамкой считывания лидерной последовательности *ompF*, поэтому активная  $\beta$ -галактозидаза не образуется. Однако если рамка считывания какого-либо клонированного фрагмента ДНК согласуется с таковой для генов *ompF* и *LacZ*, то образуется трех компонентный химерный белок, состоящий из OmpF-фрагмента, белка, кодиру-

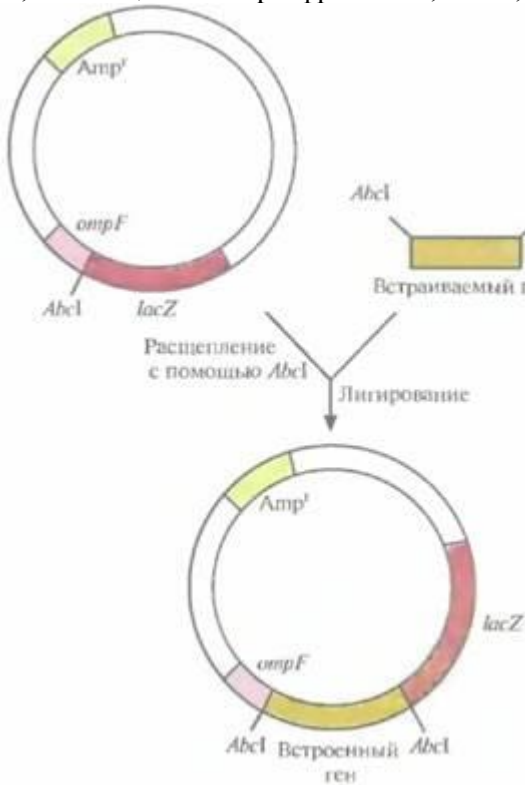


Рис. 6.7. Клонированный вектор системы слияния. Он содержит ген устойчивости к ампициллину ( $Amp^r$ ) в качестве селективного маркера, 5'-концевой сегмент гена *ompF*, кодирующий N-конец наружного мембранного белка, сайт для рестрицирующей эндонуклеазы *AbcI* и укороченный ген  $\beta$ -галактозидазы (*lacZ*). Ген, который хотят клонировать, встраивают в *AbcI*-сайт. После транскрипции и трансляции этой генетической конструкции образуется трехкомпонентный химерный белок.

Таблица 6.3. Очистка химерных белков, продуцируемых *E. coli*<sup>1'</sup>

| Компонент химерного белка, связывающийся с антителом <sup>2'</sup> | Размер           | Антитело               | Условия элюирования                                    |
|--|------------------|------------------------|--|
| ZZ   | 14 кДа           | IgG                    | Низкий pH  |
| Гистидиновый «хвост»   | 6-10 аминокислот | Ni <sup>2+</sup>       | Имидазол   |
| Strep-tag  | 10 аминокислот   | Стрептавидин           | Иминобиотин  |
| PinPoint   | 13кДа            | Стрептавидин           | Биотин   |
| МБР  | 40кДа            | Амилоза                | Мальтоза   |
| β-Лактамаза  | 27кДа            | Фенилборат             | Борат  |
| GST  | 25кДа            | Глутатион              | Восстанавливающий реагент                              |
| Flag   | S аминокислот    | Специфическое антитело | Моноклональное антитело<br>Низкая концентрация кальция |

<sup>1)</sup> По данным работы Nygren et al., 1994, *Trends Biotechnol*, 12: 184-188,

<sup>2)</sup> ZZ - фрагмент белка *A. Staphylococcus aureus*, Strep-tag - пептид, обладающий сродством к стрептавидину; PinPoint - белковый фрагмент, биотинилированный в *E. coli* in vivo; MBP — мальтозосвязывающий белок; GST — глутатион S-трансфераза; Flag — пептид, узнаваемый энтерокиназой.

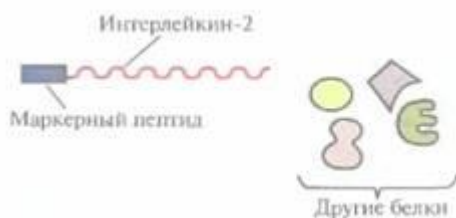
емого клонированным геном, и функционально активной С-концевой части β-галактозидазы. Он может использоваться как антиген для выработки антител, дающих перекрестную реакцию с белком клонированного гена, или как инструмент для получения небольших фрагментов специфических белков.

Химерные белки используются не только для стабилизации полипептидов, но и для упрощения процедуры очистки рекомбинантных белков (табл. 6.3). Так, плазмидная конструкция *Saccharomyces cerevisiae*, содержащая ген человеческого интерлейкина-2 с присоединенным к нему сегментом ДНК, кодирующим маркерный пептид Asp-Туг- Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys (он продается под названием Flag), выполняет двойную функцию: обеспечивает стабилизацию продукта гена интерлейкина-2 и облегчает его очистку. Интерлейкин-2 — это биологический фактор, стимулирующий рост Т-клеток и синтез В-клеточных антител. Химерный белок, образующийся после экспрессии этой генетической конструкции в дрожжевых клетках, может быть очищен за один прием с помощью иммуноаффинной хроматографии. Для этого моноклональные антитела к маркерному пептиду фиксируют на полипропиленовом носителе и пропускают через колонку химерный белок, который связывается с этими антителами (рис. 6.8). Маркерный пептид — небольшая молекула, на его образование расходуется лишь малая часть клеточных ресурсов. Химерный белок обладает такой же биологической активностью, что и нативный интерлейкин-2. Однако если он предназначен для применения в клинике, то маркерный пептид необходимо удалить. Таковы требования государственных служб, контролирующих использование фармацевтических препаратов. Для этого можно использовать бычью энтерокиназу.

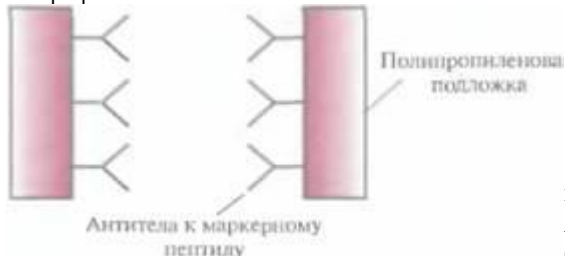
Многие белки, продуцируемые *E. coli*, накапливаются в клетках в форме нерастворимых биологически неактивных телец включения. И хотя из таких структур часто удается получать в небольших количествах биологически активный белок, для этого приходится проводить продолжительную солюбилизацию. Плохая растворимость белков in vivo часто обуславливается их неправильной укладкой, и эту проблему пытались решить различными способами. Так, известно, что химерные белки, одним из компонентов которых является тиоредоксин, белок мол, массой 11,7 кДа, остаются в растворе, даже если на их долю приходится 40% суммарного клеточного белка. Имея это в виду, ген-мишень встроили в полилинкер сразу вслед за геном тиоредоксина, так чтобы оба этих гена попали под контроль р<sup>L</sup>-промотора в плазмидном векторе *E. coli* (рис. 6.9). В хромосоме хозяйских клеток *E. coli*, использующихся в этой системе, присутствует генетическая конструкция, детерминирующая образование репрессора cI — копия гена cI, находящаяся под транскрипционным контро-



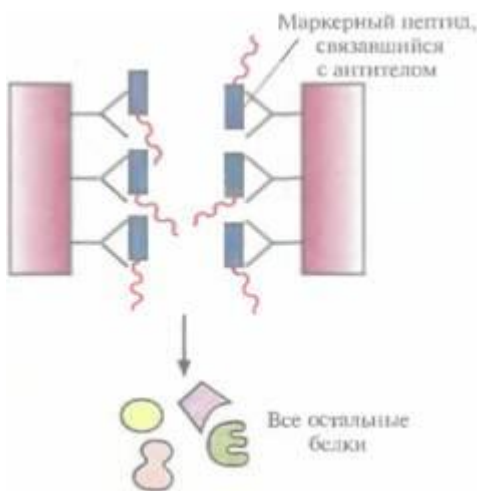
1. Смесь секретированных белков



2. Подготовка колонки для иммуоаффинной хроматографии



3. Наслаивание смеси белков



4. Элюирование химерного белка

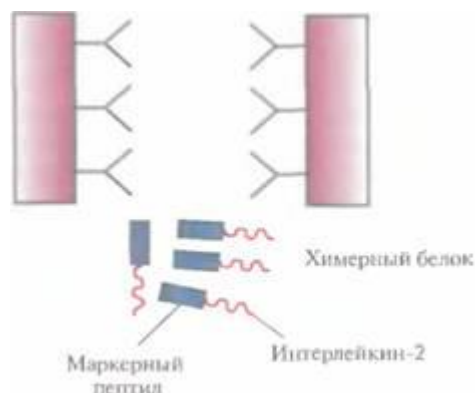


Рис. 6.8. Очистка химерного белка с помощью иммуоаффинной хроматографии. Антитела к маркерному пептиду химерного белка фиксируют на твердом носителе и пропускают через колонку химерный белок. Маркерный пептид, входящий в состав химерного белка, связывается с антителами, а все остальные белки свободно проходят через колонку. Очищенный химерный белок элюируют из колонки.

лем промотора *trp*. В отсутствие триптофана (рис. 6.9, А) репрессор образуется в количестве, достаточном для блокирования транскрипции с  $p^L$ -промотора, и химерный белок не синтезируется. Когда в среду добавляют триптофан (рис. 6.9, Б), *trp*- промотор выключается и белок-репрессор не синтезируется, а гены химерного белка транскрибируются с плазмидного  $p^L$ -промотора. Синтезируемый химерный белок, состоящий из тио-редоксина и белка-мишени, концентрируется в основном в особых областях с внутренней стороны плазматической мембраны *E. coli*, называемых зонами адгезии, и высвобождается из клеток при осмотическом шоке. Далее белок-мишень можно отщепить от химерного белка с помощью энтерокиназы. Химерный белок, содержащий тиоредоксин, можно очистить еще одним способом. Если белок-мишень остается стабильным при повышении температуры, то, поскольку тиоредоксин не разрушается при нагревании вплоть до 80 °C, химерный белок можно инкубировать при высоких температурах и освободиться от большинства других клеточных белков, разрушающихся при этих условиях.

### Включение белков в поверхностные структуры

Для скрининга обширных (до  $5 \cdot 10^{10}$  клонов) библиотек комплементарных ДНК (кДНК), кодирующих редко встречающиеся белки, были разработаны специальные системы слияния. Обычно кДНК встраивают в гены поверхностных белков (белков филаментов или пилей) нитчатых бактериофагов (например, M13) или бактерий и после транскрипции и трансляции получают химерные белки, входящие в состав поверхностных структур этих микроорганизмов. Здесь их идентифицируют иммунологическими методами. Часто для слияния используют ген поверхностного белка рIII фага M13, который связывается с F-пилиями *E. coli* и инициирует инфекцию. Для клонирования кДНК и других



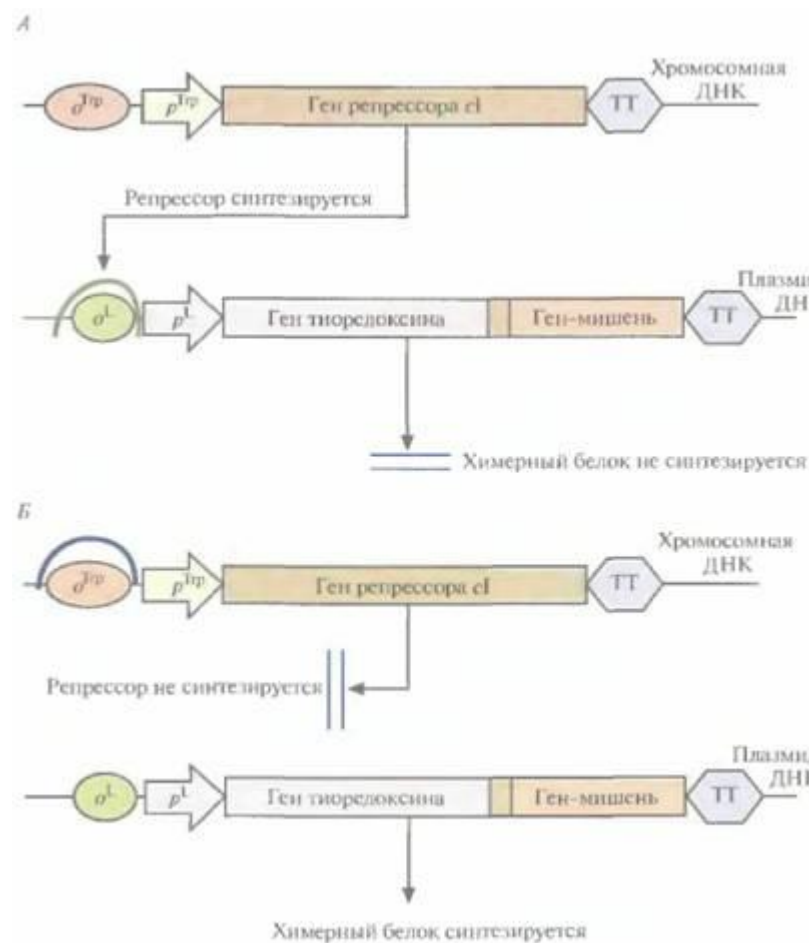


Рис. 6.9. Экспрессия плазмидного вектора с генетической конструкцией «ген тиоредоксина— ген белка-мишени» в отсутствие (А) и в присутствии (Б) триптофана. Стрелки, помеченные  $p^{trp}$  и  $p^L$ , указывают направление транскрипции. Сокращения и обозначения:  $\sigma^{trp}$  - оператор, с которым связывается репрессор *trp*;  $\sigma^I$  - оператор, с которым связывается репрессор *ci*;  $p^{trp}$  - *trp*-промотор,  $p^L$  - левый промотор бактериофага  $\lambda$ ; ТТ - сигнал терминации транскрипции. Между генами тиоредоксина и белка-мишени находится нуклеотидная последовательность, которая кодирует пептид, расщепляемый энтерокиназой. Подковообразными кривыми изображено связывание репрессоров с соответствующими операторами.

кодирующих последовательностей была сконструирована плазида (фагмида), содержащая небольшой фрагмент ДНК М13, который обеспечивал ее упаковку *in vitro* в фаговые частицы. ген белка рIII под контролем какого-нибудь регулируемого бактериального промотора (например, *lac*-промотора *E. coli*) и сайт клонирования вблизи 5'-конца гена рIII. После репликации рекомбинантного фага М13 в *E. coli* белок-мишень оказывался сшитым с N-концом фагового белка, и содержащие его бляшки можно было идентифицировать иммунологическими методами. Рекомбинантные фагмиды, выделенные из таких бляшек, могут служить источником соответствующей кДНК. Эта весьма эффективная селективная система позволяет обнаруживать кДНК редких, но очень важных белков.

Библиотеки, содержащие гены поверхностных бактериальных белков, можно использовать и для идентификации клонов, несущих специфические нуклеотидные последовательности. Чтобы включить искомый белок в поверхностные структуры грамотрицательной бактерии, например *E. coli*, сшивают его гены и гены белков этой структуры. В качестве бактериальных белков используются белок наружной мембраны А (OmpA) и пептидом и кансвязан-ный липопротеин (PAL) *E. coli*, а также белок F наружной мембраны *Pseudomonas aeruginosa* (OprF). При этом белок-мишень обычно находится либо на С-, либо на N-конце химерного белка, но иногда короткие полипептиды включаются в середину молекулы бактериального белка (рис. 6.10).

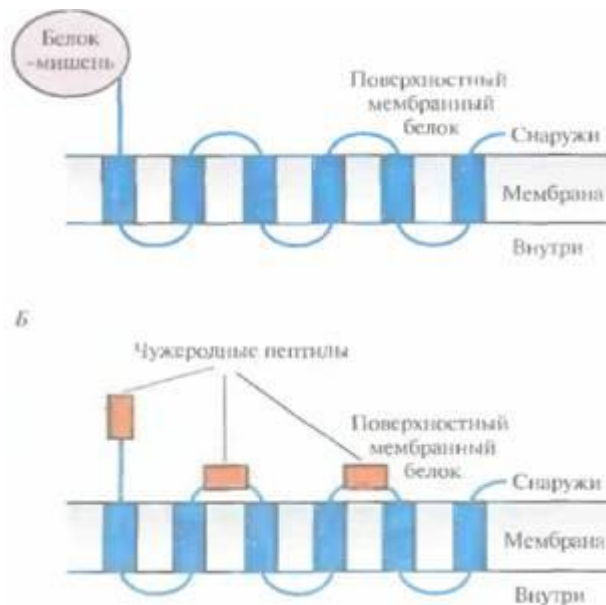


Рис. 6.10. Химерные белки, состоящие из поверхностного бактериального белка и чужеродного белка-мишени, присоединенного к его N- или С-концу (А) либо включенного в экспонируемые участки молекулы (Б). В обоих случаях чужеродные пептиды или белок оказываются на поверхности бактериальной клетки.

Системы слияния с локализацией белков-мишеней на поверхности бактериальных клеток можно использовать также для суперпродукции некоторых белков и пептидов. Так, в одной из работ в участок, кодирующий основной белок наружной мембраны *Pseudomonas aeruginosa* (OprF), был встроен ген антигенного детерминанта возбудителя малярии *Plasmodium falciparum*. Бактериальные клетки, синтезирующие соответствующий химерный белок, давали положительную реакцию с моноклональными антителами к *P. falciparum*. Следовательно, поверхностные химерные белки можно использовать в качестве вакцин (гл. 11).

## Однонаправленное тандемное расположение генов

Обычно уровень генной экспрессии пропорционален числу копий транскрибируемого гена в хозяйских клетках. Отсюда следует, что с увеличением числа копий плазмиды должно увеличиваться и количество продукта встроенного в эту плазмиду гена. Однако помимо клонируемого гена плазмида содержит и другие транскрибируемые последовательности, например гены устойчивости к антибиотикам, и по мере увеличения ее копийности энергетические ресурсы клетки будут во все большей степени направляться на образование белков, кодируемых плазмидой, и метаболическая активность хозяйской клетки упадет. Выходом из этой ситуации могло бы стать встраивание в малокопийную плазмиду нескольких копий интересующего исследователя гена. Однако при этом возникает одна техническая проблема — расположение генов в такой ориентации, чтобы все они могли правильно транскрибироваться и транслироваться. Простое сшивание «конец-в-конец» приводит к случайной ориентации генов, так что одни из них экспрессируются, а другие, находящиеся в противоположной ориентации, — нет (рис. 6.11).

Чтобы решить эту проблему можно использовать рестрицирующий фермент *AvaI*, который узнает последовательность CTCGGG и разрезает ДНК с 5'-конца от остатка Т. Процедура состоит в следующем. Плазмиду, содержащую эту последовательность, разрезают с помощью *AvaI* и, используя ДНК-полимеразу I, достраивают липкие концы. Затем к обоим ее тупым концам пристраивают *EcoRI*-линкер (GAATTC), вновь замыкая кольцо. Получившаяся плазмида содержит сегмент ДНК с двумя *AvaI*-сайтами, фланкируемыми *EcoRI*-сайт и перекрывающимися с ним (рис. 6.12, А и Б), т. е. последовательность CTCGGG AATTCTCGGG (здесь подчеркнутые основания — сайты узнавания для *AvaI*). Нужный ген вместе с трансляционными старт-и стоп-сигналами встраивают в *EcoRI*-сайт и затем вырезают из плазмиды с помощью *AvaI* (рис. 6.12, В). Такие фрагменты имеют неидентичные липкие концы, и поэтому при последующем сшивании соединяются в одной ориентации. Подобный набор однонаправленных тандемных копий гена может быть встроен в экспрессирующий вектор. При этом тандемная последовательность может находиться в двух ориентациях относительно промотора, так что ее экспрессия будет происходить только в 50% случаев.

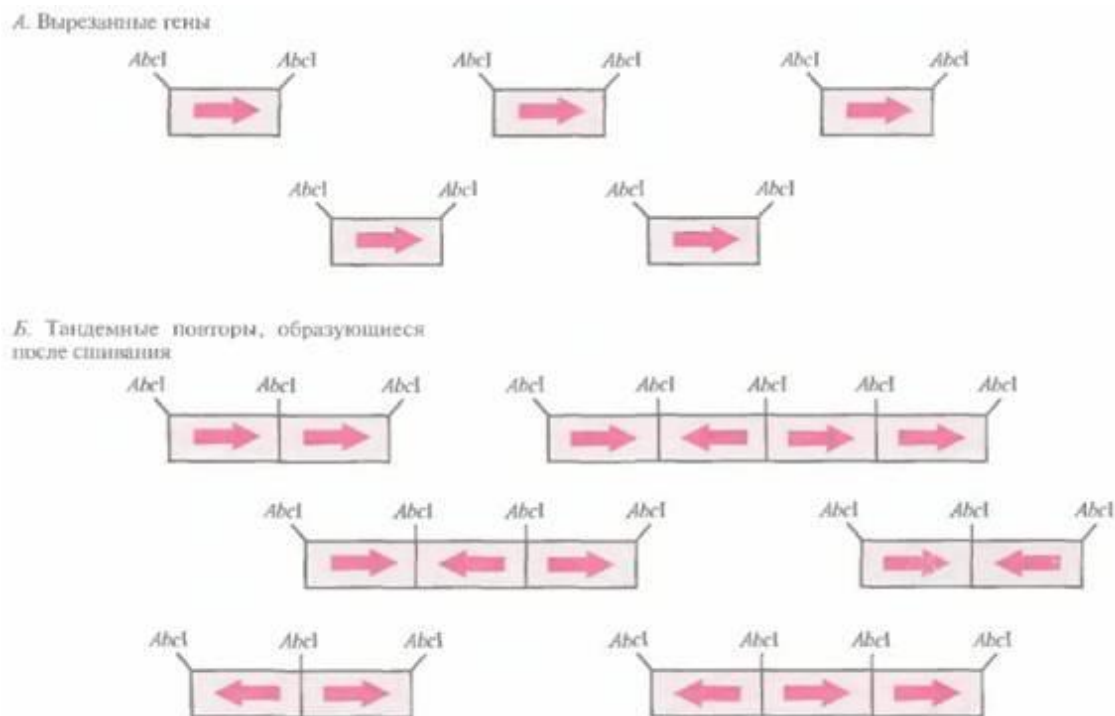


Рис. 6.11. Образование случайно ориентированных тандемных повторов. А. Клонированные гены вырезают из клонирующего вектора с помощью рестрицирующей эндонуклеазы *AbcI* и отделяют от векторной ДНК. Б. Создают условия, при которых происходит сшивание вырезанных генов. Поскольку нуклеотидные последовательности обоих выступающих концов генов одинаковы, последние могут соединяться в любой ориентации. В результате образуются тандемные повторы из случайно ориентированных последовательностей.

Другой подход основан на использовании синтетических ориентированных адаптеров - коротких олигонуклеотидов, присоединенных к концам линейаризованной плазмидной ДНК и к концам фрагментов ДНК с клонируемым геном. При лигировании эти фрагменты располагаются только в одной ориентации. Описанная процедура технически значительно более проста, чем та, в которой используется ре-стрицирующая эндонуклеаза *AvaI*; кроме того, она не требует, чтобы в гене-мишени отсутствовали *AvaI*- и *EcoRI*-сайты.

Уже показано экспериментально, что уровень экспрессии генов интерферона действительно увеличивается пропорционально числу тандемных копий гена, по крайней мере до четырех копий на плазмиду. Однако тандемные повторы иногда оказываются нестабильными и со временем некоторые из них или даже все утрачиваются плазмидой.

### Трансляционные экспрессирующие векторы

Наличие сильного регулируемого промотора - это очень важное, но недостаточное условие максимизации количества продукта клонированного гена. Большую роль играют также эффективность трансляции и стабильность самого продукта. В прокариотических клетках разные мРНК не всегда транслируются с одинаковой эффективностью. Различие может составить несколько сотен раз, и в результате в клетке будут присутствовать сотни или даже тысячи копий одних белковых молекул и лишь несколько копий других.

Различия в трансляции связаны — по крайней мере частично — со свойствами имеющегося в транскрибированной РНК сигнала инициации трансляции, называемого сайтом связывания рибосомы. Сайт связывания рибосомы — это

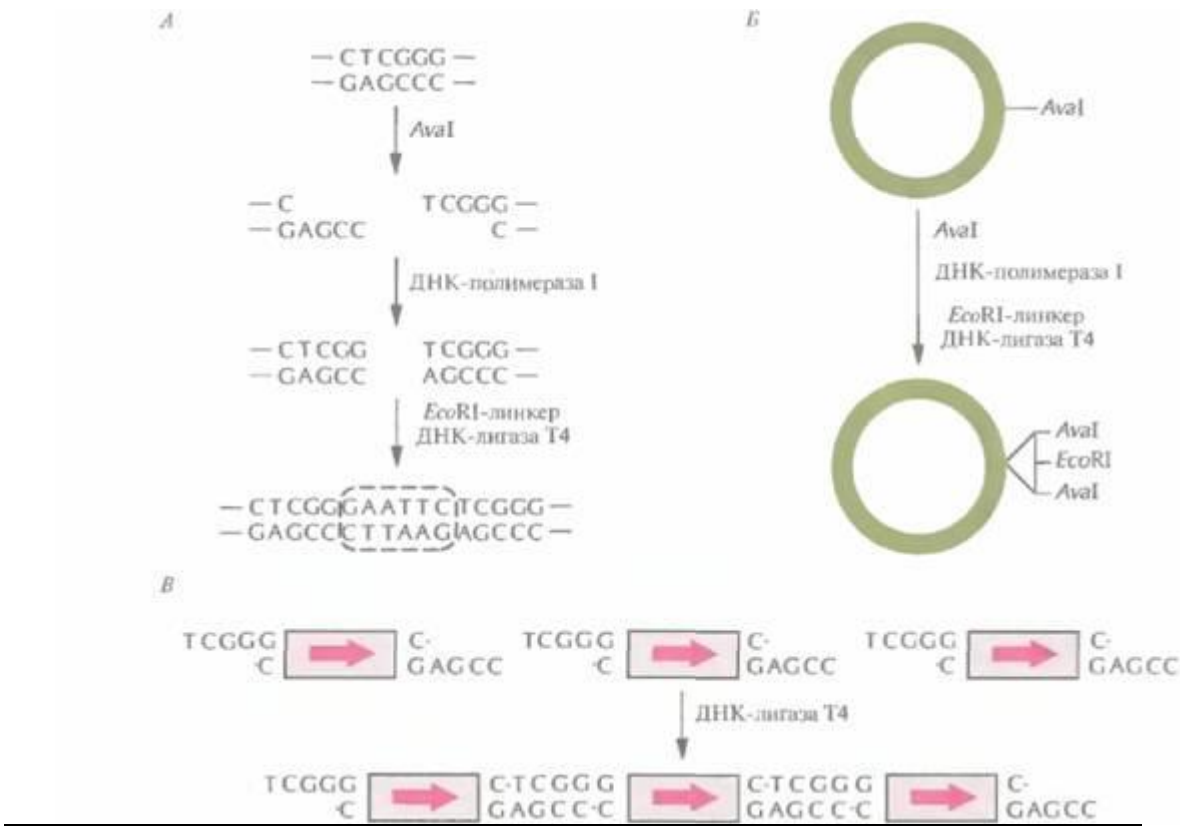


Рис. 6.12. Клонирование нескольких копий гена в одной плазмиде. *А.* Создание вектора. Плазмиду разрезают по *Ava*I-сайту и образовавшиеся липкие концы достраивают с помощью ДНК-полимеразы I *E. coli*. К тупым концам присоединяют *Eco*RI-линкер, замыкающий кольцо. *Б.* Встраивание *Eco*RI -линкера в *Ava*I-сайт в плазмиде. *В.* Образование однонаправленного тандемного повтора.

Рис. 6.13. Внутрицепочечное спаривание в молекуле мРНК, препятствующее эффективной трансляции. GGGGG — сайт связывания рибосомы, AUG (красные буквы) - инициаторный кодон, CAG-CAU-GAU-UUA-UUU — несколько первых кодонов. Обратите внимание, что кроме обычных для мРНК пар А-У и Г-С иногда образуются пары Г-У.



## ***lac*- Промотор: функциональный гибрид, полученный из *trp*- и *lac*- промоторов**

Н. А. DeBoer, L J. Comstock, M. Yasser *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 21-25, 1983

Приступая к более того, силу промотора как раз обратная. Он и его конструированию *lac*- увеличивали только те мутации, коллеги решили промотора, Де Боер и его в результате которых сконструировать химерный коллеги ставили своей целью нуклеотидные промотор, у которого —10- создание на основе двух разных последовательности указанных область происходила бы от *lac*- сильных регулируемых областей приближались к промотора, а —35 — от промоторов еще более сильного консенсусным: 5'-ТАТААТ-3' промотора *trp*. Этот новый, так промотора, способного для -10 и 5'-ТТСА-3' для -35 называемый *lac*-промотор был обеспечивать высокий уровень соответственно. Эти проверен на способность экспрессии чужеродных белков. последовательности были контролировать синтез фермента. Когда они начинали свои получены в результате галактокиназы *E. coli* по исследования, нуклеотидные сравнения нуклеотидных сравнению с *lac*- и *trp*- последовательности последовательностей всех промоторами в таких же большинства прокариотических известных промоторов и условиях. Как и ожидалось, *lac*- промоторов, в первую очередь *E. coli* идентификации наиболее часто промотор оказался гораздо более *coli*, были уже установлены, встречающихся нуклеотидов. Де сильным — примерно в 5 раз по однако конкретные свойства, Боеру было известно, что у сравнению с промотором *trp* и в обуславливающие их промотора *lacUV5*, более 10 — по сравнению с *lac*. Кроме эффективность, оставались сильного варианта *lac*- того, *lac*-промотор, как и *lac*, неизвестными. Было показано, промотора, — 10-область имеет реагировал на *lac*-репрессор и что почти все мутации, кон-сенсусную нуклеотидную активировался под действием влияющие на силу промотора, последовательность, а — 35- ИПТГ. Таким образом, новый локализуются в —10- или в -35- область — нет, а у *trp*- промотор был не только более областях (находя-щихся на промотора, в норме сильным, но и регулируемым. расстоянии 10 или контролирующего соответственно 35 п. н. до точки транскрипцию генов, которые инициации транскрипции). Бо- отвечают за биосинтез триптофана, ситуация

последовательность из шести-восьми нуклеотидов (например, UAAGGAGG), спаривающаяся с комплементарной последовательностью (в данном случае AUUCCUCC) РНК-компонента (рРНК) малой субъединицы рибосомы. Обычно чем прочнее связывание между мРНК и рРНК, тем выше эффективность инициации трансляции. Именно поэтому большинство экспрессирующих *E. coli*-векторов конструируют таким образом, чтобы мРНК клонированного гена обязательно содержала сильный сайт связывания рибосомы. Это необходимое условие трансляции гетерологичных про- и эукариотических генов в *E. coli*. Однако должны соблюдаться и некоторые другие условия. Во-первых, нуклеотидная последовательность, связывающаяся с рРНК, должна находиться на определенном расстоянии от старт-кодона клонированного гена (в РНК старт-кодоном является AUG; в ДНК ему соответствует кодон ATG). Во-вторых, участок ДНК, содержащий сайт связывания рибосомы и несколько первых кодонов клонированного гена, не должен иметь такую нуклеотидную последовательность, при которой после транскрипции может произойти внутримолекулярное спаривание (рис. 6.13), нарушающее связывание мРНК с рибосомой. Именно локальная вторичная структура мРНК, обеспечивающая экранирование или, напротив, экспонирование сайта связывания рибосомы, и определяет прочность связывания мРНК с комплементарной рРНК. Таким образом, при клонировании любого гена важно убедиться в том, что сайт связывания рибосомы расположен на нужном расстоянии от этого гена и что вторичная структура мРНК не мешает его присоединению к рибосоме.

Уже создано большое количество векторных систем, которые включают как транскрипционный, так и трансляционный сигналы, обеспечивающие экспрессию клонированных эукариотических генов в *E. coli*. Одной из таких систем



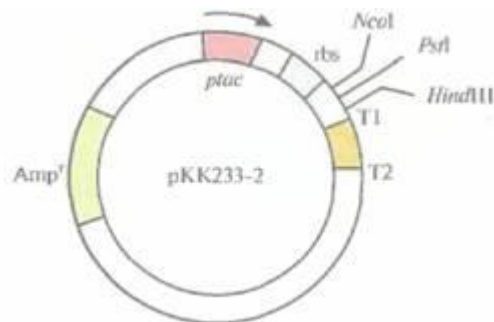


Рис. 6.14. Экспрессирующий вектор на основе плазмиды рКК233-2 (без соблюдения масштаба). Он содержит ген устойчивости к ампициллину (Amp<sup>r</sup>), являющийся селективным маркером, *lac*-промотор (*p(ac)*), *lacZ*-участок связывания рибосомы (*rbs*), три сайта для рестрицирующих эндонуклеаз (*NcoI*, *PstI* и *HindIII*) и два сайта терминации транскрипции (T1 и T2). Стрелка — направление транскрипции.

является экспрессирующий вектор рКК233-2, содержащий следующие элементы (рис. 6.14):

- селективный маркер устойчивости к ампициллину
- *tes*-промотор
- *lacZ*-участок связывания рибосомы
- старт-кодон АТГ, расположенный на расстоянии восьми нуклеотидов от сайта связывания рибосомы
- сайты терминации транскрипции T1 и T2 фага λ.

Клонируемый ген встраивают в *NcoI*-, *PstI*-или *HindIII*-сайт, расположенный между сайтом связывания рибосомы и сайтами терминации транскрипции. Если его рамка считывания не попадает «в ногу» с кодоном AUG, то необходимо произвести минимальную коррекцию. В этом случае после индукции и транскрипции происходит достаточно эффективная трансляция клонированного гена. Однако следует иметь в виду, что поскольку нуклеотидная последовательность, кодирующая N-концевой участок белка-мишени, у разных клонированных генов неодинакова, нельзя создать универсальный вектор, исключаяющий одноцепочечное спаривание мРНК при любых обстоятельствах. Поэтому ни одна из областей инициации трансляции, как бы она ни была оптимизирована, не может га-

рантировать эффективность трансляции всех клонированных генов. Таким образом, описанные выше экспрессирующие векторы - это только основа для создания оптимальной системы трансляции.

Эффективной трансляции может препятствовать и «несовместимость» клеток, обусловленная тем, что в клонируемом гене имеются кодоны, редко встречающиеся в геноме организма-хозяина. В таких случаях в хозяйской клетке может не доставать транспортных РНК (тРНК), узнающих редко используемые кодоны, что снижает выход продукта клонированного гена. Как решить эту проблему — не совсем понятно. Если продукт клонированного гена очень ценен, можно попытаться химически синтезировать такой вариант клонируемого гена, который состоит из кодонов, обычно используемых хозяйским организмом (оптимизация кодонов).

Стабилизация белков

Обычно время полужизни белков составляет от нескольких минут до нескольких часов. Такая вариабельность обуславливается различиями в числе дисульфидных связей в белковых молекулах и наличием или отсутствием на 5'-конце определенных аминокислот. Например, если к N-концу β-галактозидазы присоединять разные аминокислоты, то время жизни модифицированного белка *in vitro* может варьировать от двух минут до более 20 часов (табл. 6.4). Аминокислоты, увеличивающие время жизни белков, можно включать в белки генноинженерными методами. Часто для стабилизации белка-мишени достаточно присоединить к N-концу всего

Таблица 6.4. Время полужизни β-галактозидаз, к N-концу которых присоединены разные аминокислоты<sup>1)</sup>

| Присоединенные аминокислоты | Время полужизни |
|-----------------------------|-----------------|
| Met, Ser, Ala               | >20 ч           |
| Thr, Val, Gly               | >20 ч           |
| Ile, Glu                    | >30 мин         |
| Tyr, Gln                    | ~ 10 мин        |
| Pro                         | ~7 мин          |
| Phe, Leu, Asp, Lys          | ~3 мин          |
| Arg                         | ~2 мин          |

<sup>1)</sup> По данным работы Bachmairelal., 1986, *Science* 234:179-186.



один аминокислотный остаток. Долгоживущие белки накапливаются в клетках, что увеличивает конечный выход продукта. Это характерно как для эу-, так и для прокариот.

Однако стабильность белков может не только повышаться. Так, включение некоторых аминокислотных последовательностей во внутреннюю часть белковой молекулы делает ее более чувствительной к протеолитическому расщеплению. Такие последовательности обогащены остатками пролина (P), глутаминовой кислоты (E), серина (S) и треонина (T), отсюда и их название -PEST-последовательности. Они часто бывают фланкированы кластерами из положительно заряженных аминокислот и, возможно, служат маркерами для протеаз. Стабильность белков, содержащих такие последовательности, можно было бы повысить, внося изменения в соответствующие гены. При этом, однако, необходимо позаботиться о том, чтобы не произошло нарушений функции белка-мишени.

### **Рост в условиях недостатка кислорода**

*E. coli* и многие другие микроорганизмы, которые используются для экспрессии чужеродных белков, обычно растут только в присутствии кислорода. К сожалению, растворимость кислорода в водных средах ограничена, а по мере увеличения плотности культуры содержание растворенного кислорода в культуральной среде быстро падает. Более того, поскольку кислород растворяется очень медленно, эту проблему нельзя решить простым продуванием через среду воздуха или кислорода даже при интенсивном перемешивании. При уменьшении концентрации кислорода экспоненциальный рост замедляется и культура медленно переходит в стационарную фазу, характеризующуюся другим метаболическим статусом. Одним из последствий этого является образование в клетках протеиназ, которые могут расщеплять белок-мишень. Проблему аэрации культуральной среды пытались решить разными способами: изменением конструкции биореактора, повышением интенсивности продувания воздуха и перемешивания, добавлением в среду веществ, увеличивающих растворимость кислорода. Все это, однако, не привело ни к каким ощутимым результатам.

### **Применение хозяйских штаммов с дефицитом протеиназ**

Один из возможных подходов к стабилизации чужеродных белков, синтезируемых *E. coli*, состоит в использовании хозяйских штаммов с дефицитом протеолитических ферментов. Однако здесь есть свои трудности. В клетках *E. coli* синтезируется по крайней мере 25 разных протеиназ, и только некоторые из них изучены на генетическом уровне. Кроме того, протеиназы выполняют в клетке очень важную функцию, разрушая чужеродные или дефектные белки и обеспечивая тем самым жизнеспособность клеток. В одной из работ были сконструированы штаммы, несущие мутации в одном или даже нескольких протеиназных генах, и чем более выражен был суммарный дефицит по протеиназам, тем хуже рос штамм. Таким образом, снижение протеиназной активности приводит к истощению клеточных ресурсов. И все же удалось создать штаммы *E. coli*, несущие мутации в гене сигма-фактора РНК-полимеразы, ответственного за синтез белков теплового шока (*rpoH*), и в гене протеиназы, необходимой для роста клеток при высоких температурах (*degP*), у которых удельная активность секретируемых белков была в 36 раз выше, чем у штаммов дикого типа. Это кажущееся увеличение было обусловлено снижением интенсивности протеолитического расщепления белков.

### **Бактериальный «гемоглобин»**

Местообитанием некоторых штаммов грамотрицательных облигатных аэробных бактерий *Vitreoscilla* являются сильно обедненные кислородом непроточные водоемы. Чтобы получать нужное количество кислорода для роста и метаболизма, они синтезируют гемоглобиноподобное вещество, связывающее кислород окружающей среды и увеличивающее концентрацию доступного кислорода в клетке. Когда ген, кодирующий этот белок, был введен в клетки *E. coli*, в последних сразу произошли серьезные изменения: повысился уровень синтеза клеточных и рекомбинантных белков, возросла эффективность протонных насосов, увеличилось количество образующегося АТФ и его концентрация, особенно при низком содержании кислорода в среде. Чтобы такую стратегию можно было ис-

пользовать применительно к другим хозяйским клеткам, необходимо, чтобы эти клетки не только эффективно экспрессировали «гемоглобиновый» ген *Vitreoscilla*, но и синтезировали гем - составляющую гемоглобиновой молекулы. Это позволит улучшить рост таких важных в коммерческом отношении бактерий, как *E. coli*, *Streptomyces lividans*, *Corynebacterium glutarnicum* и *Xanlhomonas maltophilia*, а также осуществлять в них экспрессию чужеродных генов.

## Интеграция чужеродной ДНК в хромосому хозяина

При наличии в клетке плазмиды часть энергетических ресурсов расходуется на ее репликацию, транскрипцию и синтез белков, которые она кодирует. При этом, как правило, многокопийные плазмиды требуют больше энергии, чем малокопийные, и в результате часть клеток в процессе роста популяции утрачивает плазмиды. Клетки, лишившиеся своих плазмид, обычно растут быстрее тех, в которых они сохранились, и в конечном счете оказываются в культуре преобладающими. По прошествии нескольких генераций это отражается на количестве синтезируемого продукта клонированного гена. Разработано по крайней мере два подхода к решению этой проблемы. В лабораторных условиях для сохранения плазмид клетки выращивают в присутствии антибиотиков или метаболитов, обеспечивающих рост только тех клеток, в которых есть плазида. Однако добавление антибиотиков и какихто других веществ в культуры, выращиваемые в больших объемах, или в промышленные ферментеры приводит к значительному удорожанию конечного продукта. Особенно важно, чтобы клонированные гены сохранялись, не утрачиваясь и не передаваясь другим микроорганизмам, в том случае, когда сконструированный микроорганизм предназначен для использования вне стен лаборатории. Он должен не только оставаться эффективным, но и быть экологически безопасным. Включение клонированной ДНК в хромосомную ДНК хозяйского организма позволяет обойтись без плазмид и избежать утраты плазмидных генов.

При встраивании нужного гена в хромосомную ДНК хозяина нужно позаботиться о том, чтобы сайт интеграции не находился внутри гена, кодирующего важную клеточную функцию. Для этого чужеродный ген включают в заведомо несущественный сайт. Кроме того, для обеспечения эффективной экспрессии его помещают под контроль регулируемого промотора. Для интеграции в нужный сайт вводимый ген должен содержать нуклеотидную последовательность длиной не менее 50 нуклеотидов, сходную с таковой в хромосомной ДНК, в пределах которых и должен произойти физический обмен (рекомбинация) между двумя молекулами ДНК. Вкратце процесс интеграции состоит в следующем.

1. Идентификация подходящего сайта интеграции, т. е. сегмента хозяйской ДНК, последовательность которого может быть прервана без ущерба для функционирования клетки.
2. Выделение и клонирование всего хромосомного сайта интеграции или его части.
3. Встраивание нужного гена вместе с регулируемым промотором в клонированный сайт интеграции (рис. 6.15, А) или вблизи него (рис. 6.15, Б).
4. Перенос полученной генетической конструкции «хромосомный сайт интеграции/клонированный ген» в хозяйскую клетку в составе плазмиды, не способной к автономной репликации в клетках этого хозяина.
5. Отбор и сохранение тех хозяйских клеток, которые экспрессируют клонированный ген. Наследование клонированного гена возможно только в случае его интеграции в хромосому клеток хозяина.

Если клетка трансформирована нереплицирующейся плазмидой, несущей клонированный ген в середине клонированного фрагмента с хромосомным сайтом интеграции, то может произойти спаривание между гомологичными нуклеотидными последовательностями плазмиды и хозяйской ДНК (рис. 6.15, А) и далее интеграция в результате двойного кроссинговера, осуществляемого ферментами клетки-хозяина. Альтернативный вариант - интеграция всей плазмидной ДНК в хромосому хозяина в результате одиночного кроссинговера (на рисунке не показано). Интеграция всей плазмиды может произойти и в том случае, если клонированный

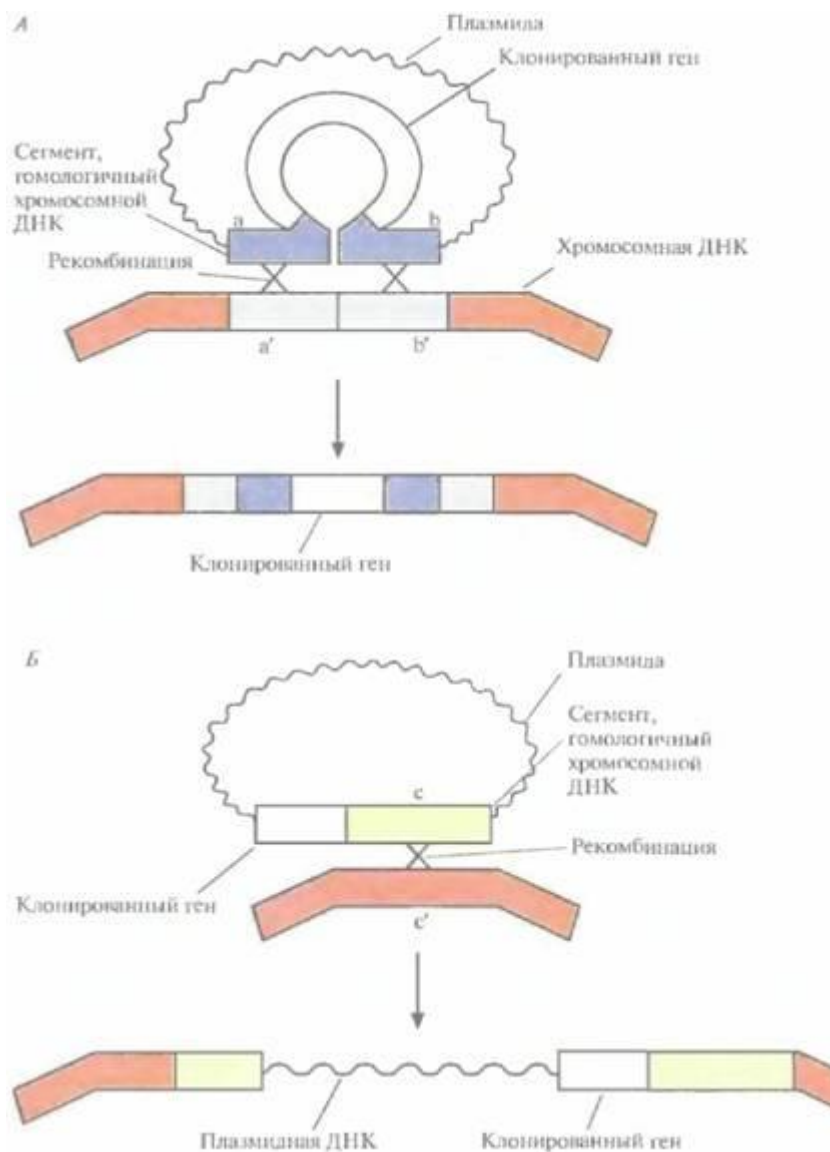


Рис. 6.15. Два способа интеграции клонированного гена в плазмиду гена в хромосому. А. Ген встроен в середину клонированного в плазмиде сегмента ab, гомологичного сегменту a'b' в хромосомной ДНК. В результате двойного кроссинговера (X-X) клонированный ген оказывается в составе хромосомы. Б. Ген встроен вблизи клонированного в плазмиде сегмента c, гомологичного сегменту c' в хромосомной ДНК. В результате одиночного кроссинговера (X) происходит интеграция в хромосому всей плазмиды вместе с включенным в нее геном.

ген встроен вблизи клонированного хромосомного сайта интеграции.

Для проверки эффективности интеграции клонированного гена использовали *B. subtilis*. Была сконструирована плазмида *E. coli*, содержащая ген  $\alpha$ -амилазы (фермента, участвующего в гидролизе крахмала) *Bacillus amyloliquefaciens*, встроенный в середину фрагмента ДНК из *B. subtilis*. Она была неспособна реплицироваться в этом микроорганизме, но ею можно было трансформировать клетки *B. subtilis*. Обнаруженные трансформанты синтезировали  $\alpha$ -амилазу, что свидетельствует об интеграции гена, кодирующего данный фермент, в хромосому *B. subtilis*, и о его функционировании. Отобранные рекомбинанты были устойчивы к ампициллину и хлорамфениколу. Поскольку оба гена устойчивости находились в плазмиде, было очевидно, что произошла одиночная рекомбинация, в результате которой вся плазмида включилась в хромосомную ДНК *B. subtilis*.

Чтобы увеличить число копий гена  $\alpha$ -амилазы, локализованных в хромосоме *B. subtilis*, ис-

ходные трансформанты выращивали в присутствии хлорамфеникола в высокой концентрации. В таких условиях выживали только те клетки, в которых происходила спонтанная дупликация интегрированной плазмиды. Клетки, отобранные по признаку устойчивости к хлорамфениколу, проверяли на активность  $\alpha$ -амилазы (табл. 6.5). После такой процедуры были получены клетки, содержащие до 9 копий гена  $\alpha$ -амилазы. Уровень ферментативной активности в клетках, содержащих  $\alpha$ -амилазные гены в составе хромосомы, была гораздо выше, чем в том случае, когда эти гены находились в многокопийной плазмиде (от 20 до 40 копий на клетку) *B. subtilis*.

В одном из исследований несколько копий чужеродного гена было встроено в разные заранее выбранные сайты в хромосоме *B. subtilis*, при этом для каждой из копий использовалась двух-этапная процедура (рис. 6.16), На первом этапе

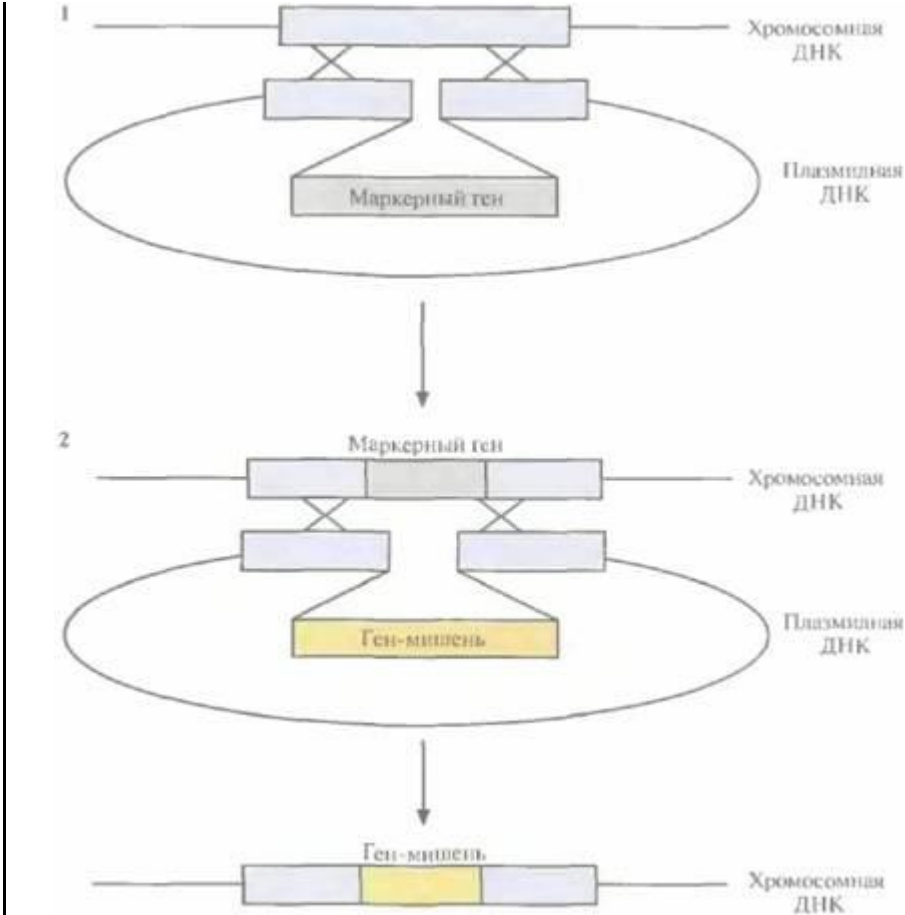
Таблица 6.5. Связь между числом копий гена  $\alpha$ -амилазы и уровнем ее активности в клетках *B. subtilis*<sup>1)</sup>

| Число копий на геном  | Активность, ЕД на 1 мл культуры, находящейся в середине экспоненциальной фазы |
|-----------------------|---|
| 2                     | 500   |
| 5                     | 2300  |
| 7                     | 3100  |
| 8                     | 3400  |
| 9                     | 4400  |
| Многокопийная плазида | 700   |

<sup>1)</sup> По данным работы Kallio et al., 1987. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27: 64-71.

выбирали селективный маркерный ген (например, ген устойчивости к какому-либо антибиотику) и встраивали его в середину вполне определенного, но несущественного фрагмента хромосомной ДНК *B. subtilis* в составе плазмид-

Рис. 6.16. Встраивание чужеродного гена в заранее выбранный сайт в хромосоме *B. subtilis*. На этапе 1 в хромосомную ДНК хозяйской клетки с помощью гомологичной рекомбинации встраивают маркерный ген. На этапе 2 маркерный ген замещают геном-мишенью. Аналогичную операцию повторяют для других сайтов.



ного вектора, не способного к репликации в этом микроорганизме. Отбирали клетки, экспрессирующие маркерный ген, т. е. клетки, у которых этот ген включился в хромосомную ДНК. На втором этапе ген-мишень с соответствующими сигналами инициации транскрипции и трансляции, введенный в середину такого же, как и выше, несущественного фрагмента хромосомной ДНК *B. subtilis* в составе плазмиды, включали в хромосомную ДНК с помощью рекомбинации, заменив им маркерный ген. Отбирали клетки, которые уже не экспрессировали маркерный ген, т. е. несли вместо него ген-мишень, интегрированный в хромосомную ДНК. Для интеграции других копий гена-мишени в хромосомную ДНК хозяйской клетки повторяли эту процедуру, используя другие несущественные области ДНК.

## Повышение эффективности секреции

Стабильность белков, кодируемых клонированными генами, зависит от их клеточной локализации. Например, рекомбинантный проинсулин оказывается примерно в 10 раз более стабильным, если он секретируется (экспортируется) в периплазму (пространство между плазматической и наружной мембранами), а не остается в цитоплазме. Кроме того, белки, секретируемые в периплазму или в среду, легче очистить.

Обычно транспорт белков через клеточную мембрану обеспечивают N-концевые аминокислотные последовательности, называемые сигнальными пептидами (сигнальными последовательностями, лидерными пептидами). Иногда удается сделать белок секретируемым, присоединив к кодирующему его гену нуклеотидную последовательность, ответственную за синтез сигнального пептида. Однако простое наличие сигнального пептида не обеспечивает эффективной секреции. Кроме того, *E. coli* и другие грамотрицательные микроорганизмы обычно не могут секретировать белки в окружающую среду из-за наличия наружной мембраны. Есть по крайней мере два способа решения этой проблемы. Первый — использование грамположительных про- или эукариот, лишенных наружной мембраны, второй — создание грамотрицательных бактерий, способных секретировать белки в среду, с помощью генной инженерии.

Если слияние гена-мишени с фрагментом ДНК, кодирующим сигнальный пептид, не приводит к эффективной секреции белкового продукта, приходится использовать другие стратегические приемы. Один из таких приемов, с успехом примененных в отношении интерлейкина-2, основывался на слиянии гена, кодирующего интерлейкин-2, с геном, кодирующим полноразмерный предшественник мальтозосвязывающего белка, а не только его сигнальную последовательность, и разделении этих генов сегментом ДНК, кодирующим сайт узнавания для фактора  $X_a$ . Когда такой химерный ген включили в плазмидный вектор и использовали его для трансформации *E. coli*, в периплазме хозяйской клетки обнаружили в большом количестве химерный белок. Обработав его фактором  $X_a$ , получили функциональный интерлейкин-2.

По данным одной из работ, секреция многих гетерологичных белков в *E. coli* зависит от уровня экспрессии соответствующих генов. Чужеродные белки, синтезируемые наиболее активно, не обязательно столь же активно секретируются. Иногда интенсивный синтез чужеродного белка вызывает перегрузку секреторного аппарата и его блокирование. Таким образом, если нужно, чтобы данный белок непременно секретировался, то можно попытаться понизить уровень экспрессии соответствующих генов.

Некоторые грамотрицательные бактерии секретируют в среду белок, называемый бактериоцином. Он активирует фосфолипазу А, локализованную во внутренней мембране бактериальной клетки, в результате чего и внутренняя, и наружная мембраны становятся проницаемыми, и некоторые цито- и периплазматические белки высвобождаются в культуральную среду. Таким образом, можно встроить ген бактериоцина в плазмиду так, чтобы он находился под контролем сильного регулируемого промотора, трансформировать клетки *E. coli* этой плазмидой и сделать их проницаемыми. Если же *E. coli* уже несут ген бактериоцина, их можно трансформировать другой плазмидой, которая содержит ген нужного белка, сшитый с нуклеотидной последовательностью, кодирующей сигнальный пептид. Если оба гена находятся под контролем одного промотора, то их можно индуцировать одновре-



менно, и белок клонированного гена будет секретироваться в среду.

Когда секретируемые чужеродные белки образуются в *E. coli* в слишком большом количестве, очень часто процессинг претерпевают не все белки-предшественники: примерно половина секретируемых белков сохраняет лидерную последовательность, а другая половина полностью процессируется с образованием зрелой формы. Это может быть связано с недостатком каких-то белков, участвующих в секреции. В такой ситуации, чтобы увеличить долю процесси-рованных белков, можно попытаться повысить уровень экспрессии генов, ответственных за синтез лимитирующих компонентов секретирующей системы. Для проверки этого предположения были поставлены следующие эксперименты. Плазмиду, несущую гены *priA4* и *secE*, которые кодируют основные компоненты молекулярного механизма, ответственного за физическое перемещение белков через мембрану, ввели в клетки *E. coli*. После такого усиления секреторного аппарата хозяйской клетки доля ре-комбинантного белка (цитокина интерлейкина-6), секретируемая в плазмиду в зрелой форме, увеличилась с 50 до более чем 90%.

Грибы *Aspergillus* секретируют в среду большое количество ферментов и широко используются для их промышленного производства. В одной из работ осуществили слияние гена человеческого интерферона с геном сигнального пептида, ответственного за секрецию, и поместили эту конструкцию под контроль глюкоамилазного промотора *Aspergillus nidulans*, индуцируемого крахмалом. После добавления последнего в среду с трансформированными клетками *Aspergillus nidulans* выход секретируемого человеческого интерферона достиг 1 мг на 1 л, что эквивалентно примерно 5% всего секретируемого клеточного белка. Эта работа показывает, что стратегии модулирования генной экспрессии, разработанные для *E. coli*, можно использовать и применительно к другим биологическим системам.

## Метаболическая перегрузка

Введение в клетку чужеродной ДНК и ее экспрессия часто приводят к нарушениям клеточного метаболизма. Эти нарушения весьма разнообразны и обусловлены давлением, которое оказывает чужеродная ДНК на все клеточные процессы. Метаболическая перегрузка может возникать по разным причинам.

- Увеличение числа копий и/или размера плазмид и связанное с этим увеличение количества энергии, необходимого для их репликации и сохранения,
- Недостаток растворенного кислорода в среде и невозможность обеспечения им и всех метаболических реакций, и процесса экспрессии плазмидных генов,
- Гиперпродукция чужеродных белков, приводящая к истощению пула некоторых аминокислот-тРНК (или даже некоторых аминокислот) и/или энергетических запасов (в виде АТФ и GTP).
- Перегрузка системы экспорта и нарушение правильной локализации жизненно важных белков хозяйской клетки вследствие «перепроизводства» чужеродного белка, экспортируемого из цитоплазмы к клеточной мембране или в пери плазматическое пространство.
- Наличие у организма-хозяина необычных метаболических свойств (например, высокая дыхательная активность у *Azotobacter* spp.), что делает его более чувствительным к различным воздействиям, чем обычные клетки.
- Непосредственное влияние чужеродных белков на функционирование хозяйской клетки (например, превращение с их помощью важных незаменимых предшественников в неприемлемые, а иногда и токсичные соединения).

Метаболическая перегрузка может привести к разнообразным изменениям в физиологии и функционировании хозяйской клетки. Одно из наиболее частых — снижение скорости роста клеток после введения чужеродной ДНК. Так, клетки, содержащие плазмиду, растут медленнее, чем нетрансформированные, не содержащие плазмид (табл. 6.6), что часто сопровождается утратой рекомбинантной плазмиды. Иногда метаболическая перегрузка приводит к тому, что под давлением отбора из плазмиды делегируется рекомбинантный ген или его часть.



Таблица 6.6. Влияние числа копий плазмиды на скорость роста хозяйских клеток<sup>1)</sup>

| Плазмиды, присутствующие в клетках <i>E. coli</i> HB101 <sup>2)</sup> | Число копий плазмиды | Относительная скорость роста |
|---|----------------------|------------------------------|
| Плаزمида отсутствует  | 0                    | 1,00                         |
| A   | 12                   | 0,92                         |
| B   | 24                   | 0,91                         |
| C   | 60                   | 0,87                         |
| D   | 122                  | 0,82                         |
| E   | 408                  | 0,77                         |

<sup>1)</sup> По данным работы Seo, Bailey. 1985. *Biotechnol. Bioeng.* 27: 1668- 1674.  
<sup>2)</sup> Плазмиды, обозначенные буквами A, B, C, D и E, кодируют только β-лактамазу и имеют одинаковый размер.

Поскольку клеткам, растущим в условиях метаболической перегрузки, не хватает энергии для нормального функционирования, затрагиваются прежде всего такие энергоемкие метаболические процессы, как фиксация азота или синтез белков. Могут изменяться также размер и форма клеток, образовываться слишком много внеклеточного полисахарида, склеивающего клетки друг с другом и затрудняющего микрофильтрацию.

Как следствие метаболической перегрузки, обусловленной образованием избыточного количества чужеродного белка и нехваткой питательных веществ или «строительных блоков» -аминокислот, может произойти запуск стрессовых механизмов, в частности инициироваться синтез клеточных протеиназ, под действием которых произойдет быстрая деградация рекомбинантного белка. Истощение пула аминокислот может стать результатом эффективной экспрессии не только клонированных генов-мишеней, но и генов самого вектора, кодирующих маркеры устойчивости к антибиотикам.

Вероятность трансляционных ошибок для *E. coli* составляет  $2 \cdot 10^{-4}$ — $2 \cdot 10^{-3}$  на 1 клетку за генерацию. Однако в условиях нехватки определенных аминоксил-тРНК, что часто случается при суперпродукции чужеродных белков, вероятность включения в белковую молекулу неправильной аминокислоты вместо недостающей сильно увеличивается. Кроме того, точность трансляции еще больше снижается из-за недостатка ГТР, который является необходимым компонентом корректирующего аппарата. В одной из работ было показано, что в условиях гиперпродукции фактора роста эпидермиса мыши в клетках *E. coli* частота ошибочных включений аминокислот в рекомбинантный белок увеличивается в 10 раз. Это не позволяет использовать синтезируемый белок в качестве лекарственного средства, поскольку: 1) удельная активность и стабильность белка могут быть гораздо ниже ожидаемых; 2) наличие в молекуле «неправильных» аминокислот может вызвать нежелательную иммунологическую реакцию при введении такого белка в организм человека.

К счастью, правильно спланировав эксперимент, можно минимизировать влияние метаболической перегрузки, оптимизировать выход рекомбинантного белка и повысить стабильность трансформированных хозяйских клеток. Например, нагрузку можно снизить, если использовать малокопийные плазмидные векторы. А еще лучше вообще отказаться от векторов и встроить чужеродную ДНК в хромосомную ДНК организма-хозяина. В этом случае не нужно заботиться об обеспечении стабильности плазмиды. Кроме того, клетке не приходится расходовать свои ресурсы на синтез ненужных продуктов, кодируемых маркерными генами устойчивости к антибиотикам. Синтез продуктов таких генов, входящих в состав плазмидных векторов наряду с генами-мишенями, является одной из основных причин метаболической перегрузки. Интеграция в хромосому особенно важна в тех случаях, когда используется сам рекомбинантный микроорганизм, а не синтезируемый им продукт. Уменьшению метаболической перегрузки помогает также применение сильных, но регулируемых промоторов. В такие случаях ферментацию проводят в две стадии. На первой из них, во время роста, промотор, контролирующей транскрипцию гена-мишени, выключен, а на второй, во время индукции, -включен.

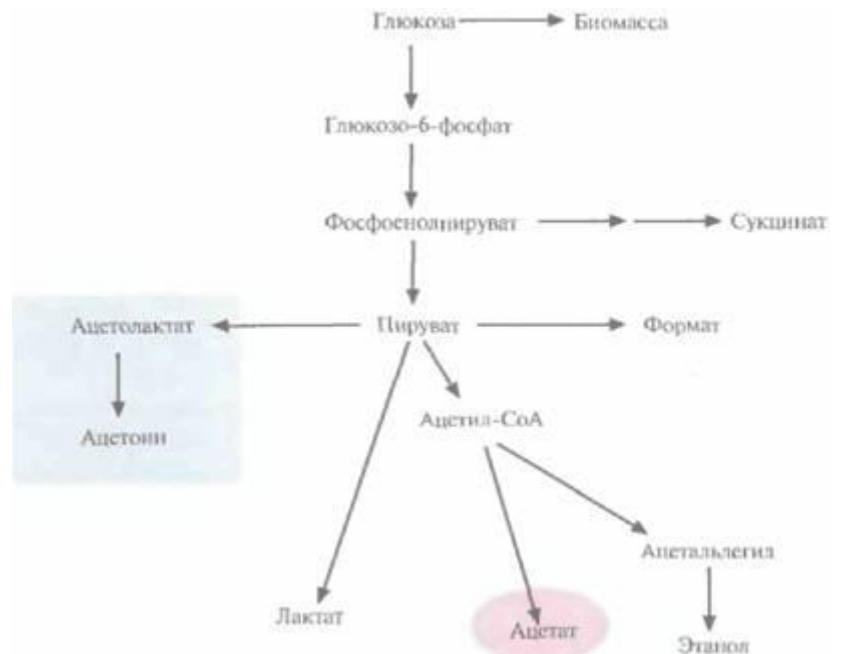
Если частота использования кодонов у чужеродного гена отличается от таковой у организма-хозяина, то проблему нехватки специфических аминоксил-тРНК можно решить, синтезировав часть гена-мишени или даже весь ген с более близким к хозяйскому организму набором кодонов. Так, в одном из исследований было показано, что количество стрептавидина, образующегося при экспрессии синтетического гена с GC-содержанием 54%, было в 10 раз больше, чем при экспрессии «природного» гена с GC-содержанием 69%. Однако этот подход довольно сложен и может применяться лишь в редких случаях.

Как это ни парадоксально, но один из способов увеличения количества чужеродного белка, синтезируемого рекомбинантным микроорганизмом, состоит в поддержании уровня экспрессии его гена на среднем уровне (так, чтобы на долю продукта приходилось примерно 5% суммарного клеточного белка), но зато в максимальном увеличении плотности культуры. Микробиологическая система с 5%-ным уровнем экспрессии чужеродного белка и низкой метаболической нагрузкой, в которой плотность может достигать 40 г/л (масса сухого вещества), оказывается более эффективной, чем система с 15%-ным уровнем экспрессии и плотностью 10 г/л.

Достиж одновременно и высокого уровня синтеза чужеродного белка, и высокой плотности культуры часто не удается из-за накопления вредных побочных продуктов (в первую очередь ацетата), подавляющих рост клеток и синтез белка. Чтобы уменьшить накопление ацетата в богатой среде, не нарушая роста клеток, можно снизить скорость поглощения глюкозы, добавив в среду ее аналог, метил- $\alpha$ -гликозид. Альтернативный подход состоит в использовании клеток *E. coli*, несущих мутацию в гене *ptsG*, который кодирует фермент II глюкозофосфотрансферазной системы. Максимальная плотность культуры *E. coli* дикого типа составила примерно 10 г/л, а культуры *E. coli* с мутацией в гене *ptsG* — 15 г/л. Кроме того, уровень синтеза  $\beta$ -лактамазы в мутантных клетках был на 25% выше (на 1 г массы сухого вещества), чем в клетках дикого типа, так что суммарное различие достигает примерно двукратной величины.

Достичь аналогичного результата можно гораздо проще и быстрее, если использовать методы генной инженерии, а не мутагенез и отбор. Один из подходов состоял во введении в *E. coli*

Рис. 6.17. Схематическое представление метаболизма глюкозы в клетках *E. coli*, трансформированных плазмидой, несущей гены ацетолактатсинтазы.



генов, кодирующих ацетолактатсинтазу. Этот фермент катализирует образование ацетолактата из пирувата, что приводит к уменьшению количества образующегося ацетата (рис. 6.17). Гены ацетолактатсинтазы вводят в клетки в составе одной плазмиды, а гены-мишени — в составе другой, из другой группы несовместимости. Трансформированные клетки синтезируют гораздо меньше ацетата, чем нетрансформированные; вместо него образуется ацетоин, соединение примерно в 50 раз менее токсичное, чем ацетат.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Чтобы получить какой-то белковый продукт, необходимо обеспечить правильную транскрипцию кодирующего его гена и трансляцию соответствующей мРНК. Для инициации транскрипции в нужном сайте необходим промотор, а для ее остановки — терминирующий кодон. Клонированный ген часто бывает лишен таких сигнальных последовательностей, и для его экспрессии в прокариотической клетке-хозяине нужно обеспечить и то, и другое. Кроме того, поскольку для решения большинства биотехнологических задач белок должен образовываться в больших количествах, необходимо использовать промотор, который позволял бы получить высокий уровень транскрипции (сильный промотор) и распознавался РНК-полимеразой хозяйской клетки. Постоянная транскрипция клонированного гена истощает энергетические ресурсы хозяйской клетки, поэтому нужно использовать промоторы, работу которых можно регулировать либо с помощью специфических низкомолекулярных соединений, либо изменением температуры.

Эффективность синтеза белка зависит от наличия в его мРНК специфических нуклеотидных последовательностей. Чтобы предотвратить разрушение белкового продукта или обеспечить его секрецию, клонированные гены, которые кодируют этот белок, подвергают направленным изменениям. Это может быть присоединение сайта связывания рибосомы перед сайтом инициации транскрипции (который в свою очередь тоже бывает нужно присоединить) или добавление к концу клонированного гена терминирующего кодона, который обеспечивал бы остановку трансляции. Если нужно, чтобы белок секретировался, то перед клонированным геном необходимо встроить сигнальную последовательность, рамка считывания которой согласуется с таковой гена-мишени.

Еще одна проблема — невысокая стабильность белков, кодируемых клонированными генами. Рекомбинантный белок может расщепляться про-теиназами хозяйской клетки. Чтобы избежать этого, можно изменить клонированный ген таким образом, чтобы на N-конце белковой молекулы оказались одна или несколько дополнительных аминокислот. В такой форме рекомбинантный белок уже не подвергается столь быстрой деградации. Кроме того, «лишние» аминокислоты иногда помогают в последующей очистке химерного белка, например с помощью иммуноаффинной хроматографии на колонке. При этом место соединения компонент подбирается так, чтобы по нему можно было расщепить молекулу (химическим или ферментативным путем) и получить эти компоненты в чистом виде.

Большинство микроорганизмов, с помощью которых получают белковые продукты, растут только в присутствии кислорода. Последний плохо растворяется в воде, и при интенсивном росте его запасы быстро истощаются. Чтобы обойти эту трудность, использовали два пути: 1) применяли штаммы, неспособные синтезировать некоторые протеолитические ферменты; 2) включали в геном хозяйских клеток гены, кодирующие гемоглобин *Vitreoscilla* sp., который связывает кислород окружающей среды и повышает его концентрацию в клетке.

С увеличением числа копий клонированного гена увеличивается количество синтезируемого продукта. Однако при переходе к крупномасштабному производству конструкция «плазида/клонированная ДНК» очень часто утрачивается. Чтобы избежать этого, разработали способы интеграции клонированного гена в хромосому организма-хозяина. В этом случае ген остается в клетке как часть хозяйской ДНК.

Введение в геном организма-хозяина и экспрессия чужеродной ДНК часто приводят к нарушению его метаболизма и нормального функционирования — так называемой метаболической

перегрузке. Разработан целый ряд способов, позволяющих минимизировать этот эффект и одновременно оптимизировать выход белка-мишени и стабильность трансформированных клеток.

Системы экспрессии весьма разнообразны, и исследователям приходится каждый раз подбирать условия, наиболее подходящие для получения того или иного белка в том или ином организме-хозяине. И все же, несмотря на различия в деталях, для создания самых разных систем экспрессии используются одни и те же основные приемы.

## ЛИТЕРАТУРА

- Ашапл Е., J. Brosius.** 1985. "ATG vectors" for regulated high-level expression of clones genes in *Escherichia coll. Gene A*: 183-190.
- Aristidou A. A., K. Y. San, G. N. Bennett.** 1995. Metabolic engineering of *Escherichia coli* to enhance recombinant protein production through acetate reduction. *Biotechnol Prog.* **II**:475—478.
- BachniarA., D. Finley, A. Varshavsky.** 1986. In vivo half-life of a protein in a function of its arnino-termimit residue. *Science* 234: 179—186.
- Bagdasarian M. M., E. Amann, **R. Lurz, B. Ruckert, M. Bagdasarian.** 1983. Activity of the hybrid *Op-lac (tac)* promoter of *Escherichia coli* in *Pseudomonas putida*. Construction of broad-host-range, controlled-expression vectors, *Gene* 26: 273-282.
- Baker R. T., A. Varshavsky.** 1991. Inhibition of the N-end rule pathway in living cells. *Proc. Naît. Acad. Set. Î&488*: 1090-1094.
- Chaitan K., J. E. Curtis, J. De Modena, U. Rinas, J. E. Bailey.** 1990. Expression of intracellular hemoglobin improves protein synthesis in oxygen-limited *Escherichia coli*. *Bio/Technology* 8: 849-853.
- Chou C. H., G. N. Bennett, K. V. San.** 1994. Effect of modified glucose uptake using genetic engineering techniques on high-level recombinant protein production in *Escherichia coli* dense cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 44: 952-960.
- deBoer H. A., L J. Cnmstnck, M. Yasser.** 1983. The *tac* promoter a functional hybrid derived from the *trp* and *lac* promoters. *Proc. Nafl. Acad. Set. USA* 80: 21-25.
- Donovan R. S., C. W. Robinson, B. R. Click.** 1996. Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the *lac* promoter. *. Ind. Microbiol.* 16: 145-154.
- Ernst J. F.** 1988. Codon usage and gene expression. *Trends Biotechnol.* 6: 196-199.
- Friesen J. D., G. An.** 1983. Expression vehicles used in recombinant DNA technology. *Biotechnol. Adv.* 1: 205-227.
- Geisow M. J.** 1991. Both bane and blessing-inclusion bodies. *Trends Biotechnol.* 9: 368-369.
- Gentz R., A. Langner, A. C. Y. Chang, S. N. Cohen, fL Bujard.** 1981. Cloning and analysis of strong promoters is made possible by the downstream placement of a RNA termination signal, *Proc. Natl. Acad. Sei. USA* 78: 4936-4940.
- Click B. R.** 1995. Metabolic load and heterologous gene expression. *Biotechnol. Adv.* 13: 247—261,
- Click B. R., G. K. Whitney.** 1987. Factors affecting the expression of foreign proteins in *Escherichia coli*. *J. Ind. Microbiol.* I: 277-282.
- Goldstein M. A., R. H. Doi.** 1995. Prokaryotic promoters in biotechnology, *In* p. 105—128. M. R. El-Gewely (ed.), *Biotechnology Annual Review*, vol. 1. Elsevier Science B. V., Amsterdam, The Nertherlands.
- Gwynne D. I., F. P. Buxton, S. A. Williams, S. Garven, R. W. Davies.** 1987. Genetically engineered secretion of active human interferon and a bacterial endoglucanase from *Aspergillus nidu-ians*. *Bio/Technology* 5: 713-719.
- Halfmann G., H. Brailly, A. Bernadac, F. A. Mon-tero-Julian, C. Lazdimski, D. Baty.** 1993. Targeting of interleukin-2 to the periplasm of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 139: 2465-2473.
- Hartley J. L., T. J. Gregori.** 1981. Cloning multiple copies of a DNA gene. *Geve* 13: 347-353.
- Hockney R. C.** 1994. Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.* **12**: 456-463.
- Hopp T. P., K. S. Pricket t, V. L. Price, R. T. Libby, C. J. March, D. P. Cerretti, D. L. Urdal, P. J. Conlon.** 1988. A short polypeptide marker sequence useful for recombinant protein identification and purification. *Bio/Technology* 6: 1204-1210.
- Hsiung H. M., A. Cantrell, J. Luirink, B. Oudega, A. J. Veros, G. W. Becker** 1989. Use of bacteri-

ocin release protein in *E. coli* for excretion of human growth hormone into the culture medium. *Bio/Technology* 7: 267-271.

**Jay G., G. Khoury, A. K. Seth, E. Jay.** 1981. Construction of a general vector for efficient expression of mammalian proteins to bacteria: use of a synthetic ribosome binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 5543-5548.

**Jespers L. S., J. H. Messens, A. De Keyser, D. Lee kin »tit, 1. Van den Brande, Y. (i. (Îansemâis. M. J. Lauwereys, G. P. Vlasuk, P. E. Stanssens.** 1995. Surface expression and ligand-based selection of cDNAs fused to filamentous phage gene VI. *Bio/Technology* 13: 378-382.

**Kaffio P., A. Palva, I. Palva.** 1987. Enhancement of  $\alpha$ -amylase production by integrating and amplifying the  $\alpha$ -amylase gene of *Bacillus amylotique-faciens* in the genome of *Bacillus subtilis*. *Appt. Microbiol. Biotechnol* 27: 64-71.

**Kiel J. A. K. W., A. M. ten Berge, P. Borger, G. Venema.** 1995. A general method for the consecutive integration of single copies of a heterol-ogous gene at multiple locations in the *Bacillus subtilis* chromosome by replacement recombination. *Appf. Environ. Microbiol.* 61: 4244—4250.

**Kolata G.** 1986. New rule proposed for protein degradation. *Science* 234: 151—153.

**Kolowsky K. S., J. G. K. Williams, A. A. Szalay.** 1984. Length of foreign DNA in chimeric plasmids determines the efficiency of its integration into the chromosome of the cyanobacterium *Synechococcus* R2. *Gene* 27: 289-299.

**Kozlowski M., A. VanBrunschot, G. Nash, R. W. Davies.** 1988. A novel vector allowing the expression of genes in a wide range of gram-negative bacteria. *Gene* 70: 199-204.

**Labes M., A. Puhler, R. Simon.** 1990. A new family of RSF1010-derived expression and /Ïc-fusion broad-host-range vectors for gram-negative bacteria. *Gene* 89: 37-46.

**Lee N., J. Cozzitorto, N. Wainwright, D. Testa.** 1984. Cloning with tandem gene system for high level gene expression. *Nucleic Acids Res.* 12: 6797-6812.

**Leemans R., E. Remaut, W. Fiers.** 1987. Broad-host-range expression vector based on the  $p^L$  promoter of coliphage 1: regulated synthesis of human interleukin 2 in *Erwinia* and *Serratia* species. *J. Bacteriol.* 169: 1899-1904.

**Little M., F. Breitling, B. Micheel, S. Dübel.** 1994. Surface display of antibodies, *Biotechnol. Adv.* 12: 539-555.

**Liu S. C., D. A. Webster, M. L. Wei, B. C. Stark.** 1996. Genetic engineering to contain the *Vitreoscilla* hemoglobin gene enhances degradation of benzoic acid by *Xanthomonas maltophilia*. *Biotechnol. Bioeng.* 49: 101-105.

**Looman A. C., J. Bodlaender, M. de Gruyter, A. Vogelaar, P. H. van Knippenberg.** 1986. Secondary structure as primary determinant of the efficiency of ribosomal binding sites in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 14: 5481-5497.

**Magnolo S. K., D. L. Leenutaphong, J. A. DeMuedena, J. E. Curtis, J. E. Bailey, J. L. Gala//«, D. E. Hughes.** 1991. Actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* and growth of *Streptomyces lividans* are improved by the expression of a bacterial hemoglobin. *Bio/Technology* 9: 473-476.

**Meerman H. J., G. Georgiou.** 1994. Construction and characterization of a set of *E. coli* strains deficient in all known loci affecting the proteolytic stability of secreted recombinant proteins. *Bio/Technology* 12: 1107-1110.

**Mieschendahl M., B. Müller-Hül.** 1985. F'-coded, temperature -sensitive  $\lambda$  cI<sub>857</sub> repressor gene for each construction and regulation of  $\lambda$  promoter-dependent expression systems. *J. Bacteriol.* 164: 1366-1369.

**Mieschendahl M., T. Pétris, U. Hanggi.** 1986. A novel prophage independent *trp* regulated Xp<sup>L</sup> expression system. *Bio/Technology* 4: 802-808.

**Murby M., M. Üblen, S. Ståhl.** 1996. Upstream strategies to minimize proteolytic degradation upon recombinant production in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 7: 129-136.

**Nagai K., H. C. Thogersen,** 1984, Construction of  $\beta$ -globin by sequence-specific proteolysis of a hybrid protein produced in *Escherichia coli*. *Nature* 309:810-812.

**Nygren P. A., S. Stahl, M. Uhlén.** 1994. Engineering proteins to facilitate bioprocessing. *Trends Biotechnol.* 12; 184-188.

**O'Neil K. T., R H. Hoess.** 1995. Phage display: protein engineering by directed evolution. *Curr, Opin. Struct. Biol.* 5: 443-449.

- Perez-Perez J., G. Marquez, J. L. Barbero, J. Gutierrez.** 1994. Increasing the efficiency of protein export in *Escherichia coli*. *Bio/Technology* 12: 178-180.
- Remaut E., H. Tsao, W. Fiers.** 1983. Improved plas-mid vectors with thermoinducible expression and temperature-regulated runaway regulation. *Gene* 22: 103-113.
- Rogers S., R. Wells, M. Rechsteiner.** 1986. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 234: 364-368.
- Sander F. C., R. A. Fachini, D. F. Hughes, J. L. Galazzo, J. E. Bailey.** 1994. Expression of *Vitreoscilla* hemoglobin in *Corynebacterium glutamicum* increases final concentration and yield of L-Jysine, p. 607-610, /« L. Alberghina, L. Frontali. P. Sensi (ed.). *Proceedings of the 6th European Congress on Biotechnology*. Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands.
- Sassenfeld H. M.,** 1990. Engineering proteins for purification. *Trends Biotechnol.* 8: 88—93.
- Simmons L. C., D. G. Yansura.** 1996. Translational level is a critical factor for the secretion of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* 14: 629-634.
- Sung W. L., F. L. Yao, D. M. Zahab, S. A. Narang.** 1986. Short synthetic oligodeoxyribonucleotide leader sequences enhance accumulation of human proinsulin synthesized in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 561-565.
- Talmadge K., W. Gilbert.** 1982. Cellular location affects protein stability in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 1830-1833.
- Taylor W. M., P. J. Hagerman.** 1987. A general method for cloning DNA fragments in multiple copies. *Gene* 53: 139-144.
- Tobias J. W., T. E. Schrader, G. Rocap, A. Varshavsky.** 1991. The N-end rule in bacteria. *Science* 254: 1374-1377.
- Tsuchiya M., Y. Morinaga.** 1988. Genetic control systems of *Escherichia coli* can confer inducible expression of cloned genes in coryneform bacteria. *Bio/Technology* 6: 428-430.
- Weinstock G. M., C. A. Rhys, M. L. Berman, B. Hampar, D. Jackson, T. J. Silhavy, J. Weisemann, M. Zweig.** 1983. Open reading frame expression vectors: a general method for antigen production in *Escherichia coli* using protein fusion to  $\beta$ -galactosidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 4432-4436.
- Wilcox G., G. M. Studnicka.** 1988. Expression of foreign proteins in microorganisms. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 10: 500-509.
- Wilkinson D. L., R. G. Harrison,** 1991. Predicting the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Bio/Technology* 9: 443—448.
- Williams J. G. K., A. A. Slay.** 1983. Stable integration of foreign DNA into the chromosome of the cyanobacterium *Synechococcus* R2. *Gene* 24: 37-51.
- Wong R. S. Y., R. A. Wirtz, R. E. W. Hancock.** 1995. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprF as an expression vector for foreign epitopes: the effects of positioning and length on the antigenicity of the epitope. *Gene* 158: 55—60.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какими способами можно влиять на экспрессию генов, клонированных в прокариотических организмах?
2. Что такое ген *lacI<sup>q</sup>* и как его используют?
3. Почему плазмидный вектор с максимально сильным промотором не всегда является наилучшим экспрессирующим вектором?
4. Что такое *tac*-промотор и как осуществляется его регуляция?
5. Промотор *p<sup>L</sup>* фага  $\lambda$ , способного инфицировать только *E. coli*, тем не менее иногда используют как составную часть экспрессирующего вектора с широким кругом хозяев. Как «приспособить» *p<sup>L</sup>*-промотор для инициации транскрипции в других организмах?
6. Иногда стратегия синтеза белка-мишени включает получение этого белка в составе химерного продукта. В чем преимущество такого подхода? Как создают химерный белок?
7. Что такое тельца включения и как избежать их образования?
8. В чем преимущество локализации чужеродных белков на поверхности клеток? Какие стратегии используются для того, чтобы сделать белки секретируемыми?
9. Как встроить в одну плазмиду несколько копий гена?



10. Как решить проблему обеспечения кислородом клеток *E. coli*, синтезирующих в большом количестве чужеродный белок?

11. Последовательность-мишень может быть встроена в хромосомную ДНК двумя способами: 1) сама по себе; 2) в составе плазмиды, которая несет эту последовательность. Как происходит каждое из этих событий? Какие

преимущества или недостатки имеет интеграция плазмидного вектора в хозяйскую ДНК?

12. Что такое метаболические перегрузки и какова их причина?

13. Предложите несколько способов снижения метаболической перегрузки *E. coli*, синтезирующих в большом количестве рекомбинантный белок.

# ГЛАВА 7

## Получение рекомбинантных белков с помощью эукариотических систем

Для получения гетерологичных рекомбинантных белков с клонированной эукариотической комплементарной ДНК (кДНК) обычно используются прокариотические системы экспрессии. Однако в некоторых случаях эукариотические белки, синтезированные в бактериях, оказываются нестабильными или биологически неактивными. Кроме того, как бы тщательно ни проводилась очистка, конечный продукт может быть загрязнен токсичными веществами или веществами, вызывающими повышение температуры у человека и животных (пирогенами). Чтобы решить эти проблемы, для получения рекомбинантных белков, предназначенных для использования в медицине, были разработаны эукариотические системы экспрессии. Такие белки должны быть идентичны природным по своим биохимическим, физическим и функциональным свойствам. Неспособность прокариот синтезировать аутентичные варианты белков обусловлена в основном отсутствием у них адекватных механизмов внесения специфических посттрансляционных модификаций,

Белки в клетках эукариот претерпевают следующие посттрансляционные изменения:

- Образование дисульфидных связей. Эту реакцию катализирует фермент дисульфидизомераза. Неправильно уложенный белок оказывается нестабильным и неактивным.

- Протеолитическое расщепление предшественника, удаление определенного участка полипептидной цепи с образованием функционально активного белка.

- Гликозилирование: основная модификация, благодаря которой белки приобретают ста-

бильность, а в некоторых случаях — особые свойства. Наиболее распространенная реакция гликозилирования — это присоединение специфического сахарного остатка либо к серину или треонину (О-гликозилирование), либо к аспарагину (N-гликозилирование).

- \* Модификации аминокислот в составе белка: фосфорилирование, ацетилирование, ацилирование, гамма-карбоксилирование, сульфатирование, миристилирование и пальмитоилирование.

Из всех этих модификаций прокариотические хозяйские клетки наименее всего способны осуществлять правильное гликозилирование и модификацию специфических аминокислот в гетерологичном белке. Однако ни одна эукариотическая система не может осуществить одновременно все посттрансляционные изменения в каждом потенциальном гетерологичном белке. Таким образом, для получения белка с полным набором специфических модификаций необходимо провести тестирование различных эукариотических систем экспрессии и найти такую, которая воспроизводила бы биологически аутентичный продукт.

Эукариотические экспрессирующие векторы имеют такую же структуру, что и их прокариотические аналоги (рис. 7.1), и должны содержать:

- \* эукариотический селективный маркер
- \* эукариотический промотор
- \* соответствующие эукариотические сайты терминации транскрипции и трансляции
- \* сигнал полиаденилирования мРНК.

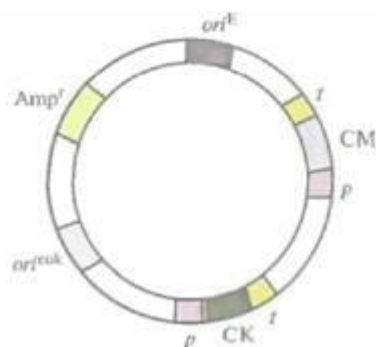


Рис. 7.1. Обобщенная структура эукариотического экспрессирующего вектора. Его основные элементы: эукариотический транскриптон с промотором ( $p$ ), сайтом клонирования (СК) и сигналами терминации и полиаденилирования ( $t$ ); эукариотический селективный маркер (СМ); сайт инициации репликации, функционирующий в клетках эукариот ( $ori^{euk}$ ); сайт инициации репликации, функционирующий в *E. coli* ( $ori^E$ ); селективный маркер *E. coli* ( $Amp^r$ ).

Если вектор представляет собой плазмиду, реплицирующуюся независимо от хромосомы, то он должен содержать сайт инициации репликации, функционирующий в хозяйской клетке. Если же вектор предназначен для встраивания в хозяйскую хромосомную ДНК, то для обеспечения рекомбинации он должен нести последовательность, комплементарную определенному участку хромосомной ДНК хозяина (хромосомный сайт интеграции). Поскольку технически многие операции с рекомбинантными ДНК сложнее проводить в клетках эукариот, чем прокариот, большинство эукариотических векторов сконструированы как челночные. Другими словами, эти векторы несут два типа сайтов инициации трансляции и два типа селективных маркерных генов, одни из которых функционируют в *Escherichia coli*, а другие — в эукариотических хозяйских клетках. Такие векторные системы экспрессии разработаны для дрожжей, насекомых и клеток млекопитающих.

Введение ДНК в бактериальные и дрожжевые клетки называется *трансформацией*. В микробиологии этот термин используется для описания наследственных изменений в результате внедрения (приобретения) экзогенной (чужеродной) ДНК. А применительно к животным клеткам трансформация обозначает изменение характера их роста в культуре, обусловленное превращением нормальных клеток в раковые. Чтобы избежать путаницы в терминологии, для обозначения наследственных изменений в животных клетках после введения в них экзогенной ДНК был выбран термин *трансфекция*.

Для трансформации дрожжей обычно используют три способа. В первом случае экзогенную ДНК добавляют к клеткам дрожжей, клеточные стенки которых удалены химически или ферментатически (протопласты) (1). В других случаях клетки перед добавлением чужеродной ДНК обрабатывают ацетатом лития (2) или подвергают электропорации (3). Трансфекцию культур животных клеток осуществляют инкубацией клеток с ДНК, осажденной фосфатом кальция или ДЕАЕ-декстраном (1), либо электропорацией в присутствии очищенной трансфицирующей ДНК (2). Как уже упоминалось в гл. 4, электропорация заключается в воздействии на клетки коротких мощных импульсов электрического тока, вследствие чего в наружной мембране или клеточной стенке образуются временные поры, через которые в клетку может проникнуть ДНК. В некоторых эукариотических системах для доставки ДНК в реципиентные клетки используют вирусы.

## Системы экспрессии *Saccharomyces cerevisiae*

Для экспрессии клонированных эукариотических генов интенсивно используют обычные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Тому есть несколько причин. Во-первых, это одноклеточный организм, генетика и физиология которого детально изучены и который можно выращивать как в небольших лабораторных колбах, так и в промышленных биореакторах. Во-вторых, выделены и охарактеризованы несколько сильных промоторов этих дрожжей, а для систем эндогенных дрожжевых экспрессирующих векторов могут использоваться природные, так называемые 2 мкм-плазмиды. В-третьих, в клетках *S. cerevisiae* осуществляется большое число посттрансляционных модификаций. В-четвертых, лишь очень немногие из собственных дрожжевых белков секретируются в среду; таким образом, если гетерологичный белок секретируется

клеткой, то его очистка не составит большого труда. В-пятых, поскольку дрожжи уже многие годы используют в хлебопечении и пивоварении, Департамент по контролю за качеством пищевых продуктов, медикаментов и косметических средств (США) включил *S. cerevisiae* в список «организмов, признанных безопасными» (GRAS, generally recognized as safe). Таким образом, использование этих организмов для получения белков, применяемых в медицине, не требует дополнительных экспериментов, необходимых при работе с неразрешенными к применению микроорганизмами. Некоторые белки, синтезированные в *S. cerevisiae*, уже применяются в качестве вакцин и фармацевтических препаратов, а также для диагностики (рис. 7.2).

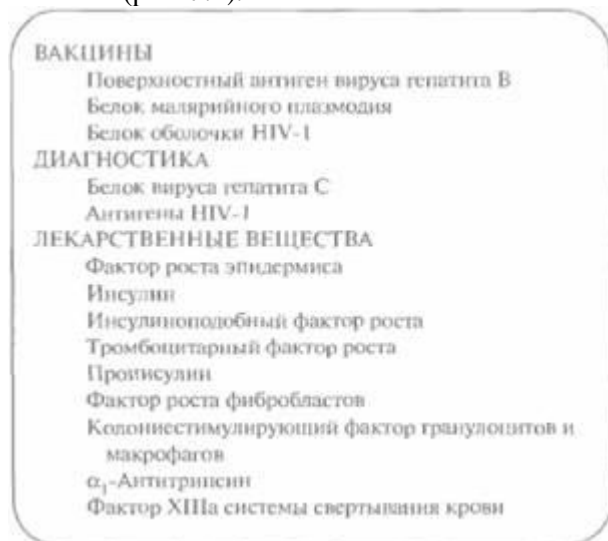


Рис. 7.2. Рекомбинантные белки, синтезируемые в системах экспрессии *S. cerevisiae*. HIV-1 — вирус иммунодефицита человека 1 типа.

### Векторы для *S. cerevisiae*

Существует три типа экспрессирующих векторов для *S. cerevisiae*. 1) эписомные, или плазмидные векторы; 2) интегрирующие векторы; 3) искусственные дрожжевые хромосомы (YAC). Плазмидные векторы уже широко использовались для получения как секретируемых, так и несекретируемых гетерологичных белков. Однако системы экспрессии, основанные на использовании плазмид, зачастую оказываются нестабильными при выращивании клеток в больших объемах (> 10 л). Стратегия с использованием векторов второго типа пока не получила широкого распространения, несмотря на то что в результате интеграции экспрессирующего вектора или транскриптона в хромосомную ДНК получается стабильный рекомбинантный организм. Причиной этого служит то, что число копий клонированного гена ограничивается одной на хромосому, иными словами, конечный выход белка невысок. Можно было бы использовать тандемные последовательности генов, но они часто оказываются нестабильными. Поэтому исследователи остановились на плазмидных векторах с одним клонированным геном, но попытались изменить условия роста, с тем чтобы повысить стабильность плазмид.

Искусственные дрожжевые хромосомы (YAC) предназначены для клонирования больших фрагментов ДНК (100 т. п. н.), которые затем поддерживаются в дрожжевой клетке как отдельные хромосомы. YAC-система чрезвычайно стабильна. С ее помощью проводили физическое картирование геномной ДНК человека и анализ больших транс-криптонов, создавали геномные библиотеки, содержащие ДНК индивидуальных хромосом человека. YAC-вектор напоминает хромосому, поскольку он содержит последовательность, функционирующую как сайт инициации репликации ДНК (автономно реплицирующуюся последовательность), сегмент центромерной области дрожжевой хромосомы и последовательности, образующиеся на обоих концах при линеаризации ДНК и действующие как теломеры, обеспечивающие стабильность хромосомы (рис. 7.3). При встраивании чужеродной ДНК в YAC может происходить нарушение рамки считывания маркерного дрожжевого гена. В результате продукт этого гена не образуется, и при выращивании клеток на специальной среде можно наблюдать цветную реакцию. Кроме того, некоторые YAC-векторы несут селективный маркер, независимый от сайта клонирования. Несмотря на все преимущества, YAC пока не использовались для промышленного синтеза гетерологичных белков.

### Прямая экспрессия в *S. cerevisiae*

Термин «прямая экспрессия» применяется для описания векторных систем, при использовании которых синтезированные белки аккумули-

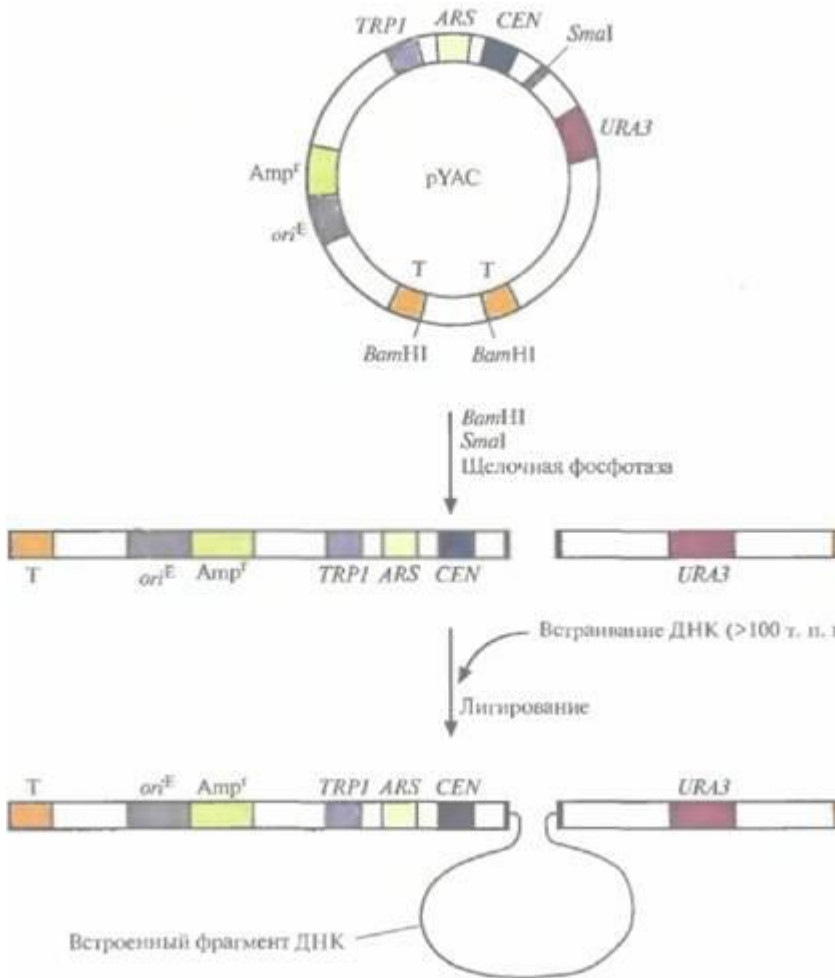


Рис. 7.3. YAC-система клонирования. YAC-плазмида (pYAC) содержит селективный маркерный ген *E. coli* (*Amp<sup>r</sup>*), сайт инициации репликации, функционирующий в *E. coli* (*ori<sup>E</sup>*); сегмент дрожжевой ДНК, включающий участки *URA3*, *CEN*, *TRP1* и *ARS* (*CEN* - последовательность, выполняющая центромерную функцию, *ARS* - дрожжевая автономно реплицирующаяся последовательность, эквивалентная дрожжевому сайту инициации репликации, *URA3* — один из генов биосинтеза урацила, *TRP1* - один из генов биосинтеза триптофана). *T* — это теломерные области дрожжевой хромосомы, *SmaI* — сайт, по которому осуществляется клонирование. pYAC сначала обрабатывают *SmaI*, *BamHI* и щелочной фосфатазой, а затем сшивают с фрагментом ДНК длиной 100 т. п. н. Конечная генетическая конструкция содержит клонированную ДНК и может стабильно поддерживаться в дрожжевых клетках *Ura<sup>-</sup> Trp<sup>-</sup>*

руются в цитоплазме хозяйской клетки. Несколькоими группами исследователей были разработаны различные экспрессирующие дрожжевые векторы, но все они имеют сходные основные черты. Мы рассмотрим процесс экспрессии чужеродного гена в *S. cerevisiae* на примере синтеза фермента супероксиддисмутазы человека.

Супероксид-анион — это побочный продукт утилизации кислорода аэробными организмами. У человека он участвует в стимуляции иммунного ответа фагоцитов и направлении лейкоцитов к месту инфекции. Однако избыток данного соединения и его производных может вызывать повреждение клеток. В минимизации потенциального цитотоксического воздействия таких веществ и принимает участие цитоплазматический фермент Cu/Zn-супероксиддисмутаза (Cu/Zn-SOD); он катализирует связывание супероксид-аниона и иона водорода с образованием пероксида водорода, который в свою очередь служит субстратом для каталазы или пероксидазы. Супероксид-анион образуется также при повторной перфузии органа, кровоснабжение которого было прекращено перед хирургическим вмешательством. Чтобы избежать повреждения клеток супероксид-анионом, исследователи предложили перед повторной перфузией вводить в орган Cu/Zn-SOD. Cu/Zn-SOD может использоваться также для лечения таких воспалительных заболеваний, как остеоартрит, ревматоидный артрит, склеродермия и болезнь Бехтерева. При этом в

обоих случаях лучше использовать белок, аутентичный Cu/Zn-SOD человека, для того чтобы избежать любых нежелательных иммунных реакций, которые могут возникнуть при введении фермента от других видов.

Первоначально кДНК Cu/Zn-SOD человека была клонирована в системе экспрессии *E. coli*. Но в этом случае от молекулы Cu/Zn-SOD только отщеплялся инициаторный N-концевой метионин — так, как это происходит со всеми белками, синтезируемыми в *E. coli*, а следующая аминокислота (аланин) не ацетилировалась, как в клетках человека. Поэтому для получения аутентичного фермента кДНК Cu/Zn-SOD человека была встроена в дрожжевой эписомный вектор. Дрожжевые клетки не способны эффективно вырезать интроны, поэтому для кодирования специфичных генных продуктов необходимо использовать соответствующие кДНК или химически синтезированные последовательности. Дрожжевой вектор с кДНК Cu/Zn-SOD человека (рис. 7.4) содержал: 1) дрожжевой ген биосинтеза лейцина (*LEU2*); 2) сегмент 2мкм-плазмиды с сигналом инициации репликации ДНК дрожжей, что обеспечивало репликацию плазмиды в дрожжевых клетках; 3) селективный маркер — *E. coli*-ген устойчивости к ампициллину (*Amp<sup>r</sup>*) и сайт инициации репликации, активный в *E. coli*, что позволяет осуществлять стандартные генноинженерные манипуляции, необходимые для создания плазмиды, в клетках *E. coli*; 4) кДНК Cu/Zn-SOD человека, встроенную между промотором дрожжевого гена глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (*GAPDp*) и последовательностью, содержащей сигналы терминирования транскрипции и полиаденилирования мРНК того же гена (*GAPDt*).

Этим вектором трансформировали штамм дрожжей, не способный к синтезу лейцина (*LEU2<sup>-</sup>*), и высевали их на среду без лейцина. В этих условиях могут расти только клетки с функционирующим *LEU2*-геном, находящимся в векторе. *GAPD*-промотор не регулируется, транскрипция с него происходит непрерывно. Поэтому кДНК Cu/Zn-SOD человека транскрибируется в течение всего периода роста (конститутивно). В этом эксперименте в дрожжевых клетках накапливались большие количества Cu/Zn-SOD, в котором, подобно

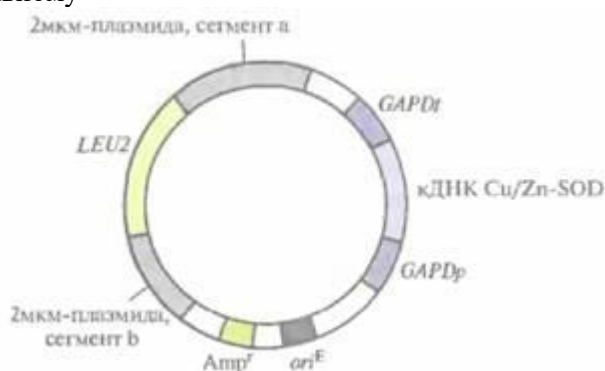


Рис. 7.4. Экспрессирующий вектор *S. cerevisiae*. Между промотором {*GAPDp*} и сигналом терминирования-полиаденилирования (*GAPDt*) гена глицеральдегидфосфатдегидрогеназы *S. cerevisiae* встроена кДНК Cu/Zn-SOD человека. Ген *LEU2*, встроенный в середину дрожжевой 2мкм-плазмиды, кодирует один из ферментов биосинтеза лейцина. Ген устойчивости к ампициллину (*Amp<sup>r</sup>*) и сайт инициации репликации *E. coli* (*ori<sup>E</sup>*) переклонированы из плазмиды pBR322.

белку из клеток человека, аминокислотная группа N-концевого остатка аланина была ацетилирована.

### Секреция гетерологичных белков, синтезируемых *S. cerevisiae*

В дрожжевых клетках гликозилируются только секретируемые белки, поэтому для получения рекомбинантных белков, которые для перехода в активную форму должны подвергнуться N-или O-гликозилированию, необходимо использовать системы секреции. Для этого перед кДНК, которая кодирует интересующий исследователя белок, нужно поместить так называемый пре-про- $\alpha$ -фактор - лидерную (сигнальную) последовательность гена  $\alpha_1$  фактора спаривания дрожжей. Синтезируемый рекомбинантный белок сможет в этом случае эффективно секретироваться дрожжами.

Во время транспорта белка в нем образуются дисульфидные связи, происходят протеолитическое расщепление и другие посттрансляционные модификации, так что в некоторых случаях в среду попадает уже активный белок. Лидерный пептид обеспечивает проникновение белка через цитоплазматическую мембрану и секрецию, при этом сам он отщепляется дрожжевой эндопротеиназой, узнающей дипептид Lys-Arg. Поэ-



тому кодоны Lys и Arg должны располагаться непосредственно перед кДНК, так чтобы после отщепления сигнального пептида синтезированный белок содержал на N-конце нужный аминокислотный остаток.

Используя эписомный экспрессирующий вектор с сигнальной последовательностью  $\alpha$ -фактора, удалось получить правильным образом модифицированный, биологически активный белок гирудин: он синтезировался и секретиrowался штаммом *S. cerevisiae*. Ген гирудина был выделен из клеток беспозвоночного — пиявки *Hirudo medicinalis*. Этот белок является мощным антикоагулянтом и не вызывает нежелательных иммунологических реакций у человека. Его можно получать в активной форме в больших количествах, что упростило исследование его способности разрушать сгустки венозной крови и устранять другие проявления тромбоза. К сожалению, клинические исследования 12 142 больных, у 4131 из которых имелись сердечнососудистые заболевания, выявили лишь незначительные преимущества рекомбинантного гирудина перед гепарином. Эти преимущества не могут компенсировать высокую стоимость рекомбинантного гирудина, так что его широкое использование в клинике представляется маловероятным.

Чтобы повысить эффективность секреции рекомбинантных белков штаммами *S. cerevisiae*, были предприняты дальнейшие исследования. Так, попытались выяснить, способствует ли повышению выхода рекомбинантного белка суперэкспрессия такого природного фермента системы секреции, как дисульфидизомеразы, которая обеспечивает правильную укладку белковой молекулы в процессе секреции. Для этого в хромосому 5. *cerevisiae* встроили ген дрожжевой дисульфидизомеразы, находящийся под контролем конститутивного промотора глицеральдегидфосфатдегидрогеназы и сигнала терминации транскрипции. Уровень синтеза дисульфидизомеразы модифицированным штаммом был в 16 раз выше по сравнению со штаммом дикого типа. Далее в штамм — суперпродукцент дисульфидизомеразы ввели внехромосомный экспрессирующий вектор, несущий ген фактора роста тромбоцитов В человека. Количество секретируемого этим штаммом тромбоцитарного фактора роста В человека превысило в 10 раз количество фактора, секретируемого штаммом с нормальным уровнем синтеза дисульфидизомеразы. Суперпродукция дисульфидизомеразы повышает секрецию белков только с дисульфидными связями. Изменение других белков дрожжевой системы секреции может повысить количество секретируемых рекомбинантных белков с другими требованиями к укладке белковой молекулы.

### Другие дрожжевые системы экспрессии

С помощью систем экспрессии *S. cerevisiae* удалось получить много разных рекомбинантных белков. К сожалению, в большинстве случаев уровень их экспрессии был довольно низким. Кроме того, обнаружились и другие проблемы.

- При увеличении масштабов системы часто происходит потеря плазмид, даже если используются индуцируемые промоторы.
- Гетерологичный белок зачастую оказывается гипергликозилированным и содержит более 100 остатков маннозы в каждой боковой олигосахаридной цепи, в то время как в нативных белках их содержится только от 8 до 13 на цепь. Наличие лишних маннозных остатков может изменять биологическую активность продукта или его иммуногенность.
- Во многих экспериментах белки, которые должны были секретироваться, на самом деле концентрировались в периплазматическом пространстве, что еще более осложняло их очистку.

Все это заставило ученых исследовать возможность получения гетерологичных белков с помощью других видов дрожжей и с использованием эукариотических систем. В частности, изучались соответствующие векторы — системы экспрессии, содержащие видоспецифичные регуляторные последовательности транскрипции и трансляции, возможность трансформации этих видов и получения высокого выхода белков и возможность крупномасштабного культивирования организма-хозяина. В качестве альтернативы *S. cerevisiae* можно использовать *Kluyveromyces lactis*, дрожжи, которые применяют для промышленного производства лактозы.

(β-галактозидазы); *Schizosaccharomyces pombe*, дрожжи, размножающиеся делением, а не почкованием; *Yarrowia lipolytica*, которые используют алканы в качестве субстрата; *Pichia pastoris* и *Hansenula polymorpha*, которые могут использовать метанол как единственный источник углерода и энергии.

### Синтез поверхностного антигена вируса гепатита В

Метилотрофные дрожжи *P. pastoris* можно без труда и больших затрат выращивать в промышленных биореакторах. Их использование в качестве организма-хозяина позволило бы увеличить выход активных продуктов — гетерологичных белков. Такой вывод можно сделать, рассмотрев в качестве примера получение поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) с помощью специально разработанной системы с использованием интегрирующего вектора. Сначала ген *HBsAg* встроили между промотором гена алкогольоксидазы 1 (*AOX1p*) и сигналом терминирования-полиаденилирования (*AOX1t*) того же гена (рис. 7.5). Регуляция активности гена *AOX1 P. pastoris* осуществляется с помощью метанола. В

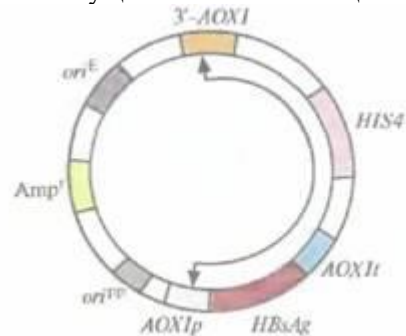


Рис. 7.5. Интегрирующий экспрессирующий вектор для *P. pastoris*. Между промотором (*AOX1p*) и сигналом терминирования-полиаденилирования (*AOX1t*) гена алкогольоксидазы 1 *P. pastoris* встроены ген *HBsAg*. *HIS4* — ген, кодирующий один из ферментов биосинтеза гистидина, гистидинолдегидрогеназу. Кроме того, вектор содержит сайт инициации репликации *P. pastoris* (*ori<sup>pp</sup>*), ген устойчивости к ампициллину (*Amp<sup>r</sup>*) и сайт инициации репликации, активный в *E. coli* (*ori<sup>E</sup>*). 3'-*AOX1* — это фрагмент 3'-концевой последовательности гена алкогольоксидазы 1 *P. pastoris*. Стрелками указан сегмент, который интегрируется в геном *P. pastoris*.

его присутствии на долю алкогольоксидазы может приходиться до 30% всех белков клетки, а в отсутствие метанола алкогольоксидаза не синтезируется вообще.

Вектор (рис. 7.5), специально сконструированный для этих исследований, содержал следующие элементы: 1) блок *AOX1p-HBsAg-AOX1t*; 2) сайт инициации репликации, функционирующий в *P. pastoris*; 3) фрагмент ДНК, содержащий сайт инициации репликации плазмиды рВR322 и селективный маркер *E. coli*; 4) фрагмент 3'-*AOX1*, способствующий интеграции клонированной ДНК в определенный сайт хромосомы; 5) активный ген гистидинолдегидрогеназы (*HIS4*), кодирующий фермент, который участвует в синтезе аминокислоты гистидина. Наличие в этой конструкции последовательностей рВR322 позволяет использовать для работы с ней *E. coli*, что облегчает клонирование и при необходимости позволяет получать большие количества векторной ДНК.

Чтобы предотвратить утрату плазмиды, была предусмотрена интеграция участка *AOX1p-HBsAg-AOX1t* в геном *P. pastoris*. Для этого штамм *P. pastoris* *HIS4<sup>-</sup>* с дефектным геном гистидинолдегидрогеназы трансформировали фрагментом вектора, содержащим элементы *AOX1p-HBsAg-AOX1t*, *HIS4* и 3'-*AOX1* (рис. 7.5). В результате двойного кроссинговера между *AOX1p* и 3'-*AOX1* введенной ДНК, с одной стороны, и комплементарными последовательностями хромосомной ДНК, с другой, произошла интеграция последовательностей *AOX1p-HBsAg-AOX1t* и *HIS4* в геном, сопровождающаяся утратой хромосомного гена *AOX1* (рис. 7.6). Клетки, в геном которых вошел ген *HIS4*, растут на среде без гистидина; этот признак может использоваться для их отбора. Вторым критерием отбора служит замедление роста клеток в присутствии метанола, поскольку после потери гена *AOX1* после двойного кроссинговера активным остается только один, менее эффективный ген *AOX2*.

Клон с интегрированным фрагментом *AOX1p-HBsAg-AOX1t* при росте в присутствии метанола, который активирует *AOX1*-промотор, синтезировал в больших количествах аутентичный белок HBsAg, накапливающийся в цитоплазме. Белковый продукт образовывал такой

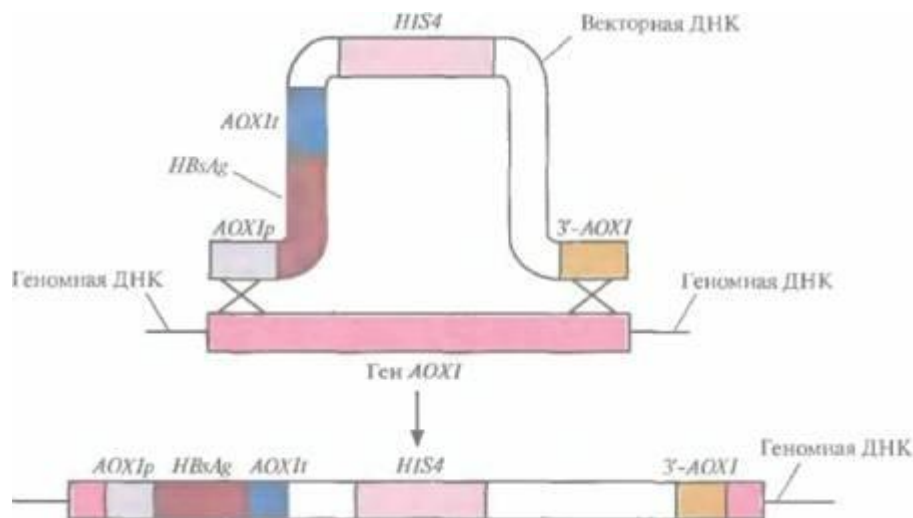


Рис. 7.6. Интеграция части экспрессирующего вектора в ген алкогольоксидазы 1 *P. pastoris*. В результате двойного кроссинговера между геном *AOX1* и участками *AOX1p* и 3'-*AOX1* (верхняя часть рисунка) происходит интеграция вектора в геномную ДНК и утрата большей части гена алкогольоксидазы 1 (*AOX1*) хозяйской хромосомой (нижняя часть рисунка). Продукт гена *HIS4* дает возможность клеткам расти на среде без гистидина. В присутствии метанола *AOX1p* активирует транскрипцию гена *HBsAg*, а *AOX1t* обеспечивает терминацию транскрипции и полиаденилирование.

же мультисубъединичный комплекс, как и соответствующий белок в клетках человека, инфицированных вирусом гепатита В, и связывался с антителами к этому вирусу. При выращивании данного клона в 240-литровом ферментере периодического действия количества синтезируемого белка хватило бы примерно на  $10^7$  вакцинаций. При этом генетическая конструкция оставалась неизменной в течение 200 часов культивирования в присутствии метанола,

### Синтез бычьего лизоцима С2

Способность *P. pastoris* секретировать гетерологичный белок исследовали в системе с использованием кДНК бычьего лизоцима С2, кодирующей полноразмерный белок и его собственный лидерный пептид. Бычий лизоцим — это желудочный фермент, разрушающий клеточные стенки бактерий; он устойчив к протеазам и сохраняет активность в узком диапазоне рН, что позволяет использовать его в качестве добавки к кормам жвачных животных для улучшения пищеварения.

Вектор, созданный для этого исследования, был идентичен вектору *AOX1p-HBsAg-AOX1t*, описанному выше, за исключением того, что вместо кодирующей последовательности *HBsAg* в него была встроена кДНК лизоцима. Вся плазмида была интегрирована в дефектную копию гена *HIS4* в хромосоме *P. pastoris*. В результате интеграции ген бычьего лизоцима оказывался фланкирован одним активным (*HIS4*) и одним дефектным (*HIS4*<sup>-</sup>) генами гистидинол-дегидрогеназы (рис. 7.7). Предшественник бычьего лизоцима процессировался в *P. pastoris* и секретировался в среду, при этом удельная активность секретируемого белка была такой же, как у нативного фермента. При ферментации 10 л культуры в течение 200 ч в непрерывном режиме при высокой плотности клеток синтезировалось примерно 20 г лизоцима.

Аутентичные гетерологичные белки были получены и с помощью других дрожжевых систем. Например, кДНК  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей гемоглобина А человека были встроены между промотором (*MOXp*) и сигналом терминации транскрипции (*MOXt*) гена метанооксидазы *Hansenula polymorpha* и помещены друг за другом в экспрессирующий вектор. Через 40 генераций был взят изолят со случайно интегриро-

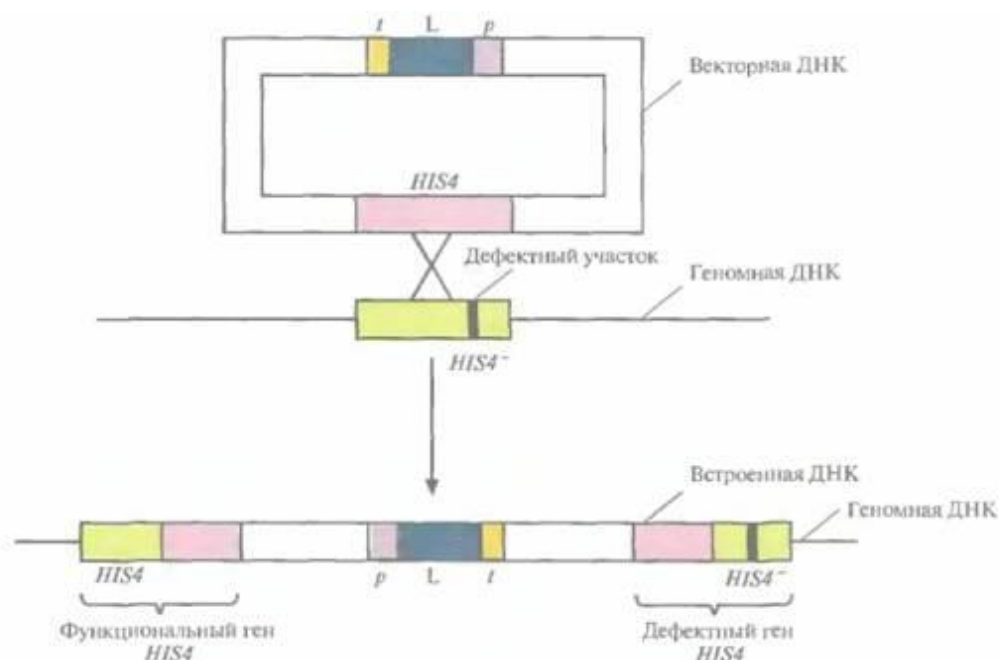


Рис. 7.7. Интеграция экспрессирующего плазмидного вектора в дефектный хромосомный ген *HIS4*<sup>-</sup> *P. pasioris*. В результате кроссинговера между плазмидным геном *HIS4* и геном *HIS4*<sup>-</sup> клетки-хозяина происходит интеграция в геном всей плазмиды, которая оказывается фланкированной функциональным и дефектным генами *HIS4*. *p*, *L* и *t* — промотор *AOX1*, кДНК бычьего лизоцима C2 и сигнал терминации транскрипции-полиаденилирования соответственно. Черная полоска — дефектный участок в *HIS4*<sup>-</sup>-гене.

вавшим участком исходного вектора и показано, что в нем присутствует функциональный гемоглобин А с правильной тетрамерной структурой: две  $\alpha$ - и две  $\beta$ -цепи ( $\alpha_2\beta_2$ ). Кроме того, с использованием экспрессирующего вектора для *S. pombe*, несущего селективный маркерный ген и клонированный ген человека, оба под контролем промоторов млекопитающих, были получены большие количества рекомбинантных белков, кодируемых разными генами человека.

Дрожжевые системы экспрессии стали играть важную роль в получении гетерологичных белков для научных, промышленных и медицинских целей. Однако, как показали исследования, ни одна из них не может гарантировать получение аутентичного белка любого гена. По этой и ряду других причин были разработаны системы экспрессии генов с использованием клеток насекомых и млекопитающих.

## Системы экспрессии с использованием культур клеток насекомых

Бакуловирусы инфицируют только беспозвоночных, в том числе многих насекомых. В ходе инфекционного процесса образуются две их формы. Одна представлена отдельными вирионами, которые высвобождаются из инфицированной клетки хозяина, как правило клетки средней кишки, и способны инфицировать другие клетки этого органа. Вторая состоит из множества вирионов, заключенных в белковый матрикс. Белок этого матрикса называется полиэдрином, а сама структура — полиэдроном. Синтез полиэдрина начинается через 36—48 ч после инфекции и продолжается 4—5 сут, пока зараженные клетки не лизируют и хозяйский организм не погибнет. После этого множество таких частиц высвобождается и попадает в среду, где от инактивации их защищает белковый

матрикс. Если восприимчивый хозяйский организм проглатывает такую частицу, то полиэдрин солюбилизируется и высвобождаются вирионы, способные инициировать новый инфекционный цикл.

Промотор гена полиэдрина чрезвычайно сильный, а цикл развития вируса не зависит от наличия самого гена. Следовательно, замена последнего геном чужеродного белка с последующей инокуляцией полученным рекомбинантным бакуловирусом культуры клеток насекомого может привести к синтезу большого количества гетерологичного белка, который благодаря сходству систем внесения посттрансляционных модификаций у насекомых и млекопитающих будет близок (а возможно, и идентичен) к нативной форме того белка, который интересует исследователя. Исходя из этого на основе бакуловирусов были разработаны векторы для экспрессии генов, кодирующих белки млекопитающих и вирусов животных.

Наиболее широко используется вирус множественного ядерного полиэдроза *Autographa californica* (AcMNPV). Этот бакуловирус инфицирует более 30 других видов насекомых, а также хорошо растет в культуре многих клеточных линий. Линии клеток, обычно используемые для работы с рекомбинантным AcMNPV, получают из гусениц *Spodoptera frugiperda*. Промотор полиэдрина в этих клетках чрезвычайно активен, и при их заражении бакуловирусом дикого типа синтезируются большие количества белка.

### Система экспрессирующих векторов на основе бакуловирусов

Первый шаг в конструировании рекомбинантного

бакуловируса AcMNPV состоит в создании транспортного вектора. Транспортный вектор - это производная плазмиды *E. coli*, содержащая фрагмент ДНК AcMNPV (рис. 7.8), который включает: 1) промоторную область и расположенную перед ней последовательность ДНК AcMNPV, необходимую для гомологичной рекомбинации с AcMNPV; 2) сайт для клонирования; 3) сайт терминирования полиаденилирования гена полиэдрина и прилегающую к нему последовательность ДНК AcMNPV — вторую область, обеспечивающую гомологичную рекомбинацию с AcMNPV (рис. 7.8). Кодирующая последовательность гена полиэдри-

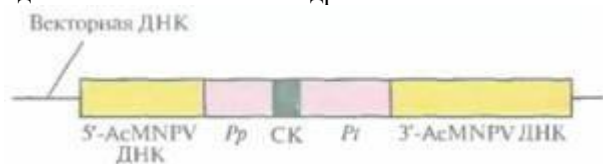


Рис. 7.8. Схематическое представление единицы экспрессии транспортного вектора на основе бакуловирусов (AcMNPV). Ген белка-мишени встраивают в сайт клонирования (СК) между промотором гена полиэдрина (Pr) и сайтом терминирования его транскрипции (Pt). Перед промотором и после сайта терминирования транскрипции встраивают фрагменты ДНК AcMNPV (5'-AcMNPV ДНК и 3'-AcMNPV ДНК соответственно), обеспечивающие интеграцию единицы экспрессии в ДНК AcMNPV за счет гомологичной рекомбинации в клетках насекомого.

на из этого фрагмента удалена. Интересующий исследователя ген встраивают между промотором и сигналом терминирования гена полиэдрина и вводят конструкцию в *E. coli*.

Культуру клеток насекомого, трансфицированную ДНК AcMNPV, трансфицируют затем транспортным вектором, несущим клонированный ген. В некоторых дважды трансфицированных клетках происходит двойной кроссинговер, в результате которого клонированный ген вместе с промотором и сигналом терминирования транскрипции гена полиэдрина встраивается в ДНК AcMNPV (рис. 7.9), замещая ген полиэдрина. Вирионы, не содержащие этого гена, образуют зоны клеточного лизиса, из которых можно выделить рекомбинантный бакуловирус.

Визуальная идентификация зон лизиса — утомительная и субъективная процедура. Вместо нее для обнаружения рекомбинантных бакуловирусов можно использовать ДНК-гибридизацию или полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Кроме того, если под контроль промотора бакуловируса, активного с ранних и до поздних стадии литического цикла, поместить ген *lacZ E. coli*, кодирующий β-галактозидазу, и такую конструкцию включить во фрагмент ДНК, встраивающийся в геном AcMNPV, то в присутствии хромогенного субстрата β-галактозидазы зоны с рекомбинантными вирусами окрасятся в синий цвет.

Гетерологичный белок, синтезируемый культурой клеток насекомого-хозяина, зараженной



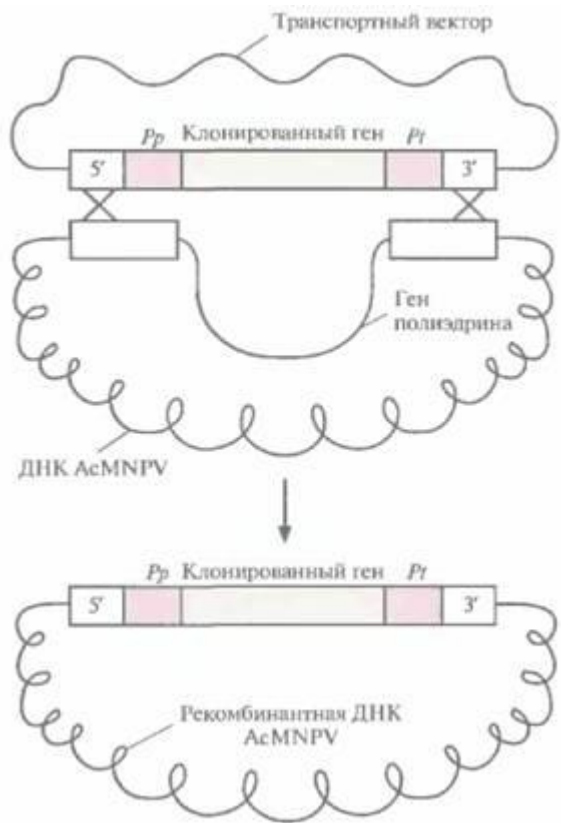


Рис. 7.9. Замещение гена полиэдрина AcMNPV единице и экспрессии транспортного вектора в результате двойного кроссинговера в 5'- и 3'-фрагментах.

рекомбинантным бакуловирусом, можно выделять через 4—5 сут. С помощью системы экспрессирующих векторов на основе бакуловирусов уже получено более 500 различных гетерологичных белков, при этом более 95% из них имели правильные посттрансляционные модификации (рис. 7.10).

Получение рекомбинантных бакуловирусов

Исходная методика получения рекомбинантных бакуловирусов в дальнейшем была изменена по ряду причин. Во-первых, применение промотора гена полиэдрина имеет ограничения: белки, синтезирующиеся на поздней стадии литического цикла, часто оказываются модифицированными не до конца. Для решения этой проблемы промотор гена полиэдрина заменили одним из сильных промоторов AcMNPV, активно функционирующих с самого начала и до конца литического цикла. Во-вторых, линейаризация генома AcMNPV перед трансфекцией клеток насекомого увеличивает долю зон лизиса с рекомбинантными вирусами. Расщепление генома AcMNPV в одном сайте уменьшает число зон с нерекомбинантными вирусами, потому что линейаризованные геномы бакуловирусов обладают ограниченной инфицирующей способностью. В результате двойного кроссинговера между линейаризованной ДНК AcMNPV и кольцевым транспортным вектором образуется замкнутая кольцевая молекула, которая обладает инфицирующей способностью. Чтобы обеспечить стабильную линейаризацию в каждом эксперименте, в геном AcMNPV дикого типа в ген полиэдрина встроили уникальный сайт для рестриктазы *Bsu361*. В результате доля зон лизиса с рекомбинантными бакуловирусами увеличилась с <1% (когда использовались нерасщепленные кольцевые молекулы AcMNPV) до примерно 30%.

|   |                                      |  |
|---|--------------------------------------|--|
| α-Интерферон  | Эритропоэтин                         | Белки вируса малярии                       |
| Аденозиндезаминаз   | G-белок-сопряженные рецепторы        | Мышинные моноклональные антитела           |
| Антиген вируса сибирской язвы   | Белок оболочки HIV-1                 | Белок — переносчик лекарственных веществ   |
| Предшественник β-амилоида   | Белки капсиды HSV                    | Белки полиовируса                          |
| β-Интерферон  | Щелочная фосфатаза человека          | Гликопротеин 50 вируса псевдобешенства     |
| Бычий ролонсин  | ДНК-полимераза α человека            | Гликопротеин вируса бешенства              |
| Антиген вируса синего языка   | Липаза поджелудочной железы человека | Антиген респираторно-синцитиального вируса |
| Регулятор проницаемости мембран, нарушения в котором приводят к муковисцидозу | Гемагглютинин вируса гриппа          | Антиген капсиды ротавируса обезьян         |
| Антиген вируса денге типа 1   | Интерлейкин-2                        | Активатор тканевого плазминогена           |
|   | Белок вируса Ласса                   |  |

Рис. 7.10. Некоторые рекомбинантные белки, синтезированные в системе экспрессирующих векторов на основе бакуловирусов. HIV-1 — вирус иммунодефицита человека 1 типа; HSV - вирус простого герпеса.



## Синтез β-глобина кролика в культуре почечных клеток обезьяны, инфицированных рекомбинантным SV40

R, C. Mulligan, B. H. Howard. P, Berg *Nature* 277: 108-114, 1979

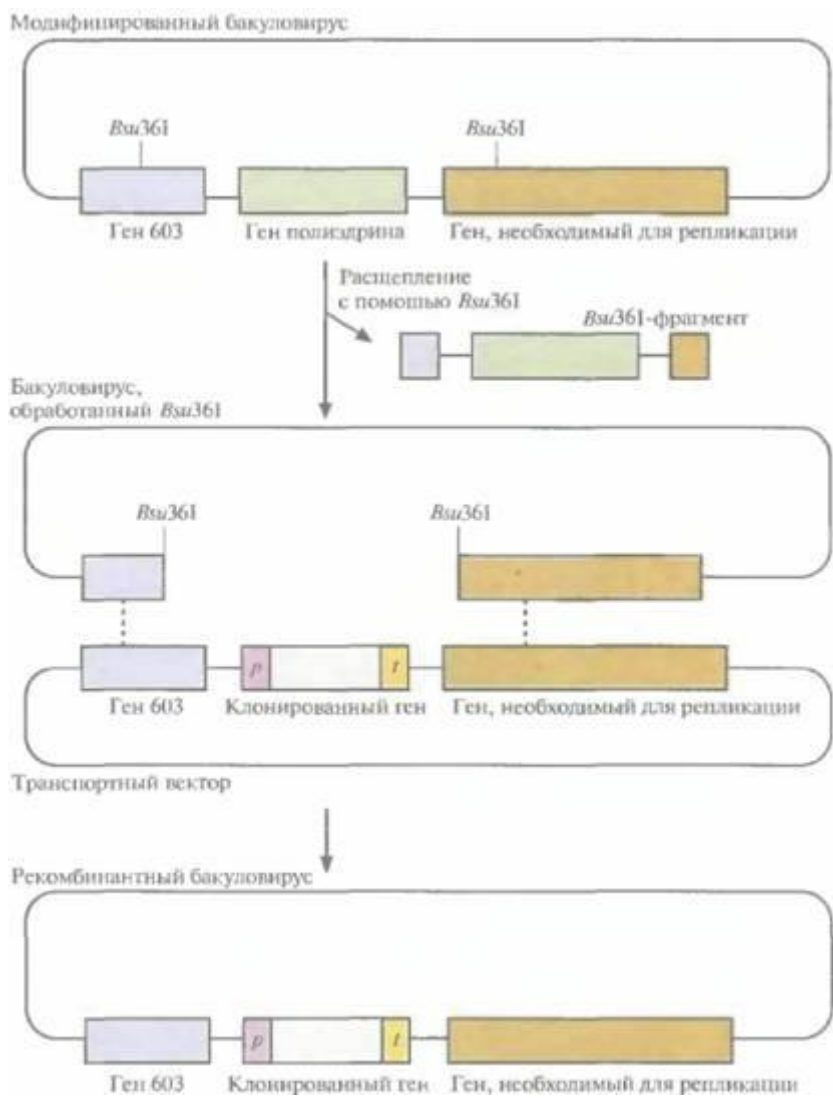
На первый взгляд разработка в векторы млекопитающих на мнению авторов статьи, любой эукариотической основе SV40 было встроено «основное новшество состояло в системе экспрессии множество разных генов, однако решении оставить неизменной представляется относительно после введения их в хозяйские клетки область вектора, участвующую простой процедурой, состоящей зрелые функциональные мРНК не в ...процессинге мРНК...» Это в подборе соответствующих обнаруживались, Муллиган и др. исследование показало, что регуляторных встроили кДНК β-глобина кролика в эффективную эукариотическую последовательностей, один из генов SV40, из которого была систему экспрессии можно встраивании их в вектор в удалена почти вся кодирующая создать, поместив ген-мишень определенном порядке и область, но который содержал «все под контроль транскрипционных клонировании гена-мишени участки, отвечающие за инициацию и и трансляционных регуляторных таким образом, чтобы терм и -нацию транскрипции, последовательностей. В ходе обеспечивалась его эффективная сплайсинг и дальнейших экспериментов были экспрессия. На практике же полиаденилирование...». В установлены все структурные создание первого поколения клетках, трансфицированных этой особенностью, которые должны эукариотических генетической конструкции, быть присущи эукариотическим экспрессирующим векторов синтезировались и мРНК β-глобина экспрессирующим векторам. оказалось весьма кропотливым кролика, и белок. По делом, основанным на методе проб и ошибок. До появления работы Муллигана, Хоуарда и Берга

*Bsu*361-систему линеаризации далее модифицировали так, чтобы получить сверхвысокую частоту рекомбинантных бакуловирусов. Для этого в геном AcMNPV внесли два *Bsu*361-сайта, по одному с каждой стороны гена полиэдрина (рис. 7.11). Один сайт находился в гене 603 (открытая рамка считывания 603 [ORF603]), а второй — в одном из генов (ORF 1629), необходимых для репликации вирусной ДНК. При трансфекции клеток насекомого с помощью ДНК модифицированного бакуловируса, инкубированного с *Bsu*361, репликация вируса не происходила, поскольку отсутствовал фрагмент необходимого для этого гена (ORF1629). Далее был создан транспортный вектор, содержащий ген-мишень и, если это нужно, селективный маркерный ген между интактной копией гена 603 и необходимым для репликации геном. Таким вектором трансфицировали клетки насекомого, которые были предварительно трансфицированы линеаризованной ДНК AcMNPV с делецией участка между *Bsu*361-сайтами. В результате двойного кроссингвера постановлялась функциональная форма ORF 1629 и происходило включение клонированного гена в геном AcMNPV (рис. 7.11). С помощью этой системы доля зон лизиса, содержащих рекомбинантные бакуловирусы, была увеличена до 99%.

## Создание челночного вектора на основе бакуловирусов для *E. coli* и клеток насекомых

Разработана система, позволяющая осуществлять все генноинженерные манипуляции по созданию экспрессирующего вектора на основе бакуловируса в *E. coli*. При этом трансфекция клеток насекомого нужна только для синтеза рекомбинантного белка. В системе используется фрагмент небольшой плазмиды *E. coli*, фланкированный участками ДНК, расположенными с 5'- и 3'-концов гена полиэдрина. Он содержит ген устойчивости к канамицину, нуклеотидную последовательность, играющую роль сайта интеграции и встроенную в ген *lacZ* без нарушения его функции, и сайт инициации репликации, активный в *E. coli*. Интеграция плазмиды в геном AcMNPV происходит в результате двойного кроссингвера и сопровождается элиминацией гена полиэдрина (рис. 7.12, А). При этом образуется кольцевая ДНК, способная сущест-

Рис. 7.11. Получение рекомбинантных бакуловирусов. В геном АсМNPV, а именно в ген 603 и ген ORF1629, необходимый для репликации бакуловируса в клетках насекомых, встраивают по одному Bsu361-сайту. Эти гены фланкируют ген полиэдрина АсМNPV. Инкубируют рекомбинантный бакуловирус с Bsu361, в результате чего выщепляется фрагмент, находящийся между Bsu361-сайтами. Трансфицируют клетки насекомого, несущие бакуловирус, который был обработан Bsu361, транспортным вектором с клонированным геном, фланкированным промотором (p) и сайтом терминирования транскрипции (t) гена полиэдрина, а также с полноразмерным геном 603 и геном, необходимым для репликации. В результате двойного кроссинговера (пунктирные линии) образуется рекомбинантный бакуловирус с функционирующим геном, необходимым для репликации. Выход рекомбинантных бакуловирусов в такой системе составляет 99%.



вовать в *E. coli* как плазида и ответственная за образование в трансфицированных клетках насекомого бакуловирусов. Челночные векторы на основе бакуловирусов для *E. coli* и клеток насекомых называют бакмидами.

Система на основе бакмид позволяет создать еще одну плазмиду *E. coli*, в которой между промотором и сайтом терминирования гена полиэдрина встроен ген-мишень (плазида-донор). В донорной плазмиде ген устойчивости к гентамицину и единица экспрессии гена-мишени фланкированы нуклеотидными последовательностями, которые связываются с сайтом интеграции в бакмиде, а ген устойчивости к ампициллину находится вне двух сайтов встраивания (рис. 7.12, Б). Рекомбинация между соответствующими сайтами в донорной плазмиде и бакмиде может происходить только в присутствии специфичных белков (белков транспозиции), которые в этой системе кодируются третьей плазмидой *E. coli* (плазмидой-помощницей), несущей еще и ген устойчивости к тетрациклину (рис. 7.12, Б).

Бактериальные клетки, несущие бакмиду, трансформируют одновременно плазмидой-по-

мощницей и донорной плазмидой. В некоторых двойных трансформантах фрагмент ДНК, ограниченный двумя сайтами интеграции, встраивается в сайт интеграции бакмиды (рис. 7.12, *Б* и *В*). Встраивание фрагмента донорной плазмиды с единицей экспрессии и геном устойчивости к гентамицину в сайт интеграции бакмиды нарушает рамку считывания гена *lacZ'*. В результате бактерии, несущие рекомбинантные (со встройкой) бакмиды, образуют белые колонии в присутствии изопропил- $\beta$ -D-тиогалактопиранозида (ИПТГ) и 5-бром-4-хлор-3-индолил- $\beta$ -D-галак-

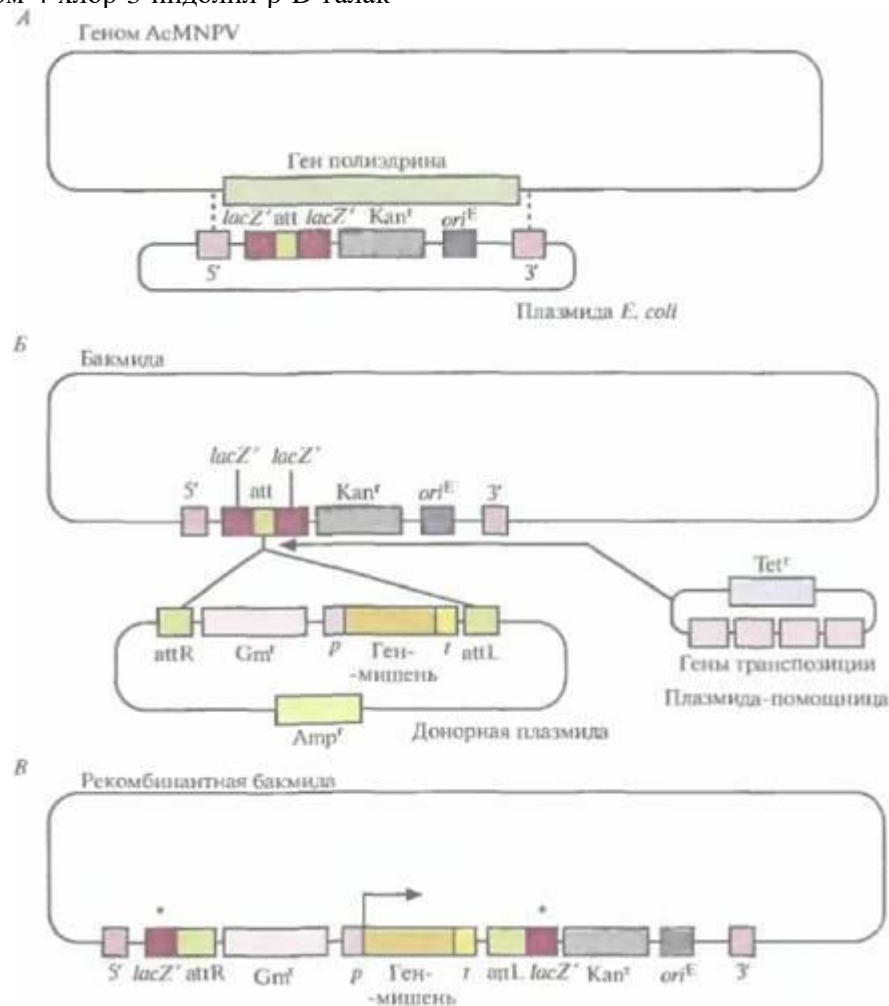


Рис. 7.12. Получение рекомбинантной бакмиды. *А*, Плазмиду *E. coli* встраивают в геном *AcMNPV* с помощью двойного кроссинговера (пунктирные линии) между сегментами ДНК (5' и 3'), фланкирующими ген полиэдрина, с образованием челночного вектора, способного к репликации как в *E. coli*, так и в клетках насекомых. Встраиваемая плазмидная ДНК содержит ген устойчивости к канамицину (Kan<sup>r</sup>), сайт интеграции (*att*), клонированный без нарушения рамки считывания в последовательности *lacZ'*, и сайт инициации репликации *E. coli* (*ori<sup>E</sup>*). *Б*, Фрагмент донорной плазмиды, ограниченный двумя сайтами интеграции (*attR* и *attL*) и несущий ген устойчивости к гентамицину (Gm<sup>r</sup>) и ген-мишень под контролем промотора (*p*) и сайта терминации транскрипции (*t*) гена полиэдрина, встраивают в сайт интеграции (*att*) бакмиды с помощью белков транспозиции, кодируемых плазмидой-помощницей. Плазмиды-помощницы и донорная плазмиды несут гены устойчивости к тетрациклину (Tet<sup>r</sup>) и ампициллину (Amp<sup>r</sup>) соответственно. *В*, Рекомбинантная бакмида содержит дефектный ген *lacZ'* (\*). Угловой стрелкой обозначен сайт инициации транскрипции клонированного гена после трансфекции клеток насекомого рекомбинантной бакмидой.

топиранозида (X-Gal). Те из них, которые устойчивы к канамицину и чувствительны к ампициллину и тетрациклину, несут только рекомбинантную бакмиду, но не донорную плазмиду и плазмиду-помощницу. В наличии вставки клонированного гена после всех этих манипуляций можно убедиться при помощи ПЦР. Далее рекомбинантной бакмидой можно трансфицировать клетки насекомого, в которых произойдет транскрипция клонированного гена и синтез рекомбинантного белка.

Для создания экспрессирующих векторов на основе бакуловирусов использовались и другие подходы. Один из них предполагал проведение всех генноинженерных манипуляций с геномом AcMNPV в дрожжевых клетках с использованием челночного вектора для дрожжей и клеток насекомых с последующим введением рекомбинантного бакуловируса в клетки насекомого. В другом для создания конструкции «клонированный ген—геном AcMNPV» использовали систему рекомбинации *in vitro*, основанную на вырезании—встраивании ДНК бактериофага P1, после чего такой конструкцией напрямую трансфицировали клетки насекомого.

### **Выделение рекомбинантного белка из клеток насекомых с помощью аффинного связывания**

Для выделения специфических гетерологичных белков из клеточных экстрактов и из смесей секретируемых белков можно использовать разные подходы. Один из них основывается на присоединении к клонированному гену - без нарушения рамки считывания — сегмента ДНК, кодирующего короткую аминокислотную последовательность, которая специфически связывается с каким-либо химическим элементом, соединением или макромолекулой. Такую конструкцию встраивают в экспрессирующий вектор между промотором и сайтом терминации транскрипции. Короткая аминокислотная последовательность в составе рекомбинантного белка, синтезируемого в хозяйской клетке, играет роль аффинной метки. В одном случае перед клонированным геном был встроен - без нарушения рамки считывания -- сегмент ДНК, кодирующий шесть остатков гистидина (His<sub>6</sub>), спейсерный участок, кодирующий семь аминокислот, и сайт расщепления протеиназы из шести аминокислот; получившийся рекомбинантный белок выделяли хроматографией на колонке с никель-агарозой. Последовательность из шести остатков гистидина (гексагистидин) связывалась с ионами никеля, и рекомбинантный белок задерживался в колонке. Его элюировали добавлением конкурирующего соединения (например, имидазола), который вытеснял гексагистидин рекомбинантного белка из комплекса с ионами никеля, или понижением pH буфера для элюции. Аффинную метку отщепляли с помощью протеолитического фермента (протеиназы) и очищали рекомбинантный белок от нее и от протеиназы хроматографическими методами. Если рекомбинантный белок не предполагается использовать в медицинских целях, можно и не отщеплять гексагистидиновую последовательность, поскольку обычно она не влияет на структуру и функцию белка.

Было разработано несколько аффинных меток. Среди них — глутатионтрансфераза, белок, связывающий мальтозу, и короткие аминокислотные последовательности — антигенные детерминанты, которые связываются соответственно с глутатионом, мальтозой и специфическими антителами. Использовали и разные сайты расщепления, специфичные для тромбина, энтерокина-зы и других протеиназ. Аффинная метка и сайт расщепления могут находиться как на N-, так и на C-конце рекомбинантного белка и использоваться в прокариотических системах экспрессии, а также в системах экспрессии на основе клеток насекомых, млекопитающих или грибов.

### **Экспрессирующие векторы для работы с клетками млекопитающих**

Внехромосомные экспрессирующие векторы млекопитающих используются для изучения функций и регуляции генов млекопитающих. Кроме того, с их помощью могут быть получены аутентичные рекомбинантные белки, которые потенциально могут использоваться в медицинских целях для лечения некоторых заболеваний человека. Уже сконструированные экспрессирующие векторы млекопитающих весьма многочисленны, но все они обладают сходными свойствами и похожи на другие эукариотические экспрессирующие векторы.

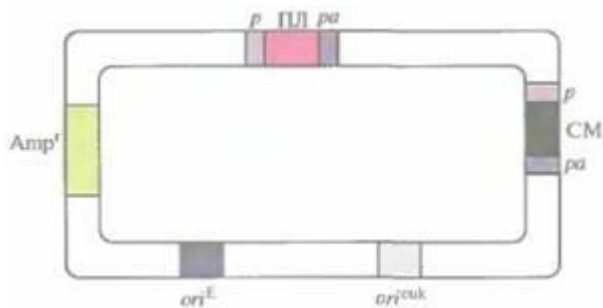


Рис. 7.13. Обобщенная схема экспрессирующего вектора млекопитающих. Полилинкер (ПЛ) и селективный маркер (СМ) находятся под контролем эукариотического промотора (p) и сигнала полиаденилирования (po). Репликация вектора в *E. coli* и в клетках млекопитающих обеспечивается сайтами инициации репликации *ori<sup>E</sup>* и *ori<sup>euk</sup>* соответственно. Для отбора трансформированных клеток *E. coli* используется ген устойчивости к ампициллину (*Amp<sup>r</sup>*)

Вектор, представленный на рис. 7.13, содержит эукариотический сайт инициации репликации вируса животных (например, обезьяньего вируса 40 [SV40]). Промоторы клонированного и селективного маркерного генов, а также их сигналы терминирования транскрипции (сигналы полиаденилирования) должны происходить из клеток эукариот; обычно используют регуляторные последовательности ДНК вирусов животных (например, цитомегаловируса человека, SV40 или HSV) или генов млекопитающих (например, гена β-актина, металлотионеина, тимидинкиназы или бычьего гормона роста). При этом более предпочтительны сильные промоторы и эффективные сигналы полиаденилирования. Последовательности, необходимые для отбора и амплификации экспрессирующего вектора млекопитающих в *E. coli*, происходят из стандартного клонирующего вектора *E. coli* (например, плазмиды pBR322).

Селективные маркерные гены

Для отбора трансфицированных клеток млекопитающих часто используют бактериальный ген *Neo<sup>r</sup>*, кодирующий неомифосфотрансферазу. В этой системе применяется токсичное соединение генетицин (G-418), блокирующее трансляцию в нетрансфицированных клетках млекопитающих. При этом в трансфицированных клетках G-418 фосфорилируется неомифосфотрансферазой и инактивируется. Следовательно, выживают и пролиферируют только клетки, синтезирующие продукт гена *Neo<sup>r</sup>*.

Другая система отбора трансфицированных клеток млекопитающих основана на использовании гена, кодирующего фермент дигидрофолатредуктазу (DHFR). В этой системе используют клетки с дефектным геном *DHFR*, т. е. клетки, в которых функциональная DHFR не синтезируется. После трансфекции *DHFR*-клеток экспрессирующим вектором млекопитающих с функционирующим *DHFR*-геном в среду добавляют метотрексат. Не трансфицированные клетки не растут в его присутствии, а клетки, синтезирующие дигидрофолатредуктазу, выживают. После предварительного отбора клеток с *DHFR*-геном концентрацию метотрексата в среде увеличивают и отбирают клетки с большим числом копий вектора, синтезирующие в большом количестве рекомбинантный белок.

Разработаны и другие схемы отбора с доминантным маркером, например с использованием фермента глутаминсинтетазы (GS), обеспечивающей устойчивость к цитотоксическому действию метионинсульфоксида. В этой системе применяется вектор, несущий *GS*-ген. Его вводят в культуру клеток млекопитающих и для отбора клеток, несущих большое количество копий вектора, повышают концентрацию метионинсульфоксида в среде. При этом в хозяйских клетках тоже должна присутствовать GS, поскольку только множественные копии *GS*-гена могут обеспечивать устойчивость к метионинсульфоксиду. Такая схема обладает определенными преимуществами перед описанной выше.

В экспрессирующих векторах млекопитающих уже встроены гены самых разных белков и осуществлена их экспрессия в хозяйских клетках. Иногда выход продукта увеличивался, если между промотором и клонированным геном встраивали интрон. Механизм этого феномена неизвестен. Возможно, первичный транскрипт клонированного гена содержит скрытые сайты сплайсинга, по которым вырезается часть кодирующей области клонированного гена, а при наличии дополнительного интрона сплайсинг по ним происходит с меньшей вероятностью.



Высокий уровень экспрессии клонированного гена достигался при ее координации с экспрессией селективного маркерного гена. Для этого, например, ген *DHFR* встраивали поблизости от клонированного гена, так чтобы оба гена находились под контролем одного промотора и имели общий сигнал полиаденилирования, а ген *DHFR* был фланкирован сайтами сплайсинга интрона. *DHFR* и рекомбинантный белок, транслировались с первичного транскрипта и сплайсированной мРНК соответственно (рис. 7.14).

### Экспрессия двух клонированных генов в одной клетке млекопитающих

Некоторые ценные в коммерческом отношении белки в активной форме состоят из разных полипептидных цепей. Например, тиреотропный гормон человека — это гетеродимер, а гемоглобин — тетрамер, состоящий из двух субъединиц, по две копии каждая ( $\alpha_2\beta_2$ ). Чтобы получить активный мультимерный белок, можно попытаться клонировать ген или кДНК каждой из субъединиц, синтезировать и очистить

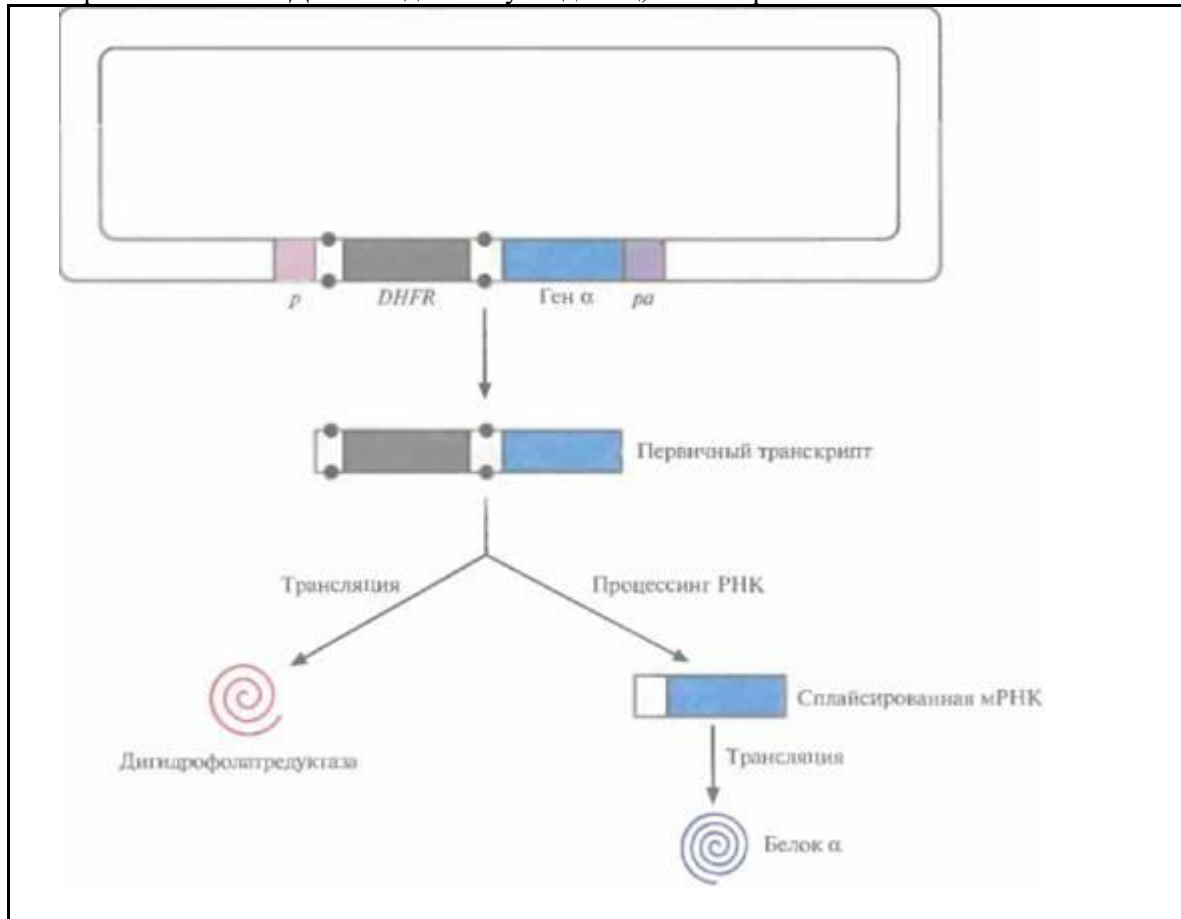


Рис. 7.14. Координированная экспрессия генов дигидрофолатредуктазы (*DHFR*) и рекомбинантного белка. Ген *DHFR* встроен между донорным и акцепторным сайтами сплайсинга интрона (точки), перед геном-мишенью (ген  $\alpha$ ). И ген *DHFR*, и клонированный ген находятся под контролем одного эукариотического промотора (*p*) и имеют общий сигнал полиаденилирования (*pa*). *DHFR* транслируется с несплайсированного (первичного) транскрипта, а гетерологичный белок (белок  $\alpha$ ) — с транскрипта, подвергнутого процессингу (сплайсингу).



субъединицы, а затем смешать их в пробирке. Однако таким образом удастся получить лишь немногие мультимерные белки, поскольку *in vitro* правильная укладка полипептидных цепей осуществляется редко. Сборка же димерных и тетрамерных белков *in vivo* протекает весьма эффективно. Поэтому были разработаны стратегии синтеза двух разных рекомбинантных белков в одной клетке.

Для этого хозяйские клетки одновременно трансфицировали двумя экспрессирующими векторами млекопитающих, каждый из которых нес ген или кДНК одной из субъединиц и разные гены селективных маркеров (рис. 7.15). Трансфицированные клетки подвергали двойному отбору, соответственно и выжившие клетки несли оба вектора. Системы с двумя векторами успешно использовались для синтеза аутентичных димерных и тетрамерных рекомбинантных белков. К сожалению, дважды Трансфицированные клетки часто утрачивают один из двух векторов. Кроме того, число копий каждого из векторов не всегда одинаково, так что одна субъединица может синтезиро-

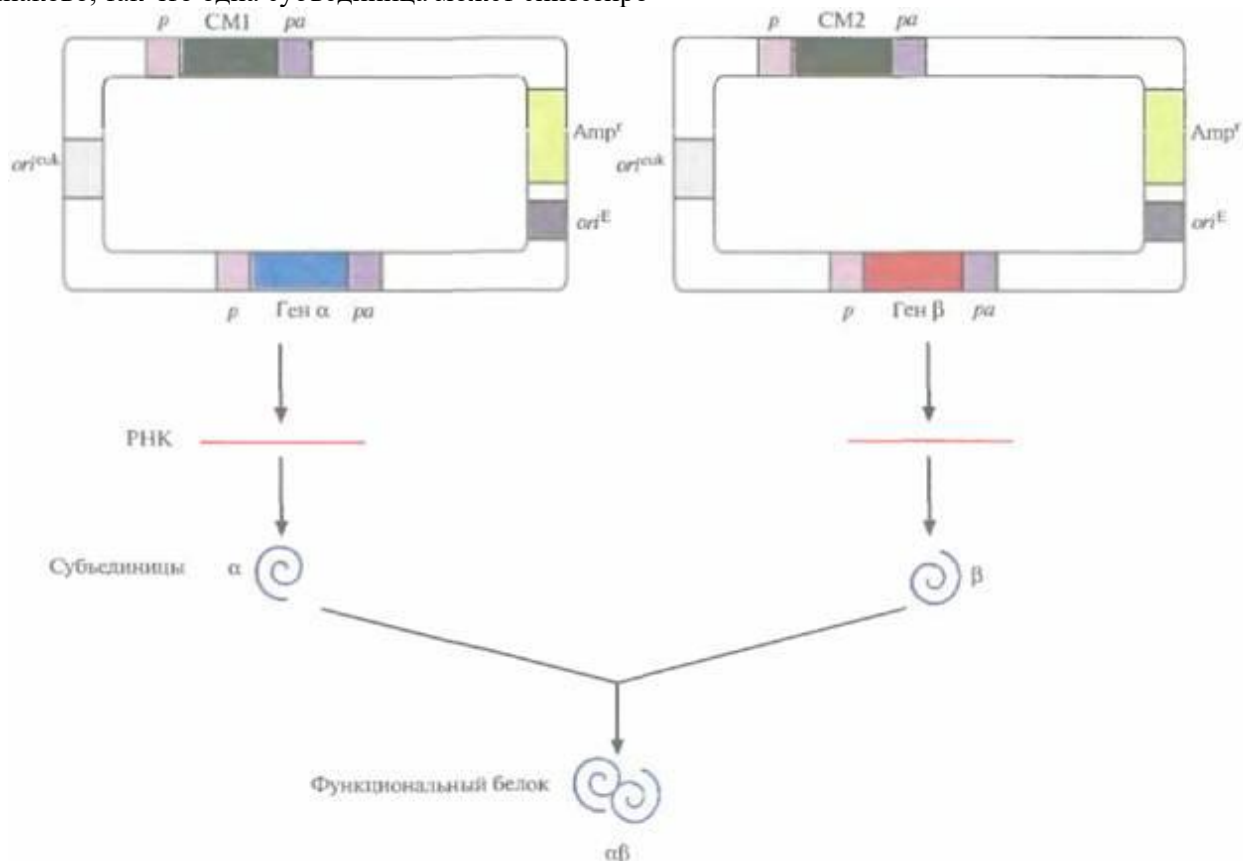
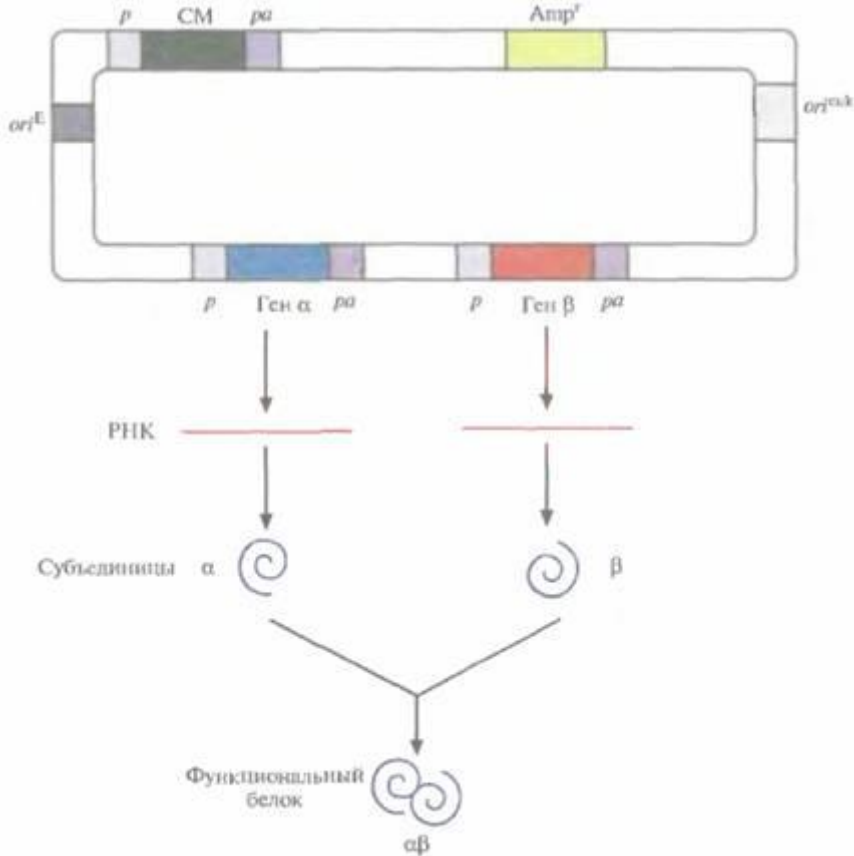


Рис. 7.15. Двухвекторная система экспрессии. Клонированные гены (α и β) кодируют субъединицы димерного белка (αβ). После одновременной трансфекции клетки двумя плазмидами в ней синтезируются обе субъединицы и собирается функциональный димерный белок. Оба вектора несут сайты инициации репликации, функционирующие в *E. coli* (*ori<sup>E</sup>*) и в клетках млекопитающих (*ori<sup>euk</sup>*); маркерный ген (*Amp<sup>r</sup>*) для отбора трансформированных клеток *E. coli*; эукариотический промотор (*p*) и сигнал полиаденилирования (*pa*), которые регулируют экспрессию селективного маркерного гена (CM) и каждого из клонированных генов.

ваться в большем количестве, чем другая, и выход конечного продукта может снижаться. Чтобы решить эти проблемы, были сконструированы векторы, содержащие оба клонированных гена. В некоторых случаях они были помещены под контроль независимых промоторов и сигналов пол над енилирования (рис. 7.16). А для того чтобы гарантировать синтез рекомбинантных белков в одинаковом количестве, были созданы так называемые двухцистронные векторы, в которых клонированные гены разделялись сегментом ДНК, содержащим внутренний сайт связывания рибосом. Такие сайты были обнаружены в геномах вирусов млекопитающих; они обеспечивают одновременную трансляцию различных белков с полицистронной мРНК. Транскрипция конструкции «ген—внутренний сайт связывания рибосом—ген» регулируется одним промотором и одним сигналом полиаденилирования. Синтезируется один транскрипт с двумя генами, трансляция начинается с 5'-конца мРНК и с внутреннего сайта, в результате синтезируются субъединицы димерного белка  $\alpha$  и  $\beta$  (рис. 7.17).

Суммируя, можно сказать, что экспрессирующие векторы млекопитающих столь же универсальны и эффективны, как и векторы для других эукариотических систем экспрессии, если речь идет о получении аутентичных рекомбинантных белков для исследовательских и медицинских целей. Однако промышленный синтез рекомбинантных белков с использованием модифицированных клеток млекопитающих обходится слишком дорого. В этом случае предпочтительны менее дорогие системы экспрессии, за исключением тех ситуаций, когда

Рис. 7.16. Экспрессирующий вектор с двумя независимо транскрибируемыми генами. Клонированные гены ( $\alpha$  и  $\beta$ ) кодируют субъединицы димерного белка ( $\alpha\beta$ ). Каждый ген встроен в вектор как часть отдельной единицы транскрипции и находится под контролем эукариотического промотора ( $p$ ) и сигнала полиаденилирования ( $pa$ ). Каждая субъединица транслируется со своей мРНК; объединяясь, субъединицы образуют функциональный димерный белок ( $\alpha\beta$ ). Векторы содержат сайты инициации репликации, функционирующие в *E. coli* ( $ori^E$ ) и в клетках млекопитающих ( $ori^{euk}$ ); маркерный ген ( $Amp^r$ ) для отбора трансформированных клеток *E. coli*; селективный маркерный ген ( $CM$ ), находящийся под контролем эукариотических промотора ( $p$ ) и сигнала полиаденилирования ( $pa$ ).



аутентичности рекомбинантного белка удастся достичь только с помощью культуры клеток млекопитающих.

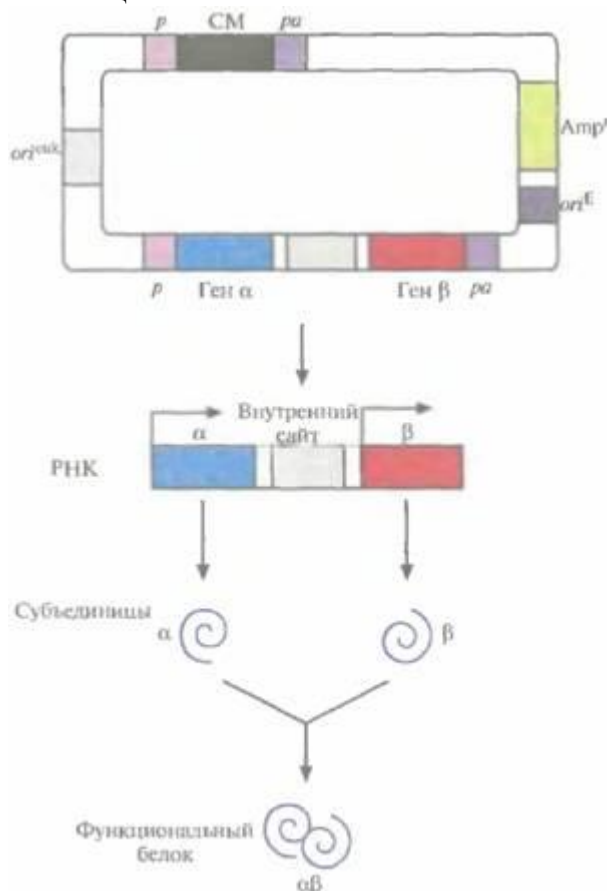


Рис. 7.17. Двухцистронный экспрессирующий вектор. Клонированные гены ( $\alpha$  и  $\beta$ ) кодируют субъединицы димерного белка ( $\alpha\beta$ ). Они разделены сегментом ДНК, который после транскрипции, на уровне мРНК, играет роль внутреннего сайта связывания рибосом. Каждый ген находится под контролем эукариотических промотора (p) и сигнала полиаденилирования (pa). Трансляция мРНК начинается с 5'-конца и с внутреннего сайта (угловые стрелки). Синтезированные субъединицы объединяются с образованием функционального димерного белка. Вектор содержит сайты инициации репликации, функционирующие в *E. coli* ( $ori^E$ ) и в клетках млекопитающих ( $ori^{euk}$ ), селективный маркерный ген ( $Amp^r$ ) для отбора трансформированных клеток *E. coli*; селективный маркерный ген (CM), находящийся под контролем эукариотических промотора (p) и сигнала полиаденилирования (pa).

Прокариотические системы экспрессии успешно используются для синтеза многих белков. Однако некоторые белки для превращения в активную форму должны претерпеть специфические посттрансляционные модификации — гликозилирование, фосфорилирование или ацетилирование, а бактерии к этому не способны. Поэтому было решено попытаться экспрессировать клонированные гены в эукариотических клетках с помощью специально созданных эукариотических экспрессирующих векторов.

Для синтеза разнообразных белков, кодируемых клонированными генами, использовались дрожжи *S. cerevisiae*. Их генетика хорошо изучена, а кроме того, их можно выращивать в больших ферментерах. Чтобы упростить очистку белков, были сконструированы векторы, обеспечивающие их секрецию. С помощью *S. cerevisiae* было получено множество самых разных аутентичных белков. Однако многие рекомбинантные белки в этой системе не подвергались посттрансляционной модификации, к тому же их выход зачастую был недостаточно высок. Поэтому были предприняты попытки разработать другие дрожжевые системы синтеза рекомбинантных белков.

В поисках других эукариотических систем экспрессии, с помощью которых можно было бы получать биологически активные белки, исследователи сосредоточили усилия на создании экспрессирующих векторов на основе бакуловирусов, в частности бакуловируса AcMNPV, инфицирующего клетки многих насекомых. Исходная стратегия предполагала трансфекцию клеток насекомого, зараженных AcMNPV, транспортным вектором, который содержал клонированный ген, фланкированный AcMNPV-специфичными последовательностями. В результате двойного кроссингвера между вектором и геном AcMNPV клонированный ген встраивался в последний и попадал под контроль сильного промотора, функционирующего на последних стадиях логического цикла. Клетки насекомого, инфицированные рекомбинантным бакуловирусом, синтезировали гетерологичный белок.

Частоту появления рекомбинантных бакуловирусов удалось повысить с менее чем 1% до 99%. Для этого ДНК AcMNPV обрабатывали эндонуклеазой рестрикции, которая расщепляла ДНК в двух специфичных сайтах с высвобождением фрагмента, несущего часть гена, необходимого для осуществления литического цикла. Клетки насекомого трансфицировали этим фрагментом, а затем — транспортным вектором. В результате двойного кроссинговера в некоторых клетках восстанавливался кольцевой геном AcMNPV, который содержал клонированный ген и функциональный ген, необходимый для осуществления литического цикла. В результате почти все вирулентные бакуловирусы оказывались рекомбинантными.

Следующий шаг в усовершенствовании системы экспрессии на основе бакуловирусов состоял в создании бакмиды, челночного вектора *E. coli*/клетки насекомого, позволяющего проводить все генноинженерные манипуляции в *E. coli*. Клетки насекомого трансфицировали рекомбинантной бакмидой только с целью получения гетерологичного белка. Примерно 95% гетерологичных белков, синтезированных в системах экспрессии на основе бакуловирусов, имели соответствующие посттрансляционные модификации.

Внехромосомные экспрессирующие векторы млекопитающих обычно применяют для синтеза гетерологичных белков, используемых в научных или медицинских целях. Они представляют собой челночные векторы с сайтами инициации репликации вируса животных и *E. coli*-плазмиды. Регуляторные элементы транскрипции обычно происходят из генома вируса животных или из геномов млекопитающих. Для отбора трансфицированных клеток используют доминантные селективные маркерные гены. Некоторые системы отбора основаны на введении в среду возрастающего количества цитотоксичного соединения и позволяют получать клетки, содержащие большое число копий вектора, что увеличивает выход чужеродного белка.

Разработаны системы экспрессии млекопитающих, позволяющие получать белки, состоящие из двух разных субъединиц. Для этого хо-

зяйские клетки трансфицировали сразу двумя векторами, каждый из которых нес ген одной из субъединиц. Альтернативный подход состоял в использовании одного вектора, который нес эти два гена в виде отдельных единиц транскрипции или в виде одного транскриптона, содержащего оба этих гена.

## ЛИТЕРАТУРА

- Cockett M. I., C. R. Beddington, G. T. Yarranton. 1990. High level expression of tissue inhibitor or metalloproteinases in Chinese hamster ovary cells using glutamine synthetase gene amplification. *Bio/Technology* 8: 662-667.
- Cole E. S., K. Lee, K. Lau/iere, C. Kelton, S. Chappel, B. Weintraub, D. Ferrara, F. Peterson, R. Bernasconi, T. Edmunds, S. Richards, L. Dickrell, I. M. Kleeman, J. II. McPhersun, B. M. Pratt. 1993. Recombinant human thyroid stimulating hormone: development of a biotechnology product for detection of metastatic lesions of thyroid carcinoma. *Bio/Technology* 11: 1014-1024.
- Cregg J. M., J. F. Tschopp, C. Stillman, R. Siegel, M. Akong, W. S. Craig, R. G. Buckhnl/, K. R. Madden, P. A. Kellaris, G. R. Davis, B. L. Smiley, J. Cruzc, R. Torregrossa, G. Velicelebi, G. P. Thill. 1987. High-level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* 5: 479-485.
- Davies A. H. 1994, Current methods for manipulating baculovirus, *Bio/Technology* 12: 47—50.
- Digan M. E., S. V. Lair, R. A. Brierley, R. S. Siegel, M. E. Williams, S. B. Ellis, P. A. Kellaris, S. A. Provow, W. S. Craig, G. Velicelebi, M. M. Harpold, G. P. ThiU. 1989. Continuous production of a novel lysozyme via secretion from the yeast, *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* 7: 160-164.
- Dirks W., M. Wirth, H. Hauser. 1993. Dicistronic transcription units for gene expression in mammalian cells. *Gene* 128: 247-249.
- Gellissen G., Z. A. Janowicz, U. Weydemann, K. Melber, A. W. M. Strasser, C. P. Hollenberg. 1992, High-level expression of foreign genes in

- Hansenula polymorpha*. *Bioiotechnol. Adv.* 10: 179-189,
- Giga-Hama Y., H. Tohda, H. Okada, M. K. Owada, H. Okayama, H. Kumagai. 1994. High-level expression of human lipocortin I in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* using a novel expression vector. *Bio/Technology* 12: 400-404.
- Gilbert S. C., H. van Urk, A. J. Greenfield, M. J. McAvoy, K. A. Denton, D. Coghlan, G. D. Jones, D. J. Mead. 1994. Increase in copy number of an integrated vector during continuous culture of *Hansenula polymorpha* expressing functional human hemoglobin. *Yeast* 10: 1569-1580.
- The Global Use of Strategies to Open Occluded Arteries (GUSTO) lib Investigators. 1996. A comparison of recombinant hirudin with heparin for the treatment of acute coronary syndromes. *N. Engl. J. Med.* 335: 775-782.
- Hallewell R. A., R. Mills, P. Tekamp-OLson, R. Blacher, S. Rosenberg, F. Otting, F. R. Masiarz,
- C. J. Scandella. 1987. Amino terminal acetylation of authentic human Cu, Zn Superoxide dismutase produced in yeast. *Bio/Technology* 5: 363-366.
- Kidd L M., V. C. Emery. 1993. The use of baculoviruses as expression vectors. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 42: 137-159.
- Kitts P. A., R. D. Possee. 1993. A method for producing recombinant baculovirus expression vectors at high frequency. *BioTechniques* 14: 810-817.
- Laroche Y., V. Strome, J. DeMeutter, J. Messens, M. Lauwereys. 1994. High-level secretion and very efficient isotopic labeling of tick anticoagulant peptide (TAP) expressed in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* 12: 1119-1124.
- Loison G., A. Findeli, S. Bernard, M. Nguyen-Juilleret, M. Marquet, N. Riehl-Bellon,
- D. Carvallo, L. Guerra-Santos, S. W. Brown, M. Courtney, C. Roitsch, Y. Lemoine. 1988. Expression and secretion in *S. cerevisiae* of biologically active leech hirudin. *Bio/Technology* 6: 72-77.
- Lucas B. K., L. M. Giere, R. A. DeMarco, A. Shen, V. Chisholm, C. W. Crowley. 1996. High-level production of recombinant proteins in CHO cells using a dicistronic DHFR intron expression vector. *Nucleic Acids Res.* 24: 1774-1779.
- Lucknow V. A., S. C. Lee, G. F. Barry, P. O. Olins. 1993. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J. Virol.* 67: 4566-4579.
- Peng S., M. Sommerfeldt, J. Logan, Z. Huang, T. Jilling, K. Kirk, E. Hunter, E. Sorscher. 1993. One-step affinity isolation of recombinant protein using the baculovirus/insect expression system. *Protein Expr. Purif.* 4: 95-100.
- Robinson A. S., V. Hines, K. D. Wittrup. 1994. Protein disulfide isomerase overexpression increases secretion of foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bio/Technology* 12: 381-384,
- Romanes M. A., C. A. Scorer, J. J. Clare. 1992. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* 8: 423-488.
- Voza L. A., L. Wittmer, D. R. Higgins, T. J. Purcell, M. Bergsied, L. A. Collins-Racie, E. R. LaVaUie, J. P. Hoeffler. 1996. Production of a recombinant bovine enterokinase catalytic subunit in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* 14: 77-81.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Почему для получения белков, используемых в медицине, лучше применять эукариотические, а не прокариотические системы?
2. Какие достоинства и недостатки имеют различные типы дрожжевых векторов, предназначенных для получения данного рекомбинантного продукта?
3. Опишите основные свойства интегративной векторной системы *P. pastoris*, обладающей высоким уровнем экспрессии,
4. Что такое бакуловирусы? Опишите исходную систему экспрессии на основе бакуловирусов и ее последующие модификации.
5. Что такое бакмида? Для чего ее используют?

6. Что такое аффинная метка? Для чего ее используют?
7. Опишите основные свойства внехромосомного экспрессирующего вектора млекопитающих.
8. Опишите как минимум две селективные системы, используемые в случае экспрессирующих векторов млекопитающих.
9. Опишите разные подходы к созданию систем синтеза двух рекомбинантных белков в одной клетке млекопитающего.
10. Какими критериями руководствуются при выборе системы экспрессии генов гетерологичных белков (дрожжи, система экспрессии на основе бакуловирусов, клетки млекопитающих)?



# ГЛАВА 8

## Направленный мутагенез и генная инженерия белков

Технология рекомбинантных ДНК позволяет выделять гены любых белков, существующих в природе, экспрессировать их в специфическом хозяйском организме и получать чистые белковые продукты. Однако физические и химические свойства таких «природных» белков часто не удовлетворяют условиям, обеспечивающим возможность их промышленного применения. Иногда для получения белков, обладающих нужными свойствами, в качестве источника соответствующих генов используют организмы, растущие в необычных, зачастую экстремальных условиях. Например, для синтеза  $\alpha$ -амилазы, не утрачивающей своей активности при высокой температуре, выделили ее ген из *Bacillus stearothermophilus* — бактерии, естественной средой обитания которой являются горячие источники с температурой воды 90 °С. Полученная таким образом  $\alpha$ -амилаза оставалась активной при температурах, при которых осуществляют промышленное производство этилового спирта из крахмала. Для получения белков с заранее заданными свойствами можно использовать также мутантные формы генов. Однако число мутантных белков, образующихся в результате замены отдельных нуклеотидов в структурном гене с помощью обычного мутагенеза, чрезвычайно велико. Мутагенез с последующим отбором редко приводит к существенному улучшению свойств исходного белка, поскольку большинство аминокислотных замен сопровождается снижением активности фермента.

Для создания белков со специфическими свойствами можно использовать другой подход, основанный на внесении изменений в кодирующие их клонированные гены. Это позволяет получать белки с другими, чем у их аналогов, свойствами.

- Изменив константу Михаэлиса ( $K_M$ ), которая характеризует прочность связывания субстрата с ферментом, и максимальную скорость ( $V_{max}$ ) превращения субстрата в продукт при определенных условиях, можно повысить общую каталитическую эффективность ( $V_{max}/K_M$ ) реакции;  $V_{max}$  равна полному количеству фермента ( $E_0$ ), умноженную на каталитическую константу ( $k_{cat}$ ).
- Повысив стабильность белка в широком диапазоне температур или pH, можно использовать его в условиях, при которых исходный белок инактивируется.
- Создав белки, способные функционировать в безводных растворителях, можно осуществлять каталитические реакции в нефизиологических условиях.
- Изменив белок таким образом, чтобы он мог работать без кофактора, можно использовать его в некоторых непрерывных промышленных процессах.
- Изменив активный центр фермента, можно повысить его специфичность и уменьшить число нежелательных побочных реакций.
- Повысив устойчивость белка к клеточным протеазам, можно упростить процедуру его очистки и повысить выход продукта.
- Изменив аллостерическую регуляцию фермента, можно уменьшить степень его ингибирования метаболитом по типу отрицательной обратной связи и увеличить выход продукта.

## Направленный мутагенез: методика

Получить новый белок с заранее заданными свойствами — непростая задача, но вполне реально изменить свойства уже существующего белка. Изменения можно вносить в сам белок или в его ген. Однако химическая модификация белков редко бывает строго специфичной и ее необходимо осуществлять заново для каждого белкового препарата, поэтому лучше вносить изменения в его клонированный ген. К сожалению, не всегда бывает известно, какую именно аминокислоту или последовательность аминокислот нужно изменить, чтобы получить белок с нужными физическими, кинетическими или химическими свойствами. Может случиться, что изменения должны затрагивать два или более аминокислотных остатка, расположенных далеко друг от друга в полипептидной цепи, но сближающихся в результате укладки белковой молекулы. Есть надежда, что уже в недалеком будущем с помощью компьютеров удастся предсказывать свойства того или иного белка, исходя из данных о его аминокислотной последовательности. Это значительно упростит процедуру создания нужных белков. Введение новой генетической информации в клонированные гены сейчас не составляет особого труда, однако чтобы определить, обладает ли искомым белок нужными свойствами, необходимо проанализировать множество белковых продуктов.

Внесение специфических изменений в кодирующие последовательности ДНК, приводящих к определенным изменениям в аминокислотных последовательностях, называется направленным мутагенезом. Идентификация аминокислот, замена которых даст желаемый результат, облегчается, если детально известна пространственная структура белка (ее устанавливают с помощью рентгеноструктурного анализа или других аналитических методов). Однако для большинства белков такие данные отсутствуют, поэтому направленный мутагенез — это в значительной мере эмпирическая процедура, основанная на методе проб и ошибок. Каждый белок, кодируемый мутантным геном, нужно протестировать и убедиться в том, что мутация дала желаемый эффект.

Для направленного мутагенеза клонированных генов используют разные экспериментальные подходы. В одних случаях вносят изменения в специфические сайты клонированного гена, в других случайным образом изменяют короткий фрагмент клонированного гена и среди образующихся мутантных белков выбирают один, обладающий необходимой активностью.

### Олигонуклеотид-направленный мутагенез с использованием ДНК фага M13

Олигонуклеотид-направленный (сайт-специфический) мутагенез — это один из наиболее простых методов внесения точковых мутаций в клонированный ген (рис. 8.1). Для его осуществления необходимо знать: 1) точную нуклеотидную последовательность той области ДНК, которая соответствует мРНК-кодону, подлежащему изменению; 2) характер аминокислотных замен. Обычно встраивают ген-мишень в двухцепочечную форму вектора на основе бактериофага M13. Сначала выделяют одноцепочечную форму вектора (плюс-цепь M13) и смешивают ее с синтетическим олигонуклеотидом, в точности комплементарным — за исключением одного нуклеотида -- нужному сегменту клонированного гена. Этот отличающийся (т. е. неспаривающийся) нуклеотид соответствует тому нуклеотиду кодона мРНК, который необходимо изменить. В случае, представленном на рис. 8.1, триплет АТТ, соответствующий изолейциновому кодону АУУ, нужно заменить на триплет СТТ, соответствующий лейциновому кодону СУУ. Олигонуклеотид будет гибридизоваться с комплементарным участком клонированного гена в том случае, если: 1) он добавлен в количестве, во много раз превышающем количество ДНК M13; 2) неспаривающийся нуклеотид находится примерно посередине олигонуклеотида; 3) отжиг проводят при низкой температуре и высокой ионной силе. 3'-конец спарившегося олигонуклеотида служит затравкой для инициации синтеза ДНК, а интактная цепь ДНК M13 — матрицей. Репликация осуществляется с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *Escherichia coli* при наличии в среде четырех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, а присоединение последнего нуклеотида синтезированной цепи к 5'-концу затравки обеспечивает ДНК-лигаза фага T4. Однако *in vitro* синтез ДНК редко идет до конца, и частично двухцепочечные молекулы приходится отделять от нормальных центрифугированием в градиенте сахарозы.

Полностью двухцепочечными молекулами ДНКфага M13, содержащими, однако, некомплементарные нуклеотиды, трансформируют клетки *E. coli*. В последних образуются фаговые

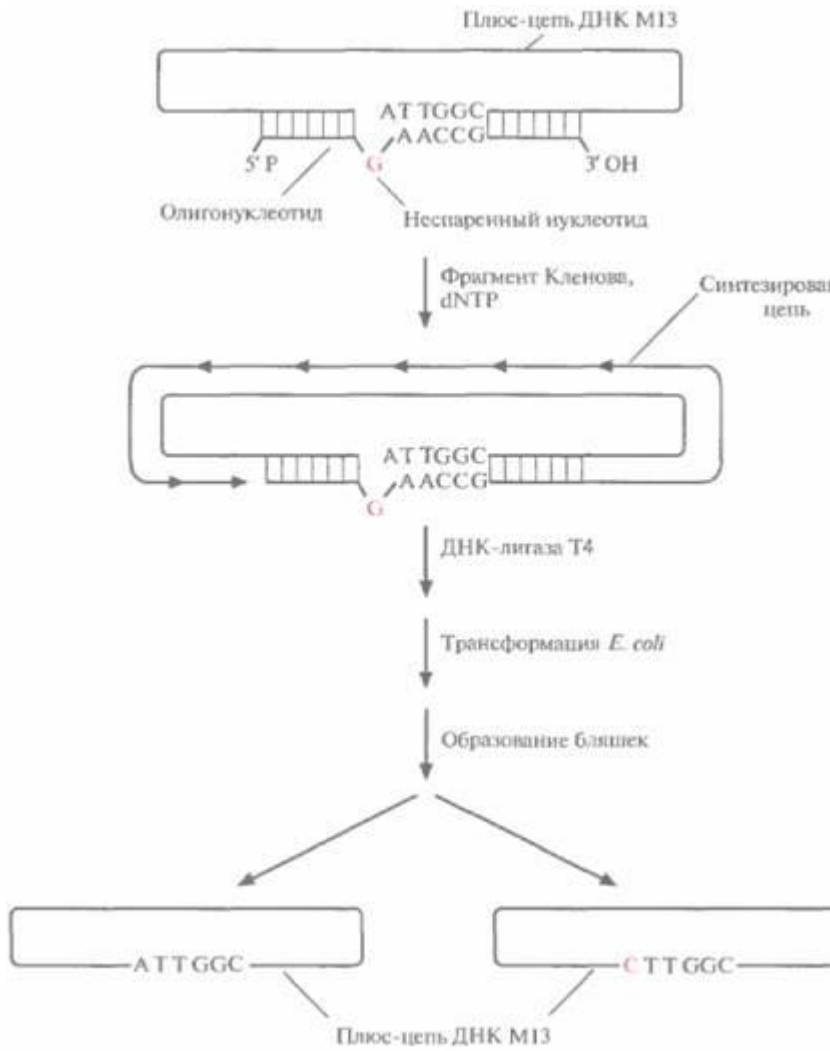


Рис. 8.1. Олигонуклеотид-направленный мутагенез. Одноцепочечную ДНК фага М13 (плюс-цепь), несущую ген-мишень, отжигают с комплементарным синтетическим олигонуклеотидом, содержащим одно основание, не комплементарное соответствующему основанию исходной ДНК. Олигонуклеотид служит затравкой для синтеза ДНК, а М13-вектор с встроенным геном — матрицей. Репликацию катализирует фрагмент Кленова ДНК-полимеразы *E. coli*. Синтезированную полноразмерную цепь замыкает в кольцо ДНК-лигаза Т4. Образовавшимися двух цепочечными молекулами трансформируют *E. coli*. Часть фаговых частиц содержит ДНК дикого типа, часть — мутантную ДНК.

частицы, что в конечном счете приводит к лизису клеток и образованию бляшек. Поскольку репликация идет по полуконсервативному механизму, половина популяции образующихся фаговых частиц должна содержать ДНК дикого типа, а половина — мутантную ДНК со специфической нуклеотидной заменой. Частицы, содержащие только мутантный ген, идентифицируют при помощи ДНК-гибридизации в жестких условиях, используя в качестве зонда исходный олигонуклеотид. Мутантный ген вырезают и встраивают в какой-либо экспрессирующий *E. coli*-вектор. Мутантный белок синтезируют в *E. coli* и очищают.

На самом деле число фаговых частиц, несущих мутантную ДНК, оказывается гораздо меньше ожидаемых 50%: лишь 1—5% бляшек содержат фаг с мутантным геном. Чтобы повысить выход мутантного фага, метод олигонуклеотиднаправленного мутагенеза модифицировали. Один из подходов состоял во введении М13-вектора, несущего ген, в который необходимо внести мутацию, в штамм *E. coli*, дефектный по двум ферментам метаболизма ДНК (рис. 8,2). Один фермент — это мутантная форма dUTP-пирофосфатазы (*dut*). Клетки с неактивной dUTP-пирофосфатазой характеризуются повышенным содержанием dUTP, что приводит к

встраиванию в ДНК при репликации нескольких остатков dUTP вместо dTTP. Вторым ферментом – это дефектная урацил-К-гликозилаза (*ung*). В отсутствие функциональной урацил-М-гликозилазы остатки dUTP, случайно встроившиеся в ДНК, не могут быть удалены. В одноцепочечной ДНК M13, синтезированной в таких клетках *E. coli*, примерно 1% тимидиновых остатков оказываются замененными уридиновыми. Олигонуклеотид с некомплементарным основанием отжигают с урацилсодержащей ДНК M13 и *in vitro* достраивают вторую

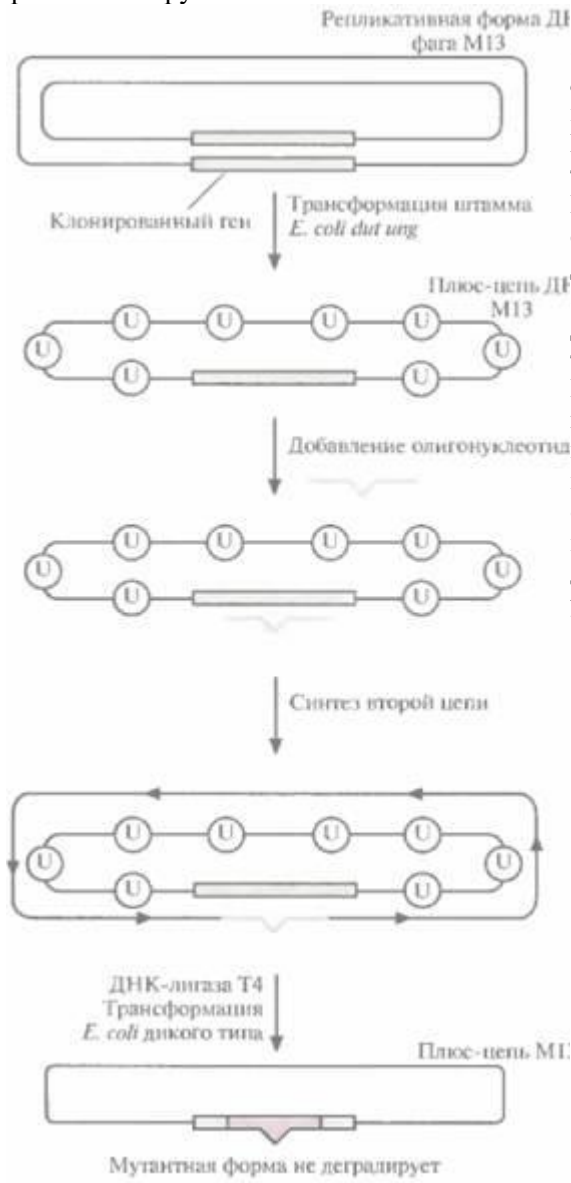


Рис. 8.2. Повышение выхода мутантного фага M13 путем трансформации штамма *E. coli dut ung*. Ген-мишень встраивают в двухцепочечную репликативную форму ДНК фага M13 и полученными молекулами трансформируют штамм *E. coli dut ung*. Мутация *dut* вызывает повышение содержания dUTP в клетке, что приводит к включению в ДНК нескольких остатков dUTP (U). а мутация *ung* блокирует их удаление. Двухцепочечной ДНК M13, содержащей ген-мишень, трансформируют клетки *E. coli* дикого типа. Продукт гена *ung* дикого типа (урацил-N-гликозилаза) удаляет все остатки урацила из исходной цепи, и она деградирует. Мутантная цепь остается интактной, поскольку она не содержит остатков урацила. Эта цепь служит матрицей для репликации ДНК, и в результате доля фаговых частиц, несущих мутантный ген, увеличивается.

цепь. Двухцепочечной ДНК трансформируют штамм *E. coli*, содержащий функциональный ген *ung*. Активная урацил-N-гликозилаза хозяйских клеток удаляет остатки уридина из ДНК M13 (рис. 8.2), исходная матричная цепь M13 деградирует и далее реплицируется только мутантная цепь, не содержащая dUTP, В результате выход фаговых частиц, несущих мутантный ген, значительно увеличивается.

**Олигонуклеотид-направленный мутагенез с использованием плазмидной ДНК**

Основной недостаток одигонуклеотид-направленного мутагенеза с использованием фага M13 — большое число процедур. Чтобы выделить мутантную форму нужного гена, приходится затратить много времени. В качестве альтернативы системе с использованием фага M13 было разработано множество других подходов, основанных на применении плазмидных ДНК. Это позволяет обойтись без переноса интересующего исследователя гена из плазмиды в фаговую ДНК, а после завершения мутагенеза — обратно в плазмиду. Один из этих подходов включает встраивание ДНК в плазмидный вектор, который несет функциональный ген устойчивости к тетрациклину и неактивный ген устойчивости к ампициллину; в середине последнего заменен один нуклеотид (рис. 8.3). Клетки *E. coli* трансформируют вектором, несущим ДНК-мишень, и двухцепочечную плазмидную ДНК денатурируют щелочью с тем, чтобы получить одноцепочечные кольцевые молекулы. Денатурированную ДНК отжигают с тремя разными олигонуклеоти-

дами. Один из них предназначен для внесения изменений в клонированную ДНК-мишень, второй — для устранения мутации в гене устойчивости к ампициллину, третий — для замены одного нуклеотида в гене устойчивости к тетрациклину с тем, чтобы инактивировать этот ген. В реакционную смесь добавляют четыре дезоксирибонуклеозидтрифосфата и ДНК-полимеразу Т4, функционирующую аналогично фрагменту Кле-нова ДНК-полимеразы I *E. coli*. Гибризовавшиеся олигонуклеотиды служат затравками для синтеза ДНК, а интактная кольцевая молекула

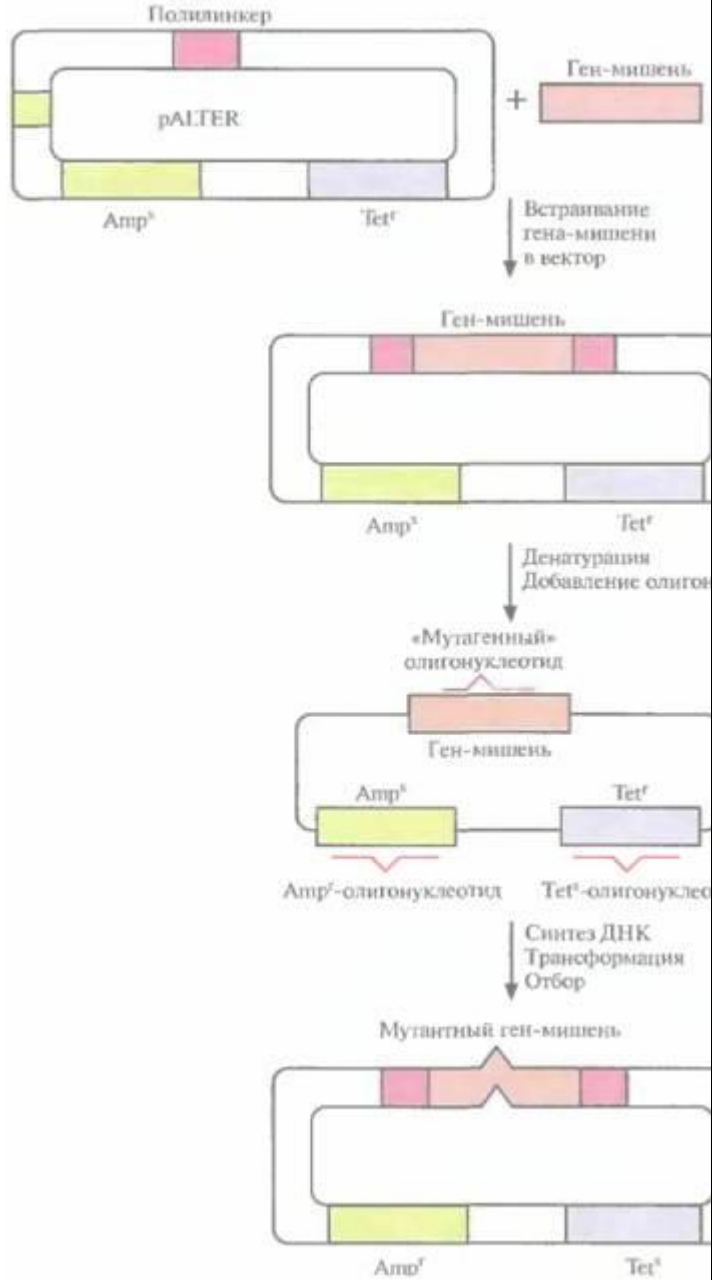


Рис. 8.3. Олигонуклеотид-направленный мутагенез с использованием плазмидной ДНК. Ген-мишень встраивают в полилинкер вектора pALTER. Плазмидную ДНК денатурируют в щелочи и отжигают с тремя олигонуклеотидами: «мутагенным» олигонуклеотидом, восстанавливающим устойчивость к ампициллину (Amp<sup>r</sup>), и олигонуклеотидом, придающим чувствительность к тетрациклину (Tet<sup>s</sup>). Эти олигонуклеотиды служат затравками для синтеза ДНК с помощью ДНК-полимеразы Т4, а исходная цепь — матрицей. Одноцепочечные разрывы в новосинтезированной цепи зашиваются ДНК-лигазой Т4. Продуктами реакции трансформируют клетки *E. coli* и отбирают трансформантов Amp<sup>r</sup> и Tet<sup>s</sup>.



ДНК — матрицей. Одноцепочечные разрывы в новосинтезированной цепи зашиваются с помощью ДНК-лигазы T4. По окончании синтеза и лигирования продуктами реакции трансформируют клетки *E. coli*. Трансформантов отбирают по признаку устойчивости к ампициллину и чувствительности к тетрациклину. Примерно 90% из них содержат специфическую мутацию в клонированном гене. У остальных трансформантов клонированный ген не был изменен либо потому, что олигонуклеотид не гибридизовался с ним, либо потому, что он вытеснялся в ходе синтеза ДНК. Клетки, несущие мутантный клонированный ген, идентифицируют с помощью гибридизации. Все плазмиды, штаммы, ферменты, олигонуклеотиды (кроме того, который предназначен для изменения клонированного гена), а также буферы продаются в наборе, что облегчает работу.

### **Олигонуклеотид-направленный мутагенез с использованием ПЦР-амплификации**

Более простой и быстрый метод получения больших количеств мутантных генов, альтернативный системе с использованием фага M13, -сайт-специфический мутагенез в сочетании с полимеразной цепной реакцией (ПЦР). Один из вариантов этого подхода состоит в следующем. Ген-мишень встраивают в плазмидный вектор (рис. 8.4) и помещают препарат в две пробирки. В каждую из них добавляют по два специфических праймера для ПЦР: 1 и 2 в одну пробирку, 3 и 4 — в другую. Праймеры 2 и 3 полностью комплементарны одному из участков клонированного гена или прилегающей к нему последовательности, а 1 и 3 комплементарны другому участку, но содержат один некомплементарный нуклеотид и гибридизуются с разными цепями, так что в результате происходит замена обоих нуклеотидов данной пары. Положение сайтов гибридизации праймеров 1 и 2 в одной пробирке и 3 и 4 — в другой таково, что ПЦР-продукты в разных пробирках имеют разные концы. По окончании ПЦР содержимое пробирок объединяют и проводят денатурацию, а затем ренатурацию. Поскольку концы амплифицированных молекул ДНК из двух пробирок неодинаковы, одноцепочечные ДНК из разных пробирок ассоциируют с образованием кольцевых молекул с двумя одноцепочечными разрывами. Эти разрывы репарируются *in vivo* после трансформации *E. coli*. При ренатурации одиночных цепей из одной пробирки образуются линейные молекулы. В клетках *E. coli* стабильно поддерживаются в виде плазмид и наследуются только кольцевые, а не линейные молекулы, при этом все они несут сайт-специфическую мутацию. Таким образом, с помощью описанного метода можно вносить точковые мутации в клонированный ген, при этом отпадает необходимость во встраивании гена в ДНК фага M13, использовании мутантных штаммов *E. coli* типа *dut ung* и в переносе мутантного гена из M13-вектора в экспрессирующий вектор.

### **Случайный мутагенез с использованием «вырожденных» олигонуклеотидных праймеров**

К сожалению, обычно бывает неизвестно, какую нуклеотидную замену в клонированном гене нужно произвести, чтобы получить белок с нужными свойствами. Поэтому часто приходится изменять один определенный нуклеотидный сайт всеми возможными способами. Например, можно синтезировать олигонуклеотидные праймеры, в одном из сайтов которых находятся разные нуклеотиды. Такие «вырожденные» олигонуклеотиды обычно получают, добавляя в автоматический синтезатор ДНК на определенном этапе, когда к цепи должен присоединяться специфический нуклеотид, небольшое количество (до нескольких процентов) трех других нуклеотидов (рис. 8.5). В результате получается гетерогенный по одному сайту набор олигонуклеотидных праймеров, с помощью которых можно получить соответствующий набор мутантных генов-мишеней с нуклеотидными заменами в специфическом сайте.

Этот подход имеет два преимущества: 1) не нужно в точности знать, какую роль играет тот или иной аминокислотный остаток в функционировании белка; 2) поскольку в данном сайте происходят разные аминокислотные замены, могут случайно синтезироваться белки с разнообразными интересными и полезными свойствами. Конечно, если ни один из образующихся белков не обладает нужными свойствами, приходится все начинать сначала, синтезировав новый набор «вырожденных» праймеров, комплементарных другой области гена.



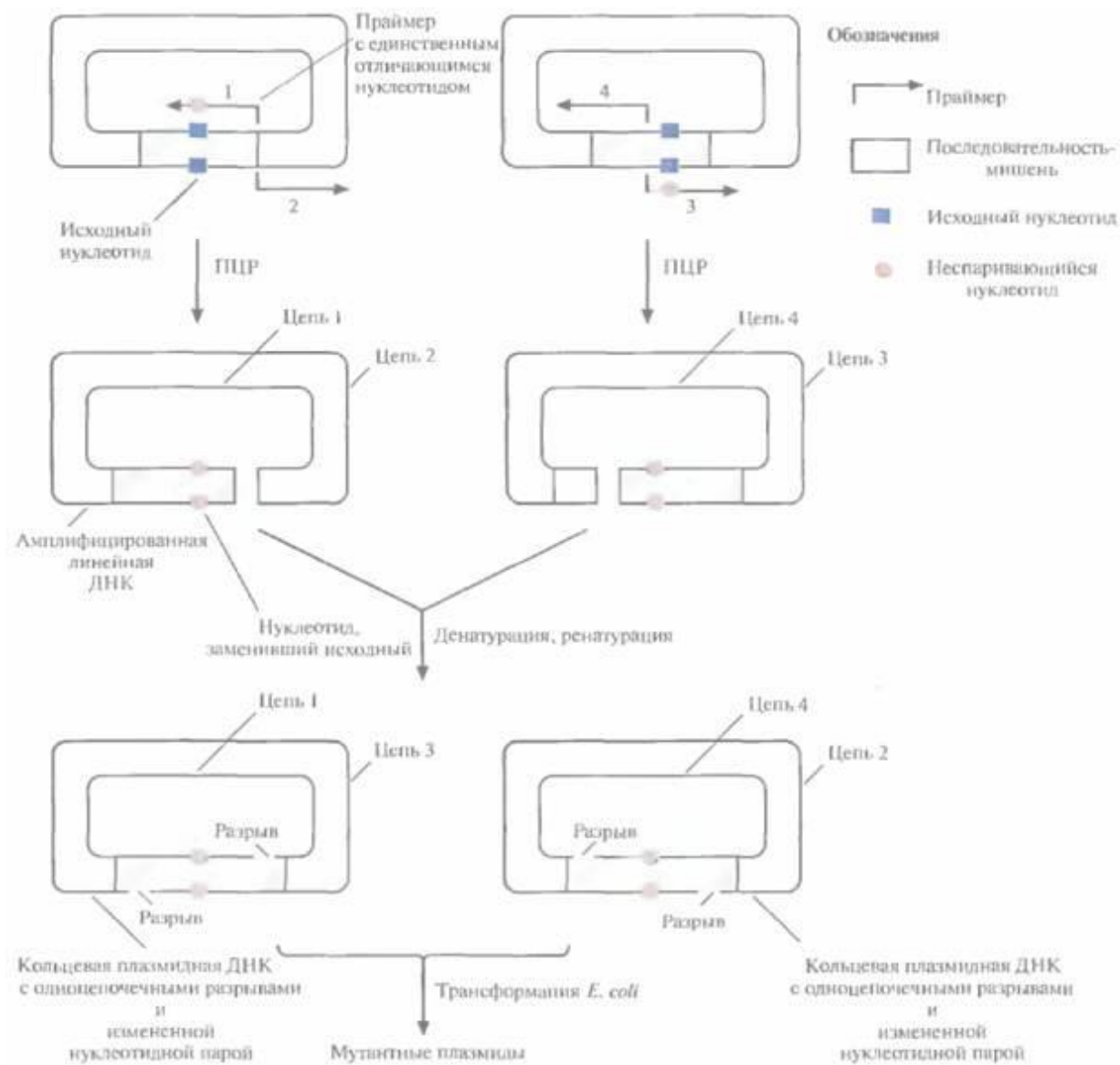


Рис. 8.4. Олигонуклеотид-направленный мутагенез с использованием ПЦР. Реакцию проводят в двух пробирках, в каждой из которых содержится одинаковая двухцепочечная плазмидная ДНК, но разные наборы праймеров. Праймеры 1 и 3 содержат один неспаривающийся нуклеотид и комплементарны разным цепям плазмидной ДНК. Праймеры 2 и 4 полностью комплементарны соответствующим участкам плазмидной ДНК и тоже гибридизуются с разными цепями. Положение сайтов гибридизации для праймеров каждой пары различается, но их концы стыкуются. В результате ПЦР-амплификации образуются линейные молекулы. По окончании реакции содержимое пробирок смешивают и проводят денатурацию, а затем ренатурацию. В результате кроме двух исходных линейных амплифицированных молекул образуются две кольцевые плазмидные ДНК, каждая с двумя одноцепочечными разрывами. После трансформации кольцевыми молекулами клеток *E. coli* разрывы репарируются ферментами клетки-хозяина, и плазида может реплицироваться независимо. Линейные молекулы ДНК в *E. coli* не сохраняются.



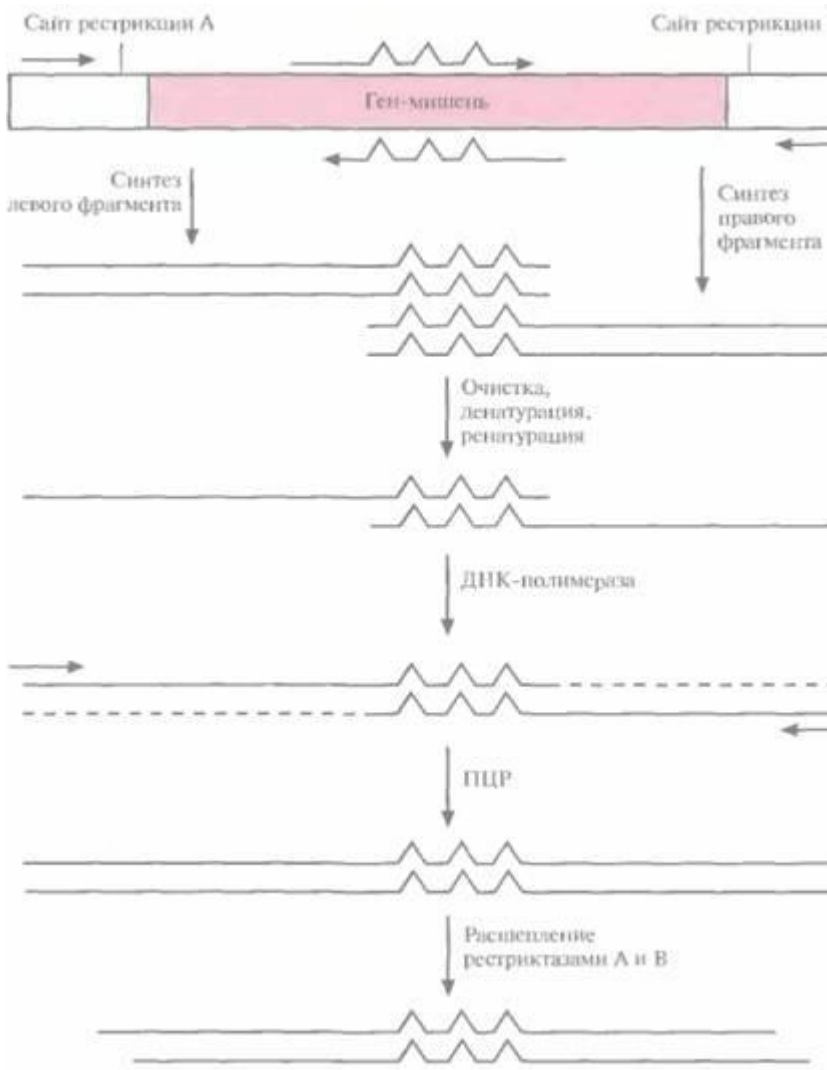


Рис. 8.6. Случайный мутагенез с использованием «вырожденных» олигонуклеотидов и ПЦР. Левую и правую части гена-мишени амплифицируют по отдельности с помощью ПЦР. Соответствующие праймеры показаны горизонтальными стрелками. «Вырожденные» олигонуклеотиды изображены стрелками с тремя зазубринами, каждая из которых отвечает нуклеотиду, не комплементарному соответствующему нуклеотиду в гене-мишени. Амплифицированные фрагменты очищают, денатурируют до полного разделения цепей и ренатурируют. В результате образуются частично двухцепочечные молекулы ДНК, спаренные в области гена-мишени. Их достраивают с помощью ДНК-полимеразы и проводят ПЦР-амплификацию. ПЦР-продукты расщепляют эндонуклеазами рестрикции А и В и встраивают в вектор, обработанный теми же ферментами.

положным концам молекул. Амплифицированные молекулы обрабатывают двумя эндонуклеазами рестрикции, уникальные сайты которых находятся на концах фрагмента, и встраивают в соответствующий плазмидный вектор. Этот подход позволяет получить измененные гены со случайными мутациями.

**Случайный мутагенез с использованием аналогов нуклеотидов**

Помимо методов внесения мутаций в клонированный ген, основанных на использовании фага М13, были разработаны другие подходы, в которых использовались плазмидные ДНК. Один из них схематично представлен на рис. 8.7. Ген-мишень встраивают в плазмиду поблизости от двух тесно расположенных сайтов рестрикции. Эти сайты подбирают так, чтобы после расщепления двумя рестриктазами образовывались укороченные 3'- и 5'-концы, а именно, чтобы 3'-конец сайта расщепления, расположенного рядом с клонированным геном, был укорочен, а 3'-конец с другой стороны плазмиды выступал. Эксонуклеаза III (EcoIII) *E. coli* расщепляет молекулу ДНК только с укороченных 3'-концов,

но не с выступающих 3'- или любых 5'-концов. Ее добавляют в реакционную смесь после инкубирования ДНК с двумя рестриктазами, и она отщепляет от укороченного 3'-конца цепи по одному нуклеотиду. Через определенное время реакцию останавливают и заполняют пробел с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I, используя смесь обычных четырех дезоксирибонуклеотидов с добавлением аналога одного из них. В результате получают плазмиды, содержащие ген-мишень, в одном или нескольких сайтах которого находится аналог соответствующего нуклеотида. Ими трансформируют клетки *E. coli*. Плазмиды реплицируются, и в клонированный ген включается нуклеотид, отличный от такового в исходном гене.

Помимо описанного выше, для случайного мутагенеза используют и другие методы, например один из вариантов олигонуклеотид-направленного мутагенеза с применением ДНК фага M13. В этом случае затравкой для синтеза ДНК служит смесь олигонуклеотидов, содержащих случайные замены. В результате получают библиотеки клонов, несущих множество мутаций в различных сайтах. Недостаток подходов, при которых в клонированном гене образуется большое число случайных мутаций, состоит в необходимости тестирования каждого клона для идентификации того, который детерминировал бы синтез нужного белка. Это весьма непростая

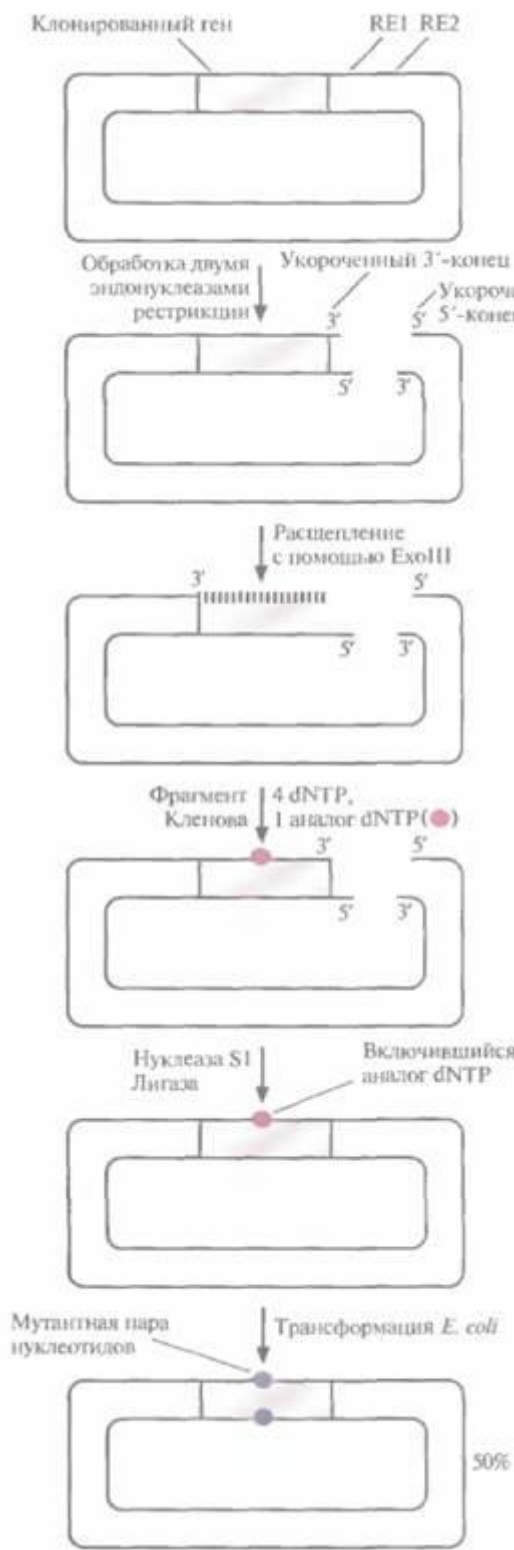


Рис. 8.7. Внесение случайных мутаций в клонированный ген. Вектор, несущий клонированный ген, расщепляют рестриктазами RE1 и RE2, в результате чего образуются один 3'- и один 5'-укороченные концы (и соответственно один 3'- и один 3'-выступающие концы). Затем его обрабатывают ферментом ExoIII, который расщепляет ДНК только с укороченного 3'-конца, удаляя по одному нуклеотиду. Через некоторое время реакцию останавливают и заполняют образовавшийся пробел с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*. При этом в реакционную смесь добавляют все четыре дезоксинуклеозидтрифосфата (dNTP) и в небольшом количестве - аналог одного из них. Обрабатывают продукт нуклеазой S1 для образования тупых концов, лигируют с помощью ДНК-лигазы и трансформируют клетки *E. coli*. При последующей репликации векторной ДНК в комплементарную цепь включаются нуклеотиды, отличные от исходных, в том сайте, где находится аналог нуклеотида. В результате в клонированный ген вносится мутация.

задача, но зачастую только так можно выявить белки, обладающие новыми свойствами. Как только эта задача решена, определяют нуклеотидную последовательность соответствующего клонированного гена и идентифицируют измененный сайт (сайты).

Генная инженерия белков

На долю 20 из многих тысяч изученных и охарактеризованных ферментов приходится более 90% всех ферментов, используемых в настоящее время в промышленности. В табл. 8.1 перечислены некоторые наиболее важные из них и указана область их применения. Остальные ферменты не используются потому, что присущая им активность не удовлетворяет требованиям, предъявляемым высокоспециализированными процессами, протекающими in vitro. Большинство ферментов быстро денатурируют при высокой температуре и в присутствии органических растворителей, а именно в этих условиях протекают многие промышленные процессы. Конечно,

Таблица 8, 1. Некоторые ферменты и области их применения

| Фермент         | Применение  |
|-----------------|---|
| α-Амилаза       | Пивоварение, производство спирта                        |
| Аминоацилаза    | Получение L-аминокислот                                 |
| Бромелаин       | Размягчение мяса, осветление соков                      |
| Каталаза        | Антиоксидант в готовых к употреблению пищевых продуктах |
| Целлюлаза       | Получение спирта и глюкозы                              |
| Фицин           | Размягчение мяса, осветление соков                      |
| Глюкоамилаза    | Пивоварение, производство спирта                        |
| Глюкозоизомераз | Производство сиропов с высоким содержанием фруктозы     |
| Глюкозооксид    | Антиоксидант в готовых к употреблению пищевых продуктах |
| Инвертаза       | Инверсия сахарозы                                       |
| Лактаза         | Утилизация сыворотки, гидролиз лактозы                  |
| Липаза          | Сыроварение, получение ароматизаторов                   |
| Папаин          | Размягчение мяса, осветление соков                      |
| Пектиназа       | Осветление соков, производство спирта                   |
| Протеаза        | Детергент, производство спирта                          |
| Реннет          | Сыроварение   |

термостабильные ферменты можно выделить из термофильных микроорганизмов, однако эти организмы не всегда синтезируют именно те специфические ферменты, которые нужны, Впрочем, эти трудности можно преодолеть при помощи направленного мутагенеза и клонирования генов-мишеней.

Образование дополнительных дисульфидных связей

Термостабильность белковых молекул можно повысить, внося в них изменения, благодаря которым они дольше не разворачиваются при повышении температуры. Кроме того, такие термостабильные белки часто не разрушаются в органических растворителях и при нефизиологических условиях (например, при экстремальных рН). К значительному повышению стабильности белковой молекулы может привести образование в ней дополнительных дисульфидных связей. Основная проблема здесь заключается в том, чтобы эти связи не мешали нормальному функционированию белка. В одном из экспериментов при помощи олигонуклеотид-направленного мутагенеза были созданы шесть вариантов лизоцима фага Т4 с новыми внутри-цепочечными дисульфидными связями. Для этого два, четыре или шесть специфических аминокислотных остатков в полинуклеотидной цепи были заменены на остатки цистеина, в результате чего образовалась одна, две и три дисульфидных связи соответственно (табл. 8.2).

Аминокислотные остатки, замененные на остатки цистеина, располагались в активном ферменте близко друг к другу, так что при образовании новых дисульфидных связей общая конформация молекулы существенно не изменялась. Кроме того, они находились вне активного центра фермента — области, наиболее чувствительной к малейшим изменениям конформации. Связи образовывались между остатками 3 и 97, 9 и 164, 21 и 142 (начало нумерации с N-конца).

После мутагенеза мутантные гены идентифицировали и Экспрессировали в *E. coli*, рекомбинантные белки очищали и определяли их ферментативную активность и термостабильность (табл. 8,2). Последняя обычно характеризуется температурой, при которой молекула денатурирует на 50%; степень денатурации определяется



Таблица 8,2. Свойства лизоцима Т4 и шести его вариантов, полученных с помощью генной инженерии<sup>1\*</sup>

| Ферме НТ        | Положения аминокислотных остатков |     |     |     |     |     | Число<br>связей<br>S— S | Активность,<br>% | Т <sub>м</sub> , °C |      |
|-----------------|-----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-------------------------|------------------|---------------------|------|
|                 | 3                                 | 9   | 21  | 54  | 97  | 142 |                         |                  |                     | 164  |
| Дикий тип       | Ile                               | Ile | Thr | Cys | Cys | Thr | Leu                     | 0                | 100                 | 41,9 |
| Псевдодикий тип | Ile                               | Ile | Thr | Thr | Ala | Thr | Leu                     | 0                | 100                 | 41,9 |
| A               | Cys                               | Ile | Thr | Thr | Cys | Thr | Leu                     | 1                | 96                  | 46,7 |
| B               | Ile                               | Cys | Thr | Thr | Ala | Thr | Cys                     | 1                | 106                 | 48,3 |
| C               | Ile                               | Ile | Cys | Thr | Ala | Cys | Leu                     | 1                | 0                   | 52,9 |
| D               | Cys                               | Cys | Thr | Thr | Cys | Thr | Cys                     | 2                | 95                  | 57,6 |
| E               | Ile                               | Cys | Cys | Thr | Ala | Cys | Cys                     | 2                | 0                   | 58,9 |
| F               | Cys                               | Cys | Cys | Thr | Cys | Cys | Cys                     | 3                | 0                   | 65,5 |

<sup>1)</sup> По данным работы Matsumura et al., Nature 342:291-293, 1998.

по изменению кругового дихроизма раствора белка. Исходная (нативная) форма лизоцима Т4 содержит два свободных остатка цистеина, не участвующих в образовании дисульфидных связей. У фермента так называемого «псевдодикого типа» они заменены на остатки Thr и Ala, при этом активность и термостабильность фермента остались прежними. Последовательность «псевдодикого типа» служила стандартом при сравнении вариантов с потенциально термостабилизирующими дисульфидными связями и также предотвращала образование случайных дисульфидных связей между вновь введенными остатками цистеина и остатками, присутствующими в нативном белке.

Результаты этого эксперимента показали, что термостабильность фермента повышается при образовании новых дисульфидных связей, при этом наиболее термостабильным является белок с максимальным числом таких связей. Однако некоторые варианты (С, Е и F), будучи более термостабильными, чем нативный фермент или фермент «псевдодикого типа», не обладают ферментативной активностью. Возможно, это обусловливается искажением конформации белковой молекулы при образовании дисульфидной связи между остатками 21 и 142. Хотя создание новых белков с помощью методов генной инженерии часто представляет собой эмпирический процесс (т. е. далеко не всегда бывает ясно, замены каких именно аминокислот позволяют получить «наилучший» вариант), описанный эксперимент показывает, что получение термостабильных белков с дополнительными дисульфидными связями вполне реально.

Была предпринята также попытка получения термостабильной мутантной ксиланазы *Bacillus circulans* — фермента, который можно использовать при производстве бумаги. Одним из этапов этого процесса является удаление гемицеллюлозы из пульпы с целью ее отбеливания, при этом образуются большие количества токсичных отходов. Обработка древесной массы ксиланазой позволяет использовать меньше отбеливающих химикатов. К сожалению, перед добавлением фермента пульпу обрабатывают горячей щелочью, а поскольку современные технологии имеют тенденцию к уменьшению количества воды, расходуемой на охлаждение пульпы, ксиланаза должна оставаться активной при относительно высоких температурах.

Чтобы определить, в какие участки полипептидной цепи могут быть введены одна, две или три дисульфидных связи для стабилизации фермента без нарушения его каталитической активности, использовали компьютерное моделирование пространственной структуры ксиланазы. Были получены восемь производных ксиланазы *B. circulans*. Все они обладали более высокой термостабильностью, чем нативный фермент, и при этом три были столь же активны при 60 °С, как и нативный белок, а один, содержащий дисульфидную связь между N- и С-концами, был даже в два раза более активным и сохранял свыше 85% своей активности после 2-часовой инкубации при 60 °С, в то время как нативный фермент полностью утрачивал активность в этих условиях уже через 30 мин. Успех этих экспериментов показывает, что данную стратегию можно использовать для повышения термостабиль-



ности различных ферментов, если только для них имеются достаточно полные рентгеноструктурные данные. И тем не менее пока нельзя быть уверенным, что термостабильная ксиланаза будет широко использоваться при производстве бумаги.

*Замена аспарагина на другие аминокислоты*

При высоких температурах остатки аспарагина и глутамина могут дезамидироваться с образованием аммиака. Теряя амидную группу, они превращаются в аспарагиновую и глутаминовую кислоты соответственно, что приводит к локальным изменениям конформации полипептидной цепи и как следствие — к утрате активности белков, в которые они входят.

Чтобы установить, какое влияние оказывает замена некоторых остатков аспарагина в молекуле триозофосфат-изомеразы *Saccharomyces cerevisiae* на свойства фермента, были поставлены специальные эксперименты. Триозофосфатизомераза состоит из двух идентичных субъединиц; каждая из них содержит два остатка аспарагина, замена которых может приводить к изменению термочувствительности белка, поскольку они расположены в месте соприкосновения субъединиц. При помощи олигонуклеотид-направленного мутагенеза были заменены остатки аспарагина в положениях 14 и 78 (табл. 8.3). Замена одного из них на остаток треонина или изолейцина приводила к повышению термостабильности фермента, на аспарагиновую

Таблица 8.3. Стабильность при 100 °С триозофосфат-изомеразы дрожжей и ее генноинженерных вариантов<sup>1)</sup>

| Фермент   | Положения аминокислотных остатков |     | Время полужизни, мин |
|-----------|-----------------------------------|-----|----------------------|
|           | 14                                | 78  |                      |
| Дикий тип | Asn                               | Asn | 13                   |
| A         | Asn                               | Thr | 17                   |
| B         | Asn                               | Leu | 16                   |
| C         | Thr                               | Phe | 22                   |
| D         |                                   | Asp | 11                   |

<sup>1)</sup> По данным работы Ahern et al., Fret. *Natl. Acad. Sci. USA* 84: 675-679, 1987.

Термостабильность фермента оценивают как время полужизни (скорость инактивации фермента) при 100 °С. Чем оно больше, тем более стабилен фермент.

кислоту — к понижению. Фермент, получающийся при замене обоих остатков аспарагина на остатки аспарагиновой кислоты, оказался нестабильным даже при нормальной температуре и обладал низкой ферментативной активностью (в табл. 8.3 не представлен),

Оценка чувствительности рекомбинантных белков к протеолитическому расщеплению показала, что существует положительная корреляция между термостабильностью белка и его устойчивостью к протеолитическому расщеплению. Полученные данные говорят о возможности создания термостабильных форм других ферментов путем замены несущественных остатков аспарагина.

*Уменьшение числа свободных сульфгидрильных групп*

Чужеродный белок, синтезируемый в организме-хозяине, иногда оказывается менее активным, чем ожидалось, и чтобы повысить его активность, можно использовать методы генной инженерии. Например, при экспрессии в *E. coli* клонированной комплементарной ДНК (кДНК) β-интерферона человека (ИФβ) белковый продукт обладал в 10 раз меньшей противовирусной активностью, чем нативная гликозилированная форма. При этом ИФβ синтезировался в довольно большом количестве, однако почти все его молекулы образовывали димеры и более высокомолекулярные неактивные комплексы.

Как показал анализ нуклеотидной последовательности гена ИФβ, в нем присутствуют три остатка цистеина, и один из них или несколько, возможно, участвуют в образовании дисульфидных связей, приводящих к образованию димеров и олигомеров в клетках *E. coli*, но не в клетках человека. Было высказано предположение, что замена одного или нескольких цистеиновых кодонов на сериновые приведет к синтезу интерферона, не образующего олигомеров. Сери́н был выбран потому, что его структура сходна со структурой цистеина за исключением того, что вместо серы он содержит кислород и поэтому не может образовывать дисульфидные связи.

Приступая к этим экспериментам, исследователи не располагали детальной информацией относительно молекулярной структуры β-интерферона и были вынуждены опираться на соответствующие

данные для родственных белков. Иными словами, они не знали, какой из трех остатков цистеина был ответствен за формирование межмолекулярных дисульфидных связей. К счастью, локализация остатков цистеина, участвующих в образовании внутримолекулярных дисульфидных связей в молекуле ИФ $\alpha$  с аналогичной структурой, была известна, что делало возможным сравнение аминокислотных последовательностей этих двух молекул (рис. 8.8). Как показали результаты анализа, остатки Cys-31 и Cys-141 в ИФ $\beta$  находятся в тех же позициях, что и остатки Cys-29 и Cys-138 в ИФ $\alpha$ . Поскольку последние участвуют в образовании в ИФ $\alpha$  внутримолекулярных дисульфидных связей, было разумно предположить, что Cys-17 в ИФ $\beta$  не вовлечен в формирование таких связей и его можно заменить,

Это предположение оказалось правильным: при синтезе в клетках *E. coli* Ser-17-ИФ $\beta$  мультимерные комплексы не образовывались. Кроме того, этот интерферон обладал такой же удельной активностью, как и аутентичный нативный ИФ $\beta$ , и был более стабилен при длительном хранении, чем нативная форма.

Повышение ферментативной активности

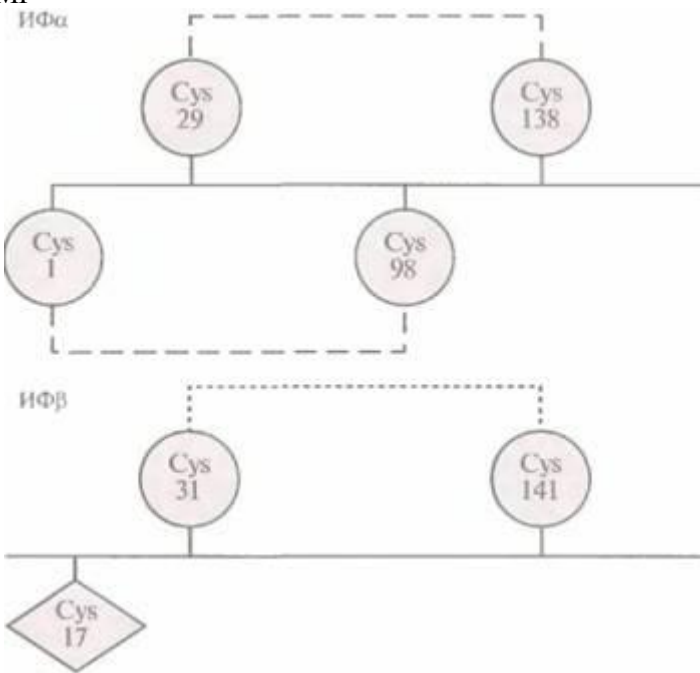
С помощью направленного мутагенеза можно не только повышать стабильность ферментов, но и изменять их каталитическую активность. В настоящее время для существенного изменения ферментативной активности любого достаточно хорошо охарактеризованного фермента необходимо располагать детальной информацией о геометрии его активного центра. В этом случае можно предсказать, какие замены необходимо произвести для изменения специфичности фермента к данному субстрату.

Возможности данного подхода иллюстрируют результаты эксперимента по изменению специфичности связывания субстрата тирозил-тРНК—синтетазой из *B. stearothermophilus*. Этот фермент катализирует аминокислотирование тРНК, которая специфически связывает тирозин (тРНК<sup>Т</sup>), в ходе двухступенчатой реакции:

- (1) Туг + АТР --> Туг-А + РР<sub>і</sub>
- (2) Туг-А + тРНК<sup>Т</sup> --> Туг-тРНК<sup>Т</sup> + АМР

1

Рнс. 8.8, Локализация остатков цистеина в молекулах ИФ $\alpha$  и ИФ $\beta$ , между которыми образуются дисульфидные связи. Выявленные внутримолекулярные дисульфидные связи в ИФ $\alpha$  обозначены штриховыми линиями, а предполагаемая связь в ИФ $\beta$  — пунктирной.



На стадии 1 АТР активирует тирозин (Туг), в результате чего образуется связанный с ферментом тирозиладенилат (Туг-А) и пирогосфат (РР<sub>3</sub>). На стадии 2 тирозиладенилат гидролизуетсч при участии свободной 3'-гидроксильной группы молекулы тРНК, так что тирозин присоединяется к тРНК с высвобождением АМР. В ходе обеих реакций субстраты остаются связанными с тирозил-тРНК—синтетазой.

Ко времени постановки эксперимента была определена пространственная структура тирозил-тРНК—синтетазы *B. stearothermophilus* и локализован ее активный центр, так что при помощи компьютерного моделирования можно было предсказать влияние замены в нем одного или нескольких аминокислотных остатков на взаимодействие фермента с субстратами. Чтобы проверить правильность прогнозов, с помощью олигонуклеотид-направленного мутагенеза в ген тирозил-тРНК—синтетазы были внесены специфические мутации. Остаток треонина в положении 51 (Thr-51) был заменен на остаток аланина или пролина. В нативном ферменте гидроксильная группа Thr-51 образует водородную связь с атомом кислорода рибозного кольца тирозиладенилата, и предполагалось, что разрыв этой слабой связи увеличит сродство фермента к АТР.

Чтобы охарактеризовать получившиеся ферменты, определили их кинетические константы. В некоторых случаях изменения оказались более существенными, чем ожидалось (табл. 8.4). Так, если для Ala-51-фермента константа связывания (K<sub>М</sub>) с АТР уменьшилась примерно в два раза без значительного изменения каталитической константы (k<sub>cat</sub>), то для Pro-51-фермента — более чем в 100 раз. При этом каталити-

Таблица 8.4. Эффективность аминокислирования, осуществляемого нативной (Thr-51) и модифицированной (Ala-51 и Pro-51) тирозил -тРНК—синтетазами <sup>1)</sup>

| Ферм<br>ент |      | <i>k</i> <sub>cat</sub> , с <sup>-1</sup> | <i>K</i> <sub>М</sub> , мМ | <i>k</i> <sub>cat</sub> / <i>K</i> <sub>М</sub> , с <sup>-1</sup> · М <sup>-1</sup> |
|-------------|------|---|----------------------------|---|
| 51          | Thr- | 4,7                                       | 2,5                        | 1860  |
| 51          | Ala- | 4,0                                       | 1,2                        | 3200  |
| 51          | Pro- | 1,8                                       | 0,019                      | 95800   |

<sup>1)</sup> По данным работы Wilkinson et al., *Nature* 307; 187-188, 1984.

ческая эффективность (k<sub>cat</sub>/K<sub>М</sub>) реакции аминокислирования увеличилась в обоих случаях. Результат, полученный для Pro-51-фермента, был неожиданным, поскольку замена треонина на пролин должна была привести к нарушению (по крайней мере локальному) структуры α-спирали в этой области, что предположительно должно отрицательно сказаться на связывании субстрата.

Эти данные показывают, что несмотря на всю сложность прогнозирования результата специфических аминокислотных замен, с помощью описанного подхода все же можно идентифицировать боковые группы, замена которых приведет к улучшению кинетических свойств фермента. Кроме того, стало очевидно, что сродство данного фермента к субстрату, а также каталитическую эффективность реакции можно повысить in vitro, внося соответствующие изменения в клонированный ген.

**Изменение потребности ферментов в металлических кофакторах**

Субтилизины — сериновые протеиназы, секретируемые в культуральную среду грамположительными бактериями, — широко используются в качестве биодеградируемых детергентов. Все они прочно связывают один или несколько атомов кальция, повышающих их стабильность. К сожалению, субтилизины используются в таких промышленных процессах, где участвуют в больших количествах соединения, хела-тирующие металлы, в том числе кальций, и в таких условиях субтилизины быстро теряют свою активность. Чтобы решить эту проблему, попытались сначала лишить субтилизин способности связывать кальций, а затем увеличить стабильность модифицированного фермента.

Получение модифицированного субтилизина было начато с идентификации гена BPN *Bacillus amyloliquefaciens*. Прежде всего с помощью рентгеноструктурного анализа высокого разрешения была определена структура белка, а затем с использованием олигонуклеотид-направленного мутагенеза создан мутантный ген с делетированными нуклеотидами, кодирующими участок белковой молекулы от 75

до 83 аминокислотного остатка, который отвечал за связывание кальция. Белок с делецией не связывал кальций и, что удивительно, сохранял конформацию, сходную с таковой исходного белка.

Далее для повышения стабильности субтилизина без кальцийсвязывающего домена идентифицировали сайты, которые необходимо изменить, и аминокислотные остатки, которые нужно ввести в эти сайты. Было высказано предположение, что все аминокислоты, взаимодействующие с кальцийсвязывающим доменом в исходном ферменте, не являются оптимальными в новых условиях. В качестве кандидатов были выбраны 10 аминокислот, а поскольку заранее не было известно, включение какого именно аминокислотного остатка приведет к наибольшей стабилизации фермента, для внесения изменений в каждый из 10 сайтов использовали случайный мутагенез.

Выбранные аминокислоты были локализованы в четырех разных областях белковой молекулы: N-концевом участке (остатки со 2 по 5), в омега-петле (остатки с 36 по 44), в  $\alpha$ -спиральной области (остатки с 63 по 85) и в одном из  $\beta$ -слоев (остатки с 202 по 220). Чтобы идентифицировать оптимальную для данного сайта аминокислоту, мутантные клоны выращивали в плашках, прогревали при 65 °С в течение 1 ч, охлаждали и измеряли активность субтилизина. Для синтеза активного, не связывающего кальций субтилизина пришлось использовать *B. subtilis*, поскольку для *E. coli* такой белок оказался токсичным.

Предварительный анализ выявил наличие стабилизирующих мутаций в 7 из 10 исследованных сайтов (табл. 8.5). Фермент, полученный при их внесении в один ген, обладал кинетическими свойствами, сходными с таковыми исходного субтилизина. Кроме того, мутантный субтилизин в отсутствие кальция был почти в 10 раз более стабилен, чем исходный и, как это ни удивительно, примерно на 50% более стабилен, чем исходный фермент в присутствии кальция. Полученные результаты показывают, что несмотря на трудоемкость этих экспериментов с помощью генной инженерии можно изменять свойства ферментов, которые зависят от большого числа аминокислотных остатков.

Таблица 8.5. Влияние случайных имен аминокислотных остатков в определенных участках на стабильность субтилизина BPN<sup>1</sup>, лишенного кальцийсвязывающего домена <sup>1)</sup>

| Участок           | Номер аминокислотного остатка | Мутация <sup>2)</sup> | Увеличение времени полужизни |
|-------------------|-------------------------------|-----------------------|------------------------------|
| N-конец           | 2                             | Gln→Lys               | 2,0                          |
|                   | 3                             | Ser→Cys               | 17,0                         |
|                   | 4                             | Не обнаружена         | 0                            |
|                   | 5                             | Pto→Ser               | 1,2                          |
| Омега-петля       | 41                            | Asp→Ala               | 1,5                          |
|                   | 43                            | Lys→Asn               | 1,2                          |
| $\alpha$ -Спираль | 73                            | Ala→Leu               | 2,6                          |
|                   | 74                            | Не обнаружена         | 0                            |
| $\beta$ -Слой     | 206                           | Gln→Gys               | 17,0                         |
|                   | 214                           | Не обнаружена         | 0                            |

<sup>1)</sup> По данным работы Strauberg et al., *Bio/Technology* 13: 669–673, 1995.

<sup>2)</sup> Замена аминокислот в положениях 3 и 206 на Cys проходила в одном клоне: между этими остатками образовались дисульфидные связи, поэтому белок оказался настолько стабильным.

Изменение специфичности фермента

Олигонуклеотид-направленный мутагенез используют в основном для улучшения уже существующих свойств ферментов, но, вероятно, с его помощью можно изменять ферменты таким образом, чтобы они приобретали другую специфичность. Например, таким способом на основе относительно неспецифичной эндонуклеазы *FokI* были получены новые сайтспецифичные эндонуклеазы.

К настоящему времени идентифицировано более 2500 ферментов рестрикции-модификации, происходящих из большого числа разных организмов. Многие из них узнают одну и ту же нуклеотидную последовательность, так что всего существует около 200 разных рестриктазных сайтов, при этом размер большинства из них составляет от 4 до 6 п. н. Эндонуклеазы рестрикции, узнающие такие сайты, расщепляют молекулу ДНК в очень многих местах и используются для получения больших фрагментов ДНК не столь широко, как эндонуклеазы рестрикции, узнающие нуклеотидные последовательности длиной в 8 п. н, или больше. Поиск новых эндонуклеаз рестрикции — весьма непростая задача, для ее решения требуется много времени. Вряд ли можно надеяться, что удастся найти достаточно много фер-



ментов, узнающих сайты длиной 8 п. н. и больше, так что для получения новых рестриктаз необходимо использовать альтернативные генно-инженерные подходы.

Существует весьма интересный класс белков, в молекуле которых присутствуют уникальные структурные домены, связывающие атомы Zn<sup>2+</sup>, — так называемые цинковые пальцы. Эти белки связываются со специфической нуклеотидной последовательностью, встраиваясь своим α-спиральным участком в большую бороздку двойной спирали. Так, белок Zif268 из клеток мышей содержит три цинковых пальца, каждый из которых взаимодействует с определенным кодоном ДНК. Поскольку эти пальцы связываются с ДНК независимо друг от друга, их можно объединить в составе одного пептида таким образом, чтобы связывание происходило с определенным сайтом. Это позволяет создавать нук-леазы, расщепляющие ДНК в уникальных сайтах, объединив нуклеотидные последовательности, кодирующие цинковые пальцы, с частью гена неспецифичной нуклеазы FokI бактерии *Flavobacterium okeanokoites*. Чтобы проверить реальность этого предположения, был создан химерный ген, кодирующий участок из шести остатков гистидина на N-конце белковой молекулы для упрощения очистки рекомбинантного белка, три цинковых пальца, линкер (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> для придания гибкости рекомбинантной молекуле, а также содержащий часть гена нуклеазы FokI (рис, 8.9), После очистки рекомбинантного белка N-концевые остатки гистидина были удалены обработкой тромбином.

Бактерии, синтезирующие эндонуклеазы рестрикции, защищают собственную ДНК от расщепления с помощью ферментов, метилирующих те участки молекулы, с которыми связывается соответствующая эндонуклеаза рестрикции. Однако геном клетки-хозяина не защищен от рекомбинантной рестриктазы FokI, и чтобы предотвратить гибель растущих клеток, синтез гибридного фермента подавляли, поместив ее ген под контроль системы экспрессии бактериофага T7,

В результате этих экспериментов были получены две рекомбинантные эндонуклеазы рестрикции FokI. Одна из них расщепляла ДНК фага λ в том сайте, который и ожидался, а вторая — в ожидаемом сайте и — в меньшей степени — в двух других сайтах. Это не удивительно, поскольку цинковые пальцы распознают в основном два из трех оснований триплета. Хотя эти рекомбинантные ферменты пока нельзя использовать в лаборатории, описанный подход создания уникальных эндонуклеаз рестрикции представляется весьма перспективным.

**Повышение стабильности и специфичности фермента**

Фермент, называемый активатором тканевого плазминогена (tPA), — это сериновая протеина-за, состоящая из нескольких доменов; ее используют в клинике для растворения сгустков крови, К сожалению, tPA быстро выводится из системы кровообращения, поэтому его приходится вводить путем инфузии. Чтобы добиться желаемого терапевтического эффекта, необходимо использовать высокие концентрации фермента, а это может приводить к неспецифическому внутреннему кровотечению. Таким образом, было бы весьма желательно получить долгоживущий фермент tPA, обладающий высоким сродством к фибрину в тромбах и не вызывающий кровотечения. Белок с такими свойствами можно получить, внося специфические мутации в ген нативного tPA, Заменяв Thr-103 на Asn, получили фермент, сохраняющийся в плазме кролика примерно в 10 раз дольше, чем нативный вариант. Заменяв аминокислоты 296-299 с Lys-His-Arg-Arg на Ala-Ala-Ala-Ala, добились существенного повышения сродства фермента к фибрину. Заменяв Asn-117 на Gin, получили фермент с такой же фибринолитической активностью, как у исходного фермента. Внеся эти три мутации в один белок, получили фермент, обладающий всеми тремя свойствами (табл. 8.6). Чтобы выяснить, можно ли использовать его вместо нативного tPA, нужно провести дополнительные исследования.



Таблица 8.6. Стабильность и активность различных мутантных вариантов фермента tPA<sup>1), 2)</sup>

| Вариант | Модификация(и)   | Стабильность в плазме | Сродство к фибрину 0,34 | Активность в плазме | Эффективность растворения сгустков |
|---------|--|-----------------------|-------------------------|---------------------|------------------------------------|
| 1       |  | 10                    |                         | 0,68                | 0,56                               |
| 2       |  | 0,85                  | 0,93                    | 0,13                | 1,01                               |
| 3       |  | 5,3                   | 0,33                    | 0,13                | 0,65                               |
| 4       | Thr(103)→Asn<br>LysHisArgArg(296-299)→AlaAlaAlaAla   | 3,4                   | 1,0                     | 1,13                | 1,17                               |
| 5       | Thr(103)→Asn, LysHisArgArg(296-299)→AlaAlaAlaAla<br>Thr(103)→Asn, Asn(117)→Gln                                       | 1,2                   | 1,33                    | 0,16                | 1,38                               |
| 6       | LysHisArgArg(296-299)→AlaAlaAlaAla, Asn(117)→Gln<br>Thr(103)→Asn, LysHisArgArg(296-299)→AlaAlaAlaAla<br>Asn(117)→Gln | 8,3                   | 0,87                    | 0,06                | 0,85                               |

<sup>1)</sup> По данным работы Pena et al., *Prix. Natl. Acad.Sci. USA*91: 3670-3674, 1994.

<sup>2)</sup> Все значения нормированы относительно соответствующих значений для исходного фермента. Стабильность в плазме обратна времени, необходимому для осветления плазмы; чем больше приведенная величина, тем выше стабильность. Сродство к фибрину коррелирует с эффективностью растворения сгустков. По отношению к активности в плазме имеет место отрицательная корреляция.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Свойства любого белка зависят от его конформации, которая в свою очередь определяется аминокислотной последовательностью. Некоторые аминокислоты в полипептидной цепи играют ключевую роль в определении специфичности, термостабильности и других свойств белка, так что замена единственного нуклеотида в гене, кодирующем белок, может привести к включению в него аминокислоты, приводящему к понижению его активности, либо, напротив, к улучшению каких-то его специфических свойств. С развитием технологии рекомбинантных ДНК появилась возможность производить специфические замены в клонированных генах и получать белки, содержащие нужные аминокислоты в заданных сайтах. Такой подход получил название направленного мутагенеза. Как правило, интересующий исследователя ген клонируют в ДНК фага М13. Одноцепочечную форму ДНК этого фага копируют с использованием олигонуклеотидного праймера, синтезированного таким образом, чтобы в ген-мишень был встроен определенный нуклеотид. Затем трансформируют двухцепочечными ДНК М13 клетки *E. coli*. Часть образующихся в клетках фаговых частиц несет ген, содержащий нужную мутацию. Такие частицы идентифицируют, встраивают мутантный ген в экспрессирующий вектор, синтезируют белок и определяют его активность. Вносить изменения в клонированные гены можно также с помощью плазмид или ПЦР. Обычно заранее не известно, какую именно аминокислоту (аминокислоты) необходимо заменить для того, чтобы улучшить то или иное свойство белка-мишени. Поэтому предпочтительно использовать случайный, а не олигонуклеотид-направленный мутагенез.

Выбор аминокислоты, подлежащей замене, как правило, производится с учетом ее роли в функционировании белка. Данные об этом получают в ходе генетических исследований или методом рентгеноструктурного анализа трехмерной структуры белка. Изменяя специфические сайты или целые участки белковой молекулы, можно повысить термостабильность белка, изменить его чувствительность к рН, специфичность, аллостерическую регуляцию, потребность в кофакторе и другие свойства. Так, термостабильность триозофосфатизомеразы удалось повысить, заменив аминокислоты в двух позициях. Этот подход можно использовать как для придания новых свойств уже существующим белкам, так и для создания уникальных ферментов.

ЛИТЕРАТУРА

Ahern T. J., J. I. Casai, G. A. Petsko, A. M. Klibanov. 1987. Control of oligomeric enzyme thermostability by protein engineering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 675-679. Brange J., U. Ribel, J. F. Hansen, G. Dodson, M. T. Hansen, S. Havdund, S. G. Mdborg, F. Norris, K. Noms, L. Snel, A. R. Sorensen, H. O, Voigt. 1988. Monomeric insulins obtained



by protein engineering and their medical implications. *Nature* 333: 679-682.

**Chen K., F. H. Arnold.** 1991. Enzyme engineering for nonaqueous solvents: random mutagenesis to enhance activity of subtilisin E in polar organic *med'm.Bio/Technology* 9: 1073-1077.

**Deng W. P., J. A. Nickoloff.** 1992. Site-directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site. *Anal. Biochem.* **200**: 81—88.

**Geisselsoder J., F. Witney, P. Yuckenberg.** 1987. Efficient site-directed in vitro mutagenesis. *Bio Techniques* **Si** 786-791.

**Herlitz S., M. Koenen.** 1990. A general and rapid mutagenesis method using polymerase chain reaction. *Gene* **91**: 143-147.

**Hermes J. D., S. M. Parekh, S. C. Blacklow, H. Küster, J. R. Knowles.** 1989. A reliable method for random mutagenesis: the generation of mutant libraries using spiked oligodeoxyribonucleotide primers. *Gene* **94**: 143—151.

Keyt B. A., N. F. Paoni, **C. J. Refino, L. Berleau, H. Nguyen, A. Chow, J. Lai, L. Pena, C. Pater, J. Ogez, T. Etcherary, D. Bofetein, W. F. Bennett.** 1994. A faster-acting and more potent form of tissue plasminogen activator. *Proc. Natl. Acad. Sei.* №(91):3670-3674.

**Kim Y.-G., J. Cha, S. Chandrasegaran.** 1996. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to *FokI* cleavage domain. *Proc. Natl. Acad. Sei. USA* **93**: 1156-1160.

**Kirchhoff F., R. C. Desrosiers.** 1995. Random mutagenesis of short target DNA sequences via PCR with degenerate oligonucleotides. *Methods Mol. Biol.* **57**: 323-333.

**Landt O., H.-P. Grunert, U. Hahn.** 1990. A general method for rapid site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Seда* **96**: 125-128.

Mark **D. F., S. D. Lu, A. A. Creasey, R. Yanaiioto, L. S. Lin.** 1984. Site-specific mutagenesis of the human fibroblast interferon gene. *Prof. Natl. Acad. Sei. USA* **81**: 5662-5666.

**Matsumura M., G. Signor, B. W. Mathews.** 1989. Substantial increase of protein stability by multiple disulfide bonds. *Nature* **342**: 291-293.

**Nosoh Y., T. Sekiguchi.** 1990. Protein engineering for thermostability. *Trends Biotechnol.* **8**: 16-20.

Picctocki M. **P., R. N. Hines.** 1994. Oligonucleotide design and optimized protocol for site-directed mutagenesis. *Bio Techniques* **16**: 702—707.

Sliraishi H., Y. Shimura. 1988. A rapid and efficient method for targeted random mutagenesis. *Gene* **64**: 313-319.

**Smith M.** 1985. In vitro mutagenesis. *Annu. Rev. Genet.* **19**: 423-462.

**Strausberg S. L., P. A. Alexander, D. T. Gallagher, G. L. Gilliliuid, B. L. Barnett, P. N. Bryan.** 1995. Directed evolution of a subtilisin with calcium-independent stability, *Bio/Technology* **13**: 669-673.

Wakarchuk **W. W., W. L. Sung, R. L. Campbell, A. Cunningham, D. C. Watsnn, M. Yagucii.** 1994. Thermostabilization of the *Bacillus circulans* xylanase by the introduction of disulfide bonds. *Protein Eng.* **7**: 1319-1386.

**Wetzel R., L. J. Perry, C. Veilleux.** 1991. Mutations in human interferon gamma affecting inclusion body formation identified by a general immuno-chemical screen. *Bio/Technology* **9**: 731—737.

**Wilkinson A. J., A. R. Fersht, D. M. Blow, P. Carter, G. Winter.** 1984. A large increase in enzyme-substrate affinity by protein engineering. *Nature* **307**: 187-188.

**Zoller M. J., M. Smith.** 1982. Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any fragment of DNA. *Nucleic Acids Res.* **10**: 6487-6500.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какие физические и химические свойства ферментов можно изменить с помощью направленного мутагенеза?

2. Предположим, что вы клонировали бактериальный ген, экспрессирующийся в *E. coli*, и хотите изменить его активность. Однако в результате применения стандартного метода мутагенеза с использованием ДНК M13 по ряду технических причин лишь небольшая часть клонов приобрела мутантный ген-мишень, а большинство из них содержит интактный ген. Как увеличить долю клонов, содержащих ДНК с нужной мутацией?

3. Предположим, что вы выделили ген фермента, синтезирующегося в *E. coli*. Опишите стратегию изменения каталитической активности этого фермента, принимая во

внимание тот факт, что вы знаете нуклеотидную последовательность кодирующего его гена, но не знаете, какой из участков молекулы фермента ответствен за каталитическую активность.

4. Каковы преимущества и недостатки олигонуклеотид-направленного мутагенеза с использованием бактериофага M13 и ПЦР?

5. Опишите стратегию олигонуклеотид-направленного мутагенеза с использованием плазмидной ДНК.

6. Как, используя «вырожденные» праймеры, можно вносить случайные мутации в ДНК?

7. Опишите стратегию повышения стабильности белка, в котором а) отсутствуют остатки цистеина; б) присутствует нечетное число остатков цистеина.

8. Как влияет замена аспарагина на другой аминокислотный остаток на стабильность белка?

9. Каким образом можно изменить потребность фермента в кофакторах?

10. Как вы будете изменять каталитическую активность или субстратную специфичность фермента, ген которого вы выделили? В чем смысл этой процедуры?



# ЧАСТЬ II.

## Молекулярная биотехнология микробиологических систем

С развитием технологии рекомбинантных ДНК появилась возможность более эффективно использовать многие полезные свойства микроорганизмов. В ч. II мы рассмотрим некоторые примеры практического применения микробиологических систем, модифицированных методами генной инженерии.

С помощью современных генетических методов биологи научились превращать бактерии в своеобразные «биологические фабрики» по производству белковых препаратов (например, рестрицирующих эндонуклеаз), различных химических соединений, аминокислот, антибиотиков и т. д. Клонировав в бактериальных клетках специфические гены, они создают новые пути биосинтеза для получения уникальных метаболитов, применяют клонированные гены болезнетворных микроорганизмов в качестве зондов для диагностики заболеваний человека и домашних животных, используют изолированные гены для получения безопасных и эффективных вакцин.

Методами генной инженерии можно усиливать природную способность определенных видов бактерий к осуществлению специфических биологических процессов. Например, уже получены штаммы бактерий, которые более эффективно разрушают токсичные отходы, загрязняющие окружающую среду, способствуют ускорению роста сельскохозяйственных культур, эффективно расщепляют целлюлозу до низкомолекулярных углеродных соединений, уничтожают вредных насекомых.

Часто думают, что выращивание больших количеств микроорганизмов представляет собой рутинную процедуру. Однако для успешного производства рекомбинантных белков в промышленных масштабах необходимо контролировать множество параметров, от которых зависит рост синтезирующих их микроорганизмов и чистота получаемых продуктов.

# ГЛАВА 9.

## Молекулярная диагностика

Успехи современной медицины и сельского хозяйства часто зависят от того, удастся ли обнаруживать специфические вирусы, бактерии, грибы, паразитические микроорганизмы, белки и низкомолекулярные соединения в организме человека или животных, в растениях, воде или почве. Например, профилактику и лечение любого инфекционного заболевания значительно облегчает ранняя и точная идентификация вызвавшего его патогенного микроорганизма. Для проведения многих диагностических процедур необходимо сначала вырастить культуру потенциально патогенного микроорганизма и лишь затем проанализировать спектр его физиологических свойств. Хотя подобные тесты весьма эффективны и обладают достаточно высокой специфичностью, они часто занимают много времени и являются дорогостоящими. Это относится к идентификации и бактерий, и паразитических микроорганизмов (табл. 9,1). Кроме того, весьма ограничена возможность выявления тех патогенных микроорганизмов, которые пло-

Таблица 9,1, Сравнение некоторых методов диагностики инфекционных заболеваний, вызванных паразитическими микроорганизмами<sup>1)</sup>

| Метод  | Преимущества   | Недостатки   |
|--|--|--|
| Микроскопическое исследование                | Простота   | Трудоемкость, длительность   |
|  | Прямое выявление паразитических микроорганизмов                  | Низкая чувствительность  |
|  | Возможность разграничения  | Невозможность разграничения сходных м и кроорганизмов                    |
|  | микроорганизмов по морфологическим признакам                     | Необходимость высокой квалификации для интерпретации результатов         |
| Культивирование in vitro и иммунизация мышей | Обнаружение только жизнеспособных паразитических микроорганизмов | Длительность анализа, высокая стоимость                                  |
|  | Возможность определения вирулентности и инфекционности           | Разные породы животных лают разные ответы                                |
|  |  | Потеря жизнеспособности в организме животного                            |
| Определение антител в сыворотке              | Простота, непродолжительность анализа                            | Использование животных   |
|  | Возможность автоматизации  | Не всегда специфичен   |
|  | Возможность тестирования большого числа образцов                 | Невозможность разграничения острой и латентной форм инфекции             |
| Гибридизация и ПЦР                           | Быстрота, высокие чувствительность и специфичность               | Высокая стоимость анализов, многоэтапность                               |
|  | Прямое обнаружение паразитических м и к роорган измо в           | Невозможность различить живые и мертвые микроорганизмы                   |
|  | Возможность разграничения разных видов                           | Возможность получения лож положительных и ложноотрицательных результатов |
|  | Независимость результатов от предыдущих инфекций                 |  |
|  | Не требуют жизнеспособности паразитов                            |  |
|  | Возможность автоматизации  |  |

<sup>1)</sup> По данным работы Weiss, *Clin. Microbiol. Rev.* 8: 113-130, 1995.



хо растут в культуре либо вообще не поддаются культивированию. В качестве примера можно привести облигатных внутриклеточных паразитов *Chlamydia trachomatis*, которые вызывают хламидиоз, болезнь, передающуюся половым путем и распространенную в Северной Америке и Европе. Хламидиоз трудно диагностировать, поскольку для этого необходима перевиваемая культура клеток. При этом часто получают ложноотрицательные результаты (т. е. ошибочно диагностируют отсутствие микроорганизма), в результате чего не проводится адекватное лечение. Безусловно, если для выявления микроорганизма необходимо выращивать его в культуре, то рутинной может стать идентификация лишь нескольких из всех известных патогенных микроорганизмов. Чтобы устранить это принципиальное ограничение, были разработаны методы молекулярной диагностики, в основе которых лежат иммунологические подходы или методы обнаружения специфической ДНК.

Любой метод выявления патогенных микроорганизмов должен быть достаточно простым и обладать высокой специфичностью и чувствительностью. Специфичный диагностический тест должен давать положительный ответ только на микроорганизм- или молекулу-мишень, чувствительный — обнаруживать очень малые количества такой мишени даже на фоне других микроорганизмов или молекул, загрязняющих образец. Простота метода подразумевает, что он является достаточно продуктивным, эффективным и недорогим для рутинного применения.

По оценкам специалистов, объем мирового рынка иммунодиагностических тестов в 1993 г. составил 3,4 млрд. долл. США и в ближайшие 10—15 лет будет возрастать на 5—10% ежегодно. В 1994г. объем мирового рынка ДНК-диагностических тестов был равен примерно 80 млн. долл., к 2000 г. он, по-видимому, составит 600 млн. долл., а к 2004 г. — 2 млрд. долл. В этой главе мы обсудим принципы некоторых методов молекулярной диагностики и сферу их применения.

## Методы иммунодиагностики

Многие иммунологические системы детекции обладают высокой чувствительностью и специфичностью, являясь в то же время достаточно

простыми. Они широко используются для тестирования лекарственных препаратов, оценки и мониторинга различных онкологических заболеваний, определения специфических метаболитов, идентификации и контроля патогенных микроорганизмов, но имеют и свои ограничения. Если молекулой-мишенью является белок, то необходимо обеспечить экспрессию детерминирующих его генов и создать условия, в которых не происходит маскирование или блокирование сайта связывания с антителом.

Традиционные процедуры диагностики возбудителей инфекции опираются либо на набор характеристик патогенного микроорганизма, либо, что предпочтительнее, на одну уникальную, легко различимую его особенность. Клинические микробиологи пытаются найти тот минимальный набор биологических характеристик, при помощи которого можно будет гарантированно обнаруживать и идентифицировать патогенные микроорганизмы. Например, некоторые возбудители вырабатывают специфические биохимические соединения, которые и необходимо обнаружить в биологическом образце. Часто подобную маркерную молекулу можно выявить непосредственно, проведя высокоспецифичный биохимический анализ. Но такой подход неизбежно приведет к увеличению числа индивидуализированных систем детекции патогенных микроорганизмов. Более предпочтительным был бы универсальный метод, позволяющий выявлять любую маркерную молекулу независимо от ее химической природы. Именно таким является метод, основанный на идентификации комплексов антиген—антитело.

## Ферментный иммуосорбентный анализ

Существует целый ряд подходов, позволяющих определить, произошло ли связывание антитела с антигеном-мишенью. Один из них — это ферментный иммуосорбентный анализ (ELISA), который часто используют для диагностики. Процедура включает следующие этапы (рис. 9.1).

1. Образец, в котором хотят обнаружить специфическую молекулу или микроорганизм, фиксируют на твердой подложке, например на пластиковой микротитровальной плашке, обычно имеющей 96 лунок (рис. 9.1, А).

2. К фиксированному образцу добавляют антитело, специфичное к маркерной молекуле (первое антитело), затем промывают лунку, чтобы удалить несвязавшиеся молекулы первого антитела (рис. 9.1, *Б*).

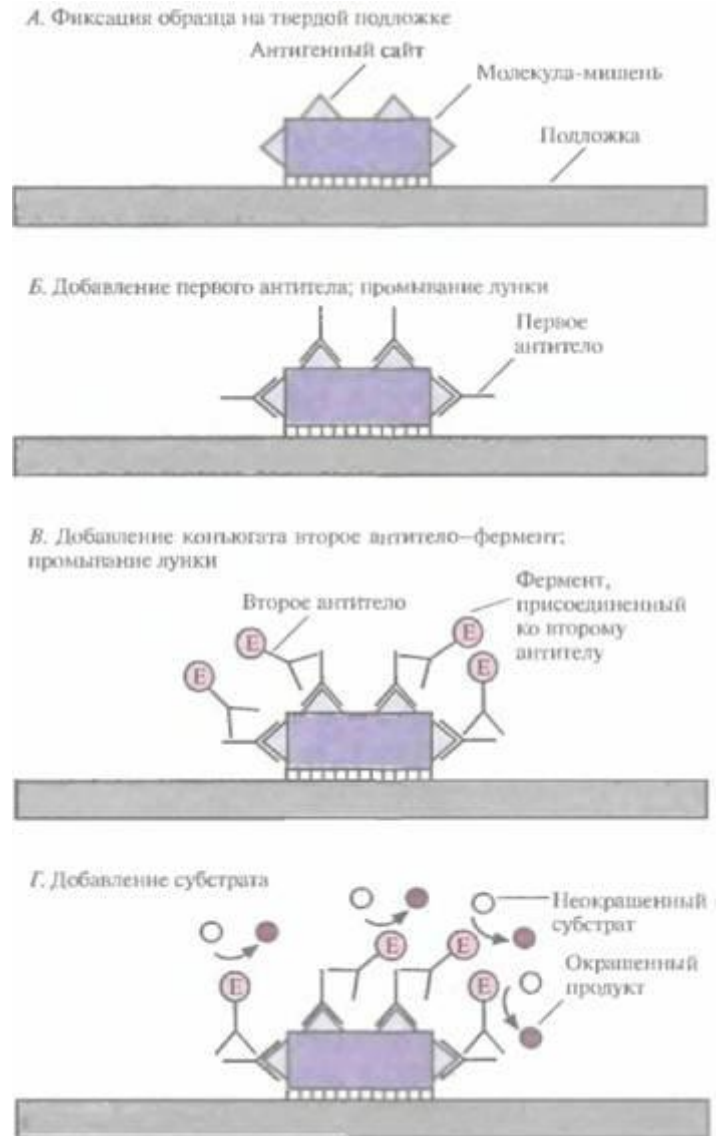
3. Добавляют второе антитело, которое специфически связывается с первым антителом и не взаимодействует с маркерной молекулой (рис. 9.1, *В*). К этому антителу присоединен фермент (например, щелочная фосфатаза, пероксидаза или уреаз), катализирующий превращение неокрашенного субстрата в окрашенный продукт. Промывают лунку, чтобы удалить несвязавшиеся молекулы конъюгата второе антитело—фермент.

4. Добавляют неокрашенный субстрат (рис.9.1, *Г*).

5. Проводят качественное или количественное определение окрашенного продукта.

Если первое антитело не связывается с мишенью образца, то оно удаляется при первом промывании. Поскольку при этом конъюгату второе антитело—фермент не с чем связываться, он удаляется при втором промывании, и образец

Рис. 9.1, Обнаружение антигена-мишени с помощью ELISA. Е— фермент, присоединенный ко второму антителу.



остается неокрашенным. Если связывание с мишенью происходит, то второе антитело присоединяется к первому, и конъюгированный фермент катализирует образование легко регистрируемого окрашенного продукта.

Основной принцип ELISA — специфическое связывание первого антитела с мишенью. Если молекула-мишень представляет собой белок, то его очищенный препарат обычно используют для получения антител, при помощи которых затем и выявляют данную мишень. Антитела, которые образуются в сыворотке (антисыворотке) крови иммунизированного животного (обычно кролика), связываются с разными антигенными детерминантами (эпитопами) молекулы-мишени. Такую смесь антител называют поликлональным препаратом. Использование поликлональных антител имеет два недостатка, существенных для некоторых методов диагностики: 1) содержание отдельных антител в поликлональном препарате может варьировать от одной партии к другой; 2) поликлональные антитела нельзя применять, если необходимо различить две сходные мишени, т. е. когда патогенная (мишень) и непатогенная (не-мишень) формы различаются единственной детерминантой. Однако эти проблемы вполне разрешимы, поскольку сейчас научились получать препараты антител, выработанных к одной антигенной детерминанте, т. е. препараты моноклональных антител.

### *Моноклональные антитела*

У млекопитающих в ходе эволюции выработался сложный набор клеточных систем, защищающих организм от токсичных веществ и инфекционных агентов. Составной частью защитной реакции является индуцированная выработка клетками лимфатической системы специфических белков (антител), которые соединяются с чужеродными веществами (антигенами) и при помощи других белков иммунной системы, включая системы комплемента, нейтрализуют их эффект. В ответ на иммунологический стимул каждая антителопродуцирующая клетка синтезирует и выделяет единственный вид антител, которые с высоким сродством распознают отдельный участок (эпитоп, антигенную детерминанту) молекулы антигена. Поскольку в молекуле антигена обычно присутствует несколько разных эпитопов, антитела против каждого из них вырабатываются отдельными клетками иммунной системы. Такие антитела, каждое из которых взаимодействует с данным антигеном, называют поликлональными.

Уже в начале нынешнего века, когда о поликлональности антител ничего не знали, было ясно, что их специфичность можно использовать для подавления инфекций. Позже антитела стали применять в качестве диагностического инструмента для выявления токсичных соединений в клинических образцах. К сожалению, эффективность препаратов поликлональных антител варьирует от одной партии к другой, поскольку в одних случаях при проведении иммунизации антителопродуцирующие клетки сильнее стимулируются одними детерминантами данного антигена, а в других иммунная система активнее отвечает на другие эпитопы того же антигена. Это может влиять на способность разных препаратов нейтрализовать антигены, поскольку отдельные эпитопы обладают разной эффективностью (стимулирующей способностью). Следовательно, в данной партии поликлональных антител может содержаться мало молекул, направленных против основного эпитопа, и в результате она будет менее эффективной, чем предыдущая.

Следовательно, для практического применения антител в качестве диагностического инструмента или компонентов терапевтических средств необходимо было создать такую линию клеток, которая росла бы в культуре и продуцировала антитела одного типа, обладающие высоким сродством к специфическому антигену-мишени, — моноклональные антитела. Подобная клеточная линия могла бы стать неиссякающим источником идентичных молекул антител. К сожалению, В-лимфоциты (В-клетки), синтезирующие антитела, не могут воспроизводиться в культуре. Решение данной проблемы виделось в создании гибридной клетки. Получив генетическую составляющую от В-клетки, она могла бы вырабатывать антитела, а приобретя способность к делению от клетки совместимого типа — расти в культуре. Было известно, что В-лимфоциты иногда перерождаются и становятся раковыми (миеломными) клетками, приобретая спо-

способность к росту в культуре и сохраняя в то же время многие свойства В-клеток. Так клетки миеломы, в первую очередь те, которые не вырабатывают антител, стали кандидатами на слияние с антителопродуцирующими В-клетками. В середине 70-х гг. эти идеи стали реальностью.

### ***Образование и отбор гибридных клеток***

Первый шаг в процессе получения гибридной клеточной линии, продуцирующей антитела одного типа, состоит во введении мышам антигена. После ряда иммунизации, проведенных в течение нескольких недель, проверяют, произошло ли развитие у животных иммунного ответа. Если ответ развился, то животных умерщвляют, извлекают селезенку, промывают ее, измельчают и несливно встряхивают для высвобождения единичных клеток, среди которых находятся и антителопродуцирующие В-клетки. Взвесь клеток селезенки смешивают со взвесью миеломных клеток, дефектных по гипоксантин-гуанин—фосфорибозилтрансферазе (HGPRT<sup>-</sup>). Комбинированную взвесь в течение нескольких минут инкубируют в 35%-ном полиэтиленгликоле, а затем переносят в среду, содержащую гипоксантин, аминоптерин и тимидин (среда ГАТ).

Обработка полиэтилен гликолем облегчает слияние клеток, тем не менее слияние происходит редко и является в достаточной степени случайным событием. В смеси присутствуют клетки миеломы, селезенки, а также слившиеся клетки миеломы-селезенки, миеломы-миеломы, селезенки—селезенки. Однако в среде ГАТ растут только гибридные клетки миеломы—селезенки, все остальные типы клеток не могут в ней пролиферировать. Клетки селезенки и слившиеся клетки селезенки—селезенки вообще не растут в культуре, а миеломные клетки HGPRT<sup>-</sup> и слившиеся клетки миеломы—миеломы не могут использовать гипоксантин в качестве предшественника в процессе биосинтеза пуриновых оснований гуанина и аденина, без которых невозможен синтез нуклеиновых кислот. Но у них есть другой естественный путь синтеза пуринов — при участии дигидрофолатредуктазы, поэтому в состав среды и входит аминоптерин, ингибирующий активность этого фермента. Таким образом, миеломные клетки HGPRT<sup>-</sup> и слившиеся клетки миеломы-миеломы не могут синтезировать пурины в среде ГАТ и погибают.

Слившиеся клетки селезенки—миеломы растут в среде ГАТ, поскольку; 1) клетки селезенки поставляют функциональную HGPRT, которая может утилизировать экзогенный гипоксантин среды несмотря на блокирование синтеза пуринов с участием дигидрофолатредуктазы аминоптеринном; 2) клетки миеломы способны активно делиться. Тимидин необходим для устранения блокирования в синтезе пиримидинов, обусловленного ингибированием дигидрофолатредуктазы. На 10-14-е сутки после слияния клеток в среде ГАТ остаются и растут только слившиеся клетки селезенки—миеломы. Их затем вносят в лунки пластиковых микротитровальных плашек и выращивают на полной культуральной среде без ГАТ.

### ***Идентификация гибридных клеточных линий, секретирующих специфические антитела***

Теперь необходимо идентифицировать гибридные клетки, вырабатывающие антитела к иммунизирующему антигену. Для этого обычно проводят скрининг культуральных сред, содержащих секретируемые антитела. Среду из тех лунок, в которых есть растущие клетки, отбирают и переносят в лунки другой микротитровальной плашки, предварительно покрытые слоем молекул антигена-мишени. Если в культуральной среде находится антитело (первое антитело), распознающее один из эпитопов данного антигена, то оно свяжется с антигеном и останется в лунках после их промывания. Затем в лунки добавляют второе антитело, специфичное к мышинным антителам. Оно будет присоединяться к любому первому антителу, связанному с антигеном.

К используемому в иммунном анализе второму антителу предварительно присоединяют фермент, который превращает неокрашенный субстрат в окрашенное соединение. Изменение цвета содержимого одной из лунок говорит о том, что исходная культуральная среда содержала антитело, специфичное к данному антигену (рис. 9.2). Если же такое антитело в среде отсутствовало, то второму антителу не с чем будет

связываться и оно смывается при втором промывании. Субстрат в таких лунках останется неокрашенным.

Лунки исходной микротитровальной плашки, среда из которых дает положительный иммунный ответ (изменение цвета), могут содержать смесь слившихся клеток. Чтобы получить линии, происходящие от одной клетки (клоны), клеточную суспензию из таких лунок разводят культуральной средой и высевают в другие лун-

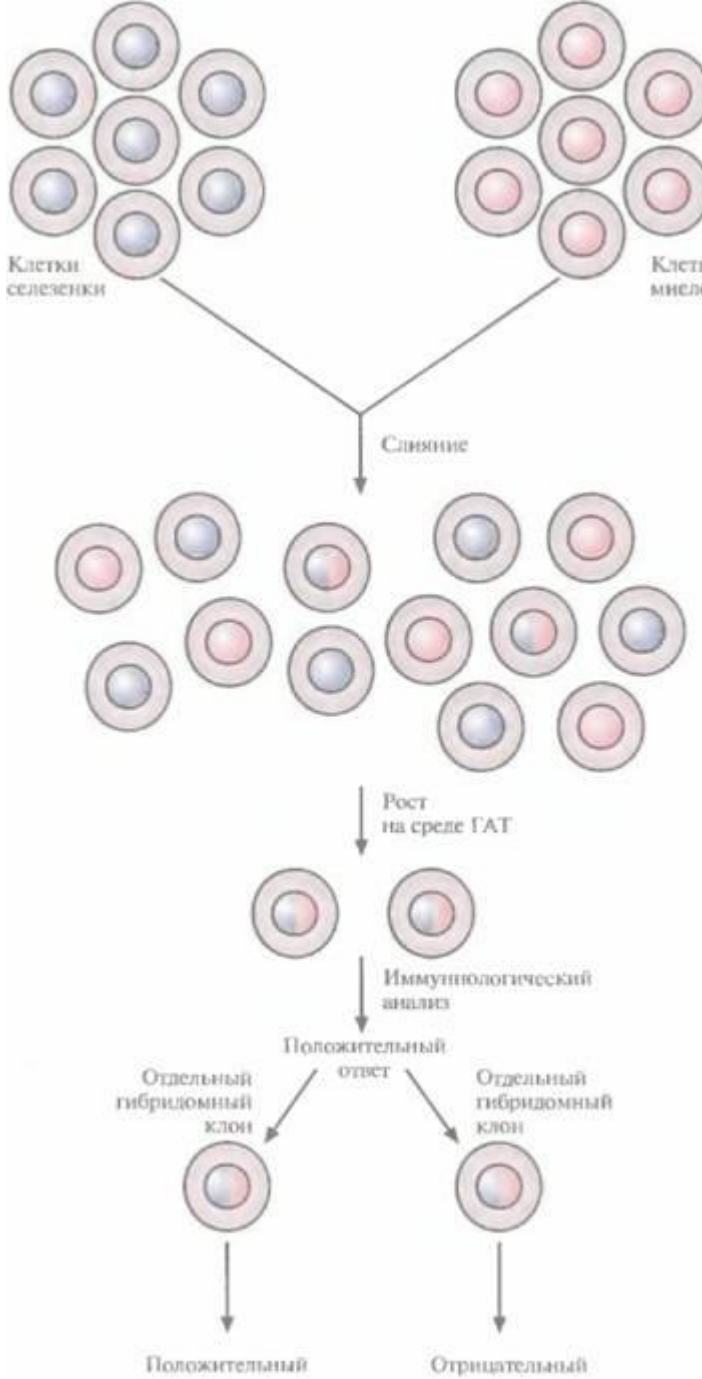


Рис. 9.2. Скрининг клеток, вырабатывающих моноклональные антитела. Выделяют клетки селезенки мыши, иммунизированной специфическим антигеном, и проводят их слияние с клетками миеломы, не вырабатывающими антитела. Слившиеся клетки отбирают по способности к росту на среде ГАТ (гипоксантин, аминоптерин, тимидин). Клетки, вырабатывающие специфические антитела к иммунизирующему антигену (клетки гибридомы), идентифицируют иммунологическими методами и субкультивируют, чтобы получить отдельные клоны. Из гибридомы, растущей в культуре и секретирующей единственный тип молекул антител, получают моноклональные антитела.



ки. После культивирования полученных клонов среды вновь тестируют, определяя, какая из клеточных линий (гибридом) продуцирует моноклональные антитела, распознающие антиген-мишень. В том случае, когда получают более одной специфичной гибридомы, проводят дальнейшие исследования, позволяющие определить, направлены ли антитела, вырабатываемые разными клонами, против одной и той же антигенной детерминанты. Каждый клон, продуцирующий моноклональное антитело, можно поддерживать в культуре практически бесконечно. Кроме того, образцы можно заморозить в жидком азоте и использовать их в дальнейшем как источник клеток.

Применение моноклональных антител позволяет существенно повысить специфичность метода ELISA, поскольку они связываются с одним, строго определенным антигенным сайтом. К настоящему времени получен целый ряд моноклональных антител, которые можно использовать для обнаружения различных соединений и патогенных микроорганизмов (рис. 9.3). Альтернативой получению моноклональных антител из культуры гибридомных клеток может быть отбор и производство моноклональных антител и их частей (Fv-фрагментов), направленных против антигена-мишени, с помощью *E. coli* (см. гл. 10).

Системы ДНК-диагностики

Информация о всем многообразии свойств организма заключена в его генетическом материале. Так, патогенность бактерий определяется наличием у них специфического гена или набора генов, а наследственное генетическое заболевание возникает в результате повреждения определенного гена. Сегмент ДНК, детерминирующий данный биологический признак, имеет строго определенную нуклеотидную последовательность и может служить диагностическим маркером.

В основе многих быстрых и надежных диагностических методов лежит гибридизация нуклеиновых кислот — спаривание двух комплементарных сегментов разных молекул ДНК. Процедура в общих чертах состоит в следующем.

1. Фиксация одноцепочечной ДНК-мишени на мембранном фильтре.
2. Нанесение меченой одноцепочечной ДНК-зонда, которая при определенных условиях (температуре и ионной силе) спаривается с ДНК-мишенью.
3. Промывание фильтра для удаления избытка несвязавшейся меченой ДНК-зонда.
4. Детекция гибридных молекул зонд/мишень.

В диагностических тестах, основанных на гибридизации нуклеиновых кислот, ключевыми являются три компонента: ДНК-зонд, ДНК-мишень и метод детекции гибридизационного сигнала. Система детекции должна быть в высшей степени специфичной и высокочувствительной.

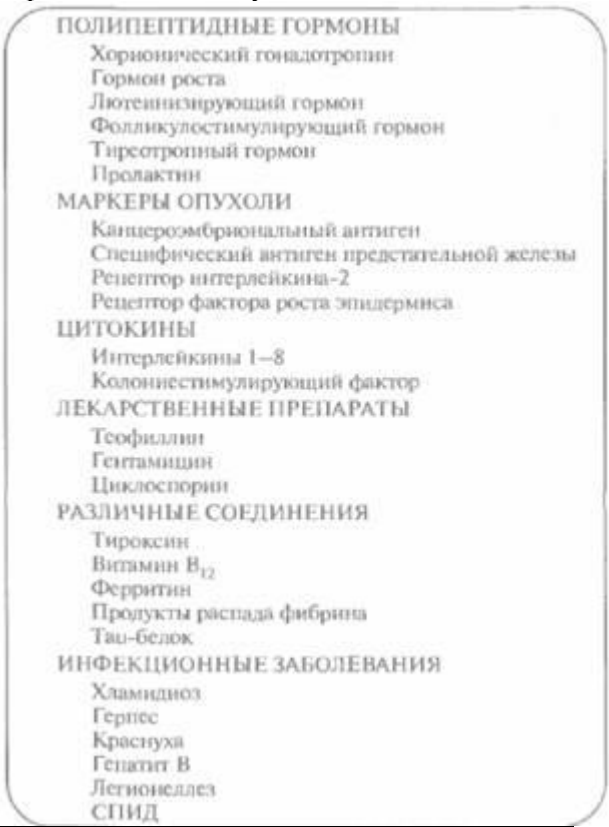


Рис. 9.3. Использование моноклональных антител для выявления различных соединений и диагностики инфекционных заболеваний.



### Гибридизационные зонды

Чтобы обеспечить адекватность диагностического теста, гибридизационные ДНК- и РНК-зонды должны быть высокоспецифичными. Другими словами, необходимо, чтобы зонд гибридизовался только с искомой нуклеотидной последовательностью. Если есть вероятность получения ложноположительного (наличие гибридизационного сигнала в отсутствие последовательности-мишени) или ложноотрицательного (отсутствие сигнала при наличии последовательности-мишени) результата, то целесообразность применения теста значительно снижается. Специфичность зондов может проявляться на разных уровнях: они могут «различать» два и более вида, отдельные штаммы в пределах одного вида или разные гены. В зависимости от ситуации зонды могут быть представлены молекулами ДНК или РНК; они могут быть длинными (более 100 нуклеотидов) или короткими (менее 50 нуклеотидов), представлять собой продукт химического синтеза, клонированные интактные гены или их фрагменты.

Зонды получают разными способами. Один из них состоит в следующем, ДНК патогенного микроорганизма расщепляют с помощью рест-ринирующей эндонуклеазы и клонируют в плазмидном векторе. Затем проводят скрининг рекомбинантных плазмид с использованием геномной ДНК как патогенного, так и непатогенного штаммов. Те плазмиды, которые содержат последовательности, гибридизующиеся только с ДНК патогенного штамма, составляют основу вилоспецифичных зондов. После этого проводят ряд дополнительных гибридизаций с ДНК, выделенными из различных организмов, чтобы удостовериться, что потенциальные зонды не дают с ними перекрестной гибридизации. Для определения чувствительности метода каждый из зондов проверяют также на модельных образцах, в том числе и на смешанных культурах.

Весьма желательно, чтобы ДНК-диагностику можно было проводить на исходном материале, без дополнительного его культивирования или выделения нуклеиновых кислот, особенно в тех случаях, когда тестируются клинические образцы. Исследователи с успехом проводят гибридизацию с ДНК-мишенями, присутствующими в образцах кала, мочи, крови, смывах из зева и в тканях без предварительной их очистки. Если концентрация последовательности-мишени в исследуемом образце слишком мала, ее можно амплифицировать с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

### Диагностика малярии

В качестве примера использования ДНК-зондов для диагностики заболеваний можно привести процедуру обнаружения *Plasmodium falciparum*. Этот паразит вызывает малярию, заболевание, угрожающее примерно трети всего населения Земли. Он инфицирует эритроциты и разрушает их, что приводит к развитию лихорадки, а в тяжелых случаях — к поражению мозга, почек и других органов. Чтобы выявить источники инфекции, оценить эффективность мер по их ликвидации и обеспечить раннюю диагностику и лечение, необходимы достаточно чувствительные, простые и недорогие методы. В настоящее время малярию диагностируют с помощью микроскопического исследования мазков крови - эффективного, но трудоемкого и занимающего много времени процесса. Иммунологические методы обнаружения *Plasmodium*, такие как ELISA, достаточно быстрые и их легко автоматизировать, но с их помощью нельзя отличить текущую инфекцию от прошедшей, поскольку при этом определяется только наличие антител к *Plasmodium* в крови больных.

Для избирательной ДНК-диагностики текущей инфекции, т. е. для выявления ДНК возбудителя, в качестве основы используются высокоповторяющиеся последовательности ДНК *P. falciparum*. Сначала с помощью ДНК-зонда проводится скрининг библиотеки геномной ДНК паразита. Затем отбираются клоны, дающие наиболее интенсивный гибридизационный сигнал, поскольку именно они предположительно содержат высокоповторяющиеся последовательности. ДНК каждого из отобранных клонов проверяют на способность к гибридизации с ДНК видов *Plasmodium*, не вызывающих малярию. В качестве специфического зонда выбирается последовательность, гибридизующаяся с ДНК *P. falciparum*, но не с ДНК *P. vivax*, *P. cynomolgi* или с ДНК человека. С его помощью

## Выявление аллелей $\beta$ -глобинового гена методом гибридизации с синтетическими олигонуклеотидами

B. J. Conner, A. A. Reyes, C. Morin, K. Itakura, R. L. Teplitz, and R. B. Wallace *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 278-282. 1983

С разработкой в начале 80-х века, отличающиеся друг от друга лишь одной парой ( $\beta^s\beta^s$ ) — только с  $\beta^s$ -зондом, а недорогих методов химического оснований, проводя ДНК индивидуума, синтеза олигонуклеотидов гибридизацию с протяженным гетерозиготного по данному гену появилась возможность (более 100 п. н.) зондом. В 1983 ( $\beta^A\beta^s$ ), — с обоими зондами. использовать радиоактивно г. Коннер и др. синтезировали Эта модельная система меченные олигонуклеотидные специфичные олигонуклеотиды. впервые продемонстрировала зонды для выявления различий способные распознавать возможность определения между нуклеотидными нормальной и мутантную ДНК, генотипов с помощью последовательностями, в при этом можно было гибридизации и положила частности для обнаружения установить, гомозиготен или начало молекулярной мутации у человека. К тому гетерозиготен данный диагностике многих времени было изолировано индивидуум по исследуемому генетических заболеваний относительно небольшое число гену. Для диагностики человека. Вслед за этим был генов, главным образом в виде серповидноклеточной анемии разработан целый ряд ДНК-комплементарных ДНК они использовали два олиго-тестов для выявления мутаций. (кДНК), поэтому подбор зонда, нуклеотида длиной по 19 п. н.; И хотя гибрид и за ц ионный гомологичного конкретному один был комплементарен метод сейчас уступил место гену, представлял собой нормальному аллелю  $\beta$ - более совершенным методам, непростую задачу. Но даже если глобинового гена ( $\beta^A$ ), а другой таким как ПЦР и ЛОЗ соответствующие кДНК были — мутантному ( $\beta^s$ ). ДНК (лигирование получены, невозможно было здорового человека ( $\beta^A\beta^A$ ) олигонуклеотидных зондов), он различить нормальный и гибридизовалась только с  $\beta^A$ - сыграл свою роль, мутантный гены чело- зондом, ДНК больного серпо- проиллюстрировав возможность определения точковых мутаций.

можно обнаруживать всего 10 пг очищенной ДНК *P.falciparum* или 1 нг той же ДНК в крови больного.

Получены и охарактеризованы более 100 различных ДНК-зондов, позволяющих обнаруживать патогенные штаммы различных бактерий, вирусов и паразитических простейших. Так, имеются зонды для диагностики бактериальных, инфекций человека, вызываемых *Legionella pneumophila* (респираторные заболевания). *Salmonella typhi* {пищевые отравления), *Campylobacter jejuni* (гастриты), а также для выявления энтерококкового штамма *Escherichia coli* (гастроэнтериты). Однако это лишь «верхушка айсберга»; в принципе с помощью гибридизации можно выявлять практически любые патогенные микроорганизмы.

### Выявление *Trypanosoma cruzi*

Паразитическое простейшее *Trypanosoma cruzi* вызывает болезнь Чагаса (южноамериканский трипаномоз), уносящую ежегодно примерно 50 тыс. жизней. Паразит широко распространен в Латинской Америке. Он переносится клопами-хищницами, проникает в печень, селезенку, лимфатические узлы, центральную нервную систему и, размножаясь, разрушает клетки, в которых паразитирует. Для диагностики острой формы болезни Чагаса обычно проводят микроскопическое исследование свежей пробы периферической крови. Можно использовать и другой тест, более длительный, но выявляющий паразитов с большей вероятностью. Незараженных насекомых кормят кровью пациента и через 30—40 сут исследуют под микроскопом их кишечник на предмет наличия паразитов. Оба метода весьма трудоемки, дорогостоящи и требуют длительного времени. Болезнь можно диагностировать и иммунологическими методами, однако они часто дают ложноположительные результаты. В качестве альтернативы этим менее чем удовлетворительным процедурам было разработано несколько подходов, основанных на применении ПЦР. В насто-

ящее время ПЦР-диагностика болезни Чагаса служит дополнением к традиционным, широко используемым методам.

Один из ПЦР-тестов основан на выявлении фрагмента ДНК длиной 188 п. н., который присутствует во множестве копий в геноме *T. cruzi*, но отсутствует в геномной ДНК нескольких родственных паразитов. После амплификации этот фрагмент без труда обнаруживается с помощью электрофореза в полиакриламид-ном геле. Незначительно варьируя методику проведения ПЦР (например, изменяя нуклеотидную последовательность праймеров), последнюю можно использовать для обнаружения широкого спектра бактерий, вирусов и паразитов.

### *Нерадиоактивные методы детекции*

В большинстве лабораторий для гибридизации используют зонды, меченные каким-либо радиоактивным изотопом, чаще всего  $^{32}\text{P}$ . Такие зонды обладают высокой удельной радиоактивностью и обеспечивают хорошее отношение сигнал/шум. Радиоактивно меченный зонд наносят на фильтр с фиксированной на нем ДНК-мишенью, проводят гибридизацию, отмывают несвязавшуюся ДНК-зонд и детектируют метку с помощью радиоавтографии.

Однако  $^{32}\text{P}$  является короткоживущим изотопом, испускающим высокоэнергетическое излучение; при работе с ним необходимо использовать специальное оборудование и обеспечивать безопасную утилизацию отходов. Чтобы обойти эти трудности, были созданы нерадиоактивные системы детекции. Для усиления гибридизаци-онного сигнала в этом случае используется ферментативное превращение хромогенного или хемилюминесцентного субстрата: первый из них под действием фермента изменяет окраску, а второй испускает свет. В большинстве подобных систем применяются ДНК-зонды, содержащие биотинилированные нуклеотиды. Гибридизация и детекция сигнала проводятся более или менее стандартным образом.

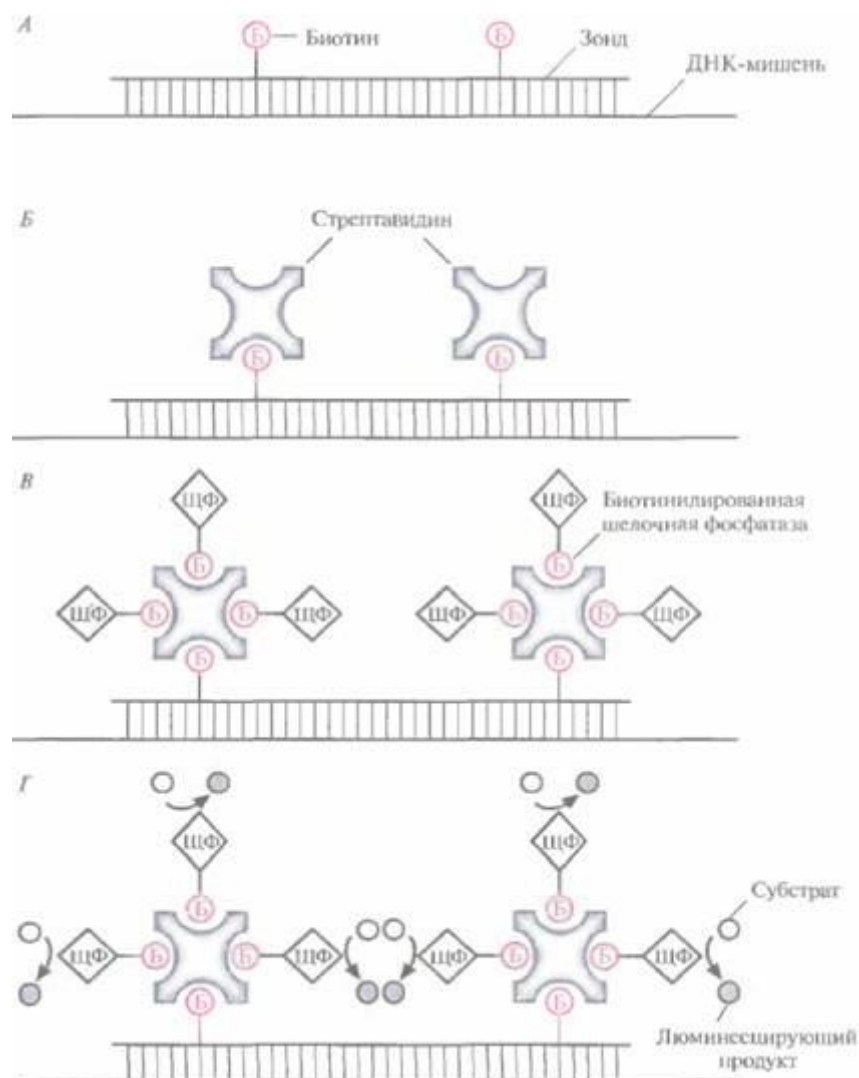
1. Зонд, меченный биотином, гибридизуют с ДНК-мишенью (рис. 9.4, А).
2. Промывают фильтр для удаления избытка несвязавшегося зонда.
3. Добавляют авидин (белок куриного яйца) или стрептавидин (бактериальный аналог авидина) (рис. 9.4, Б).
4. Добавляют биотинилированный фермент щелочную фосфатазу или пероксидазу хрена (рис. 9.4, В).
5. В зависимости от используемого фермента добавляют хромогенный или хемилюминесцентный субстрат и регистрируют изменение окраски либо люминесценцию, сопровождающую превращение субстрата в продукт (рис. 9.4, Г).

В качестве альтернативы после гибридизации ДНК с биотинилированным зондом можно добавлять уже готовый комплекс стрептавидин—фермент, имеющий сайт связывания с биотином.

Как авидин, так и стрептавидин связываются с биотином очень прочно (константа диссоциации ( $K_d = 10^{-15}$ )); кроме того, каждый из белков имеет четыре независимых биотинсвязывающих сайта, благодаря чему одна молекула авидина или стрептавидина может одновременно присоединять фермент и зонд, меченные биотином. Биотинилирование и связывание со стрептавидином не приводят к снижению ферментативной активности. В хромогенных системах детекции в том месте, где находится гибридная ДНК, под действием фермента образуется нерастворимый краситель, а в хемилюминесцентных системах — продукт, который испускает свет.

Нерадиоактивные системы детекции обладают и другими преимуществами: биотинилированная ДНК остается стабильной при комнатной температуре как минимум год; методы регистрации хемилюминесценции обладают такой же чувствительностью, как и методы регистрации радиоактивного сигнала; детекция испускаемого света при помощи рентгеновской пленки или люминометра, как и регистрация изменения цвета, занимают несколько часов. По-видимому, хемилюминесцентные системы регистрации сигнала, все же более чувствительные, чем хромогенные, вскоре вытеснят все остальные, используемые при ДНК-диагностике. Если при этом применяется ГЩР, то амплифицируемый продукт можно пометить флуоресцентным красителем, присоединяя его

Рис. 9.4. Хемилюминесцентный метод обнаружения ДНК-мишени. Б — биотин, ЩФ — щелочная фосфатаза. А. Связывание биотинилированного зонда с ДНК-мишенью. В. Связывание стрептавидина с биотином. В. Связывание биотинилированной щелочной фосфатазы со стрептавидином. Г. Образование люминесцирующего продукта под действием щелочной фосфатазы.



к 5'-концу каждого праймера. В качестве красителей часто используют флуоресцеин и родамин, которые испускают зеленый и красный свет соответственно. После ПЦР-амплификации ДНК-мишени проводят разделение флуоресцеин-меченного праймера и продуктов амплификации, после чего регистрируют включение метки (рис. 9.5). Если ДНК-мишень в образце отсутствует, то не будет образовываться и флуоресцирующий продукт.

Один из недавно разработанных нерадиоактивных методов детекции основан на использовании зонда — «молекулярного маяка» (рис. 9.6). Такой зонд состоит из 25 нуклеотидов. Средние 15 из них комплементарны ДНК-мишени и не спариваются друг с другом, а 5 концевых нуклеотидов взаимно комплементарны и образуют шпильку. К 5'-концу присоединен флуоресцентный хромофор (флуорофор), а к 3'-концу — нефлуоресцентный хромофор (тушитель), на который передается энергия возбуждения флуорофора. В растворе при комнатной температуре «маяк» имеет такую конфигурацию, при которой флуорофор и тушитель находятся в тесном контакте, и флуоресценция флуорофора тушится. Когда же 15 средних нуклеотидов зонда гибридизуются с комплементарной последовательностью ДНК- или РНК-мишени, происходит пространственное разделение

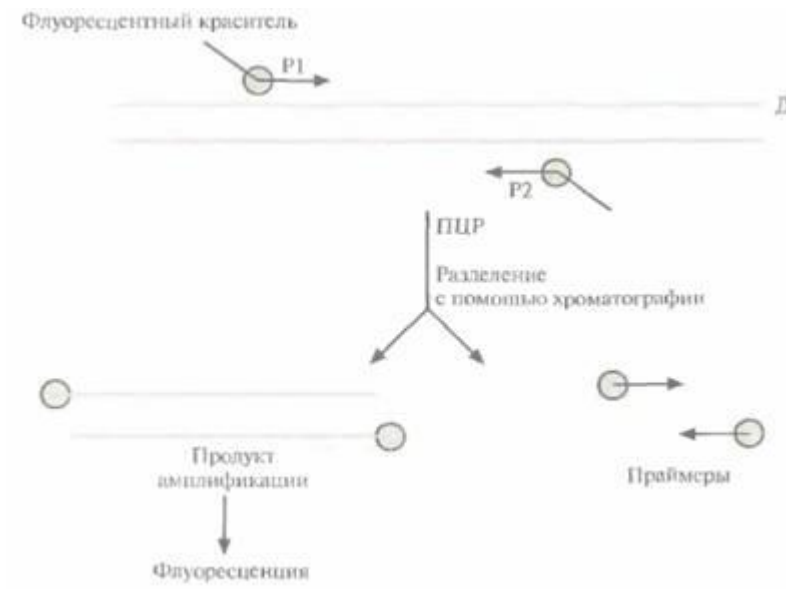


Рис. 9.5. Детекция ПЦР-продуктов с помощью флуоресцентного красителя, присоединенного к праймерам (P1 и P2),

флуорофора и тушителя, и зонд испускает свет. Температура реакционной смеси должна быть близка к комнатной, поскольку при ее повышении шпилька денатурирует, флуорофор и тушитель расходятся и происходит флуоресценция. Необходимо также, чтобы все 15 нуклеотидов зонда были комплементарны соответствующей последовательности ДНК- или РНК-мишени.

*Геномная дактилоскопия*

Метод геномной дактилоскопии (ДНК-типирование) часто используется в судебной медицине для идентификации биологических образцов. С его помощью можно доказать, что подозреваемый действительно совершил преступление, или, напротив, что он невиновен. Для проведе-

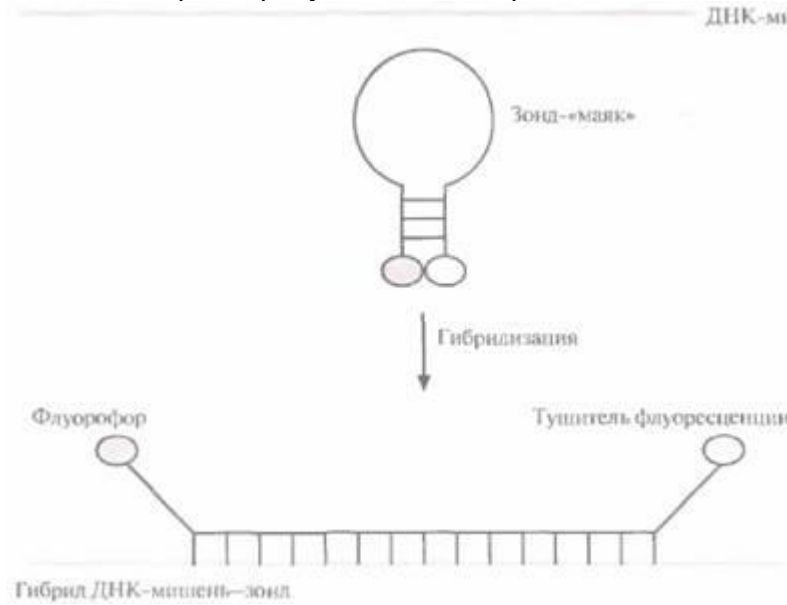


Рис. 9.6. Гибридизация зонда — «молекулярного маяка» с ДНК-мишенью. Одноцепочечная область зонда гибридизуется с комплементарной последовательностью ДНК-мишени, его «шпилька» разрушается, флуорофор и тушитель флуоресценции перестают контактировать друг с другом и наблюдается флуоресценция. Это указывает на то, что между зондом и последовательностью-мишенью произошла гибридизация. Из работы Tuagi, Kramer, *Nat. Biotechnol.* 14: 303-308, 1996, с изменениями



ния ДНК-типирования сначала берут часть биологического образца (пробу крови, сперму, кусочек кожи, волосы) и определяют, достаточно ли в нем интактной ДНК для последующего анализа. Затем ДНК подвергают эндонуклеазному расщеплению, полученные фрагменты разделяют в агарозном геле и переносят на най-лоновый фильтр. Проводят последовательную гибридизацию с четырьмя или пятью радиоактивно мечеными зондами, каждый из которых распознает определенную последовательность ДНК (при этом перед гибридизацией со следующим зондом предыдущий полностью удаляют с мембраны). После каждой гибридизации с помощью радиоавтографии визуализируют полосы, отвечающие продуктам гибридизации зонда с рестрицированной ДНК, и строят «лестницу фрагментов» для всех образцов (рис. 9.7). Каждый этап (гибридизация и радиоавтография) длится от 10 до 14 сут, так что вся процедура может занять много недель и даже несколько месяцев. В качестве зондов обычно используют минисателлитные ДНК, многократно встречающиеся в геноме человека и состоящие из тандемно повторяющихся участков. Длина повторов варьирует от 9 до 40 п. н., а их число — от 10 до 30; при этом одни и те же минисателлитные последовательности у разных индивидов могут иметь разную длину. Эти различия возникают в результате увеличения или уменьшения числа тандемных повторов, по-видимому, в ходе репликации ДНК. Никаких биологических последствий такие вариации не имеют, поскольку минисателлитные ДНК не кодируют белков. Ребенок наследует одну минисателлитную последовательность от одного родителя, а другую — от другого.

«ДНК-отпечаток» данного индивида представляет собой набор различающихся по длине фрагментов, соответствующих минисателлитным последовательностям его генома. Ввиду большого разнообразия этих повторов вероятность того, что в популяции найдется два человека с идентичными «ДНК-отпечатками», равна  $10^{-5}$ — $10^{-8}$ . Другими словами, характер расположения полос минисателлитных ДНК почти столь же индивидуален, как и отпечатки пальцев. Геномную дактилоскопию применяют также при установлении отцовства. Часть полос «ДНК-отпечатка» ребенка должна соответствовать полосам материнского «отпечатка», а часть — отцовского.

Если ДНК в исследуемом образце недостаточно, но она не очень сильно разрушена, можно амплифицировать небольшие участки мини-сателлитной ДНК с помощью ПЦР, а затем провести их секвенирование; этот метод более

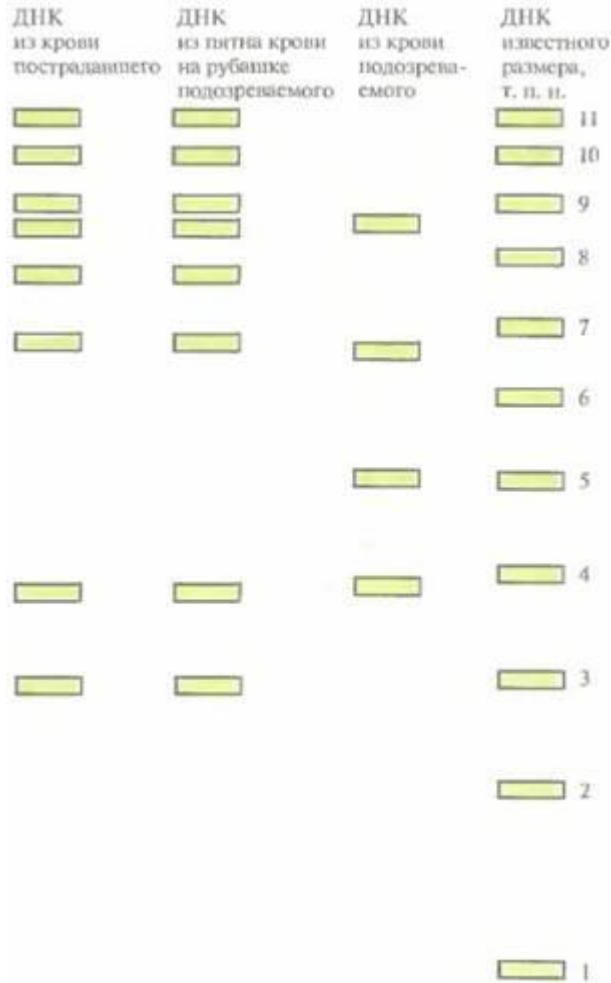


Рис. 9.7. Использование Саузерн-гибридизации для судебной экспертизы. ДНК, выделенная из крови пострадавшего, из пятна крови на рубашке подозреваемого и из его крови была обработана одной и той же рестрицирующей эндонуклеазой. «Лестница фрагментов» для ДНК, выделенной из пятна крови на рубашке, идентична таковой для ДНК пострадавшего и отличается от «лестницы фрагментов» для ДНК подозреваемого.



чувствителен, чем определение полиморфизма длины tandemных повторов.

*Использование полиморфных ДНК-маркеров*

Метод «ДНК-отпечатков» может оказаться полезным и при установлении различий между растительными культурами. Один из вариантов этого метода основан на использовании полиморфных ДНК-маркеров для амплификации случайных фрагментов {random amplified polymorphic DNA, RAPD). Для этого берут произвольные праймеры длиной 9—10 нуклеотидов, не содержащие палин-дромных последовательностей и имеющие ОС-содержание 50—80%, и добавляют их по отдельности к препаратам хромосомной ДНК растений. Каждая ПЦР инициируется одним праймером, который должен быть способен связываться с обеими цепями ДНК-мишени. Нуклеотидные последовательности всех олигонуклеотидов известны, но какой из них окажется эффективным инициатором ПЦР, неясно. Если праймер гибридизуется с обеими цепями ДНК-мишени в подходящей ориентации и сайты расположены на расстоянии от 100 до 3000 п. н. друг от друга, то фланкированный ими сегмент ДНК будет амплифицирован, а полученный фрагмент можно выделить с помощью гель-электрофореза и визуализировать окрашиванием. Число разных фрагментов ДНК, образующихся при амплификации, зависит от праймера и геномной ДНК. Для одних и тех же праймера и ДНК-мишени продукты амплификации будут каждый раз одинаковыми, а замена лишь одного нуклеотида в праймере приведет к полной смене набора получаемых фрагментов. Таким образом, используя один и тот же набор олигонуклеотидных праймеров, можно сравнивать RAPD-«ДНК-отпечатки» разных растительных культур, а следовательно, и сами культуры. Для выявления различий между двумя очень близкими сортами или культурами растений часто приходится использовать несколько произвольных праймеров с известной нуклеотидной последовательностью (рис. 9.8). Как и все другие молекулярные маркеры, RAPD можно применять для характеристики целых геномов, отдельных хромосом или генов.

По сравнению с другими методами идентификации сложных ДНК метод RAPD обладает следующими преимуществами: 1) для всех видов растений можно использовать один и тот же (универсальный) набор олигонуклеотидных праймеров; 2) не нужно создавать геномные биб-

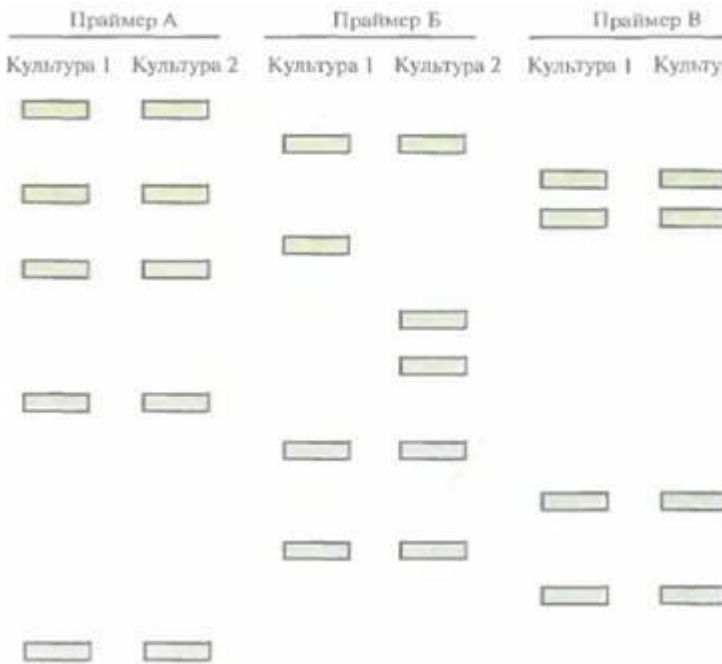


Рис. 9.8. Электрофорез ПЦР-амплифицированных фрагментов растительной ДНК в полиакриламидном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием. Для амплификации фрагментов каждой из двух культур использовали три разных произвольных праймера. В случае праймеров А и В характер распределения полос в полиакриламидном геле для культур 1 и 2 совпадает, если же используется праймер Б, то положение полос различается. Таким образом, с помощью праймера Б можно выявлять различия между культурами 1 и 2.

лиотеки, использовать радиоактивные зонды, проводить гибридизацию, т. е. можно легко и быстро охарактеризовать большое количество образцов; 3) процесс можно автоматизировать. Кроме того, для проведения обычной ПЦР необходимо знать нуклеотидную последовательность искомого гена или его фрагмента — мишени для амплификации. В случае же RAPD амплифицируется любой участок генома, содержащий две комплементарные праймер у последовательности, которые фланкируют сегмент ДНК длиной от 100 до 3000 п. н.

С помощью метода RAPD удалось отличить друг от друга шесть инбредных линий кукурузы и показать, что ПЦР-продукты гибридов кукурузы представляют собой сочетание ПЦР-продуктов родительских инбредных линий. RAPD-маркеры использовали также для скрининга разных штаммов грибов *Leptosphaeria maculans*, вызывающих заболевание «черная ножка» у крестоцветных. Было установлено различие между невирулентным (не приводящим к развитию болезни) и вирулентным (вызывающим заболевание) штаммами.

## Молекулярная диагностика генетических заболеваний

Диагностика специфических наследственных заболеваний человека на генетическом уровне дает ответ на вопрос, входят ли обследуемые индивидуумы или их потомки в группу повышенного генетического риска. ДНК-анализ можно использовать для выявления носителей генов наследственных заболеваний, а также для пренатальной и пресимптоматической диагностики серьезных генетических нарушений.

Тесты на уровне ДНК позволяют безошибочно выявлять специфические мутации. Раньше для этого применялись биохимические методы, основанные на выявлении продукта анализируемого гена. ДНК-тесты не требуют экспрессии мутантного гена для его выявления, что позволяет разработать системы скрининга для всех моногенных заболеваний.

### Серповидноклеточная анемия

Серповидно клеточная анемия ~ генетическое заболевание, обусловленное заменой одного нуклеотида в кодоне, который соответствует шестой аминокислоте в β-цепи молекулы гемоглобина. У индивидов, гомозиготных по мутантному гену (S/S), эритроциты имеют необычную серповидную форму; это связано с искажением конформации молекулы гемоглобина вследствие замены в ней валина на глутаминовую кислоту. Мутантный гемоглобин не может с достаточной эффективностью переносить кислород, и у таких больных развивается тяжелая анемия с прогрессирующим поражением сердца, легких, мозга, суставов и других органов. У индивидов, гетерозиготных по данному гену (A/S) (носителей генетического заболевания), эритроциты имеют нормальную форму, и симптомы заболевания проявляются лишь в экстремальных условиях (на большой высоте над уровнем моря либо при слишком высоких или низких температурах, когда снижается снабжение организма кислородом). Если оба родителя гетерозиготны (имеют генотип A/S), то вероятность того, что их ребенок будет гомозиготным по мутантному гену (S/S) (т. е. будет болен серповидноклеточной анемией), составляет 25%. Ген серповидноклеточной анемии с высокой частотой встречается среди афроамериканцев и их потомков, а также среди латиноамериканцев. В США проводят скрининг для выявления носителей гена серповидноклеточной анемии, которые могут передать этот ген своим потомкам. Рассмотрим один из используемых для этого тестов.

Замена одного нуклеотида в β-глобиновом гене, приводящая к серповидноклеточной анемии, сопровождается элиминацией сайта для рестрицирующей эндонуклеазы CvnI. Этот фермент узнает последовательность CCTNAGG и расщепляет молекулу ДНК между основаниями С и Т (N -любой из четырех нуклеотидов). В нормальном гене эта последовательность имеет вид CCTGAGG, а в гене серповидноклеточной анемии — CCTGTGG. На этом различии основывается ДНК-диагностика данного заболевания (рис. 9.9).

Используя праймеры, фланкирующие сайт CvnI, амплифицируют с помощью ПЦР небольшое количество тестируемой ДНК (рис. 9.9, A). Амплифицированный фрагмент обрабатывают CvnI, продукты рестрикции разделяют с помощью гель-электрофореза и окрашивают их бромистым этидием. При наличии CvnI-сайта на электрофореграмме появляется специфический набор полос (рис. 9.9, B), отличный от такового

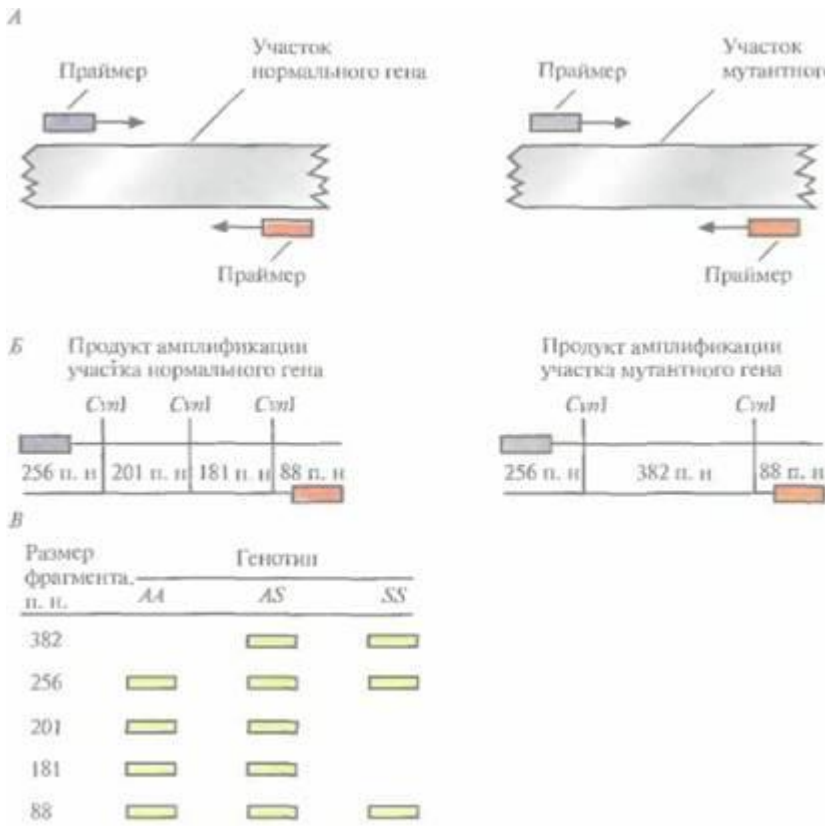


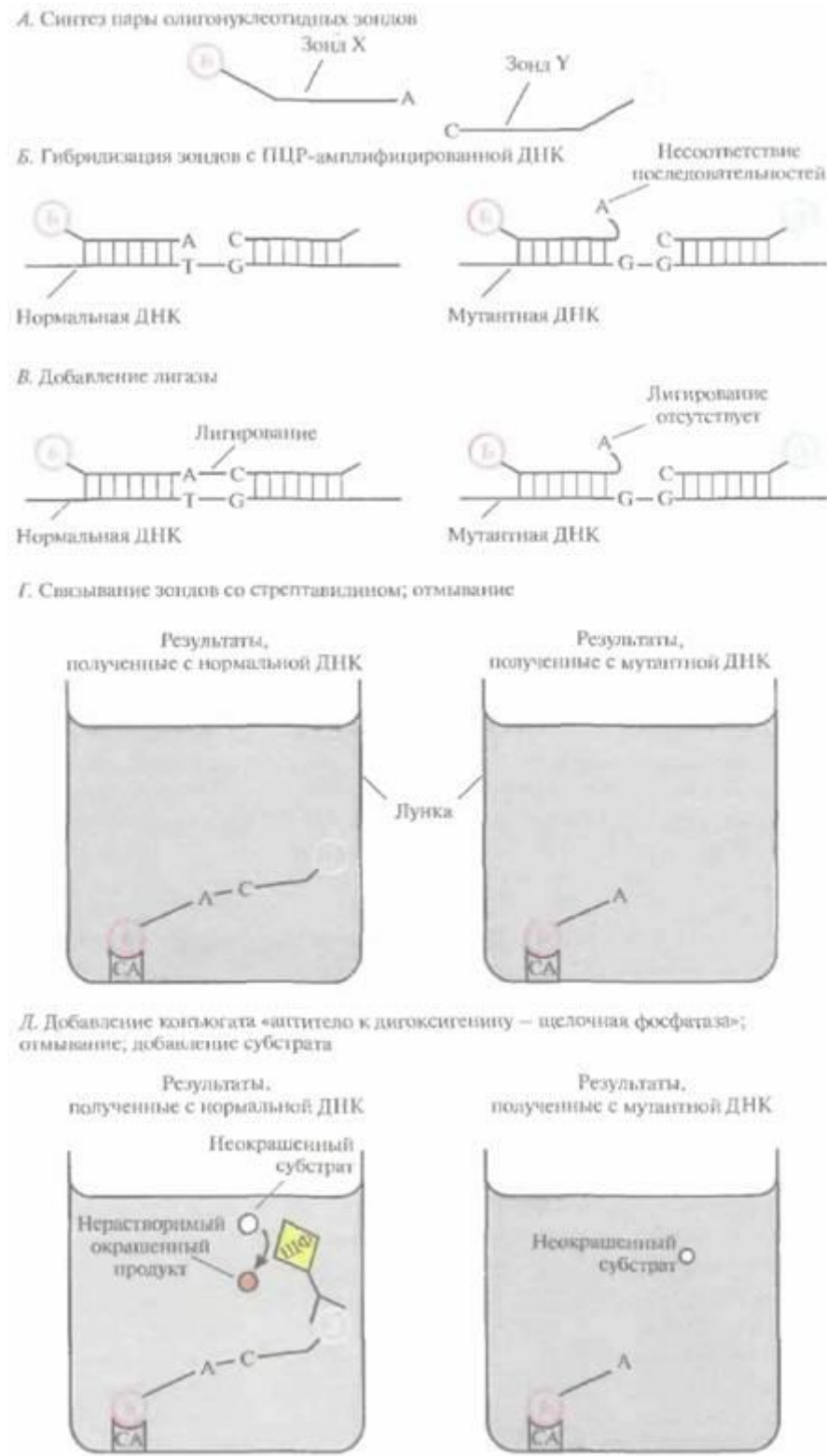
Рис. 9.9. Выявление мутантного гена, ответственного за развитие серповидноклеточной анемии, **А**. ПЦР-амплификация участка β-глобинового гена, содержащего сайты для эндонуклеазы *CvnI*, один из которых отсутствует в мутантном гене. **Б**. Рестрикция ПЦР-продуктов с помощью *CvnI*. Нормальный ген содержит три *CvnI*-сайта в сегменте ДНК, фланкируемом прай-мерами, а мутантный — два. **В**. Электрофоретическое разделение фрагментов, полученных при обработке ПЦР-амплифицированной р-глобиновой ДНК с помощью *CvnI*. *AA* — гомозиготность по нормальному β-глобиновому гену, *AS* — гетерозиготность, *SS* — гомозиготность по гену серповидноклеточной анемии.

в отсутствие *CvnI*-сайта. Описанным способом можно без труда и достаточно быстро установить генетический статус обследуемого, не проводя при этом процедуру гибридизации,

**Метод ПЦР/ЛОЗ**

Не все генетические нарушения, приводящие к появлению дефектных генов, сопровождаются утратой или изменением сайтов рестрикции, поэтому для обнаружения однонуклеотидных замен применяют и другие подходы. В одном из них объединены ПЦР и метод, основанный на лигировании олигонуклеотидных зондов (ЛОЗ), ПЦР/ЛОЗ. Предположим, что в определенном сайте нормального гена (скажем, в 106-м положении) находится пара А-Т, а в том же сайте мутантного гена — G-С. Зная нуклеотидные последовательности, фланкирующие 106-й нуклеотид, можно синтезировать два коротких (20-нуклеотидных) фрагмента, прилегающих к данному сайту и комплементарных противоположным цепям (рис. 9.10). Основная особенность этой пары олигонуклеотидов состоит в том, что 3'-концевой нуклеотид одного из них (зонд X) комплементарен основанию, находящемуся в 106-м положении нормальной последовательности, а 5'-концевой нуклеотид второго (зонд Y) комплементарен нуклеотиду, примыкающему к 106-му нуклеотиду. При отжиге этих зондов с содержащей нормальную последовательность ДНК-мишенью (амплифицированной методом ПЦР) происходит их полная гибридизация, и при добавлении в реакционную смесь ДНК-лигазы зонды X и Y ковалентно сшиваются. Если же эти зонды отжигаются с мутантной ДНК, в которой произошла замена 106-го нуклеотида, то некомплементарный ему 3'-концевой нуклеотид зонда X не может образовать с ним пару. И хотя зонд Y по-прежнему гибридизуется полностью, ДНК-лигаза не может сшить зонды X и Y.

Рис. 9.10. Метод ПЦР/ЛОЗ. Б - биотин; Д — дитоксигенин; ЩФ - щелочная фосфатаза; СА — стрептавидин.



Можно синтезировать и другие олигонуклеотидные зонды, полностью соответствующие последовательности с мутантным 106-м нуклеотидом. При таком наборе зондов лигирование будет происходить в случае их отжига с мутантной ДНК-мишенью и не будет в случае отжига с нормальной мишенью. Таким образом, метод ПЦР/ЛОЗ различает две ситуации: лигирование зондов и отсутствие лигирования.

Чтобы определить, произошло ли лигирование, 5'-конец зонда X метят биотипом, а 3'-конец зонда Y — дигоксигенином, низкомолекулярным соединением, связывающимся с соответствующим антителом. После гибридизации и лигирования проводят денатурацию ДНК для высвобождения гибридизовавшегося зонда и переносят смесь в небольшую пластиковую лунку, покрытую стрептавидином. Лунку промывают, чтобы удалить весь материал, кроме связавшегося со стрептавидином биотинилированного зонда. Затем добавляют в лунку антитела к дигоксигенину, предварительно соединенные со щелочной фосфатазой. После промывания, в ходе которого происходит удаление несвязанного конъюгата, добавляют бесцветный хромогенный субстрат. Окрашивание раствора в лунке свидетельствует о связывании антитела к дигоксигенину с зондом, меченным дигоксигенином, т. е. о том, что этот зонд был лигирован с зондом, меченным биотином. Если же окрашивания не происходит, значит лигирования не было.

Располагая двумя парами зондов, можно установить генетический статус любого человека. Например, ДНК гетерозиготных носителей дает положительный ответ с обеими парами зондов, ДНК лиц, обладающих двумя копиями нормального гена, — только с тем набором зондов, который содержит нуклеотид, комплементарный нормальному сайту, и, наконец, ДНК индивидов с двумя измененными копиями гена — только с набором зондов, детектирующим мутантный сайт. Чтобы минимизировать необходимое для анализа количество исходной ДНК, перед гибридизацией участок ДНК-мишени, содержащий тестируемый сайт, амплифицируют с помощью ПЦР,

ПЦР/ЛОЗ является быстрым, чувствительным и высокоспецифичным методом. Все его стадии роботизированы, что позволяет проводить до 1200 тестов в день.

Более простым, хотя и менее чувствительным вариантом ПЦР/ЛОЗ является метод лигазной цепной реакции. Тестируемую ДНК смешивают с избытком двух индикаторных зондов, описанных выше, в присутствии термостабильной ДНК-лигазы. Проводят лигирование при 65 °С, затем повышают температуру до 94 °С, чтобы произошла денатурация образовавшихся гибридов зонд—ДНК-мишень, и вновь понижают температуру до 65 °С для гибридизации свободных нелигированных индикаторных ЛОЗ-зондов с ДНК-мишенью. Этот цикл повторяют 20 раз. Если индикаторные ЛОЗ-зонды полностью комплементарны ДНК-мишени, то лигирование будет происходить в каждом цикле, и после 20 циклов накопится достаточно продуктов лигирования («сшитых» зондов X и Y) для того, чтобы их можно было обнаружить с помощью электрофореза или ELISA. Если комплементарность неполная, то лигирование не произойдет и никаких продуктов зарегистрировано не будет.

## **Генотипирование с использованием флуоресцентно меченных ПЦР-праймеров**

Колориметрическое генотипирование основано на применении ПЦР-праймеров, меченных различными флуоресцентными красителями. Чтобы различить мутантную ДНК и ДНК дикого типа, проводят ПЦР с двумя разными праймерами. Один из них (P1) комплементарен ДНК дикого типа и на 5'-конце помечен родамином (красный цвет), другой (P3) комплементарен мутантной ДНК и на 5'-конце помечен флуоресцеином (зеленый цвет) (рис. 9.11). В обоих случаях амплификацию проводят в присутствии третьего, немеченного праймера (P2), комплементарного противоположной цепи. Поскольку ПЦР может идти только в том случае, когда праймер полностью комплементарен ДНК-мишени, в присутствии в реакционной смеси всех трех праймеров будет амплифицироваться либо ДНК дикого типа, либо мутантная ДНК, либо обе они, в зависимости от ДНК-мишени, играющей роль матрицы. Если индивид гомозиготен по ДНК дикого типа, то после проведения ПЦР и удаления лишних праймеров будет наблюдаться флуоресценция красного цвета, если он гомозиготен по мутантной ДНК — зеленого, а если присутствуют и мутантная ДНК, и ДНК дикого

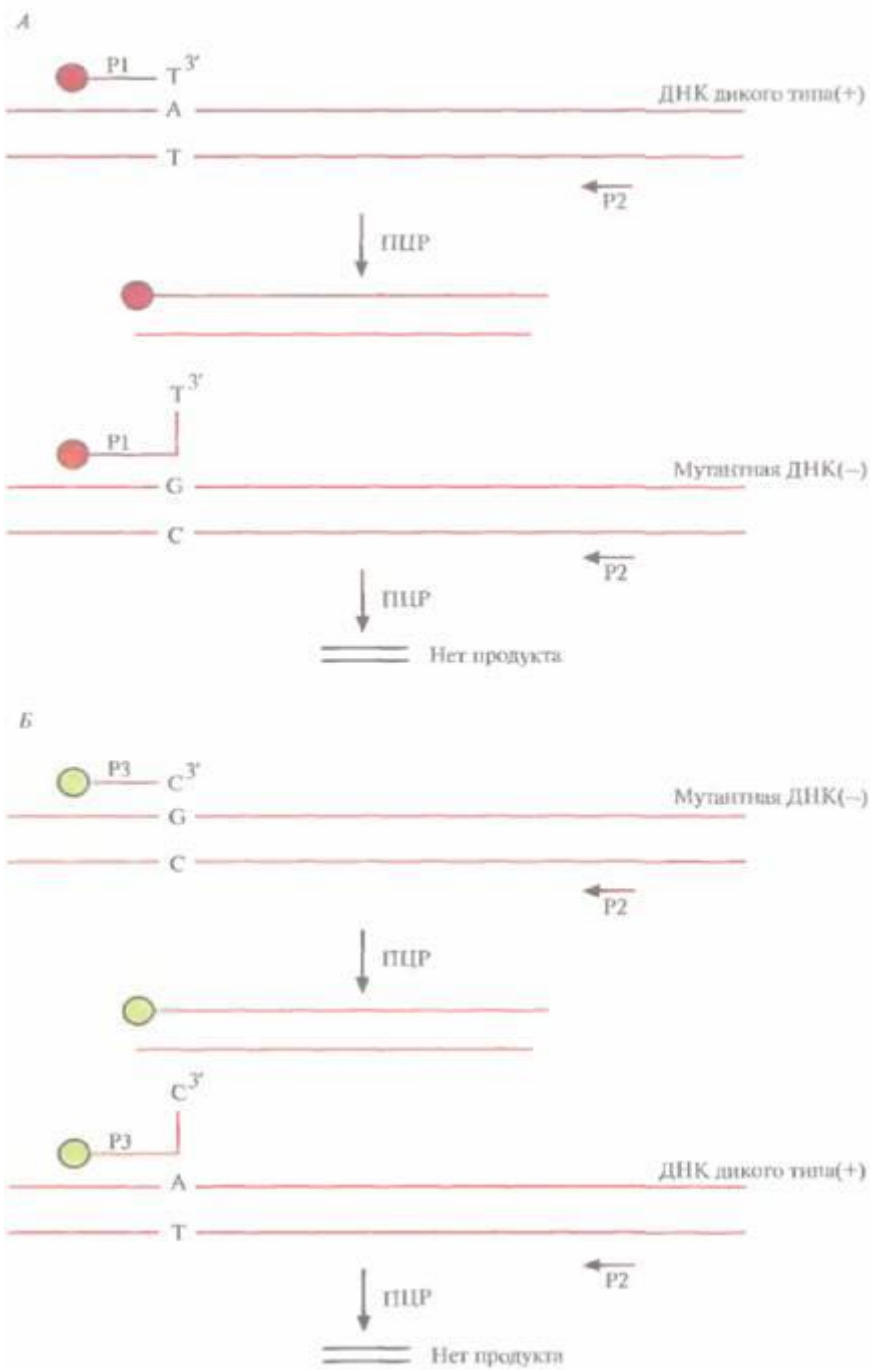


типа (т. е. индивид гетерозиготен) — желтого. Этот метод можно автоматизировать и адаптировать для любого однонуклеотидного сайта-мишени в любом гене с известной нуклеотидной последовательностью.

Мутации в разных сайтах одного гена

Далеко не все генетические заболевания обуславливаются одним специфическим изменением в гене. В большинстве случаев мутации происхо-

Рис. 9.11.  
Обнаружение точечной мутации с помощью флуоресцентно меченных ПЦР-праймеров. А. Используя праймеры Р1 и Р2, амплифицируют ДНК дикого типа. Мутантная ДНК при помощи данных праймеров не амплифицируется из-за несоответствия ей праймера Р1, 5'-конец праймера Р1 помечен родамином, праймер Р2 немеченый. Б. Используя праймеры Р3 и Р2, амплифицируют мутантную ДНК; ДНК дикого типа в этом случае не амплифицируется. 5'-конец праймера Р3 помечен флуоресценном, праймер Р2 немеченый. Знаки «+» и «—» соответствуют сайту дикого типа и мутантному сайту, В случае генотипов «+/+», «+/-» и «-/-» образуются ПЦР-продукты, содержащие только родамин, смесь родамина и флуоресцеина и только флуоресцеин, и соответственно наблюдается Красная, желтая и зеленая флуоресценция .

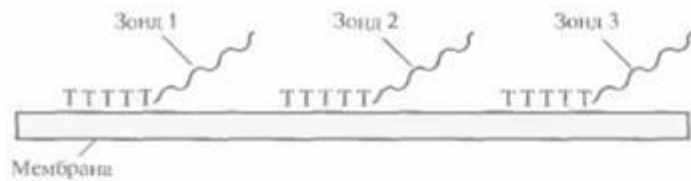




дят в разных сайтах в пределах одного гена, но приводят к одному генетическому заболеванию. В качестве примера можно привести  $\beta$ -талассемию — наследственное заболевание, связанное с утратой активности  $\beta$ -глобина. У гетерозиготных носителей при этом обычно наблюдается небольшая анемия. Индивиды же, гомозиготные по одному из как минимум восьми возможных мутантных сайтов, для поддержания жизни нуждаются в регулярном переливании крови и другом лечении. Поскольку мутация в любом из восьми специфических сайтов  $\beta$ -глобинового гена может приводить к  $\beta$ -талассемии, необходимо провести по крайней мере восемь разных тестов. Такая диагностика возможна, хотя и весьма дорогостояща.

Поэтому для скрининга мутаций, возникающих в разных сайтах одного гена, была разработана стратегия ПЦР/гибридизация, основанная на проведении одной реакции. Для этого синтезируют набор специфических 20-нуклеотидных зондов, каждый из которых полностью комплементарен фрагменту гена-мишени, несущему известную мутацию. К 3'-концу каждого зонда присоединен гомополимер poly(dT) длиной

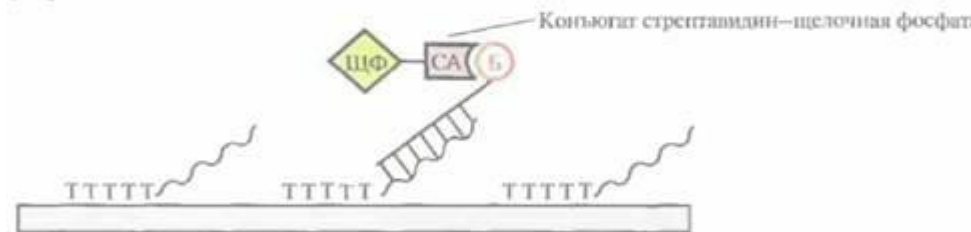
А. Связывание специфических зондов с мембраной



Б. Гибридизация с ПЦР-амплифицированными биотинилированными фрагментами гена-мишени



В. Добавление конъюгата стрептавидин-щелочная фосфатаза



Г. Добавление субстрата

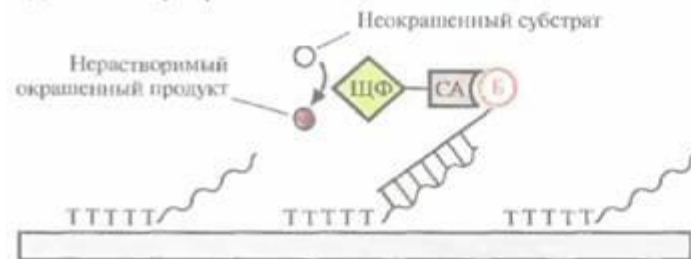


Рис. 9.11. Выявление мутаций в разных сайтах одного гена. Б — биотин; СА — стрептавидин; ЩФ — щелочная фосфатаза.

примерно 400 нуклеотидов, с помощью которого ДНК-зонд связывается с заранее отмеченной точкой на нейлоновом фильтре, а остальная его часть остается свободной и может гибридизоваться (рис. 9.12). Сегменты тестируемой ДНК, каждый из которых включает по одному из возможных мутационных сайтов, одновременно амплифицируют с помощью ПЦР, причем один праймер из каждой пары на 5'-конце помечен биотипом. Амплифицированные фрагменты ДНК-мишени гибридизуют с зондами, пришитыми к фильтру, в условиях, обеспечивающих гибридизацию только полностью комплементарных последовательностей. В гибридизационную смесь добавляют стрептавидин, связанный с щелочной фосфатазой (можно также использовать пероксидазу хрена или уреазу). После гибридизации промывают фильтр и добавляют неокрашенный субстрат. Если имеет место полное соответствие между амплифицированным сегментом ДНК-мишени и специфическим олигонуклеотидным зондом, то на фильтре появится цветная точка. На один и тот же фильтр можно нанести несколько точек, соответствующих целому ряду разных специфических олигонуклеотидных зондов. Проанализировав эту цветную мозаику, можно идентифицировать один из многих возможных сайтов мутации.

## Перспективы

Молекулярная диагностика — это быстро развивающееся направление. Хотя его основные принципы уже сформировались, технические детали отдельных тестов могут различаться. Для получения в достаточном количестве ДНК-мишени сейчас успешно применяют ПЦР. Использование ПЦР и специфических зондов существенно повышает чувствительность тестов и позволяет применять нерадиоактивные хромогенные, хемилюминесцентные и флуоресцентные системы регистрации. Во многих случаях для выявления мутации или экзогенной ДНК инфекционного агента в исследуемом образце достаточно провести ПЦР с последующим электрофоретическим разделением продуктов. Не вызывает сомнения, что с помощью ДНК-диагностики можно будет выявлять большинство, а возможно и все наиболее распространенные генетические и инфекционные заболевания, а также новообразования.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Любой эффективный диагностический тест должен быть: 1) высокоспецифичным в отношении молекулы-мишени; 2) достаточно чувствительным для выявления небольших количеств мишени; 3) достаточно простым, позволяющим без труда получать однозначные результаты. Существуют два типа методов молекулярной диагностики: один основан на сродстве антитела к конкретному антигену, другой — на идентификации специфических нуклеотидных последовательностей с помощью гибридизации или ПЦР.

Наиболее распространенным иммунологическим методом является ELISA. Вкратце он состоит в следующем: 1) фиксация образца на твердой подложке; 2) добавление первого антитела, специфичного к антигену-мишени, и его связывание с антигеном-мишенью; 3) добавление конъюгата второго антитело-фермент, который присоединяется к первому антителу; 4) добавление неокрашенного субстрата, который под действием фермента, входящего в состав конъюгата, превращается в окрашенное соединение. Изменение цвета реакционной смеси свидетельствует о присутствии в образце молекулы-мишени.

ELISA применяется для обнаружения различных белков, идентификации вирусов и бактерий, а также определения низкомолекулярных соединений в широком спектре биологических образцов. Чтобы повысить специфичность первых антител, для диагностики часто используют моноклональные антитела. При этом для уменьшения стоимости прибегают к технике клонирования их фрагментов в *E. coli* и получают комбинаторную библиотеку, а на ее основе — широкий спектр комбинаций Fv-фрагментов.

Высокочувствительным и специфичным методом обнаружения нуклеотидных последовательностей в биологических образцах является гибридизация. Его использовали при разработке способов идентификации патогенных микроорганизмов в клинических образцах и различных микроорганизмов в окружающей среде.

ДНК-диагностика основывается на обнаружении известных нуклеотидных последовательностей; для этого синтезируют специфические праймеры и амплифицируют последовательность-мишень. Это позволяет использовать нерадиоактивные системы детекции (например, хемилюминесцентный метод) или регистрировать ПЦР-продукты методом гель-электрофореза. Кроме того, ПЦР-продукты можно пометить флуоресцентным красителем, присоединив его к 5'-концу праймера.

В судебной медицине все более широкое применение находит метод геномной дактилоскопии, основанный на том, что ДНК каждого человека образует уникальный набор гибридизационных полос. При этом в качестве зондов обычно используют минисателлитные ДНК человека, которые не кодируют никаких белков и отличаются высокой вариабельностью.

Для характеристики ДНК растений используют набор произвольных олигонуклеотидных праймеров, проводят ПЦР-амплификацию случайных фрагментов ДНК, осуществляют электрофорез и получают специфичный для каждого растения набор полос ДНК; данный подход носит название RAPD.

Методы ДНК-диагностики применяют также для обнаружения точковых мутаций в данном гене. Один из подходов заключается в лигировании двух олигонуклеотидных праймеров. При несоответствии всего одного нуклеотида в месте стыковки гибридизовавшихся олигонуклеотидов лигирования не происходит.

## ЛИТЕРАТУРА

- Barany F.** 1991. Single-nucleotide genetic disease detection using cloned thermostable ligase. *Proc. 1991 Miami Bio/Technol. Winter Symp.* 1:88.
- Barker R. H., L., Suebsaeng, W. Rooney, G.C. Alecrim, H. V. Dourado, D. F. With.** 1986. Specific DNA probe for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria. *Science* 231: 1434-1436.
- Bugawan T L., R. K. Saiki, C. H. Levenson, R. M. Watson, H. A. Erfich.** 1988. The use of non-radioactive oligonucleotide probes to analyze enzymatically amplified DNA for prenatal diagnosis and forensic HLA typing. *Bio/Technology* 6:943-947.
- Carlson D. P., C. Superko, J. Mackey, M. E. Gaskill, P. Hansen.** 1990. Chemiluminescent detection of nucleic acid hybridization. *Focus* 12:9-12.
- Caskey C. T.** 1987. Disease diagnosis by recombinant DNA methods. *Science* 236: 1223-1229.
- Chehab F. F., Y. W. Kan.** 1989. Detection of specific DNA sequences by fluorescence amplification: a color complementation assay, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9178-9182.
- Debenham P. G.** 1992. Probing identity: the changing face of DNA fingerprinting. *Trends Biotechnol.* 10:96-102.
- Erlich H. A., D. Gelfand, J. J. Sninsky.** 1991. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* 252: 1643-1651.
- Gillani I. C.** 1987. Non-radioactive probes for specific DNA sequences. *Trends Biotechnol.* 5: 332-334.
- Hartskeerl R. A., M. Y. L., De Wit, P. R. Klatser.** 1989. Polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Gen. Microbiol.* 135: 2357-2364.
- Jeffreys A. J., A. MacLeod, K. Tamaki, D. L. Neil, D. G. Monckton.** 1991. Mini satellite repeat coding as a digital approach to DNA typing. *Nature* 354: 204-209.
- Kingsbury D. T.** 1987. DNA probes in the diagnosis of genetic and infectious diseases. *Trends Biotechnol.* 5: 107-111.
- Klevan L., G. Gebeyehu.** 1990. Biotinylated nucleotides for labeling and detecting DNA. *Methods Enzymol.* 184: 561-577.
- Kohler G., C. Milstein,** 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495—497.
- Kuppuswamy M. N., J. VV. Hoffmann, C. K. Kasper, S. G. Spitzer, S. L. Groce, S. P. Bajaj.** 1991. Single nucleotide primer extension to detect genetic diseases: experimental application to hemophilia B (factor IX) and cystic fibrosis genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1143-1147.
- Mathews J. A., L. J. Kricka.** 1988. Analytical strategies for the use of DNA probes. *Anal. Biochem.* 169: 1-25.
- Nickerson D. A., R. Kaiser, S. Lappin, J. Stewart, L. Hood, U. Landegren.** 1990. Automated DNA diagnostic using an ELISA-based oligonucleotide ligation assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 8923-8927.

- Persing D. H., T. F. Smith, F. C. Tenover, T. J. White** (ed.). 1993. *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Plikaytis B. B., R. H. Gelber, T. M. Shinnick.** 1990. Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium leprae* using a nested-prime r gene amplification assay. *J. Clin. Microbiol.* 28: 1913-1917.
- Pollard-Knigh D., A. C. Simmonds, A. P. Schaap, H. Akhavan, M. A. W. Brady.** 1990. Nonradio-active DNA detection on Southern blots by enzymatically triggered chemiluminescence. *Anal. Biochem.* 185: 353-358.
- Etafalski J. A., S. V. Tingey.** 1993. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *Trends Genet.* 9: 275-279.
- Saiki R. K., P. S. Walsh, C. H. Levenson, H. A. Fjlich.** 1989. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6230-6234.
- Sayler G. S., A. C. Layton.** 1990. Environmental application of nucleic acid hybridization. *Anna. Rev. Microbiol.* 44: 625-648.
- Tyagi S., F.R. Kramer.** 1996. Molecular beacons: probes that fluorescence upon hybridization. *Nat. Biotechnol.* 14: 303-308.
- Waldmann T. A. 1991. Monoclonal antibodies in diagnosis and therapy. *Science* 252: 1657—1662.
- Weiss J. B.** 1995. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 8: 113-130.
- White T. J., N. Arnheim, H. A. Erlich.** 1989. The polymerase chain reaction. *Trends Genet.* 5: 18;:--L8S
- White T. J., R. Made], **D. H. Persuig.** 1992. The polymerase chain reaction: clinical applications. *Adv. Clin. Chem.* 29: 161-196.
- Winter G., C. Milstein.** 1991. Man-made antibodies. *Nature* 349: 293-299.
- Vu K. F., A. Van Deynze, **K. P. Pauls.** 1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis, p. 287-301. In B.R. Click and J.E. Thompson (ed.). *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*. CRC Press, Boca Raton, Fla,

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Кратко опишите, как с помощью ПЦР можно выявить изменения в гене β-глобина человека, приводящие к серповидноклеточной анемии.
2. Изложите принцип метода ПЦР/ЛОЗ.
3. Что такое метод ELISA?
4. Опишите три способа нерадиоактивного мечения ДНК. Каковы преимущества нерадиоактивных методов детекции?
5. Перед вами стоит задача разработать простой, чувствительный и воспроизводимый тест для обнаружения содержащего двухцепочечную ДНК вируса, вызывающего летальную инфекцию у крупного рогатого скота. Поскольку эффективность лечения зависит от ранней и точной диагностики заболевания, необходимо использовать методы, позволяющие выявлять вирус при его минимальном содержании в *организме* инфицированного животного, еще до появления каких-либо симптомов заболевания. Кратко опишите и обоснуйте последовательность ваших действий.
6. Что означают чувствительность, специфичность и простота применительно к диагностическим тестам?
7. Как в настоящее время диагностируют болезнь Чагаса? Каким образом можно усовершенствовать существующую процедуру?
8. Почему использование флуоресцентных красителей облегчает обнаружение специфических нуклеотидных последовательностей?
9. Что такое зонд — «молекулярный маяк» и как он действует?
10. Что такое геномная дактилоскопия и как ее используют для характеристики следовых количеств ДНК в судебной медицине?
11. Что представляет собой метод RAPD и как его используют для выявления генетических вариантов растительных культур?

# ГЛАВА 10.

## Микробиологическое производство лекарственных средств

До появления технологии рекомбинантных ДНК многие лекарственные препараты на основе белков человека удавалось получать только в небольших количествах, их производство обходилось очень дорого, а механизм биологического действия иногда был недостаточно изучен. Предполагалось, что с помощью новой технологии можно будет получать весь спектр таких препаратов в количествах, достаточных как для их эффективного тестирования, так и для применения в клинике. И эти ожидания оправдались. На сегодняшний день клонировано более 400 генов (в основном в виде кДНК) различных белков человека, которые в принципе могут стать лекарственными препаратами. Большинство этих генов уже экспрессированы в клетках-хозяевах, и сейчас их продукты проходят проверку на возможность применения для лечения различных заболеваний человека (табл. 10.1). Впрочем, хотя более 30 таких биотехнологических препаратов и получило одобрение в США (табл. 10,2), пройдет еще несколько лет, прежде чем они будут рекомендованы для широкого использования и поступят в продажу; вначале их подвергнут проверке на животных и проведут тщательные клинические испытания. Однако фармацевтические фирмы уже сейчас проявляют к ним интерес. По подсчетам специалистов, ежегодный объем мирового рынка лекарственных препаратов на основе белков человека составляет около 150 млрд. долларов и постоянно растет. Объем мирового рынка лекарственных средств на основе рекомбинантных белков увеличивается на 12—14% в год и к 2000 г. составит примерно 20 млрд. долларов.

Разработка новых методов профилактики и лечения многих заболеваний человека внесла огромный вклад в рост благосостояния людей в XX в. Однако этот процесс никогда нельзя считать завершенным. Так называемые «старые» заболевания (например, туберкулез) могут дать о себе знать вновь, как только будут ослаблены профилактические меры или появятся резистентные штаммы. Весьма привлекательной выглядит перспектива применения в качестве терапевтических средств специфических антител; их можно будет использовать для нейтрализации токсинов, борьбы с бактериями, вирусами, для лечения раковых заболеваний. Антитело можно уподобить самонаводящейся ракете, которая либо нейтрализует «нарушителя» — чужеродный агент, либо, если она оснащена «боеголовкой», разрушает специфическую клетку-мишень. К сожалению, несмотря на многообещающие возможности, антитела довольно редко применялись для профилактики и лечения болезней и других патологий. И лишь в последнее время, с развитием технологии рекомбинантных ДНК и разработкой методов получения моноклональных антител и с расшифровкой молекулярной структуры и функции иммуноглобулинов, интерес к применению специфических антител для лечения различных заболеваний вновь пробудился.

### Лекарственные препараты

#### *Выделение кДНК интерферонов*

Для выделения генов или кДНК белков человека используют разные подходы. В ряде случаев выделяют нужный белок и определяют аминокислотную последовательность соответствующей

Таблица 10.1. Некоторые белки человека, полученные генно инженерны ми методами

| Белок  | Заболевание/Физиологический процесс                                       |
|--|---|
| Адренокортикотропный гормон                  | Ревматизм   |
| a, - Антитрипсин                             | Эмфизема  |
| Бактерицидный/повышающий проницаемость белок | Различные инфекции  |
| Гемоглобин                                   | Анемия  |
| Гормон роста (соматотропин)                  | Задержка роста  |
| Инсулин                                      | Сахарный диабет   |
| Инсулиноподобный фактор роста                | Сахарный диабет, почечная недостаточность                                 |
| Интерлейкины                                 | Злокачественное новообразование, иммунные заболевания                     |
| Интерфероны (α, β, γ)                        | Вирусные заболевания, злокачественное новообразование, рассеянный склероз |
| Кальцитонин                                  | Остеомаляция  |
| Лимфотоксин                                  | Злокачественное новообразование   |
| Нейротропный фактор, вырабатываемый в мозге  | Боковой амиотрофический склероз   |
| Релаксин                                     | Роды  |
| Рецептор интерлейкина- 1                     | Астма, ревматоидный артрит  |
| Соматолиберин                                | Задержка роста  |
| Соматомедин С                                | Задержка роста  |
| Сывороточный альбумин                        | Дефицит белков плазмы   |
| Тиреотропный гормон                          | Рак щитовидной железы   |
| Тканевой активатор плазминогена              | Тромбообразование   |
| Тромбоцитарный фактор роста                  | Атеросклероз  |
| Урогастрон                                   | Язвы  |
| Уроки наза                                   | Тромбообразование   |
| Фактор, активирующий макрофаги               | Злокачественное новообразование   |
| Фактор некроза опухоли                       | Злокачественное новообразование   |
| Фактор роста нервов                          | Повреждение нервной ткани   |
| Фактор роста эпидермиса                      | Ожоги   |
| Фактор VIII                                  | Гемофилия   |
| Фактор IX                                    | Гемофилия   |
| Факторы роста В-лимфоцитов                   | Иммунные заболевания  |
| Колонистимулирующие факторы                  | Злокачественные новообразования   |
| Хорионический гонадотропин                   | Женское бесплодие   |
| Эндорфины и энкефалины                       | Боль  |
| Эритропоэтин                                 | Анемия, заболевания почек   |

щего участка молекулы. Исходя из этого находят кодирующую его нуклеотидную последовательность, синтезируют соответствующий олигонуклеотид и используют его в качестве гибридиза-ционного зонда для выделения нужного гена или кДНК из геномных или кДНК-библиотек. Другой подход состоит в выработке антител к очищенному белку и использовании их для скрининга библиотек, в которых происходит экспрессия определенных генов. Для белков человека, синтезируемых преимущественно в какой-то одной ткани, кДНК-библиотека, полученная на основе мРНК, выделенной из этой ткани, будет обогащена последовательностью ДНК-мишени. Например, основным белком, синтезируемым клетками островков Лангерганса поджелудочной железы, является инсулин, и 70% мРНК, выделенных из этих клеток, кодируют именно его. Однако принцип обогащения кДНК неприменим для тех белков человека, количество которых очень мало или место синтеза которых неизвестно. В этом случае могут понадобиться другие экспериментальные подходы. Интерфероны (ИФ) человека, включающие α-, β- и γ-интерфероны (ИФα, ИФβ, ИФγ), — это природные белки, каждый из которых может найти свое терапевтическое применение (табл. 10.3), При выделении их кДНК пришлось разработать новый подход, позволяющий преодолеть трудности, связанные с недостаточным содержи-



Таблица 10.2. Некоторые рекомбинантные белки, получившие разрешение Департамента по контролю за качеством пищевых продуктов, медикаментов и косметических средств (США) на применение для лечения заболеваний человека

| Белок                           | Фирма   | Заболевание   |
|---------------------------------|---|---|
| Антигемофильный фактор          | M ilex, Baxter Healthcare, Genetics Institute | Гемофилия А   |
| Глюкоцеребброзидаза             | Genzynie                                      | Болезнь Гоше  |
| Гормон роста                    | Cenentech                                     | Дефицит гормона роста у детей   |
| ДНКаза I                        | Genentech                                     | Муковисцидоз  |
| Инсулин                         | Eli Lilly                                     | Сахарный диабет   |
| Интерлейкин-2                   | Chiron  | Рак почки   |
| ИФ $\alpha_{2a}$                | Hoffmann- La Roche                            | Волосистая лейкоплакия, саркома Капоши  |
| ИФ $\alpha_{2b}$                | Schering-Plough                               | Волосистая лейкоплакия, остроконечная кондилома, саркома Капоши, гепатиты В и С |
| ИФ $\alpha_{n3}$                | Interferon Sciences                           | Остроконечная кондилома   |
| ИФ $\beta_{1b}$                 | Berlex Laboratories and Chiron                | Рецидивирующий рассеянный склероз   |
| ИФ $\gamma_{1b}$                | Genentech                                     | Хронический гранулематоз  |
| Соматотропин                    | Eli Lilly                                     | Дефицит гормона роста   |
| Тканевой активатор плазминогена | Genentech                                     | Острый инфаркт миокарда, острая обширная эмболия легочной артерии               |
| Эритропоэтин                    | Amgen and Ortho Biotech                       | Анемия, заболевания почек   |

ем соответствующих мРН К и белков. Процедура выделения кДНК интерферонов состояла в следующем.

1. Из лейкоцитов человека выделили мРНК и фракционировали ее по размерам; провели обратную транскрипцию и встроили в сайт *Pst*I плазмиды рВR322.
2. Полученным продуктом трансформировали *Escherichia coli*. Образовавшиеся 6000 клонов подразделили на 12 групп; по 512 клонов в каждой. Тестирования проводили на группе клонов, что позволило ускорить процесс их идентификации.
3. Каждую группу клонов гибридизовали с неочищенным препаратом ИФ-мРНК,
4. Из образовавшихся гибридов, содержащих клонированную ДНК и мРНК, выделили мРНК и провели ее трансляцию в бесклеточной системе синтеза белка.
5. Определили интерферонную противовирусную активность каждой смеси, полученной в результате трансляции. Группы, проявившие интерферонную активность, содержали клон с кДНК, гибридизовавшейся с ИФ-мРНК.
6. Позитивные группы разбили на 8 подгрупп, содержащих по 64 клона, и вновь провели тестирование. Разбиение на подгруппы повторяли до тех пор, пока не идентифицировали клон, содержащий полноразмерную ИФ-кДНК человека.

Если нужно получить большие количества ИФ, соответствующую кДНК можно субклонировать в экспрессирующем *E. coli*-векторе, который позволяет достичь высокого уровня экспрессии.

Таблица 10.3. Возможное терапевтическое применение некоторых интерферонов человека

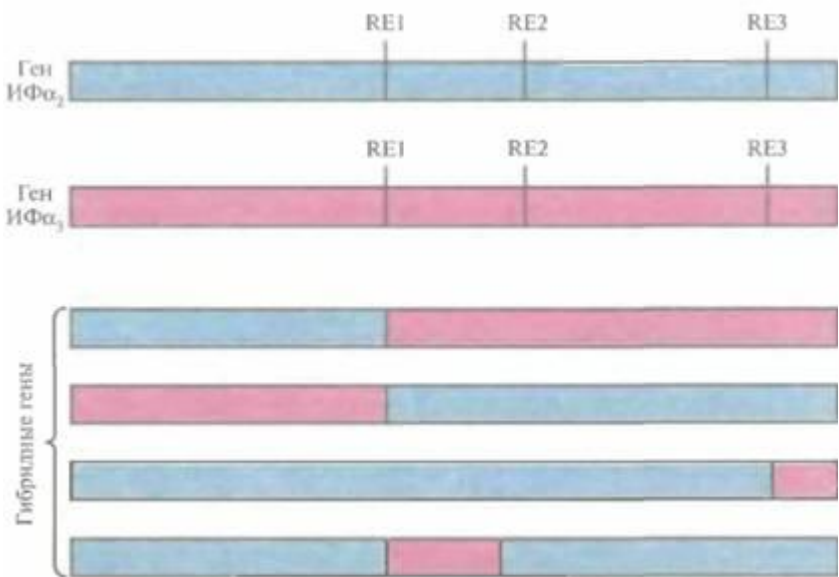
|                         | Заболевание   |
|-------------------------|---|
| Интерферон              |   |
| $\alpha_{2a}$           | Гепатит С, волосистая лейкоплакия   |
| $\alpha_{2b}$           | Рак мочевого пузыря, рак головы и шеи, злокачественная меланома, множественные миеломы, неходжкинская лимфома, рак почки, болезнь Крона, ВИЧ-инфекция |
| $\alpha_{n3}$           | СПИД, цервикальная дисплазия, папилломавирусные инфекции, хронический гепатит С, остроконечная кондилома  |
| $\beta_{1a} \beta_{1b}$ | Рассеянный склероз  |
|                         | Хронический прогрессирующий рассеянный склероз  |
| $\gamma_{1b}$           | Рак почки, хронический гранулематоз   |

**Интерфероны человека, полученные методом генной инженерии**

Первый ген интерферона был выделен в начале 80-х гг. С тех пор было обнаружено несколько разных интерферонов. Как мы уже говорили, исходя из химических и биологических свойств всех их можно подразделить на три группы: ИФа, ИФβ и ИФγ. ИФа и ИФβ синтезируются клетками, обработанными препаратами вирусов или вирусной РНК, а ИФγ вырабатывается в ответ на действие веществ, стимулирующих рост клеток. ИФа кодируется семейством генов, включающим как минимум 15 неаллельных генов, в то время как ИФβ и ИФγ кодируются одним геном каждый. Подтипы ИФа проявляют разную специфичность. Например, при проверке эффективности ИФа<sub>1</sub> и ИФа<sub>2</sub> на обработанной вирусом линии клеток быка эти интерфероны проявляют сходную противовирусную активность, в случае же обработанных вирусом клеток человека ИФа<sub>2</sub> оказывается в семь раз активнее, чем ИФа<sub>1</sub>. Если противовирусная активность проверяется на клетках мыши, то ИФа<sub>2</sub> оказывается в 30 раз менее эффективным, чем ИФа<sub>1</sub>.

Было предпринято несколько попыток создать ИФ с комбинированными свойствами, используя тот факт, что члены семейства ИФа различаются по степени и специфичности своей противовирусной активности. Теоретически этого можно достичь, соединив части последовательностей генов разных ИФа. Это приведет к образованию гибридного белка с другими свойствами, чем у каждого из исходных белков. Сравнение последовательностей кДНК ИФа<sub>1</sub> и ИФа<sub>2</sub> показало, что они содержат одинаковые сайты рестрикции в позициях 60, 92 и 150. После расщепления обеих кДНК в этих сайтах и последующего лигирования фрагментов было получено несколько гибридных генов (рис. 10.1). Эти гены экспрессировали в *E. coli*, синтезированные белки очистили и исследовали их биологические функции. Проверка защитных свойств гибридных ИФ на культуре клеток млекопитающих показала, что некоторые из них проявляют большую активность, чем родительские молекулы. Кроме того, многие гибридные ИФ индуцировали образование 2'—5'-олигоизoadенилат-синтетазы в контрольных клетках. Этот фермент участвует в синтезе 2'—5'-связанных олигонуклеотидов, которые в свою очередь активируют латентную клеточную эндорибонуклеазу, расщепляющую вирусную мРНК. Другие гибридные ИФ проявляли большую, чем родительские молекулы, антипролиферативную активность в культурах различных раковых клеток человека.

Рис. 10.1. Структура генов ИФа<sub>2</sub>, ИФа<sub>3</sub> и четырех гибридных генов. Сравнение нуклеотидных последовательностей генов ИФа<sub>2</sub> и ИФа<sub>3</sub> обнаруживает наличие у них одинаковых сайтов для рестрицирующих эндонуклеаз (RE1, RE2, RE3). Рестрикция по этим сайтам и лигирование полученных фрагментов приводят к образованию различных гибридных генов. В нижней части рисунка представлены четыре из них.



*Гормон роста человека, полученный методом генной инженерии*

Стратегию конструирования новых белков путем замены функциональных доменов или с помощью направленного мутагенеза можно использовать для усиления или ослабления биологического действия белка. Например, нативный гормон роста человека (ГРЧ) связывается в разных типах клеток как с рецептором гормона роста, так и с пролактиновым рецептором.

Чтобы избежать нежелательных побочных эффектов в процессе лечения, нужно исключить присоединение ГРЧ к пролактиновому рецептору. Поскольку участок молекулы гормона роста, связывающийся с этим рецептором, по своей аминокислотной последовательности лишь частично совпадает с участком молекулы, который взаимодействует с пролактиновым рецептором, удалось избирательно снизить связывание гормона с последним. Для этого использовали сайт-специфический мутагенез, в результате которого произошли определенные изменения в боковых группах некоторых аминокислот (His-18, His-21 и Glu-174) — лигандов для ионов  $Zn^{2+}$ , необходимых для высокоаффинного связывания ГРЧ с пролактинным рецептором (рис. 10.2). Модифицированный гормон роста связывается только со «своим» рецептором. Полученные результаты представляют несомненный интерес, но смогут ли модифицированные ГРЧ найти применение в клинике, пока неясно.

*Оптимизация генной экспрессии*

Недостаточно создать новый белок, важно оптимизировать экспрессию его гена. Для начала исследователи определяют возможность синтеза достаточных количеств аутентичного белка в прокариотической или эукариотической системах экспрессии. Прокариотическим системам отдается предпочтение, поскольку работа с ними обходится дешевле, а производительность выше. К сожалению, не все микроорганизмы синтезируют функциональные формы гетерологичных белков с одинаковой эффективностью, поэтому необходимо проводить сравнительные количественные оценки.

При изучении экспрессии гена интерлейкина-3 человека в различных клетках-хозяевах «наилучшим» хозяином оказалась *Bacillus licheniformis* (табл. 10.4). Хотя в одной из систем *E. coli* был достигнут несколько более высокий уровень экспрессии, полученный белок мол. массой 20 кДа представлял собой продукт слияния интерлейкина-3 с участком β-галактозидазы *E. coli*, а не зрелый аутентичный белок мол. массой 15 кДа. Как правило, подобный химерный белок нельзя использовать в качестве лекарственного средства. Клетки дрожжей *Kluveromyces lactis* и *Saccharomyces cerevisiae*, а также клетки человека были способны гликозилировать интерлейкин-3, однако уровень экспрессии в них был относительно низок. Гликозилирование не оказывает заметного влияния на активность интерлейкина-3, но ведет к ощутимой разнице в размерах молекулы.



Рис. 10.2. Схематическое изображение нативной и модифицированной форм гормона роста человека (ГРЧ). С помощью олигонуклеотид-направленного мутагенеза получена форма ГРЧ, утратившая способность связываться с пролактиновым рецептором, но сохранившая специфичность к рецептору гормона роста.

Таблица 10.4. Уровень экспрессии гена интерлейкина-3 в разных системах клеток-хозяев<sup>1)</sup>

| Клетка-хозяин         | Промотор <sup>2)</sup>      | Уровень экспрессии, ЕД | Мол. масса белка, кДа |
|-----------------------|-----------------------------|------------------------|-----------------------|
| Клетки чело           | Металлотронеиновый          | 2                      | 20–40                 |
| <i>B. licheniform</i> | Амилазный                   | 300                    | 15 (зрелый)           |
| <i>E. coli</i>        | <i>lacZ</i>                 | 20                     | 15 (зрелый)           |
| <i>E. coli</i>        | <i>lacZ</i>                 | 500                    | 20 (химерный)         |
| <i>K. lactis</i>      | Лактазный                   | 20                     | 20–100                |
| <i>S. cerevisiae</i>  | Фактора конъюгации $\alpha$ | 20                     | 20–100                |

<sup>1)</sup> Из работы van Leen et al, *Bio/Technology* 9: 47-52, 1991, с изменениями. <sup>2)</sup> В каждом случае использовался один из наиболее сильных промоторов, «работающих» в данной системе.

Ферменты

ДНКаза I

Наиболее частым летальным наследственным заболеванием среди европеоидов является муковисцидоз. В США выявлено 30 000 случаев этого заболевания, в Канаде и странах Европы - 23 000. Пациенты с муковисцидозом часто страдают инфекционными заболеваниями, поражающими легкие. Лечение рецидивирующих инфекций антибиотиками в конце концов приводит к появлению резистентных штаммов патогенных бактерий. Бактерии и продукты их лизиса вызывают накопление в легких вязкой слизи, затрудняющей дыхание. Одним из компонентов слизи является высокомолекулярная ДНК, которая высвобождается из бактериальных клеток при лизисе. Ученые из биотехнологической компании Genentech (США) выделили и экспрессировали ген ДНКазы — фермента, который расщепляет высокомолекулярную ДНК на более короткие фрагменты. Очищенный фермент вводят в составе аэрозоля в легкие больных муковисцидозом, он расщепляет ДНК, вязкость слизи снижается, что облегчает дыхание. Хотя эти меры и не излечивают муковисцидоз, они облегчают состояние больного. Применение данного фермента было недавно одобрено Департаментом по контролю за качеством пищевых продуктов, медикаментов и косметических средств (США), и объем его продаж составил в 2000 г. примерно 100 млн. долларов.

Альгинат-лиаза

Альгинат - это полисахарид, синтезируемый целым рядом морских водорослей, а также почвенными и морскими бактериями. Его мономерными единицами являются два сахара — β-D-маннуронат и α-L-гулуронат, относительное содержание и распределение которых и определяют свойства конкретного альгината. Так, остатки α-L-гулуроната образуют межцепочечные и внутрицепочечные сшивки путем связывания ионов кальция; остатки β-D-маннуроната связывают ионы других металлов, Альгинат, содержащий такие сшивки, образует эластичный гель, вязкость которого прямо пропорциональна размеру полисахаридных молекул.

Выделение альгината слизистыми штаммами *Pseudomonas aeruginosa* существенно повышает вязкость слизи у больных муковисцидозом. Чтобы очистить дыхательные пути и облегчить состояние больных, в дополнение к обработке ДНКазой I следует провести деполимеризацию альгината с помощью альгинат-лиазы.

Ген альгинат-лиазы был выделен из *Flavobacterium* sp., грамотрицательной почвенной бактерии, активно вырабатывающей этот фермент. На основе *E. coli* был создан банк клонов *Flavobacterium* и проведен скрининг тех из них, которые синтезируют альгинат-лиазу, путем высевания всех клонов на твердую среду, содержащую альгинат, с добавлением ионов кальция. В таких условиях весь альгинат, находящийся в среде, за исключением того, который окружает продуцирующие альгинат-лиазу колонии, образует сшивки и становится мутным. Гидролизованный альгинат теряет способность к формированию сшивок, поэтому среда вокруг синтезирующих альгинатлиазу колоний остается прозрачной-Анализ клонированного фрагмента ДНК, присутствующего в одной из положительных колоний, показал наличие открытой рамки считывания, кодирующей полипептид мол. массой около 69 000. Более детальные биохимические и

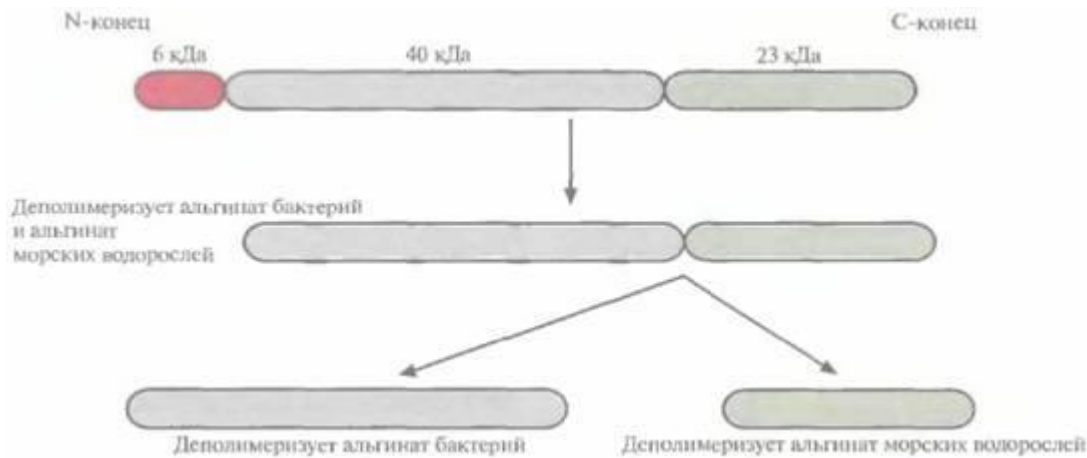


Рис. 10.3. Процессинг белка — предшественника рекомбинантной альгинат-лиазы *Flavobacterium*, происходящий в *E. coli*. В результате отщепления от белка мол. массой 69 кДа пептида 6 кДа образуется белок мол. массой 63 кДа, способный деполимеризовать альгинат морских водорослей и бактериальный альгинат. Расщепление белка 63 кДа дает белок мол. массой 23 кДа, активно деполимеризующий альгинат морских водорослей, и белок мол. массой 40 кДа, гидролизующий бактериальный альгинат.

генетические исследования показали, что этот полипептид, по-видимому, является предшественником трех альгинат-лиаз, вырабатываемых *Flavobacterium* sp. (рис. 10.3). Сначала какой-то протеолитический фермент отрезает от него N-концевой пептид массой около 6000. Оставшийся белок мол. массой 63 000 способен деполимеризовать альгинат, вырабатываемый как бактериями, так и морскими водорослями. При его последующем разрезании образуется продукт мол. массой 23 000, деполимеризующий альгинат морских водорослей, и фермент мол. массой 40 000, разрушающий альгинат бактерий. Для получения больших количеств фермента мол. массой 40 000 кодирующую его ДНК амплифицировали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), а затем встраивали в выделенный из *B. subtilis* плазмидный вектор, несущий ген, кодирующий сигнальный пептид  $\alpha$ -амилазы *B. subtilis*. Транскрипцию контролировали при помощи системы экспрессии гена пенициллиназы (рис. 10.4). При

трансформации клеток *B. subtilis* полученной плазмидой и высевании их на содержащую альгинат твердую среду с добавлением ионов кальция образовались колонии с большим ореолом. Когда такие колонии выращивали в жидкой среде, ре-комбинантная альгинат-лиаза выделялась в культуральную среду. Последующие тесты показали, что этот фермент способен эффективно разжижать альгинаты, синтезируемые слизистыми штаммами *P. aeruginosa*, которые были выделены из легких больных муковисцидозом. Для того чтобы определить, целесообразно ли проводить клиническое тестирование рекомбинантной альгинат-лиазы, нужны дополнительные исследования.

**Моноклональные антитела как лекарственные средства**

Примерно 100 лет назад была предпринята попытка лечения детей, больных дифтерией, с помощью неочищенной антисыворотки, получен-



Рис. 10.4. ДНК, кодирующая альгинат-лиазу мол. массой 40 кДа. К последовательности, кодирующей N-конец альгинат-лиазы, присоединен сегмент гена  $\alpha$ -амилазы *B. subtilis*, кодирующий ее сигнальный пептид. Транскрипция контролируется при помощи системы экспрессии гена пенициллиназы *B. subtilis*.



ной от лошадей, которых инфицировали *Corynebacterium diphtheriae*, вызывающей дифтерию у человека. *C. diphtheriae* инфицирует горло и миндалины, выделяя экзотоксин, приводящий к гибели клеток человека. Проникая в кровоток, этот токсин поражает органы, удаленные от места первичной инфекции, и в отсутствие лечения болезнь может иметь летальный исход. (В те времена, о которых идет речь, смертность достигала 45%.) Однако, если больному в первые несколько дней после начала инфекции ввести лошадиную антисыворотку, содержащую антитела к этому экзотоксину, то у него возникнет пассивный иммунитет, который позволяет избежать летального исхода.

К сожалению, риск, связанный с использованием антител, не позволяет широко применять этот метод терапии. Дело в том, что в организме больного часто вырабатываются собственные антитела на чужеродные белки, присутствующие в цельной или частично очищенной антисыворотке, и ее повторное введение в случае сенсibilизации организма может привести к развитию анафилактического шока и гибели пациента.

С развитием гибридной технологией вновь появилась надежда на то, что антитела можно будет использовать в качестве терапевтических средств для поддержания постоянного уровня чистых моноклональных антител в организме. Однако остаются проблемы, связанные с риском развития перекрестных реакций, приводящих к развитию иммунного ответа и анафилаксии: ведь в организме больного могут вырабатываться собственные антитела на детерминанты моноклональных антител мыши. Поэтому основная задача в настоящее время состоит в том, чтобы разработать методы получения моноклональных антител человека, обладающих как специфическими иммунотерапевтическими свойствами, так и пониженной иммуногенностью.

### Структура и функции антител

Молекула антитела (иммуноглобулин) состоит из двух «легких» (L) и двух «тяжелых» (H) белковых цепей, которые соединены водородными связями и расположенными в строго определенных местах дисульфидными мостиками. N-концевые участки L- и H-цепей образуют антигенсвязывающий сайт. Отдельные домены (области) молекулы антитела выполняют разные функции, что облегчает манипуляции с генами антител (рис. 10.5). Антигенсвязывающие сайты состоят из трех участков, определяющих комплементарность антител к антигену (CDR, от англ. complementarity-determining regions), и образующих вариабельные ( $V_H$  и  $V_L$ ) области на N-концах H- и L-цепей. Для CDR характерна очень высокая изменчивость последовательности аминокислот, поэтому их еще называют гипервариабельными. Помимо вариабельных ( $V_H$  и  $V_L$ ), каждая L-цепь содержит одну константную область, или домен ( $C_L$ ), а каждая H-цепь — три константных области, или домена ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  и  $C_{H3}$ ). При обработке антитела протеолитическим ферментом папаином образуются три фрагмента: два идентичных (Fab), каждый из которых содержит интактную L-цепь, связанную дисульфидным мостиком с  $V_H$ - и  $C_{H1}$ -доменами H-цепи, и один Fc, состоящий из двух соединенных дисульфидной связью  $C_{H2}$ - и  $C_{H3}$ -доменов H-цепи, Fab-фрагмент, точнее его N-концевая часть, называемая Fv-фрагментом, обладает антигенсвязывающей активностью, присущей интактной молекуле антитела (рис. 10.5). При этом его аминокислотная последовательность у разных молекул существенно различается.

После связывания антигена с интактным антителом запускаются следующие реакции иммунного ответа.

- Активируется система комплемента. Компоненты этой системы разрушают клеточные мембраны, активируют фагоциты и генерируют сигналы, мобилизующие другие компоненты системы иммунного ответа.
- В результате связывания Fc-участка антитела с Fc-рецептором эффекторной клетки запускается реакция опосредованной антителами клеточной цитотоксичности. Активированная эффекторная клетка высвобождает вещества, лизирующие чужеродную клетку, с которой связан Fab-участок молекулы антитела.
- После связывания Fab-участка с растворимым антигеном Fc-участок антитела может присоединяться к Fc-рецепторам фагоцитов, которые захватывают и разрушают комплекс антиген—антитело.



*Профилактика отторжения трансплантированных органов*

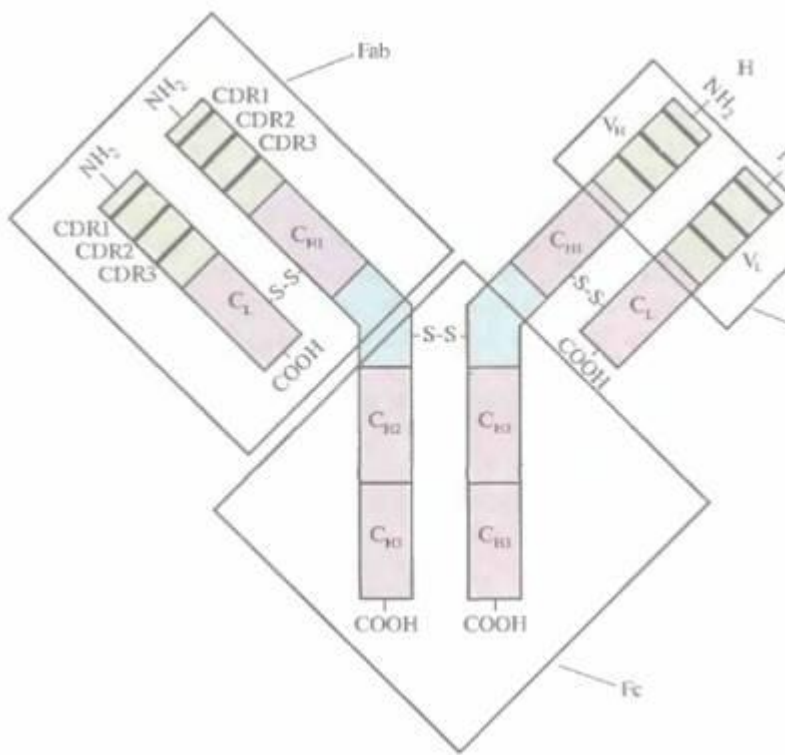
В 1970-х гг. были пересмотрены взгляды на пассивную иммунизацию: ее стали считать профилактическим средством борьбы с отторжением трансплантированных органов. Предлагалось вводить пациентам специфические антитела, которые будут связываться с лимфоцитами определенного типа, уменьшая иммунный ответ, направленный против пересаженного органа.

Первыми веществами, рекомендованными Департаментом по контролю за качеством пищевых продуктов, медикаментов и косметических средств (США) для использования в качестве иммуносупрессоров при пересадке органов у человека, были моноклональные антитела мыши ОКТ3. За отторжение органов отвечают так называемые Т-клетки — лимфоциты, дифференцирующиеся в тимусе. ОКТ3 связываются с рецептором, находящимся на поверхности любой Т-клетки, который называется CD3. Это предупреждает развитие полного иммунного ответа и отторжение трансплантированного органа. Подобная иммуносупрессия весьма эффективна, хотя и оказывает некоторые побочные действия, например вызывает лихорадку и приводит к появлению сыпи.

*Лекарственные вещества, связанные с моноклональными антителами*

Лекарственные вещества, проявляющие высокую активность при тестировании *in vitro* (обычно в культуре клеток), зачастую оказываются значительно менее эффективными *in vivo*. Кажущееся снижение их активности объясняется тем, что они не достигают органа или клетки-мишени в нужной концентрации. Увеличение дозы принимаемого препарата не решает проблему, поскольку при этом часто возникают побочные эффекты. Более того, чтобы избежать таких эффектов, многие терапевтические средства заведомо вводят в дозах, не достигающих оптимальных, что дополнительно снижает их эффективность. Для облегчения доставки лекарственного вещества к месту его действия используют несколько приемов. 1. Заключают его в особые частицы — липосомы, липидная обо-

Рис. 10.5. Строение молекулы антитела. Н- и L-цепи состоят из переменных (V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub>) и константных (C<sub>L</sub>, C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> и C<sub>H3</sub>) доменов. Переменные домены содержат CDR-участки (CDR1, CDR2 и CDR3).



лочка которых имеет высокое сродство к нужным органам. 2. Встраивают гены специфических токсинов в инфильтрирующие опухоль лимфоциты, которые высвобождают эти токсины непосредственно в опухоли. 3. Присоединяют молекулы лекарственных веществ к моноклональным антителам, специфичным по отношению к белкам, находящимся на поверхности строго определенных клеток, например опухолевых (рис. 10.6). 4. Используют лекарственные вещества в неактивной форме, переводя их в активное состояние при помощи ферментов. Чтобы такое превращение происходило только вблизи клетки-мишени, фермент присоединяют к моноклональному антителу, специфичному к поверхностному антигену этой клетки (рис. 10.6).

Для эффективной работы последней из описанных систем необходимо, чтобы а) моноклональное антитело, связанное с ферментом, переводящим лекарственное вещество в активную форму, было в достаточной степени очищено и имелось в нужном количестве; б) связывалось с высокоспецифичным для клетки-мишени белком; в) было стабильным в физиологических условиях, но в то же время быстро выводилось из кровотока; 2) при необходимости могло проникать в опухолевую ткань, обеспечивая действие препарата на все ее клетки. В этом случае мишенями оказываются строго определенные клетки, что позволяет использовать лекарственное вещество в гораздо меньших дозах, чем при прямом введении. Применение в такой системе моноклональных антител мыши может приводить к развитию иммунного ответа, поэтому очень важно использовать фрагменты антител человека или антител, максимально сходных с ними по структуре.

Наиболее частой причиной смерти в странах Северной Америки и Европы является тромбоэмболия мозговых или сердечных артерий. Тромб состоит из молекул фибрина, фактора свертывающей системы крови, образующего сеть в ответ на повреждение сосудистой стенки. Е норме молекулы фибрина в образовавшемся тромбе расщепляются с помощью плазмина сериновой протеиназы, который образуется из плазминогена под действием активатора (рис. 10.7), Однако нередко эта биологическая

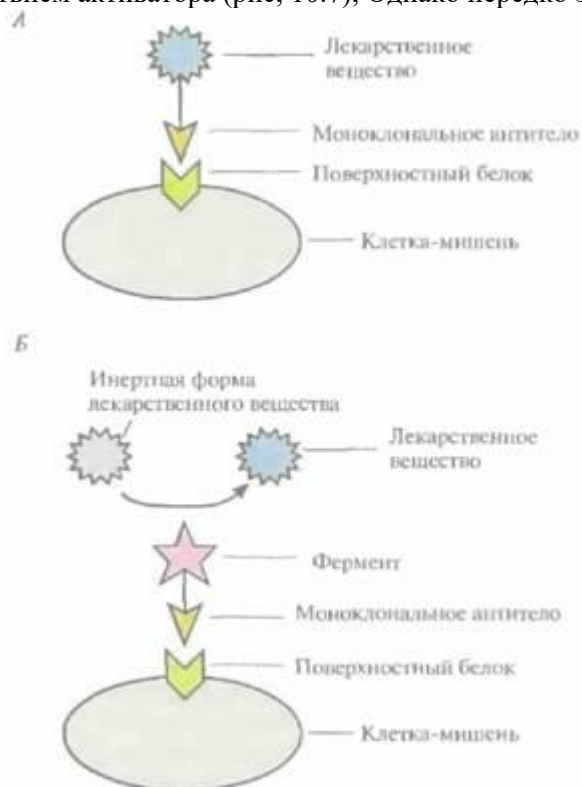


Рис. 10.6. Схематическое изображение системы целевой доставки лекарственного вещества, основанной на использовании моноклональных антител. А. Молекула лекарственного вещества присоединена к моноклональному антителу. Б. К моноклональному антителу присоединен фермент, превращающий инертную форму лекарственного вещества в активную только в непосредственной близости от клетки-мишени. В обоих случаях моноклональное антитело связывается с одним специфическим белком на поверхности клетки-мишени.

система работает недостаточно эффективно, что приводит к закупорке артерий. В таких ситуациях для повышения уровня плазмина в крови было предложено использовать активатор плазминогена в качестве терапевтического средства.

Однако плазмин способен разрушать и предшественник фибрина фибриноген (рис. 10.7), и если уровень последнего в результате терапии с использованием активатора плазминогена снизится слишком сильно, могут произойти обширные внутренние кровотечения. Это привело к необходимости создания тромболитических препаратов, разрушающих только фибрин в



Рис. 10.7. Активация плазминогена с превращением его в плазмин и разрушение плазмином двух субстратов (фибриногена и фибрина) в крови.

тромбе. Ученые исходили из того, что если к активатору плазминогена «пришить» антитело, специфичное к фибрину, то будет происходить только локальное повышение концентрации плазмينا вблизи тромба (рис. 10.8). Для проверки этой гипотезы тканеспецифичный активатор плазминогена был присоединен к моноклональному антителу, специфичному в отношении фибрина. Испытания на модельных системах показали, что комплекс присоединялся к сгусткам крови и лизировал их, не вызывая значительного разрушения фибриногена. Были созданы и другие типы конъюгатов антитело—активатор плазминогена, тоже приводящие к локальному образованию плазмينا, разрушающего кровяные сгустки.



Рис. 10.8. Структура иммунотерапевтического тромболитического агента, К моноклональному антителу, специфичному к фибрину, присоединен активатор плазминогена (АПг). Этот комплекс связывается с фибрином, находящимся в тромбе, активатор плазминогена вызывает накопление плазмينا вблизи тромба, и плазмин лизирует тромб.

### Моноклональные антитела человека

Несмотря на кажущуюся перспективность иммунотерапии, этот метод имеет и ряд ограничений, связанных с применением моноклональных антител животных и процедурой присоединения к ним нужных молекул. Сам процесс химического присоединения весьма неэффективен, присоединение происходит случайным образом, а кроме того, при этом может снижаться ферментативная активность активатора плазминогена или других веществ, используемых в терапии. И наконец, если предполагается многократное введение препарата, необходимо использовать антитела человека, а не животных, чтобы предотвратить возникновение перекрестных иммунных реакций и сенсibilизацию пациента.

Создание специфических антител, не вызывающих перекрестных реакций, представляет собой довольно трудную задачу, поскольку получение антител человека путем традиционной гибридомной технологии сталкивается с рядом проблем.

- Хромосомы человека в клетках, полученных слиянием лимфоцитов человека с клетками мисломы мыши, нестабильны, поэтому трудно получить клетки, способные вырабатывать моноклональные антитела человека.
- Пока не удалось получить эффективные клеточные линии миеломы человека, которые могли бы заменить мышинные.
- Иммунизация человека различными антигенами не проводится по соображениям этического характера.

Таким образом, для получения антител человека необходимо разрабатывать другие подходы.

В одной из схем В-лимфоциты человека, активно продуцирующие специфические антитела, обработали флуоресцентно меченным антигеном, затем с помощью клеточного сортера провели обогащение образца В-лимфоцитами, вырабатывающими эти антитела. Поскольку В-клетки плохо растут в культуре, для улучшения роста их трансформировали вирусом Эпштейна—Барр. Некоторые клоны трансформированных В-кле-

## ВАЖНАЯ ВЕХА

**Полипептид, обладающий действием лейкоцитарного интерферона человека, синтезируется в *E. coli*.****S. Nagata, H. Taira, A. Hall, L. Johnsrud, M. Streuli, J. Ecsödi, W. Boll, K. Cantell, C. Weissmann *Nature* 284: 316-320, 1980**

В конце 70-х— начале 80-х гг. первых, несмотря на то что известно, есть ли клетки молекулярная биотехнология интерферон был очищен более человека, способные стала Привлекать к себе внимание чем в 80 000 раз, его удавалось вырабатывать интерферон в обществности и крупных получать лишь в очень небольших достаточно больших количествах, инвесторов. Одним из количествах, поэтому в то время т, е. существует ли источник биотехнологических продуктов не была известна его точная мол. мРНК интерферона. Несмотря на был интерферон, на который в то масса. Во-вторых, в отличие от все эти трудности, в конце концов время возлагали надежды как на многих белков интерферон не была выделена и чудодейственное средство против обладает легко охарактеризована кДНК, множества вирусных заболеваний идентифицируемой химической кодирующая интерферон. С тех и рака. О выделении кДНК или биологической активностью: пор было обнаружено несколько интерферона человека и его ее оценивали только по снижению разных типов интерферонов. Были последующей экспрессии в цитопатического действия вируса выделены гены нескольких *Escherichia coli* сообщали газеты и животных на культуру клеток, а интерферонов и показана их журналы всего мира. Некоторые это сложный и длительный эффективность при лечении особенности интерферона сделали процесс. В-третьих, в отличие различных вирусных заболеваний, выделение его кДНК особенно от инсулина было неиз- но, к сожалению, интерферон не сложным. Во- стал панацеей.

ток вырабатывают моноклональные антитела человека, взаимодействующие с селектирующим антигеном. К сожалению, выход моноклональных антител был очень небольшим и они обладали низкой антиген связывающей активностью. К тому же вероятность того, что в неиммунизированном организме найдутся секретирующие антитела клетки, которые будут распознавать селектирующий антиген, очень мала.

Еще один подход заключается во введении иммунных клеток человека мутантным мышам, которые практически лишены собственной иммунной системы. После трансплантации иммунных стволовых клеток человека таким мышам, страдающим тяжелым сочетанным иммунодефицитом (*scid*-мыши), они приобретают клетки иммунной системы человека и в ответ на введение антигена могут вырабатывать антитела человека.

Предпринимаются попытки ввести зародышам мышей гены иммуноглобулинов человека с целью создания транс генных мышей, которые в ответ на иммунизацию конкретным антигеном смогут вырабатывать иммуноглобулины человека. Чтобы получить от трансгенных животных клетки, секретирующие специфические моноклональные антитела, можно использовать стандартную гибридную технологию, затем провести скрининг таких положительных клеточных линий и определить, какие из них вырабатывают антитела, кодируемые генами иммуноглобулинов человека. Недавно появилось сообщение о том, что уже получена трансгенная мышь, экспрессирующая нативные формы H- и L-цепей иммуноглобулинов человека.

Трансплантация стволовых клеток иммунной системы человека *scid*-мышам и получение линий трансгенных мышей — весьма трудоемкие способы производства моноклональных антител человека. Поэтому ученые пытаются создать генноинженерные методы получения антител человека, которые можно использовать в качестве терапевтических средств, и эффективных бифункциональных белков, способных связываться с мишенью и разрушать ее.

***Гибридные моноклональные антитела человека и мыши***

Тот факт, что разные участки молекулы иммуноглобулина выполняют разные функции, позволяет модифицировать моноклональное антитело

мыши таким образом, что оно приобретает некоторые сегменты антитела человека, сохраняя в то же время свою исходную антигенсвязывающую специфичность. Такое гибридное антитело называют химерным. Первым участком моноклонального антитела мыши, который был заменен соответствующим участком антитела человека, был Fc-фрагмент. Выбор объяснялся тем, что Fc-фрагмент антитела мыши выполнял роль эффектора иммунного ответа у человека недостаточно хорошо; кроме того, он с большой вероятностью индуцировал образование антител в организме человека. Чтобы снизить иммуногенность и усилить эффекторные функции, провели замену последовательностей ДНК, кодирующих Fv-области L- и H-цепей иммуноглобулина человека, на аналогичные фрагменты специфического моноклонального антитела мыши (рис. 10.9). Такую замену можно осуществить разными путями: реплицировать ДНК *in vitro* с применением олигонуклеотидов в качестве затравки либо использовать субклонированные фрагменты ДНК. Сегменты ДНК, кодирующие химерные цепи, встраивали в экспрессирующий вектор и вводили в культуру В-лимфоцитов, из которой выделяли наработанные антитела.

Химерные антитела, несущие антигенсвязывающий участок моноклонального антитела мыши к поверхностному антигену клеток рака толстой кишки человека, тестировали на больных с раком толстой и прямой кишки. Антитела оставались в кровотоке примерно в шесть раз дольше обычных антител мыши, тем самым оказывая свое действие в течение большего времени. При этом лишь у одного пациента из 10 наблюдался слабо выраженный иммунный ответ. К сожалению, в этих испытаниях не удалось получить противоопухолевого эффекта антител; возможно, это было связано с введением их в слишком малых дозах или с тем, что раковый процесс находился на поздних стадиях. В опытах *in vitro* химерные антитела проявляли высокую эффекторную активность, что позволяет надеяться на успешное их применение в других случаях.

Конструирование химерных молекул, о которых шла речь выше, — это первый этап в создании моноклональных антител мышей и крыс, обладающих сходством с антителами человека. Другой подход состоит в замещении только CDR-участков человеческих антител фрагмента-

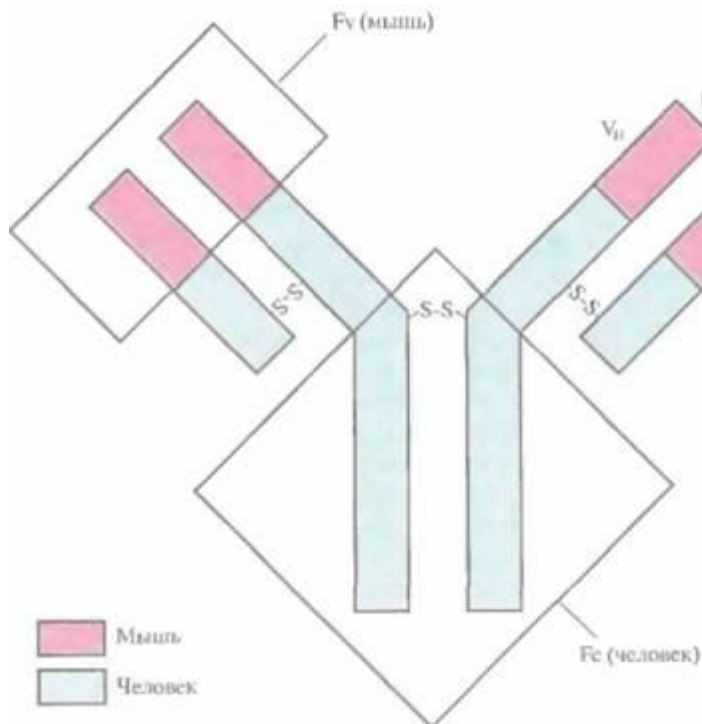
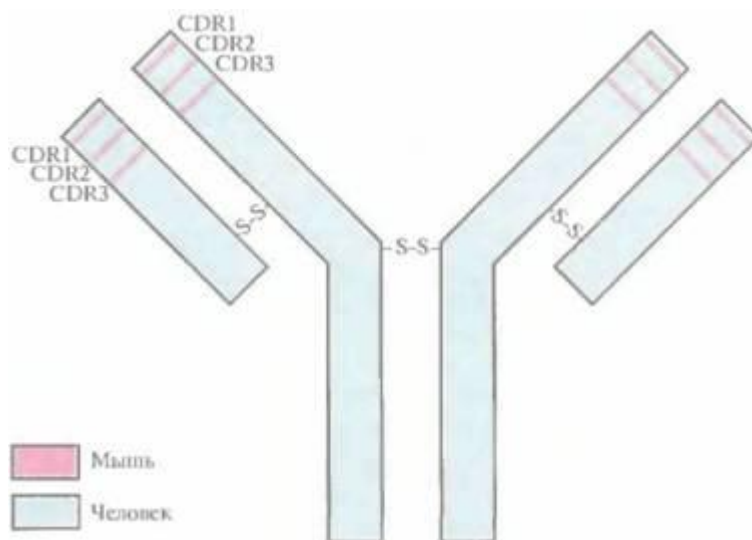


Рис. 10.9. Полученное методом генной инженерии антитело, сходное по своей структуре с антителом человека. Участки генов L- и H-цепей иммуноглобулина человека, кодирующие  $V_L$  и  $V_H$ -домены, заменены последовательностями ДНК, кодирующими  $V_L$  и  $V_H$ -домены иммуноглобулина мыши. Продуктом рекомбинантных генов является химерный иммуноглобулин, обладающий антигенсвязывающей специфичностью моноклонального антитела мыши, эффекторными свойствами Fc-фрагмента иммуноглобулина человека и пониженной иммуногенностью для человека.



Рис. 10.10. Полученное методом генной инженерии антитело, сходное по своей структуре с антителом человека. Сегменты ДНК, кодирующие CDR-участки (CDR1, CDR2 и CDR3) антитела человека, заменены на последовательности, кодирующие CDR-участки H- и L-цепей иммуноглобулина мыши. Продуктом этого рекомбинантного гена является иммуноглобулин с антигенной специфичностью моноклонального антитела мыши (участки, выделенные розовым цветом) и остальными свойствами антитела человека (участки, выделенные голубым цветом).



ми моноклональных антител грызунов (рис. 10.10). Такие «восстановившие форму» антитела человека могут стать эффективным терапевтическим средством, поскольку они по своей антигенсвязывающей способности приближены к исходным моноклональным антителам грызунов.

Моноклональные антитела грызунов, сходные с антителами человека, можно получить, выделив кДНК L- и H-цепей из клеточной линии гибридомы грызунов и амплифицировав их переменные области с помощью ПЦР. В качестве праймеров для амплификации можно использовать олигонуклеотиды, комплементарные высококонсервативным сегментам ДНК, фланкирующим с 5'- и 3'-концов последовательность, кодирующую переменную область. Зная нуклеотидные последовательности кДНК переменных областей легкой и тяжелой цепей ( $V_L$  и  $V_H$ ), легко определить границы CDR, основываясь на том, что соответствующие им последовательности гиперпеременны, в то время как каркасные области относительно консервативны. Исходя из данных о нуклеотидных последовательностях ДНК, кодирующих CDR грызунов, синтезировали шесть пар олигонуклеотидных праймеров. Каждая пара инициировала синтез ДНК, кодирующей одну из шести CDR грызунов: три, локализованных на L-цепи, и три — на H-цепи. Кроме того, на 5'-конце каждого праймера находилось 12 дополнительных нуклеотидов, комплементарных фланкирующим последовательностям каркасных участков ДНК человека, по которым происходило встраивание CDR-ДНК грызунов (рис. 10.11). Далее с помощью олигонуклеотид-направленного мутагенеза осуществляли последовательную замену CDR-ДНК человека амплифицированной CDR-ДНК грызунов — фактическую «пересадку» CDR от грызунов в каркасные участки молекулы антитела человека. Модифицированную таким образом кДНК антител встраивали в векторы экспрессии и трансформировали ими подходящие клетки-хозяева, обычно *E. coli* или клетки млекопитающих, в которых и вырабатывались антитела.

Данный метод предполагает, что за антигенсвязывающую способность антитела отвечают только CDR-участки, а не каркасные области. Однако, если связывание «гибридного» антитела с антигеном происходит недостаточно эффективно, может возникнуть необходимость в замене некоторых аминокислот в каркасных областях с помощью олигонуклеотид-направленного мутагенеза.

К настоящему времени этим методом получено более 50 различных моноклональных антител, обладающих сходством с антителами человека. К сожалению, данная технология, являясь весьма эффективной и универсальной, довольно дорогостоящая и требует больших затрат вре-



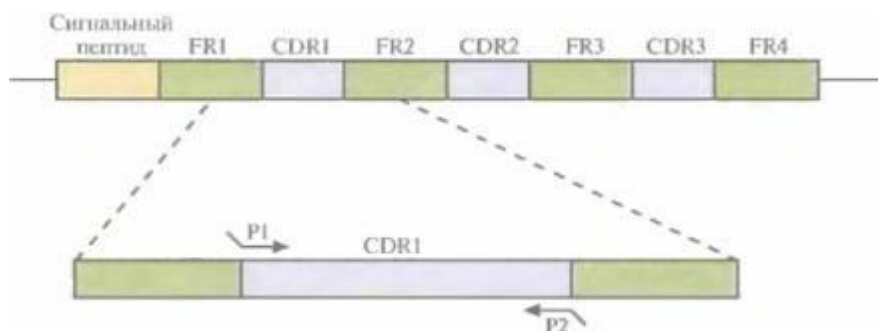


Рис. 10.11. ПЦР-амплификация CDR1-участка, входящего в состав кДНК L-цепи моноклонального антитела грызуна. Олигонуклеотидные праймеры P1 и P2 комплементарны последовательностям ДНК CDR1-участка антитела грызуна. Кроме того, каждый праймер содержит на 5'-конце 12 нуклеотидов, комплементарных каркасным участкам (framework region, FR) кДНК L-цепи антитела человека. Используя шесть пар олигонуклеотидных праймеров — три для  $V_L$ - и три для  $V_H$ -областей, — с помощью ПЦР амплифицировали отдельно каждый из ДНК-сегментов, кодирующих CDR-участки антитела грызуна. Затем, используя олигонуклеотид-направленный мутагенез, заменили ими соответствующие сегменты генов антитела человека. Такая замена оказалась возможной благодаря тому, что амплифицированные фрагменты содержали участки, комплементарные каркасным областям гена антитела человека.

мени. Возможно, более предпочтительным способом получения антител человека и их фрагментов окажется метод, основанный на использовании фаговых «комбинаторных» библиотек, созданных на основе мРНК, полученной из В-клеток неиммунизированных доноров.

### Производство антител с помощью *E. coli*

Гибридомы, подобно большинству других клеточных культур животных, растут относительно медленно, не достигают высокой плотности и требуют сложных и дорогих сред. Получаемые таким образом моноклональные антитела очень дороги, что не позволяет широко использовать их в клинике. Чтобы решить эту проблему, были предприняты попытки создания своего рода «биореакторов» на основе генетически модифицированных бактерий, растений и животных. Для эффективной доставки и функционирования некоторых иммунотерапевтических средств зачастую достаточно одной антигенсвязывающей области антитела (Fab- или Fv-фрагмента), т. е. присутствие Fc-фрагмента антитела необязательно.

На рис. 10.12 представлена методика получения функциональных антител с помощью *E. coli* (рис. 10.12).

1. Используя мРНК, выделенную из вырабатывающих антитела клеток (В-лимфоцитов) мыши или человека, синтезируют кДНК.

2. Проводят отдельную ПЦР-амплификацию кДНК, кодирующих H- и L-цепи.

3. Амплифицированные кДНК обрабатывают специфическими рестрицирующими эндонуклеазами, а затем встраивают в вектор на основе бактериофага  $\lambda$ . кДНК H- и L-цепей содержат разные, характерные для каждой из них эндонуклеазные сайты, что облегчает специфическое встраивание каждой нуклеотидной последовательности в свой вектор. На этом этапе происходит клонирование множества разных сегментов H- и L-цепей (рис. 10.13, A и E).

4. кДНК одной H- и одной L-цепи встраивают в общий «комбинаторный» вектор, так что в бактериофаге синтезируются обе цепи и образуется «полноценный» Fv-фрагмент (рис. 10.13,5).

Синтез H- и L-цепей происходит во время литического цикла бактериофага  $\lambda$ , поэтому можно провести скрининг библиотеки клонов комбинаторных бактериофагов с целью определения их антигенсвязывающей активности.



Рис. 10.12. Создание с помощью *E. coli* комбинаторной библиотеки кДНК  $V_L$ - и  $V_H$ -областей антитела.

На этапе соединения кДНК Н- и L-цепей в одном векторе образуется широкий спектр генов различных антител. Некоторые из них кодируют уникальные сайты связывания, получить которые с помощью обычной гибридомной технологии было бы невозможно. Пул антител млекопитающих включает  $10^6$ — $10^8$  разных антител. Фаговая библиотека содержит примерно столько же клонов, поэтому можно ожидать, что одна комбинаторная библиотека будет вырабатывать такое же количество различных антител (Fv-молекул), как любое млекопитающее. Кроме того, однажды создав исходную комбинаторную библиотеку, можно комбинировать L- и Н-цепи и получать Fv-фрагменты, распознающие необычные эпитопы. Еще большего разнообразия можно достичь, используя неспецифический мутагенез. Поскольку за относительно короткое время можно провести скрининг миллионов фаговых бляшек, идентификация Fv-фрагментов с нужной специфичностью занимает от 7 до 14 дней. Для сравнения: скрининг нескольких сотен гибридных клеточных линий обычно занимает месяцы.

Векторы на основе бактериофага  $\lambda$  не очень пригодны для получения больших количеств белковых молекул. Чтобы решить эту проблему, сконструировали такой вектор, в котором ДНК Н-и L-цепей встраиваются в сайт, фланкированный плазмидной ДНК. Такую плазмиду, содержащую ДНК Н- и L-цепи, можно вырезать из вектора и трансформировать ею *E. coli* (рис. 10.12). Являясь частью плазмиды, ДНК Fv-фрагментов будет многократно реплицироваться в клетках *E. coli* с образованием большого количества продукта, который можно использовать как в диагностических, так и в терапевтических целях.

При создании комбинаторных библиотек вместо фага  $\lambda$  можно использовать нитевидные бактериофаги M13 или fd (рис. 10.14). В этих случаях соответствующий фрагмент антитела синтезируется как часть химерного белка, локализованного на поверхности фаговой частицы. Скрининг комбинаторной библиотеки фрагментов антител можно провести при помощи ферментного иммуносорбентного анализа (ELISA). Суть метода состоит в следующем: образцы (аликвоты) из библиотеки помещают в ячейки планшеты, содержащие антиген-мишень. Ячейки промывают, чтобы удалить несвязанные фаговые частицы. В каждую ячейку вносят конъюгат, состоящий из антитела, связывающегося с белком фаговой оболочки, и фермента. Ячейки промывают для удаления несвязанного конъюгата и добавляют в каждую из них хромогенный субстрат, который расщепляется ферментом, связанным с фагом, и окраши-

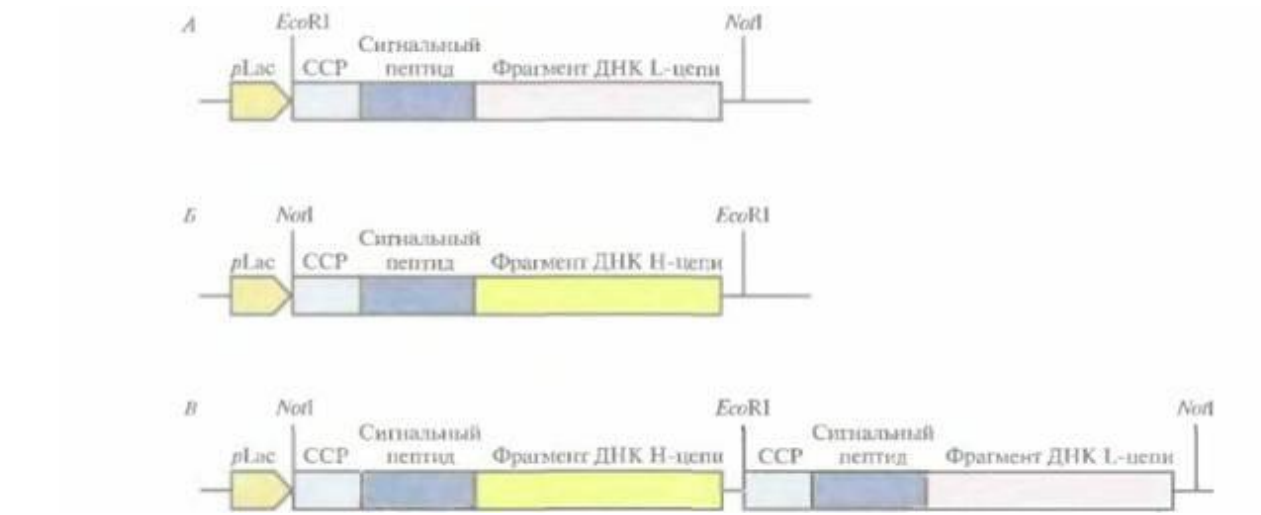


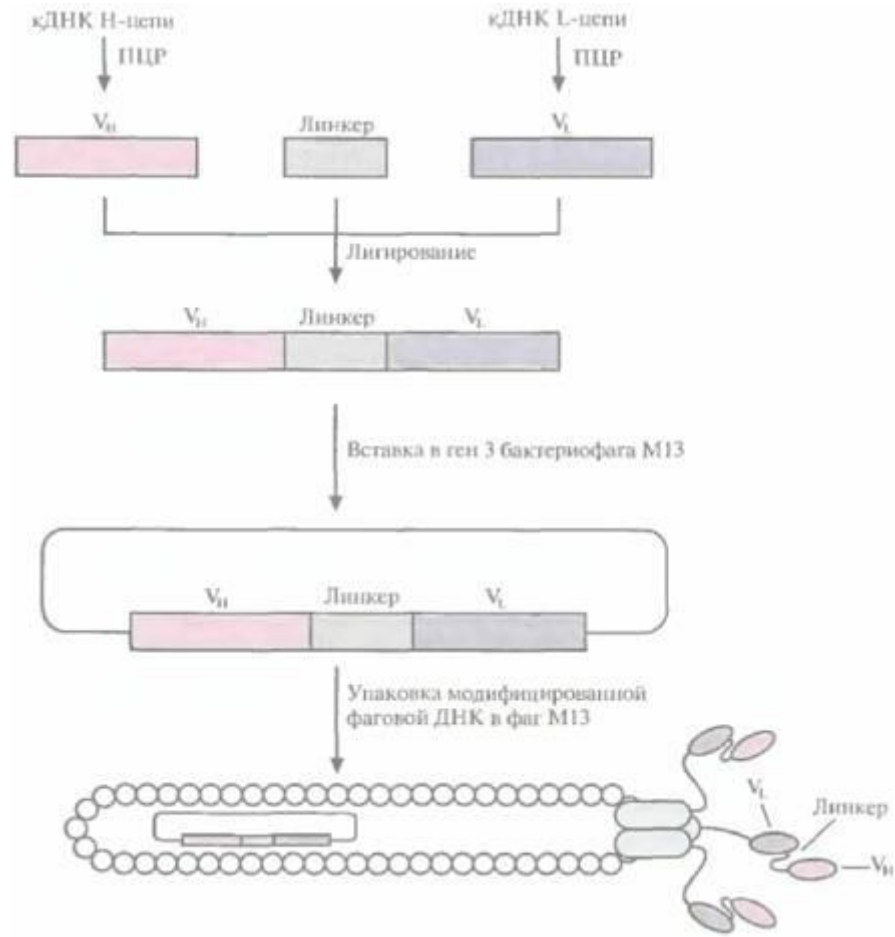
Рис. 10.13. Сконструированные участки ДНК из комбинаторной библиотеки кДНК Fv-фрагмента, клонированные в бактериофаг *a*. *A* и *Б*. Фрагменты ДНК *L*-(*A*) и *H*-(*Б*) цепей раздельно встроили в векторы на основе бактериофага *a*. *В*. Провели рестрикцию каждой *EcoRI*- библиотеки и лигировали фрагменты ДНК из библиотеки *H*-цепи с фрагментами ДНК из библиотеки *L*-цепи, в результате чего получили комбинаторную библиотеку, содержащую все возможные сочетания фрагментов *L*- и *H* -цепей с экспрессией соединенного фрагмента в одном векторе. *pLac* — *lac*-промотор *E. coli*, CCP - сайт связывания с рибосомой.

вайт те ячейки, в которых находятся фаговые частицы, несущие антитела к антигену-мишени. Процесс отбора и последующая очистка бактериофагов, синтезирующих фрагмент антитела, специфичный к нужному антигену, в этом случае гораздо проще, чем тогда, когда проводится подсчет бляшек бактериофага  $\lambda$ . Выделив фаг, синтезирующий желаемый фрагмент антитела, можно экстрагировать кодирующую этот фрагмент ДНК и субклонировать ее в экспрессирующем векторе. Разные варианты антител с повышенным сродством к антигену-мишени можно получать замещением фрагментов ДНК  $V_L$ - и  $V_H$ -областей или с помощью неспецифического мутагенеза.

Разработав методы получения Fv-фрагментов, исследователи попытались определить, способна ли отдельная белковая цепочка, состоящая только из  $V_L$ -и  $V_H$ -доменов, образовать функциональную молекулу, связывающую антиген. Компьютерное моделирование трехмерной структуры предполагаемого одноцепочечного антитела показало, что для образования конформации, необходимой для связывания антигена,  $V_L$ - и  $V_H$ -домены должны быть разделены линкерным пептидом. Имея это в виду,  $V_L$ - и  $V_H$ -ДНК, синтезированные на кДНК-матрице клонированного моноклонального антитела, присоединили к химически синтезированному ДНК-линкеру, создав конструкцию  $V_L$ -ДНК—линкер— $V_H$ -ДНК. Соответствующий одноцепочечный белок синтезировали в *E. coli*, очистили и обнаружили, что его сродство и специфичность к антигену сходны с таковыми ин-тактного моноклонального антитела. Таким образом, с помощью *E. coli* можно без труда получать функциональные одноцепочечные антитела.

Одноцепочечные антитела могут найти широкое применение в клинике в тех случаях, когда проявление Fc-эффекторных функций не является необходимым, а малый размер молекулы (мол. масса одноцепочечного антитела составляет примерно 27 кДа, а иммуноглобулина G — 150 кДа) дает определенные преимущества. Кроме того, к одноцепочечному антителу можно присоединить последовательность, кодирующую тот или иной белок, получив бифункциональную молекулу, которая сможет связываться с определенной мишенью, проявляя при этом специфическую активность.

Рис. 10.14. Создание комбинаторной библиотеки κДНК Fv-фрагментов антител с помощью нитевидного бактериофага M13. κДНК V<sub>L</sub>- и V<sub>H</sub>-областей амплифицировали методом ПЦР, а затем лигировали, используя ДНК короткого линкерного пептида. Полученные фрагменты ДНК, составляющие комбинаторную библиотеку κДНК одноцепочечных антител, встроили в геном фага M13 с присоединением их к фаговому гену 3, который кодирует поверхностный фаговый белок. В M13 с гена 3 синтезируется три белковых молекулы, поэтому каждый рекомбинантный фаг M13, содержащий комбинаторную библиотеку κДНК одноцепочечных антител, будет нести три молекулы химерного белка, состоящего из продукта гена 3 и одноцепочечного антитела.



Был проведен также еще один эксперимент: вместо того чтобы соединять V<sub>L</sub>- и V<sub>H</sub>-цепи коротким пептидом, аминокислоты каркасной области модифицировали таким образом, чтобы между ними образовывался дисульфидный мостик. Эффективность такой стабилизированной дисульфидной связью FV-молекулы, связанной с токсином, разрушающим раковые клетки, сравнили с эффективностью одноцепочечной Fv-молекулы, связанной с тем же токсином (рис. 10.15). Обнаружилось, что стабилизированный дисульфидной связью и одноцепочечный Fv-иммунотоксины обладают одинаковой активностью и специфичностью, но первый в несколько раз стабильнее. Можно предположить, что в каких-то ситуациях стабилизированные Fv-молекулы могут оказаться предпочтительнее одноцепочечных Fv-молекул.

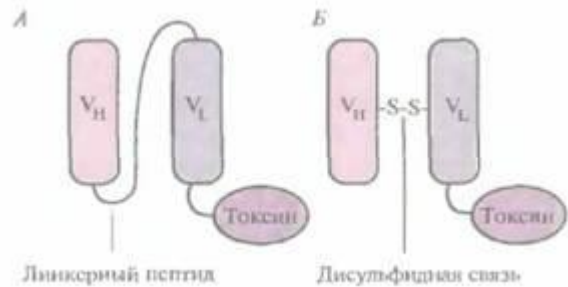


Рис. 10.15. Схематическое изображение одноцепочечного Fv-иммунотоксина (А) и Fv-иммунотоксина, стабилизированного дисульфидной связью (В).

## Лекарственные средства против ВИЧ

Ученым пока не удалось получить вакцину, достаточно эффективную против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), который вызывает развитие синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД). Параллельно с созданием такой вакцины идет поиск других средств, позволяющих замедлить патологический процесс.

ВИЧ поражает один из видов лимфоцитов, а именно Т-хелперы (Т<sub>н</sub>-клетки). В норме в процессе развития иммунного ответа Т<sub>н</sub>-клетки связывают продукты деградации специфических антигенов и высвобождают факторы, стимулирующие другие клетки иммунной системы к участию в иммунном ответе. Т<sub>н</sub>-клетки играют в этом процессе ключевую роль, а при ВИЧ-инфекции они перестают функционировать. Как только вирус внедряется в Т<sub>н</sub>-клетку, он становится защищенным от иммунной системы организма и начинает оказывать свое разрушающее действие на Т<sub>н</sub>-клетки.

- В результате размножения вируса в инфицированной клетке происходит ее лизис.
- Пораженная клетка действует как фабрика по производству ВИЧ-гликопротеина (gp120), который вызывает разрушение Т<sub>н</sub>-клеток и других Т-лимфоцитов.
- Пораженная клетка сливается с другими Т<sub>н</sub>-клетками, формируя синцитий, который не способен выполнять функции, свойственные индивидуальным Т<sub>н</sub>-клеткам.

Основным следствием ВИЧ инфекции является неспособность иммунной системы организма обеспечивать его защиту от обычных бактериальных и вирусных инфекций, которые в конце концов приводят к гибели больного, несмотря на лечение антибиотиками и другими средствами.

На первом этапе ВИЧ-инфекции происходит взаимодействие между гликопротеином оболочки вируса мол. массой 120 кДа (gp120) и рецептором на поверхности Т<sub>н</sub>-клеток — CD4 (рис. 10.16, А). In vitro поражение Т<sub>н</sub>-клеток блокируется антителами к СЕМ; процесс замедляется также при избытке свободного белка CD4. Однако ни один из этих способов не приводит к

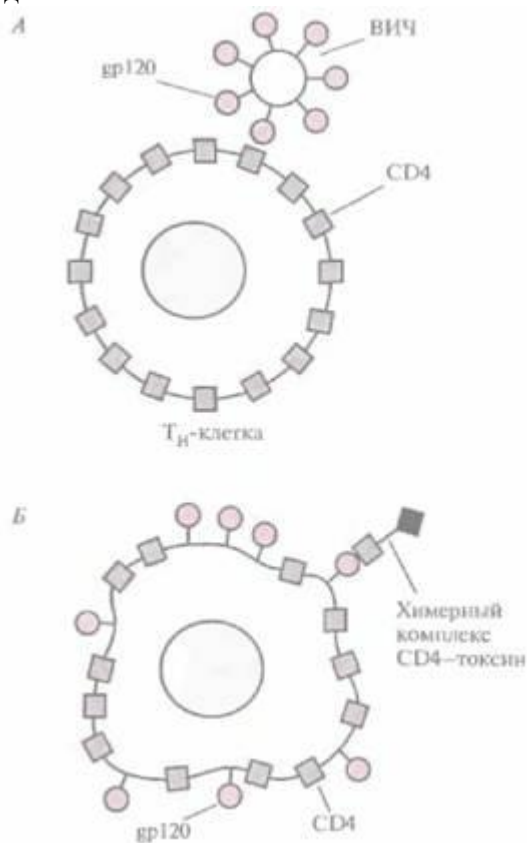


Рис. 10.16. ВИЧ-инфекция и ее терапия, А. Связывание ВИЧ с Т<sub>н</sub>-клеткой опосредуется контактированием вирусного белка gp120 с Т<sub>н</sub>-клеточным поверхностным белком CD4. Б. На поверхности ВИЧ-инфицированной клетки находится белок gp120, с которым может связываться свободный химерный комплекс CD4—токсин. Попад внутрь инфицированной клетки, токсинная часть химерной молекулы убивает ее.

уничтожению вируса. Один из подходов, обеспечивающих как защиту Т<sub>н</sub>-клеток, так и инактивацию вируса, заключается в создании химерного белка, состоящего из фрагмента молекулы CD4 и Fc-фрагмента иммуноглобулина. Свойства этого белка, называемого СВ4-иммуноад-гезином, определяются составными частями его молекулы: CD4-компонент связывает gp120 и блокирует ВИЧ, а иммуноглобулиновый обеспечивает замедление разрушения молекулы в плазме и ее связывание с клетками, несущими



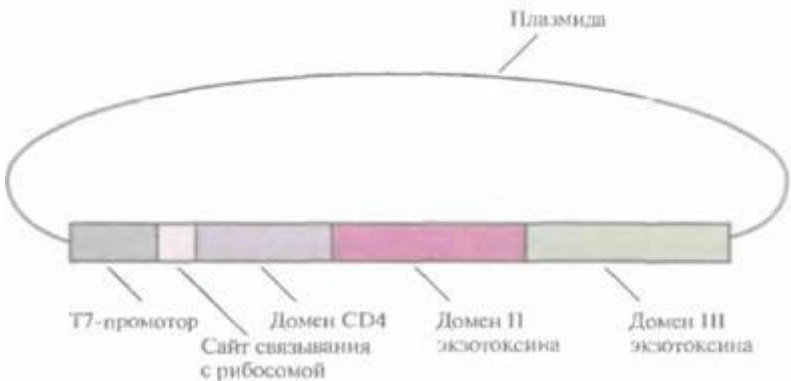
рецептор к антителу. После присоединения CD4-иммуноадгезина к свободной вирусной частице или к инфицированной клетке запускается реакция опосредованной антителами клеточной цитотоксичности, которая обеспечивает уничтожение вируса или пораженной им клетки.

Другой подход, позволяющий контролировать развитие ВИЧ-инфекции, заключается в создании системы мечения ВИЧ-пораженных клеток для их специфического уничтожения. Например, если сшить два фрагмента ДНК, один из которых кодирует рецептор CD4, а другой — внутриклеточный токсин *Pseitdomonas* (экзотоксин А), то мы получим ген, кодирующий химерный белок с комбинированными свойствами (рис. 10.17). Экзотоксин А *Pseudomonas* -это белок с мол. массой 66 кДа, состоящий из трех доменов: домен I отвечает за связывание с клеткой, II — за проникновение белка в клетку, III — за присоединение ADP-рибозы к эукарио-тическому фактору элонгации (EF-2), что приводит к его инактивации. Химерный белок CD4—экзотоксин А *Pseudomonas* вместо домена I содержит большую часть последовательности CD4 (рис. 10.17), в результате чего обладает и цитотоксической активностью экзотоксина *Pseudomonas*, и gp120-связывающей активностью CD4. На поверхности всех ВИЧ-поражен-ных клеток находится гликопротеин gp120, поэтому CD4-домен химерного белка соединяется исключительно с этими клетками. Присоединившись к инфицированной клетке, химерный белок проникает внутрь нее при участии домена II экзотоксина А *Pseudomonas*. Затем экзотоксиновая часть химерного белка инактивирует фактор элонгации EF-2, участвующий в синтезе белка. Это препятствует дальнейшему синтезу белка, что в конце концов приводит к гибели клетки. Таким образом, CD4-домен «помечает» ВИЧ-пораженные клетки, а экзотоксин выступает в роли «наемного убийцы».

Синтезируясь в *E. coli*, химерный белок образует нерастворимые цитоплазматические включения. Их растворяют в гуанидингидрохлориде и выделяют с помощью быстрого разведения и анион-обменной хроматографии. Полученный таким образом белок с успехом выдержал проверку в контрольной культуре клеток. Однако в организме человека на *Pseudomonas*-компонент химерного белка может возникнуть иммунная реакция, и не исключено, что его придется вводить вместе с каким-либо иммуносупрессантом, например циклоспорином. Нужно иметь в виду, что описанный выше способ борьбы с ВИЧ-инфекцией находится на начальной стадии разработки, хотя в будущем и может оказаться весьма эффективным.

Подобные иммунопрепараты обладают достаточно высокой эффективностью, что позволяет применять их в низких дозах и свести к минимуму побочное действие на иммунную систему. Кроме того, они могут оказаться полезными для лечения различных новообразований, а иногда и заменять химиотерапию. На пораженные клетки можно «нацелить" и другие цитотоксичные белки, например дифтерийный токсин или растительный токсин рицин. Впрочем, даже при

Рис. 10.17. Генетически сконструированный химерным комплекс CD4—экзотоксин А *Pseudomonas*. Использован промотор бактериофага T7 *E. coli*.





оптимальном развитии событий пройдет еще несколько лет, прежде чем терапевтическое применение рекомбинантных экзотоксинов станет рутинным.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С помощью клонирования специфических генов и последующей их экспрессии в бактериях получен целый ряд белков, которые можно будет использовать в качестве лекарственных препаратов. Большинство этих белков имеют эукариотическое происхождение, так что для выделения нужного гена сначала получают препарат мРНК, обогащенный интересующими исследователя фракциями, затем создают кДНК-библиотеку и встраивают соответствующую ДНК в подходящий вектор для экспрессии. Произведя обмен участков родственных генов, кодирующих аналогичные белковые домены, или прямо заменяя сегменты клонированного гена, кодирующие функциональные части белка, можно создавать новые модификации таких белков. В качестве лекарственных средств можно использовать и некоторые ферменты. Например, для снижения вязкости слизи, которая накапливается в легких больных муковисцидозом, применяют в виде аэрозоля рекомбинантную ДНКазу I и альгинатлиазу.

С развитием технологии рекомбинантных ДНК и разработкой способов получения моноклональных антител, а также с установлением структуры и функций иммуноглобулинов появился интерес к использованию специфических антител для лечения различных заболеваний. Работа с генами антител облегчается тем, что отдельные домены молекулы антитела выполняют разные функции.

Лекарственные вещества или ферменты можно присоединять к моноклональным антителам или их Fv-фрагментам, специфичным в отношении поверхностных белков определенных клеток, например опухолевых. При этом лекарственное вещество может находиться в инертной форме. Если предполагаются многократные введения таких комплексов, то их иммуноглобулиновый компонент должен представлять собой антитело или фрагмент антитела человека; это позволяет предотвратить развитие перекрестной иммунной реакции и сенсибилизацию больного. Если же предполагается использовать в этих целях моноклональные антитела грызунов, их структуру следует максимально приблизить к структуре антител человека. Для этого в последних достаточно заменить CDR-участки на аналогичные фрагменты антител грызунов. Недавно удалось провести отбор и синтез моноклональных антител человека с помощью *E. coli*.

Генноинженерные методы позволяют получать уникальные лекарственные средства, которые представляют собой комплекс белка, связывающегося со специфическими клетками, например ВИЧ-инфицированными, и токсина. Этот подход пока только разрабатывается, но его перспективы обнадеживают.

## ЛИТЕРАТУРА

**Barbas C.F., III, D. R. Burton.** 1996. Selection and evolution of high-affinity human anti-viral antibodies. *Trends Biotechnol.* **14**: 230-234.

**Bird R. E., B. W. Walker.** 1991. Single chain antibody variable regions. *Trends Botechnol.* **9**: 132-137.

**Brinkmann U., L. H. Pai, D. J. FitzCerald, M. Wülingham, I. Pastan.** 1991. B3(Fv)-PE38KDEL, a single-chain immunotoxin that causes complete regression of a human carcinoma in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 8616-8620.

**Brüggemann M., H. M. Caskey, C. Teale, H. Waldmann, G. T. Williams, M. A. Surani, M. S. Mcubergcr.** 1989. A repertoire of monoclonal antibodies with human heavy chains from transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 6709-6713.

**Bryn R. A., J. Mordenti, C. Lucas, D. Smith, S. A. Marslers, J. S. Johnson, P. Cossum, S. M. Chamow, F. M. Wurm, T. Gregory, J. E. Gronpman, D. J. Capon.** 1990. Biological properties of a CD4 immunoadhesin. *Nature* **344**: 667-670.

**Buchner J., R. Rudolph.** 1991. Renaturation, purification and characterization of recombinant Fab-fragmnls produced in *E. coli*. *Bio/Technology* **9**: 157-162.

- Burton D. R.** 1991- Human and mouse monoclonal antibodies by repertoire cloning. *Trends Biotechnol.* 9: 169-175.
- Capon D. J., S. M. Chamow, J. Mordent!, S. A. Marsters, T. Gregory, H. Mitsuya, R. A. Bym, C Lucas, F. M. Wurm, J. E. Groopraan, S. Broder, D. H. Smith.** 1989. Designing CD4 immunoadhesins for AIDS therapy. *Nature* 337: 525-530.
- Chamow S. M., A. Ashkenazi.** 1996. Immunoadhesins: principles and applications. *Trends Biotechnol.* 14: 52-60.
- Chaudhary V, K., T. Mizukami, T. R. Fuerst, D. J. FitzGerald, B. Moss, L Pastan, E, A. Berger,** 1988. Selective killing of HIV-infected cells by recombinant human *CD4-Pseudomonas* exotoxin hybrid protein. *Nature* 335: 369-372.
- Chester K. A-, R. E. Hawkins.** 1995. Clinical issues in antibody design. *Trends Biotechnol.* 13: 294—300.
- Chiswell D. J., J. McCafferty.** 1992. Phage antibodies: will new 'coliclonal' antibodies replace monoclonal antibodies? *Trends Biotechnol.* 10: 80-84.
- Collet T. A., P. Roben, R. O Kennedy, C. F. Barbas III, D. R. Burton, R. A. Lerner.** 1992. A binary plasmid system for shuffling combinatorial antibody libraries. *Proc. Natl. Acad. Sei. USA* 89: 10026-10030.
- Cunningham B. C., J. A. Wells.** 1991. Rational design of receptor-specific variants of human growth hormone. *Pn>c. Natl. Acad. Set. USA* 88: 3407-3411.
- Davis G. T., W. D. Bedzyk, E. W. Voss, T. W. Jacobs.** 1991. Single chain antibody (SCA) encoding genes: one-step construction and expression in eukaryotic cells, *Bio/Technology* 9:165-169.
- Dewerchin M., D. Collen.** 1991. Enhancement of the thrombolytic potency of plasminogen activators by conjugation with clot-specific monoclonal antibodies. *Bioconjugaie Chem.* 2: 293—300.
- Gram H., L. A. Marconi, C. F. Barbas III, T. A. Collet, R. A. Lerner, A. S. Kang.** 1992. *In vitro* selection and affinity maturation of antibodies from a naive combinatorial immunoglobulin library. *Proc. Natl. Acad. Sei. Ÿ&489: 3576-3580.*
- Harris W. J.** 1994. Humanizing monoclonal antibodies for in vivo use. *Animal Cell Biotechnol.* 6: 259-279.
- Hodgson ,l.** 1991, Making monoclonals in microbes. *Bio/Technology* 9:421^125.
- Huennekens F. M.** 1994. Tumor targeting: activation of prodrugs by enzymemonoclonal antibody con-jugates. *Trends Biotechnol.* 12: 234-239.
- Huse W. D., L. Sastry, S. A. Iverson, A. S. Kang, M. Alting-Mees, D. R. Burton, S. J. Benkovfc, R. A. Lerner.** 1989. Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda. *Science* 246: 1275-1281.
- Johnson I. S.** 1983, Human insulin from recombinant DNA technology. *Science* 219: 632-637.
- Little M., F. Breitling, S. Dübel, P. Fuchs, M. Bramiage).** 1995. Human antibody libraries in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 41: 187-195.
- LoBuglio A. G., R. H. Wheeler, J. Trang, A. Haynes, K. Rogers, E. B. Harvey, L. Sun, J. Ghraycb, M. B. Khazaeli.** 1989. Mouse/human chimeric monoclonal antibody in man: kinetics and immune response, *Proc. Natl. Acad. Sei. USA* 86: 4220-4224.
- Marks J. D., A. D. Griffiths, M. Malmqvist, T. P. Oackson, J. M. Bye, G. Winter.** 19Y2. Bypassing immunization: building high affinity antibodies by chain shuffling. *Bio/Technology* 10: 779-783.
- Meyer F., A. Hinnen, A. Meister, M. G. Grutier, S. Alkan.** December 1989. Hybrid inerlcrons. U.S. patent 4, 885,166.
- Mullinax R. L., E. A. Gross, J. R. Amberg, B. N. Hay, H. H. Hogrefe, M. M. Kubitz, A. Greener, M. Alting-Mees, D. Ardourel, J. M. Short, J. A. Sorge, B. Shopes.** 1990. identification of human antibody fragment clones specific for tetanus toxoid in a bacteriophage λ immunoex-pression library. *Proc. Natl. Acad. Sei. USA* 87: 8095-8099.
- Murata K., T. Inose, T. Hisano, S. Abe, Y. Yonemnto, T. Yaniashita, M. Takagi, K. Sakaguchi, A. Kimura, T. Imanaka.** 1993. Bacterial alginate lyase: enzymology, genetics and appb'cation. */.* *Ferment. Bioeng.* 76:427-437,
- Nagata S., H. Taira, A. Hall, L. Johnsruc!, M. Streu«, J. Escodi, W. Boll, K. CanteU, C. Weismann.** 1980. Synthesis in *E. coli* of a polypeptide with human leukocyte interferon activity. *Nature* 284: 316-320.
- Pastan I., D. FitzGerald.** 1991. Recombinant toxins for cancer treatment. *Science* 254: 1173-1177.
- Pluckthun A.** 1991. Antibody engineering: advances from the use of *E. coli* expression systems, *Bio/Technology* 9; 545-551.

**Primrose S. B.** 1986. The application of genetically engineered microorganisms in the production of drugs. / *Appl. Bacterial*. **61**:99-116.

**Queen C., W. P. Schneider, H. E. Selfck, P. W. Payne, N. F. Landolf, J. F. Duncan, N. M. Avdalovic, IVL Levitt, R. P. Junghans, T. A. WaWmanih** 1989. A humanized antibody that binds to the inter-leukin 2 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 10029-10033.

**Reiter Y., U. Brinkmann, K. O. Webber, S.-H. Jung, I. Pastan.** 1994. Engineering interchain disulfide bonds into conserved framework regions of Fv fragments: improved biochemical characteristics of recombinant immunotoxins containing disulfide-stabilized Fv. *Protein Eng.* **7**:697-704.

**Riechmann L., M. Clark, H. Waldmann, and G. Winter.** 1988. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* **332**: 323-327.

**Taniguchi T., Y. Fiyii-Kuriyama, M. Muramatsu.** 1980, Molecular cloning of human Interferon cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**:4003-4006.

**van Leen R. W., J. G. Bakhuis, R. F. W. C. van Bedthorn, H. Burger, L. C. J. Dorssers, R. W. J. Hommes, P. J. Lemson, B. Noordam, N. L. M. Persoon, G. Wagemaker,** 1991. Production of human inter-leukin-3 using industrial microorganisms. *Bio/Technology* **9**: 47-52.

**Vaughan T. J., A. J. Williams, K. Pritchard, J. K. Osbourn, A. R. Pope, J. C. Earnshaw, J. M. Cafferty, R. A. Hodits, J. W. Kon, K. S. Johnson.** 1991. Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library, *Nat. Biotechnol.* **14**: 309-314.

**Waldmann T. A.** 1991, Monoclonal antibodies in diagnosis and therapy. *Science* **252**: 1657—1662.

**Winter G., C. Milstein.** 1991. Man-made antibodies, *Nature* **349**: 293-299.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Вам нужно клонировать и экспрессировать фрагмент ДНК, кодирующий интерферон человека, у вас нет нужного ДНК-зонда для гибридизации, но вам удалось выделить линию клеток человека, в которых можно индуцировать синтез интерферона с интенсивностью, превышающей фоновую примерно в 100 раз. Какую стратегию клонирования и экспрессии этой ДНК вы выберете?

2. Что такое Fc-фрагмент молекулы антитела? Fab-фрагмент? Fv-фрагмент? CDR-участок?

3. Как осуществляется координированный синтез легкой и тяжелой цепей антитела в *E. coli*?

4. Какова роль ДНКазы I и альгинатлиазы при лечении муковисцидоза?

5. Как зарегистрировать синтез альгинатлиазы, кодируемой клонированным геном, в трансформированных клетках *E. coli*?

6. Что такое комбинаторная библиотека кДНК?

7. Как с помощью бактериофага M13 можно отбирать Fv-фрагменты, связывающиеся со специфическими антигенами-мишенями?

8. Что такое стабилизированная дисульфидными связями и одноцепочечная Fv-молекула?

9. Как, присоединяя ферменты к моноклональным антителам или их Fv-фрагментам, можно получать лекарственные средства?

10. Как получить моноклональные мышиные антитела, максимально близкие по структуре к антителам человека? Почему они необходимы?

11. Опишите способ получения терапевтического средства, которое «помечает» и уничтожает специфические клетки.

# ГЛАВА 11.

## Вакцины

Вакцинация способствует формированию у реципиента иммунитета к патогенным микроорганизмам и тем самым защищает его от инфекции. В ответ на пероральное или парентеральное введение вакцины в организме хозяина вырабатываются антитела к патогенному микроорганизму, которые при последующей инфекции приводят к его инаktivации (нейтрализации или гибели), блокируют его пролиферацию и не позволяют развиваться заболеванию.

Эффект вакцинации открыл более 200 лет назад — в 1796 г. — врач Эдвард Дженнер. Он доказал экспериментально, что человек, перенесший коровью оспу, не очень тяжелую болезнь крупного рогатого скота, становится невосприимчивым к оспе натуральной. Натуральная оспа — высококонтагиозное заболевание с высокой смертностью; даже если больной не погибает, у него нередко возникают различные уродства, психические расстройства и слепота. Дженнер публично провел прививку коровьей оспы 8-летнему мальчику Джеймсу Фиппсу, используя для этого экссудат из пустулы больной коровьей оспой, а затем через определенное время дважды инфицировал ребенка гноем из пустулы больного натуральной оспой. Все проявления заболевания ограничились покраснением в месте прививки, исчезнувшим через несколько дней.

Ранее такие инфекционные болезни, как туберкулез, оспа, холера, брюшной тиф, бубонная чума и полиомиелит, были настоящим бичом для человечества. С появлением вакцин, антибиотиков и внедрением мер профилактики эти эпидемические болезни удалось взять под контроль. Однако защитные меры со временем становились неэффективными, и возникали новые вспышки заболеваний. В 1991 г. эпидемия холеры поразила Перу; в течение трех следующих лет было выявлено примерно 1 млн. заболевших, несколько тысяч из них умерли. К сожалению, против многих болезней человека и животных вакцин не существует. Сегодня во всем мире более 2 млрд. людей страдают заболеваниями, которые можно было бы предотвратить с помощью вакцинации. Вакцины могут оказаться полезными и для профилактики постоянно появляющихся «новых» болезней (например, СПИДа).

Как правило, современные вакцины создают на основе убитых (инактивированных) патогенных микроорганизмов либо живых, но неvirulentных (аттенуированных) штаммов. Для этого штамм дикого типа выращивают в культуре, очищают, а затем инактивируют или модифицируют таким образом, чтобы он вызывал иммунный ответ, достаточно эффективный в отношении virulentного штамма. Несмотря на значительные успехи в создании вакцин против таких заболеваний, как краснуха, дифтерия, коклюш, столбняк, оспа и полиомиелит, производство современных вакцин сталкивается с целым рядом ограничений.

- Не все патогенные микроорганизмы удастся культивировать, поэтому для многих заболеваний вакцины не созданы.
- Для получения вирусов животных и человека необходима дорогостоящая культура животных клеток.
- Титр вирусов животных и человека в культуре и скорость их размножения часто бывают очень низкими, что удорожает производство вакцин.

- Необходимо строго соблюдать меры предосторожности, чтобы не допустить инфицирования персонала.
- При нарушении производственного процесса в некоторые партии вакцины могут попасть живые или недостаточно ослабленные вирулентные микроорганизмы, что может привести к неумышленному распространению инфекции.
- Атенуированные штаммы могут ревертировать к исходному штамму, поэтому необходимо постоянно контролировать вирулентность.
- Некоторые заболевания (например, СПИД) нельзя предупреждать с помощью традиционных вакцин.
- Большинство современных вакцин имеют ограниченный срок годности и сохраняют активность только при пониженной температуре, что затрудняет их использование в развивающихся странах.

В последнее десятилетие, с развитием технологии рекомбинантных ДНК, появилась возможность создать новое поколение вакцин, не обладающих недостатками традиционных вакцин. Для их разработки применяют методы генной инженерии.

- Патогенный микроорганизм модифицируют, делегируя гены, ответственные за вирулентность. Способность вызывать иммунный ответ при этом сохраняется. Такой микроорганизм можно безбоязненно использовать в качестве живой вакцины, поскольку выращивание в чистой культуре исключает возможность спонтанного восстановления целого гена,
- Создают живые непатогенные системы переноса отдельных антигенных детерминант неродственного патогенного организма. Такая система переноса способствует развитию выраженного иммунного ответа на патогенный микроорганизм.
- Если патогенные микроорганизмы не растут в культуре, можно изолировать, клонировать и экспрессировать в альтернативном хозяине (например, в *E. coli* или линии клеток млекопитающих) гены тех белков, которые содержат основные антигенные детерминанты, и

использовать эти белки как «субъединичные», вакцины (см, следующий раздел). • Некоторые патогенные микроорганизмы действуют опосредованно, вызывая развитие аутоиммунной реакции на инфицированные клетки организма-хозяина. Для таких заболеваний можно создать систему специфического уничтожения клеток-мишеней, сконструировав ген, кодирующий химерный белок, одна часть которого будет связываться с инфицированной клеткой, а другая — уничтожать ее. Эта система не является истинной вакциной, хотя она и действует только на инфицированные клетки, устраняя саму причину развития аутоиммунной реакции.

К вакцинам для животных предъявляются менее жесткие требования, поэтому первыми вакцинами, полученными с помощью технологии рекомбинантных ДНК, были вакцины против ящура, бешенства, дизентерии и диареи поросят. Создаются и другие вакцины для животных, а в скором времени появятся и рекомбинантные вакцины, предназначенные для человека (табл. 11.1).

### Субъединичные вакцины

Как правило, вакцины содержат неповрежденные патогенные микроорганизмы, но при этом неживые или аттенуированные. Антитела, вырабатываемые в ответ на их введение, связываются с поверхностными белками патогенного организма и запускают иммунный ответ. В связи с этим возникает вопрос: должна ли вакцина содержать целые клетки или лишь какие-то специфические поверхностные компоненты? Что касается вирусов, то, как было показано, для выработки в организме-хозяине антител в ответ на вирусную инфекцию достаточно очищенных поверхностных белков вируса (белков капсида или внешней оболочки) (рис. 11.1). Вакцины, содержащие лишь отдельные компоненты патогенного микроорганизма, называют «субъединичными»; для их разработки с успехом используется технология рекомбинантных ДНК.

Субъединичные вакцины имеют свои достоинства и недостатки. Достоинства состоят в том, что препарат, содержащий очищенный иммуно-

Таблица 11.1. Патогенные микроорганизмы, против которых в настоящее время разрабатываются вакцины

| Микроорганизм                            | Заболевание   |
|--|---|
| Вирусы                                   |   |
| Вирус ветряной оспы— опоясывающего лишая | Ветряная оспа                                       |
| Цитомегаловирус                          | Постнатальные инфекции и снижение иммунного статуса |
| Вирус Денге                              | Геморрагическая лихорадка                           |
| Вирус гепатита А                         | Высокая температура, поражение печени               |
| Вирус гепатита В                         | Хроническое поражение печени                        |
| Вирус простого герпеса типа 2            | Язвы гениталий                                      |
| Вирусы гриппа А и В                      | Острые респираторные заболевания                    |
| Вирус японского энцефалита В             | Энцефалит   |
| Вирус парагриппа                         | Воспаление верхних дыхательных путей                |
| Вирус бешенства                          | Энцефалит   |
| Респираторно-синцитиальный вирус         | Поражение верхних и нижних дыхательных путей        |
| Ротавирус                                | Острый гастроэнтерит новорожденных                  |
| Вирус желтой лихорадки                   | Поражение сердца, почек и печени                    |
| Вирус иммунодефицита человека            | СПИД  |
| Бактерии                                 |   |
| <i>Vibrio cholerae</i>                   | Холера  |
| Энтеротоксичные штаммы <i>E. coli</i>    | Диспепсия   |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i>             | Гонорея   |
| <i>Haemophilus influenzae</i>            | Менингит, сепсис                                    |
| <i>Mycobacterium leprae</i>              | Проказа   |
| <i>Neisseria meningitidis</i>            | Менингит  |
| <i>Bordetella pertussis</i>              | Коклюш  |
| Штаммы <i>Shigella</i>                   | Дизентерия  |
| <i>Streptococcus</i> группы А            | Скарлатина, ревматическая атака, ангина             |
| <i>Streptococcus</i> группы В            | Сепсис, уrogenитальная инфекция                     |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i>          | Пневмония, менингит                                 |
| <i>Clostridium tetani</i>                | Столбняк  |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i>        | Туберкулез  |
| <i>Salmonella typhi</i>                  | Брюшной тиф   |
| Паразиты                                 |   |
| <i>Onchocerca volvulus</i>               | «Речная слепота»                                    |
| <i>Leishmania</i> spp.                   | Поражения кожи и внутренних органов                 |
| <i>Plasmodium</i> spp.                   | Малярия   |
| <i>Schistosoma mansoni</i>               | Шистосомоз  |
| <i>Trypanosoma</i> spp.                  | Сонная болезнь (американский трипаносомоз)          |
| <i>Wuchereria bancrofti</i>              | Филяриатоз  |

генный белок, стабилен и безопасен, его химические свойства известны, в нем отсутствуют дополнительные белки и нуклеиновые кислоты, которые могли бы вызывать нежелательные побочные эффекты в организме-хозяине. Недостатки заключаются в том, что очистка специфического белка стоит дорого, а конформация выделенного белка может отличаться от той, которую он имеет in situ (т. е. в составе вирусного капсида или оболочки), что может приводить к изменению его антигенных свойств. Решение о производстве субъединичной вакцины принимается с учетом всех имеющих отношение к делу биологических и экономических факторов.



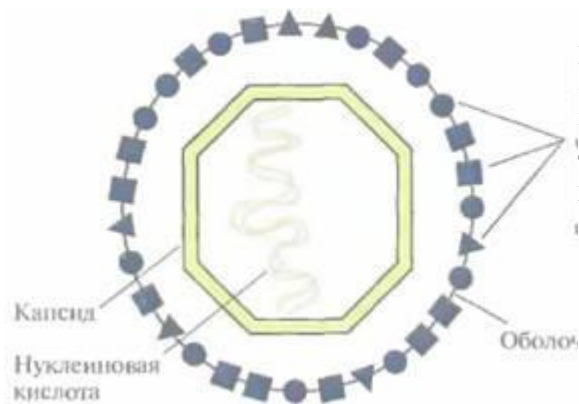


Рис. 11.1. Строение вируса животных. Геном вируса обычно представлен относительно небольшой молекулой нуклеиновой кислоты (одно- или двухцепочечной ДНК или РНК длиной от 3 до 200 т. п. н.), заключенной в белковый капсид. У некоторых вирусов капсид окружен еще и белковой оболочкой.

*Противогерпетические вакцины*

Вирус простого герпеса (HSV, *herpes simplex virus*) вызывает инфекционные заболевания генерализованного или местного характера (тяжелые поражения глаз, энцефалит, урогенитальные инфекции и т. д.). Кроме того, он является онкогенным, поэтому вакцинация убитым или аттенуированным вирусом сопряжена с определенным риском развития рака. Для защиты от HSV-инфекции можно использовать неонко-генную субъединичную вакцину.

Для создания любой субъединичной вакцины прежде всего нужно идентифицировать те компоненты патогенного микроорганизма, которые индуцируют выработку антител. В случае HSV типа 1 (HSV-1) таким компонентом является гликопротеин D оболочки (gD). В ответ на введение этого гликопротеина мышам у них вырабатываются антитела, нейтрализующие интактный HSV. Ген gD HSV-1 был изолирован, клонирован в одном из экспрессирующих векторов в клетках млекопитающих и введен в яйцеклетки китайского хомячка (CHO), в которых в отличие от *E. coli* происходит гликолизирование чужеродных белков. Полноразмерный ген gD кодирует белок, в норме связывающийся с мембраной клетки млекопитающего (рис. 11.2, А). Такой белок труднее очистить, чем раствори-

мый, поэтому ген gD модифицировали, удалив ту его часть, которая кодирует С-концевой трансмембранный домен (рис. 11.2, Б). Затем модифицированным геном трансформировали CHO-клетки, которые гликозилировали белковый продукт и секретировали его во внешнюю среду, поскольку он не мог встраиваться в клеточную мембрану. Лабораторные испытания показали, что антитела, вырабатываемые в ответ на введение модифицированного белка gD, эффективны в отношении как HSV-1, так и HSV-2.

*Противоящурные вакцины*

Вирус ящура (FMDV, foot-and-mouth disease vims) в высшей степени вирулентен и вызывает массовую гибель крупного рогатого скота и свиней. Для защиты от FMDV-инфекции используют вакцину, содержащую вирус, инактивированный фор-

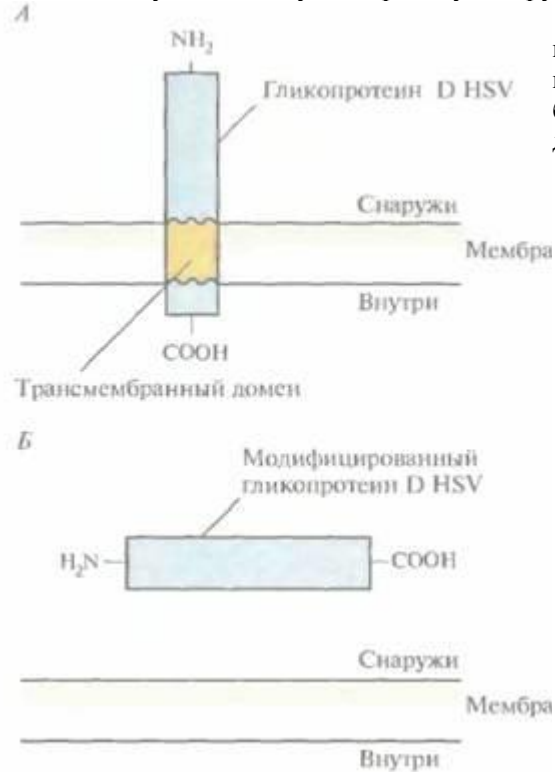


Рис. 11. 2. А. Молекула gD HSV-1 с транс мембранным доменом, погруженным в плазматическую мембрану. Б. Растворимый белок gD, не содержащий трансмембранного домена.

малином. В мире ежегодно производится примерно 1 млрд. доз этой вакцины.

Основной антигенной детерминантой, индуцирующей образование антител, является вирусный капсидный белок 1 (VP1, viral protein 1). Это более слабый антиген, чем интактные вирусные частицы, но все же он индуцирует образование антител и обеспечивает защиту животных от инфекции. Поэтому были предприняты попытки клонировать VP1-ген.

Геном FMDV представляет собой одноцепочечную РНК. Поэтому сначала синтезировали полноразмерную двухцепочечную кДНК длиной примерно 8000 п. н. Затем ее расщепили с помощью рестрицирующих эндонуклеаз и клонировали полученные фрагменты в экспрессирующем *E. coli*-векторе. Продукт кодирующей последовательности VP1 -гена идентифицировали иммунологическими методами как часть слитого (химерного) белка, синтез которого контролируется системой  $p^L$ -проМОТОр—сI-репрессор. Белок состоит из 396 аминокислотных остатков, содержит часть молекулы репликазы бактериофага MS2 и полноразмерный VP1-белок FMDV, благодаря чему он и индуцирует выработку нейтрализующих FMDV антител.

Получить разрешение на применение вакцины, содержащей химерный белок, очень трудно, поэтому, вероятно, придется субклонировать VP1-последовательность в другом экспрессирующем векторе. Так или иначе, субъединичная вакцина против ящура скоро будет готова для проведения доклинических испытаний.

### Противотуберкулезные вакцины

Туберкулез — системное инфекционное заболевание, широко распространенное во всем мире. Его возбудителем является бактерия *Mycobacterium tuberculosis*. Она инфицирует разные ткани и органы (чаще всего легкие) и приводит к гибели клеток. У пациентов наблюдаются лихорадка, потеря веса, а в отсутствие лечения заболевание заканчивается смертью. По оценкам, этим патогенным микроорганизмом инфицировано около 2 млрд. людей, а туберкулез ежегодно уносит примерно 3 млн. жизней. Последние 50 лет для лечения туберкулеза использовали антибиотики, но уже появилось множество устойчивых к ним штаммов *M. tuberculosis*, так что заболевание, казавшееся побежденным, вновь стало серьезной проблемой.

В настоящее время в ряде стран в качестве противотуберкулезной вакцины используют один из штаммов *Mycobacterium bovis*, бациллу Кальмета—Герена (BCG, bacillus Calmette—Guérin). Однако эффективность такого подхода вызывает сомнения по двум причинам: 1) живые BCG-клетки могут вызвать серьезное заболевание у лиц со сниженным иммунным статусом (например, у больных СПИДом); 2) лица, которым ввели BCG-вакцину, дают положительный ответ на обычную процедуру выявления вызывающих туберкулез бактерий, что не позволяет отличить их от больных туберкулезом. В связи с этим в некоторых странах, в том числе и в США, BCG-вакцина к использованию не разрешена. В попытках создания более безопасной и эффективной субъединичной противотуберкулезной вакцины были изучены иммунопротективные свойства очищенных внеклеточных белков *M. tuberculosis*. Из жидкой бактериальной культуры выделили и очистили шесть основных из 100 секретируемых белков, и каждый из них по отдельности, а затем различные их комбинации использовали для иммунизации морских свинок. Животным вводили в виде аэрозоля примерно 200 живых клеток *M. tuberculosis*, что является для них весьма высокой дозой. Через 9—10 нед животных умерщвляли и исследовали их легкие и селезенку на предмет присутствия этой патогенной бактерии. При введении некоторых комбинаций очищенных белков потеря веса, поражение легких и селезенки и уровень смертности были такими же, как и при иммунизации живой BCG-вакциной. Теперь нужно провести сравнение эффективности белков *M. tuberculosis*, полученных с помощью технологии рекомбинантных ДНК, с эффективностью секреторных белков и разработать безопасную и эффективную вакцину для профилактики туберкулеза у человека.

### Пептидные вакцины

Далее возникает следующий вопрос: может ли небольшой участок белковой молекулы (домен) служить эффективной субъединичной вакциной и индуцировать выработку антител? Интуитивно кажется, что те домены, которые доступны

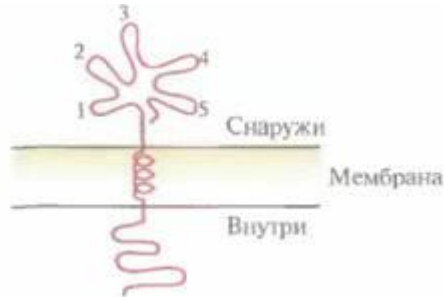


Рис. 11.3. Обобщенный мембраносвязанный белок, внешние эпитопы (1—5) которого могут индуцировать иммунный ответ.

для антитела (т. е. те, которые находятся на поверхности вируса), обладают иммуногенными свойствами, а внутренние домены несущественны, если только они не влияют на конформацию иммуногенного домена (рис. 11.3). Если это предположение верно, то короткие пептиды, имитирующие эпитопы (антигенные детерминанты), можно использовать для создания вакцин.

Имея все это в виду, синтезировали химическими методами домены VP1 FMDV и проверили возможность создания на их основе пептидных вакцин. Каждый из пептидов, соответствующих аминокислотным остаткам 141—160, 151—160 и 200—213 С-концевого участка VP1 и аминокислотным остаткам 9—24, 17—32 и 25—41 М-концевого участка, сшили по отдельности с инертным



Рис. 11.4. Короткие пептиды, сшитые с белком-переносчиком и служащие основой пептидной вакцины.

белком-переносчиком (гемоцианином моллюска фиссурелии), чтобы предотвратить их разрушение, и ввели морским свинкам (рис. 11.4). Синтез антител в количестве, достаточном для защиты животного от последующих FMDV-инфекций, наблюдался только при введении пептида 141—160. Введение же целого VP1 или пептидов 9—24, 17—32 и 25—41 индуцировало синтез антител в меньших количествах.

Более длинный пептид, состоящий из аминокислотных остатков 141 — 158 и 200—213, которые были соединены двумя пролиновыми остатками, индуцировал эффективный синтез антител у морских свинок даже в том случае, когда он не был сшит с белком-носителем. Эта «двухпептидная» молекула оказалась эффективнее любого изолированного пептида и блокировала пролиферацию FMDV у крупного рогатого скота и морских свинок.

Эти результаты являются весьма многообещающими, однако количество (доза) пептидного материала, необходимого для индукции иммунного ответа, примерно в 1000 раз выше, чем в случае убитой FMDV-вакцины. Чтобы решить эту проблему, фрагмент ДНК, кодирующий пептид из аминокислотных остатков 142—160 VP1 FMDV, сшили с геном, кодирующим коро-вирусный белок гепатита В (HBsAg). При экспрессии этого химерного гена в *E. coli* или культуре животных клеток его продукты — белковые молекулы — в процессе самосборки образовывали стабильные «27нм-частицы», на поверхности которых находился пептид из VP1 FMDV. Эти частицы обладали высокой иммуногенностью. Таким образом, HBsAg можно использовать в качестве эффективной молекулы-носителя синтетических пептидов. Сравнение иммуногенности различных пептидных FMDV-вакцин, содержащих домен 142—160 VP1-белка, проведенное на морских свинках, показало, что иммуногенность химерного белка, состоящего из HBsAg и указанного домена, в 10 раз ниже, чем у инактивированных FMDV-частиц, в 35 раз выше, чем у химерного белка, содержащего β-галактозидазу *E. coli* и домен 137-162 из VP1 FMDV, и в 500 раз выше, чем у свободного синтетического пептида, состоящего из аминокислотных остатков 142—160. Поскольку синтетический пептид, сшитый с HBsAg, образует 27нм-частицы, сход-

ные с вирусом гепатита В, и они обладают почти такой же иммуногенностью, как и интактный вирус, на основе которого получен синтетический пептид, этот подход может стать основным способом доставки пептидных вакцин к месту их действия.

И все же существует несколько ограничений на использование коротких пептидов в качестве вакцин.

- Эпитоп, использующийся для создания эффективной пептидной вакцины, должен представлять собой короткий, но непрерывный участок белковой молекулы, а это бывает не всегда.
- Конформация пептида должна быть такой же, как у эпитопа в интактной вирусной частице.
- Изолированный эпитоп может не обладать достаточной иммуногенностью. В будущем синтетические пептидные вакцины могут стать высокоспецифичной, относительно недорогой, безопасной и эффективной альтернативой традиционным вакцинам, хотя для этого необходимо провести еще немало исследований.

### Генная иммунизация

Новый подход, позволяющий индуцировать у организма иммунный ответ без введения антигена, основан на включении в клетки животного-мишени гена, кодирующего белок-антиген. В первых экспериментах такого рода *E. coli*-плазмиду, содержащую клонированный ген белка-антигена, транскрипция которого находилась под контролем промотора вируса животных, конъюгировали с микрочастицами золота и бомбардировали ими клетки уха мыши. Впоследствии выяснилось, что клонированную кДНК можно вводить в клетки и с помощью внутримышечной инъекции раствора с большим количеством плазмиды, несущей соответствующую ДНК. Для этого необходимо в  $10^3$ - $10^4$  раз больше ДНК, чем при бомбардировке микрочастицами. В одном из экспериментов более чем в 75% случаев ген включался в клетки мыши, и синтезированный белок-антиген индуцировал синтез антител. Этот подход позволяет избежать очистки антигена, что требует много времени и средств, или использования для создания вакцины технологии рекомбинантных ДНК. Кроме того, получаемые с его помощью белки с большей вероятностью подвергаются правильной посттрансляционной модификации, чем белки, синтезируемые организмами-хозяевами. Этот метод, получивший название генной иммунизации, можно использовать для вакцинации домашних животных.

Перспективы генной иммунизации были тщательно изучены. В одной из серий экспериментов мышам в квадрицепсы обеих задних конечностей вводили раствор с *E. coli*-плазмидой, несущей кДНК нуклеопротеина вируса гриппа А, транскрипция которой находилась под контролем промотора вируса саркомы Рауса или цитомегаловируса. Хотя уровень экспрессии гена нуклеопротеина был настолько низок, что не поддавался регистрации, через 2 нед после иммунизации в крови мышей обнаруживались антитела к нему. Выживаемость иммунизированных мышей оказалась значительно выше, чем мышей из контрольной группы (рис. 11.5). Более того, они были нечувствительны и к другому штамму вируса гриппа. Такая перекрестная защита не вырабатывается при введении традиционных противогриппозных вакцин, полученных на основе поверхностных антигенов вируса, и поэтому каждая вакцина специфична лишь к одному штамму вируса. Более того, традиционные вакцины сохраняют свою эффективность только до тех пор, пока остаются неизменными поверхностные антигены. К сожалению, для генов поверхностных антигенов характерна высокая частота мутаций, что приводит к появлению существенно различающихся штаммов вируса. Кровные же белки, такие как нуклеопротеин, относительно стабильны и активируют иммунную систему по другому механизму, чем поверхностные антигены.

ДНК-иммунизация позволяет не только избежать очистки белковых антигенов, но и индуцировать иммунный ответ, направленный именно на кодируемый плазмидой белок, а не на саму плазмиду. Поэтому один и тот же вектор можно использовать для доставки разных белков или для многократного введения одного и того же гена.

Судьба введенной в клетку ДНК точно неизвестна. В принципе она может интегрироваться в

геном хозяина с весьма серьезными последствиями, если при этом затрагивается какой-то важный ген или происходит злокачественная трансформация клетки. Однако такое развитие событий считается крайне маловероятным. Скорее всего такая ДНК какое-то время просуществует в клетке в виде нереплицирующегося внехромосомного элемента, а затем разрушится. Генную иммунизацию пока используют для выработки иммунитета к некоторым патогенным микроорганизмам (вирусу гриппа А, вирусу иммунодефицита человека типа I, вирусу бычьего герпеса, вирусу бешенства, *Plasmodium* sp., вызывающему малярию, вирусу гепатита В) у животных, но не у человека.

Для облегчения доставки ДНК в клетки животных при проведении генной иммунизации был создан модифицированный штамм *Shigella flexneri*. Эта бактерия проникает в эпителиальные клетки животных путем фагоцитоза, и присутствующая в ней плазмидная ДНК попадает в цитоплазму клетки-хозяина, где и происходят транскрипция и трансляция переносимого ею гена, находящегося под контролем эукариотического промотора. *Shigella* — это патогенный микроорганизм, и как таковой он не может использоваться для доставки ДНК. Ее непатогенный штамм можно получить, введя делецию в ген *asd*, кодирующий фермент аспартат-β-полуальдегид—дегидрогеназу, который участвует в синтезе компонента клеточной стенки диаминопимелиновой кислоты.

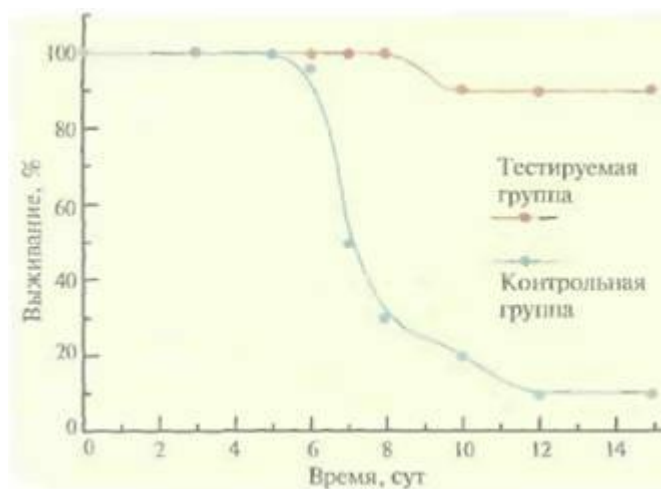


Рис. 11.5. Выживание мышей, иммунизированных вирусной ДНК. Тестируемых мышей иммунизировали *E. coli*-плазмидой, несущей κДНК нуклеопротеина вируса гриппа А под контролем промотора вируса саркомы Рауса. Контрольным мышам вводили только плазмидную ДНК. По оси абсцисс отложено время, прошедшее после контакта животных с вирусом гриппа.

Штаммы с мутацией в *asd*-гене растут только в присутствии диаминопимелиновой кислоты и их можно использовать для доставки плазмидной ДНК в эпителиальные клетки животных, поскольку они в них не пролиферируют.

Эксперименты, в которых в качестве вектора для доставки ДНК в клетки использовалась *SfingeNa*, были проведены на морских свинках, и хотя они оказались успешными, судить о безопасности данной системы можно будет лишь после проведения клинических испытаний. Огромным преимуществом этого подхода является возможность перорального введения вакцин.

### Аттенуированные вакцины

В некоторых случаях в качестве живых вакцин можно использовать генетически модифицированные (рекомбинантные) микроорганизмы (бактерии или вирусы). Такие вакцины содержат либо непатогенные микроорганизмы, синтезирующие антигенные детерминанты определенного патогенного агента, либо штаммы патогенных микроорганизмов, у которых модифицированы или делетированы гены вирулентности. В этих случаях основные антигенные детерминанты являются составными компонентами бактериальных или вирусных частиц и имеют такую же конформацию, какую они принимают в болезнетворном микроорганизме. Изолированный же антиген часто утрачивает исходную конформацию и вызывает лишь слабый иммунный ответ.



**Иммунизация с помощью пептида, синтезированного исходя из данных о нуклеотидной последовательности РНК вируса ящура**

J. L. Bittle, R. A. Houghten, H. Alexander, T. M. Shinnick, J. G. Sutcliffe, R. A. Lerner, D. J. Rowlands, F. Brown *Nature* 298: 30-33, 1982

Начиная с первой вакцины, эффективных и в то же соответствующие созданной Дженнером более 200 лет назад, большинство имеющих ограничений в выводу, что его антигенные человеческих противовирусных применении. Введение вакцины детерминанты находятся на N-вакцин содержали убитые или индуцирует выработку антител или С-конце белковой молекулы. аттенуированные патогенные к антигенным детерминантам, в Определив их аминокислотные вирусы или сходные с ними норме присутствующим на последовательности, они непатогенные штаммы. Этот поверхности вирусной частицы, синтезировали серию пептидов, подход достаточно эффективен и поэтому разумно было которые сшили с белками-предотвращает распространение предположить, что аналогичный переносчиками и ввели ряда вирусных инфекций, иммунный ответ могут вызвать кроликам. В ответ на однако его применение короткие синтетические иммунизацию С-концевыми ограничено по ряду причин: не пептиды с такой же пептидами VP1 у кроликови все вирусы могут расти в аминокислотной морской свинок вырабатывались культуре, что не позволяет последовательностью, как у антитела, защищающие их от создавать вакцины против них; вирусной антигенной инфекции интактным вирусом производство традиционных детерминанты. Конечно, такой ящура. Эта работа показала, что вакцин - дорогостоящая и подход применим лишь в том для индукции синтеза антител, потенциально опасная случае, когда антигенная нейтрализующих ин-тактные процедура; не все вирусные область представляет собой вирусные частицы, достаточно заболевания можно короткий, но непрерывный одного (или нескольких) домена предотвратить с помощью доменов. Биттл и др. выделили и (доменов) специфического традиционных вакцин. С охарактеризовали РНК вируса вирусного белка, и, развитием молекулярной ящура и определили следовательно, можно создавать биотехнологии во многих аминокислотную вакцины нового типа, не лабораториях были предприняты последовательность основного содержащие патогенных попытки создания более вирусного белка — VP1. вирусов. Проведя

**Противохолерные вакцины**

Живые вакцины, как правило, гораздо более эффективны, чем неживые или субъединичные. Основное требование, предъявляемое к ним, -отсутствие в инокуляционном материале вирулентных микроорганизмов. Это требование учитывалось и при создании живой противохолерной вакцины. Холера — быстро развивающаяся кишечная инфекция, характеризующаяся лихорадкой, диареей, болью в животе, дегидратацией; передается через питьевую воду, загрязненную фекалиями. В развивающихся странах, где системы очистки воды и удаления сточных вод недостаточно развиты, угроза холеры вполне реальна. Возбудителем холеры является *Vibrio choierae*. Бактерия размножается в тонком кишечнике и выделяет в большом количестве энтеротоксин, который и ответствен за патогенный эффект. Энтеротоксин — это гексамерный белок: он состоит из одной субъединицы А, которая обладает ADP-рибозилирующей активностью и стимулирует аденилатциклазу, и пяти субъединиц В, которые специфически связываются с клеточным рецептором слизистой кишечника. Субъединица А имеет два функциональных домена: А<sub>1</sub>, обладающий токсической активностью, и А<sub>2</sub>, отвечающий за ее связывание с субъединицами В. В настоящее время используется противохолерная вакцина, содержащая убитые фенолом холерные вибрионы; она обеспечивает только частичную защиту от инфекции и лишь в течение 3—6 мес. Поэтому были предприняты попытки создать другие типы противохолерной вакцины. Как показали проведенные ранее исследования, субъединичная вакцина, содержащая инактивированный холерный энтеротоксин, не приводит к выработке полноценного иммунитета.



Поскольку *V. cholerae* колонизирует слизистую кишечника, разумно было предположить, что наиболее эффективной будет пероральная противохолерная вакцина. Имея это в виду, создали штамм *V. cholerae*, из генома которого была делетирована часть кодирующей А<sub>1</sub>-пептид нуклеотидной последовательности. Этот штамм не синтезирует энтеротоксин, а потому не является патогенным и подходит для создания живой вакцины.

Эксперимент состоял в следующем. В ген А<sub>1</sub>-пептида *V. cholerae* был встроен ген устойчивости к тетрациклину. При этом прерывалась рамка считывания для А<sub>1</sub>-пептида, но штамм становился устойчивым к тетрациклину. Его нельзя было использовать в качестве вакцины и потому, что со временем происходила спонтанная утрата тетрациклинового гена, и синтез энтеротоксина восстанавливался. Чтобы обойти эту проблему, создали штамм с дефектной нуклеотидной последовательностью, кодирующей А<sub>1</sub>-пептид, которая не могла восстанавливаться (рис. 11.6). Для этого использовали следующий подход,

1. Плазмиду, которая содержала сегмент ДНК, кодирующий А<sub>1</sub>-пептид, обработали рестри-цирующими эндонуклеазами *Cla*I и *Xba*I, каждая из которых расщепляла только кодирующую А<sub>1</sub>-пептид последовательность вставки.

2. Чтобы замкнуть плазмиду в кольцо, к *Cla*I-сайту пришили *Xba*I -линкер и обработали плазмиду рестриктазой *Xba*I.

3. С помощью ДНК-лигазы фага Т4 соединили *Xba*I-сайты плазмиды. В результате из середины кодирующей А<sub>1</sub>-пептид последовательности оказался удаленным сегмент длиной 550 п. н., соответствующий аминокислотным остаткам 183-194.

4. С помощью конъюгации перенесли эту плазмиду в штамм *V. cholerae*, несущий ген устойчивости к тетрациклину в локусе, кодирующем А<sub>1</sub>-пептид.

5. В результате рекомбинации между оставшейся в составе плазмиды частью последовательности, кодирующей А<sub>1</sub>-пептид, и геном А<sub>1</sub>-пептида, прерванным Tet<sup>r</sup>-геном, кодирующая А<sub>1</sub>-пептид последовательность в хромосоме была замещена гомологичным плазмидным сегментом с делецией.

6. Внехромосомная плазида не могла долго существовать в холерном вибрионе и через несколько поколений была утрачена.

7. Отобрали клетки с интегрированной дефектной А<sub>1</sub> -кодирующей последовательностью, используя их чувствительность к тетрациклину.

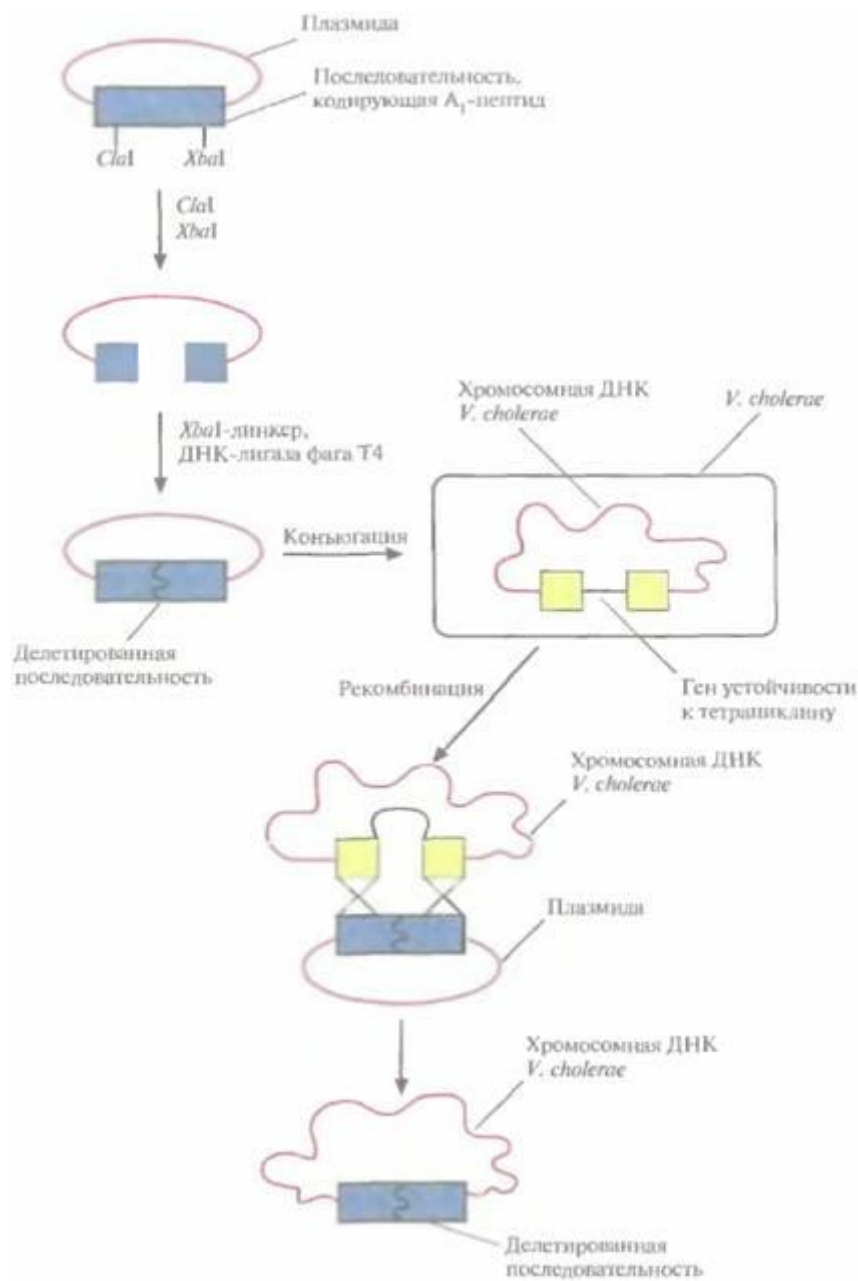
Полученный таким способом стабильный штамм с делегированной кодирующей А<sub>1</sub>-пептид последовательностью не синтезировал активный энтеротоксин и при этом сохранял все остальные биохимические свойства патогенной формы *V. cholerae*. Проводимые в настоящее время клинические испытания эффективности этой формы как противохолерной вакцины пока не дали однозначного результата. Вакцина обеспечивает почти 90%-ную защиту от холеры, но у некоторых испытуемых наблюдаются побочные эффекты. Возможно, понадобится изменить другой хромосомный локус этого штамма, чтобы можно было использовать его как вакцину.

### Противосальмонеллезные вакцины

Другой способ получения непатогенных штаммов, пригодных для создания на их основе живых вакцин, состоит в удалении из генома патогенных бактерий хромосомных областей, отвечающих за независимые жизненноважные функции. При этом лучше делетировать по крайней мере две такие области, поскольку вероятность их одновременного восстановления очень мала. Предполагается, что штамм с двойной делецией будет обладать ограниченной пролиферативной способностью и сниженной патогенностью, но обеспечит выработку иммунного ответа.

Разные штаммы *Salmonella* вызывают острые кишечные инфекции, постназальную инфекцию, брюшной тиф, пищевую токсикоинфекцию. Для профилактики всех этих заболеваний совершенно необходимо иметь эффективную вакцину. Чтобы получить аттенуированные штаммы *Salmonella*, вносили делеции в гены *aga*, кодирующие ферменты биосинтеза ароматических соединений, и в гены *pur*, кодирующие ферменты метаболизма пуринов. Такие штаммы с двойной делецией вызывают легкую форму инфекции и обладают в 10<sup>6</sup> раз меньшей вирулентностью. На их основе уже созданы эффективные

Рис. 11.6. Создание штамма *V. cholerae* с делецией части нуклеотидной последовательности, кодирующей A<sub>1</sub>-пептид холерного токсина.



пероральные вакцины для мышей, овец, крупного рогатого скота, цыплят, а совсем недавно — и для человека.

**Противолеишманиозные вакцины**

Простейшие паразиты *Leishmania* тоже могут вызывать у человека развитие иммунного ответа, однако создание эффективных вакцин против них представляет собой нелегкую задачу. С этой целью можно использовать аттенуированные линии *Leishmania*, но они часто ревертируют и становятся вирулентными, а кроме того, могут длительное время бессимптомно персистировать в организме человека — резервуаре инфекции - и передаваться другим людям. Чтобы решить эти проблемы, попытались создать атте-

нуированную неревертирующую линию *Leishmania* с помощью делеции одного из важных для метаболизма генов (например, гена дигидрофолатредуктазы—тимидилатсинтазы). У одного из таких паразитов, *Leishmania major* E10-5A3, два гена дигидрофолатредуктазы—тимидилатсинтазы были заменены генами устойчивости к антибиотикам G-418 и гигромицину. В отличие от паразитов дикого типа, при выращивании *L. major* E10-5A3 в обычной культуре или в культуре макрофагов в среду необходимо добавлять тимидин (рис. 11.7). В организме мышей BALB/c паразиты оставались жизнеспособными в течение нескольких дней, что достаточно для создания стойкого иммунитета у животных (рис. 11.8), но недостаточно для развития заболевания. Ни персистирующая инфек-

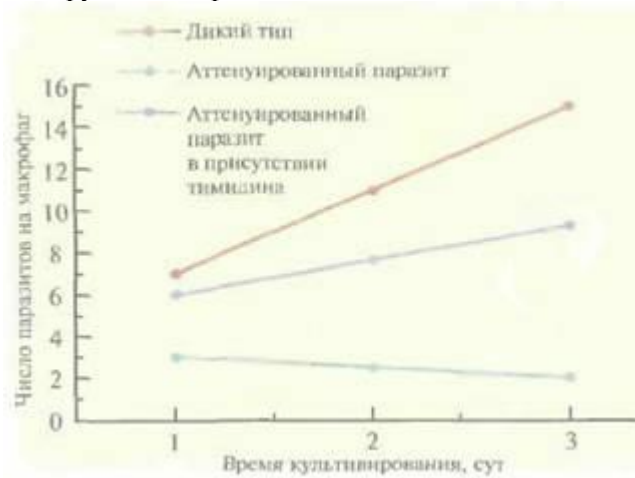


Рис. 11.7. Пролиферация *L. major* дикого типа и аттенуированного паразита в мышинных макрофагах. Для инвазии в обоих случаях использовали одинаковое количество *L. major*, находящихся в стационарной фазе. (Из работы Titus et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 10267-10268, 1995, с изменениями.)

ция, ни заболевание не возникали даже у наиболее чувствительных видов мышей, так что данная линия вполне подходит для создания вакцины. Проведя дополнительные эксперименты на животных, можно будет проверить ее эффективность при иммунизации человека.

«Векторные» вакцины

Противовирусные вакцины

В качестве эффективной живой противооспенной вакцины широко используют вирус коровьей оспы (ВКО), относящийся к роду поксвирусов. Геном этого вируса полностью секвенирован; он представляет собой двухцепочечную ДНК длиной 187 т.п.н., кодирующую примерно 200 разных белков. ДНК ВКО реплициру-

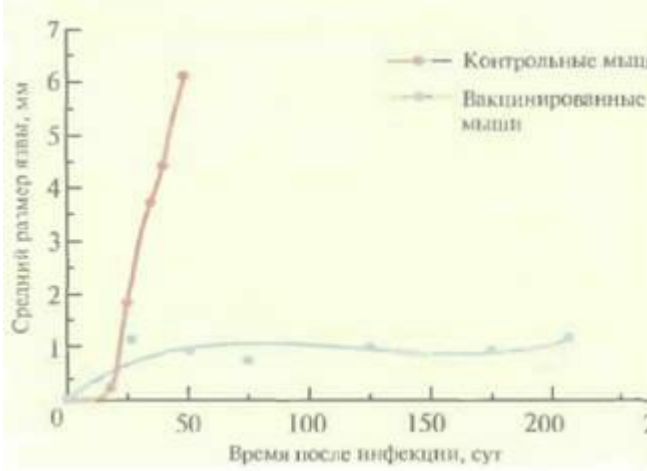


Рис. 11.8. Иммунитет к вирулентному паразиту *L. major*, вырабатывающийся у мышей BALB/c после инвазии аттенуированного паразита *L. major*. В момент времени 0 мышей, предварительно вакцинированных аттенуированным паразитом, заражали вирулентным паразитом, а затем определяли средний размер лейшманиозных язв. Контрольных мышей не вакцинировали. (Из работы Titus et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 10267-10268, 1995, с изменениями.)

ется в цитоплазме инфицированных клеток, а не в ядре, благодаря наличию у вируса генов ДНК-полимеразы, РНК-полимеразы и ферментов, осуществляющих кэпирование, метилирование и полиаденилирование мРНК. Поэтому, если в геном ВКО встроить чужеродный ген, так чтобы он находился под контролем ВКО-промотора, то он будет экспрессироваться независимо от регуляторных и ферментных систем хозяина.

ВКО имеет широкий спектр хозяев (позвоночных и беспозвоночных), остается жизнеспособным в течение многих лет после лиофилизации (испарения воды с помощью замораживания) и не обладает онкогенными свойствами, а потому может использоваться для создания так называемых векторных вакцин. С их помощью осуществляется доставка и экспрессия в организме-хозяине клонированных генов, кодирующих антигенные белки, которые индуцируют выработку протективных антител. Геном ВКО имеет большие размеры и не содержит уникальных сайтов рестрикции, что не позволяет встраивать в него дополнительные нуклеотидные последовательности. Однако нужные гены можно вводить в геном ВКО с помощью гомологичной рекомбинации *in vivo* следующим образом.

1. Сегмент ДНК, кодирующий специфичный антиген (например, НВсAg), встраивают в плазмидный вектор непосредственно после клонированного ВКО-промотора, включенного в какой-либо несущественный ген ВКО, например ген тимидинкиназы (рис. 11.9, А).

2. Этой плазмидой трансформируют культуру дефектных по тимидинкиназе животных клеток, обычно фибробластов куриного эмбриона, предварительно инфицированных ВКО дикого типа, который синтезирует функциональную тимидинкиназу,

3. В результате рекомбинации между нуклеотидными последовательностями, фланкирующими промотор и ген протективного антигена, и гомологичными последовательностями вирусного генома происходит встраивание клонированного гена в вирусную ДНК (рис. 11.9, Б). Частота таких рекомбинаций невысока, однако популяцию клеток, содержащих реком-

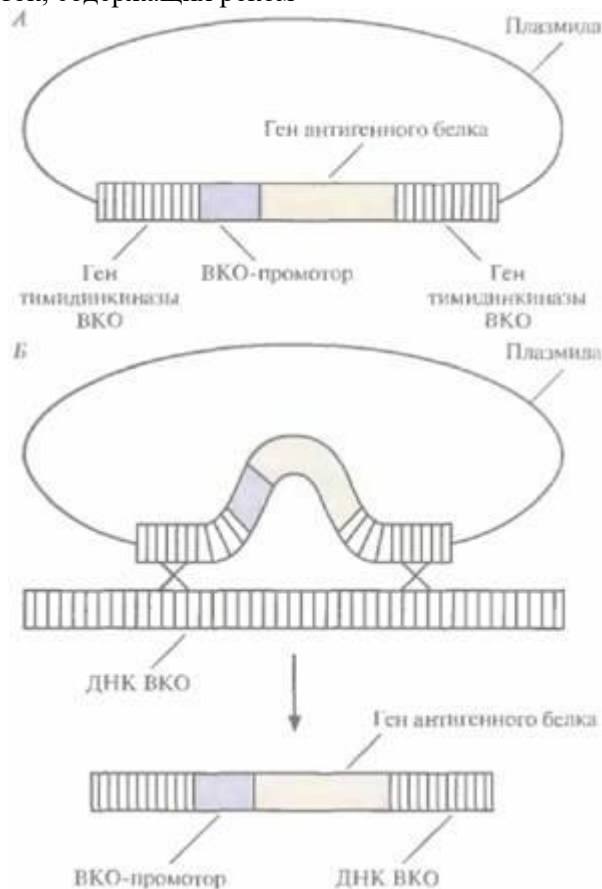


Рис. 11.9. Встраивание в ДНК ВКО гена, белковый продукт которого (обычно вирусный антиген) индуцирует иммунный ответ. А. Плазмида, несущая ген антигенного белка, способный экспрессироваться. Б. Двойной кроссинговер, приводящий к встраиванию этого гена в ДНК ВКО.

бинантный ВКО, можно обогатить, используя селективную среду с бромдезоксисуридином. Этот токсичный аналог тимидина в отсутствие тимидинкиназы не включается в синтезируемую ДНК и не оказывает токсического действия. Дефектные по тимидинкиназе клетки-хозяева, которые содержат обычный ВКО, в присутствии бромдезоксисуридина погибают, а клетки, несущие рекомбинантный ВКО с разрывом в гене ти-

мидинкиназы, становятся устойчивыми к его токсическому действию.

4. Проводят окончательный отбор с помощью ДНК-зонда, гибридизующегося с геном антигенного белка.

Поскольку дефектные по тимидинкиназе ВКО спонтанно возникают с относительно высокой частотой (примерно 1 на 10<sup>3</sup>—10<sup>4</sup> вирусных частиц), нередко проводят котрансфекцию клеток каким-либо селективным маркером и нужным геном. Это облегчает разграничение спонтанных мутантов и мутантов, полученных с помощью гомологичной рекомбинации. В качестве селективного маркера обычно используют ген *neo*, кодирующий фермент неомизин-фосфотрансферазу [I и обеспечивающий устойчивость к аналогу канамицина G-418. Этот ген, в отличие от других селективных маркеров, остается стабильным при встраивании в геном ВКО.

Разработана специальная система, позволяющая избежать прерывания рамки считывания генов ВКО при встраивании чужеродного гена. При этом отпадает необходимость в использовании селективных маркеров, поскольку каждый образующий бляшку рекомбинантный вирус будет содержать и экспрессировать ген-мишень. ДНК ВКО дикого типа несет ген *vr37*, отвечающий за образование бляшек при росте вируса в монослойной культуре животных клеток (рис. 11.10, А). Если заменить этот ген маркерным геном *E. coli*, то образуется мутантный ВКО, который не формирует бляшки при выращивании его в течение 2—3 сут в культуре животных клеток (рис. 11.10, Б). Ген-мишень вводят в этот мутантный вирус с помощью гомологичной рекомбинации его ДНК с вектором, несущим ген *vr37* и ген-мишень (рис. 11.10, В). Мутантный ВКО, получивший ген *vr37*, приобретает способность к образованию бляшек, при этом в его геном встраивается ген-мишень, а маркерный ген утрачивается. Мутантный вирус с делегированным геном *vr37* не может ревертировать к дикому типу, поэтому каждая вирусная частица, образующая бляшку, содержит желаемую конструкцию. Этот метод прост, применим для переноса и экспрессии любого гена-мишени, не требует каких-либо дополнительных маркерных генов и не прерывает рамку считывания генов ВКО.

В геном ВКО уже удалось встроить и экспрессировать в культуре животных клеток несколько генов антигенных белков: G-белка ви-

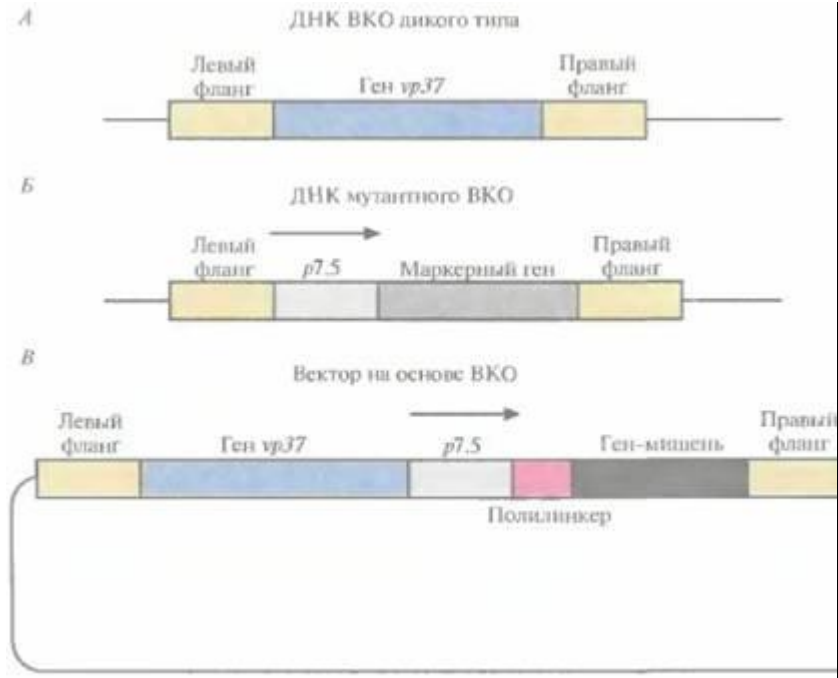


Рис. 11.10. А. ДНК ВКО дикого типа. Б. ДНК мутантного ВКО. В. Вектор на основе ВКО. Левый фланг и правый фланг — последовательности, примыкающие слева и справа соответственно к гену *vr37* в геноме ВКО дикого типа. Промотор *vr37* не показан, *p 7.5* -- сильный «ранний» (или «поздний») ВКО-промотор. Ген-мишень встроен в полилинкер. Гомологичная рекомбинация между рекомбинантным вектором и ДНК мутантного вируса приводит к замене маркерного гена *E. coli* на ген *vr37* и ген -мишень.

руса бешенства, поверхностного антигена гепатита В, поверхностных белков вируса Синдбис, NP- и НА-белков вируса гриппа, N- и G-белков вируса везикулярного стоматита, гликопротеинов вируса простого герпеса. Некоторые из полученных на основе ВКО рекомбинантных векторов можно использовать для создания эффективных вакцин. Так, рекомбинантный ВКО, экспрессирующий ген гликопротеина D вируса простого герпеса типа 1, предотвращает герпесные инфекции у мышей, а рекомбинантный ВКО, экспрессирующий ген поверхностного антигена вируса бешенства, индуцирует выработку протективных антител у лис, основных переносчиков вируса бешенства в Европе.

Векторные ВКО-вакцины позволяют провести иммунизацию сразу от нескольких заболеваний. Для этого можно использовать рекомбинантный ВКО, который несет несколько генов, кодирующих разные антигены.

В зависимости от используемого ВКО-промотора чужеродный белок может синтезироваться в ранней или поздней фазе инфекционного цикла, при этом его количество определяется силой промотора. Обычно для достижения высокого уровня экспрессии используют «поздние» ВКО-промоторы: p11 (промотор гена, отвечающего за синтез белка мол. массой 11 кДа) или pCAE (промотор гена интегрального белка вируса коровьей оспы типа А). При встраивании в одну ДНК ВКО нескольких чужеродных генов каждый из них помещают под контроль отдельного ВКО-промотора, чтобы предотвратить гомологичную рекомбинацию между различными участками вирусной ДНК, которая может привести к утрате встроенных генов.

Живая рекомбинантная вирусная вакцина имеет ряд преимуществ перед неживыми вирусными и субъединичными вакцинами: 1) презентация аутентичного антигена практически не отличается от таковой при обычной инфекции; 2) вирус может реплицироваться в клетке-хозяине и увеличивать количество антигена, который активирует продукцию антител В-клетками (гуморальный иммунитет) и стимулирует выработку Т-клеток (клеточный иммунитет); 3) встраивание генов антигенных белков в один и большее число сайтов генома ВКО еще больше уменьшает его вирулентность.

Недостаток живой рекомбинантной вирусной вакцины состоит в том, что при вакцинации лиц со сниженным иммунным статусом (например, больных СПИДом) у них может развиваться тяжелая вирусная инфекция. Чтобы решить эту проблему, можно встроить в вирусный вектор ген, кодирующий человеческий интерлейкин-2, который стимулирует Т-клеточный ответ и ограничивает пролиферацию вируса.

Нежелательные побочные эффекты пролиферации ВКО можно предупредить инаktivацией вируса после вакцинации. Для этого был создан чувствительный к интерферону вирус (ВКО дикого типа относительно устойчив к его действию), пролиферацию которого можно регулировать в случае возникших при вакцинации осложнений.

Механизм устойчивости ВКО к интерферону оставался неустановленным, пока не была обнаружена открытая рамка считывания K3L, кодирующая белок мол. массой 10,5 кДа. Этот белок содержит аминокислотную последовательность, гомологичную N-концевой части эукариотического фактора инициации eIF-2 $\alpha$  мол. массой 36,1 кДа. N-концевые области обоих белков содержат 87 практически идентичных аминокислотных остатков, причем в положении 51 в обоих случаях находится серин, который в eIF-2 $\alpha$  фосфорилируется активируемой интерфероном P1-киназой, что приводит к ингибированию синтеза белка в обработанных интерфероном клетках. K3L-белок действует как конкурентный ингибитор фосфорилирования eIF-2 $\alpha$ , обеспечивая устойчивость ВКО к интерферону, и если из генома ВКО удалить ген K3L или его часть, то вирус станет чувствительным к интерферону. С помощью ПЦР-мутагена за гена K3L, находящегося в составе плазмиды, и последующей гомологичной рекомбинации между ДНК ВКО и плазмидой с целью замены K3L-последовательности дикого типа модифицированным вариантом был сконструирован мутантный ВКО K3L<sup>-</sup>. Этот штамм оказался в 10—15 раз более чувствительным к интерферону, чем штамм дикого типа (рис. 11.11). Эта работа является важным этапом на пути создания более безопасных ВКО-векторов. Последовательности, сходные с K3L, могут содержать и другие устойчивые к интерферону вирусы, что позволит с помощью де-



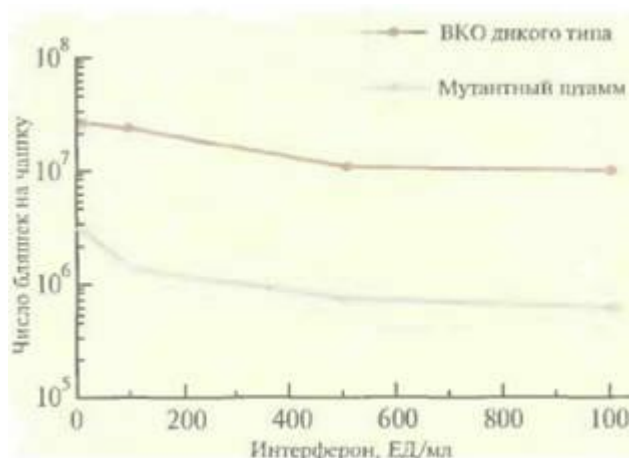


Рис. 11.11. Чувствительность к интерферону ВКО дикого типа ( $K3L^+$ ) и мутантного штамма ( $K3L^-$ ). Мышинные клетки L929 перед инокуляцией вирусом обрабатывали в течение 24 ч смесью мышиных альфа- и бета-интерферонов. На каждой чашке, не обработанной интерфероном, было примерно  $3 \cdot 10^7$  бляшек. (Paoletti, Tartaglia, U.S. patent 5,378,657, 1995, с изменениями).

лений создавать их штаммы, чувствительные к интерферону.

Большинство работ по созданию живых вирусных вакцин проводились на ВКО, однако в качестве кандидатов на роль векторов для вакцинации рассматриваются и другие вирусы: аденовирус, полиовирус и вирус ветряной оспы. Вектор на основе живого аттенуированного полиовируса (его исследования только начинаются) привлекателен тем, что позволяет проводить пероральную вакцинацию. Такие «слизистые» вакцины (вакцины, компоненты которых связываются с рецепторами, расположенными в легких или желудочно-кишечном тракте) пригодны для профилактики самых разных заболеваний: холеры, брюшного тифа, гриппа, пневмонии, мононуклеоза, бешенства, СПИДа, болезни Лайма. Но до любых клинических испытаний любого на первый взгляд безобидного вируса как системы доставки и экспрессии соответствующего гена необходимо убедиться в том, что он действительно безопасен. Например, повсеместно используемый ВКО вызывает у людей осложнения с частотой примерно  $3,0 \cdot 10^{-6}$ . Поэтому из генома рекомбинантного вируса, который предполагается использовать для вакцинации человека, желательно удалить последовательности, ответственные за вирулентность.

### Противобактериальные вакцины

Для лечения заболеваний, вызываемых бактериями, широко используются антибиотики, и лишь совсем недавно начались работы по созданию противобактериальных вакцин. Стимулом к этому стали весьма веские причины.

- Не все бактериальные инфекции поддаются лечению антибиотиками.
- Широкое использование антибиотиков в последние 40 лет привело к появлению большого числа устойчивых к ним бактериальных штаммов.
- Во многих тропических странах отсутствуют условия для хранения антибиотиков.
- Часто больные прекращают лечение раньше, чем это предписано врачом, или принимают антибиотики в недостаточной дозе.

Имея в виду, что создаваемая противобактериальная вакцина должна быть достаточно эффективной, важно выбрать правильную стратегию. Если патогенная бактерия плохо растет в культуре и сложно получить ее аттенуированный штамм, необходимо использовать альтернативные способы. Например, *Rickettsia rickettsii*, грамотрицательная облигатная внутриклеточная бактерия, вызывающая пятнистую лихорадку Скалистых гор, не растет в культуре. Чтобы обойти эту трудность, создали субъединичную вакцину, содержащую основной поверхностный антиген *R. rickettsii*, белок мол. массой 155 кДа. Она эффективно защищала мышей от этой патогенной бактерии.

### Бактерии как системы доставки антигенов

Антигены, находящиеся на наружной поверхности бактериальной клетки, обладают более высокой иммуногенностью, чем локализованные в цитоплазме. Поэтому один из подходов, исполь-

зуемых при создании вакцин, состоит в размещении протективного антигена патогенной бактерии на поверхности живой непатогенной бактерии. Многие бактерии имеют жгутики, состоящие из белка флагеллина; под микроскопом они выглядят как нити, отходящие от бактериальной клетки. Если сделать так, что жгутики непатогенного микроорганизма будут нести специфический эпитоп патогенного микроорганизма, то можно будет индуцировать выработку протективных антител.

Именно такой подход использовали при создании противохолерной вакцины. Синтетический олигонуклеотид, кодирующий эпитоп субъединицы В холерного токсина, встроили в гипервариабельный участок гена флагеллина *Salmonella* и полученную конструкцию ввели в дефектный по флагеллину штамм *Salmonella*. При этом было известно, что эпитоп, включающий 50—64 аминокислотные остатки субъединицы В холерного токсина, индуцирует выработку антител к интактному холерному токсину. Химерный флагеллин нормально функционировал, а эпитоп холерного токсина размещался на поверхности жгутиков. Иммунизация мышей с помощью интраперитонеальной инъекции примерно  $5 \cdot 10^6$  живых или убитых формалином бактерий с модифицированным флагеллином индуцировала выработку большого количества антител как к пептиду (50—64 аминокислотным остаткам), так и к молекуле интактного холерного токсина. Аналогичным образом можно встраивать два и даже три разных эпитопа в один флагеллиновый ген *Salmonella* и создать поливалентную противобактериальную вакцину.

С помощью перорального введения аттенуированных штаммов *Salmonella* можно осуществлять доставку в организм хозяина многих бактериальных, вирусных и паразитарных антигенов. Большую роль при этом играет выбор промотора, контролирующего транскрипцию чужеродного гена. Если используется слишком сильный промотор, может возникнуть метаболическая «перегрузка», сдерживающая пролиферацию бактерий. В отличие от ферментера, организм животного-хозяина не является замкнутой системой, и экспрессию чужеродного гена нельзя регулировать изменением температуры или добавлением специфических метаболитов. Регуляторную роль может играть только промотор, реагирующий на те или иные сигналы. Например, работу промотора *nirB E. coli* можно регулировать, изменяя содержание нитритов и кислорода в среде, а наиболее активен он в анаэробных условиях. В одном из экспериментов промотор *nirB* использовали для контроля экспрессии гена нетоксичного иммуногенного С-фрагмента столбнячного токсина в аттенуированном штамме *Salmonella*. В развивающихся странах инфекция *Clostridium tetani* уносит более 1 млн. жизней в год. Если генетически модифицированный штамм *Salmonella* выращивать в аэробных условиях, то С-фрагмент столбнячного токсина синтезироваться не будет. При пероральном же введении этой бактерии тестируемым мышам С-фрагмент синтезируется, и у животных вырабатываются антитела к нему. Таким образом, штамм *Salmonella*, в который встроен С-фрагмент столбнячного токсина, находящийся под контролем промотора *nirB*, можно использовать как живую пероральную противостолбнячную вакцину. Чтобы выяснить, насколько эффективен этот подход при вакцинации человека, необходимо провести дополнительные исследования.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Традиционные вакцины содержат инаktivированные или аттенуированные патогенные микроорганизмы (бактерии или вирусы). Эти вакцины имеют ряд недостатков: не все патогенные микроорганизмы можно вырастить в необходимых для производства вакцины количествах; работа с большим количеством патогенных микроорганизмов требует соблюдения строжайших мер предосторожности; аттенуированные штаммы нередко ревертируют и становятся вирулентными; инаktivация часто бывает неполной; срок годности вакцины зависит от условий ее хранения.

Технология рекомбинантных ДНК позволяет создавать надежные вакцины, используя при этом разные подходы. Делетируя гены, ответственные за вирулентность, получают живые вакцины, содержащие непатогенные, иммунологически активные штаммы, которые не могут

ревертировать и становиться патогенными. Клонированные гены, кодирующие основные антигенные детерминанты патогенного организма, встраивают в геном непатогенного носителя (обычно вируса) и получают безопасную, не содержащую болезнетворных микроорганизмов вакцину. Наконец, гены или их сегменты, кодирующие основные антигенные детерминанты патогенных микроорганизмов, встраивают в экспрессирующие векторы, получают нужный продукт в большом количестве и используют его как вакцину. Последний подход позволяет производить субъединичные и пептидные вакцины (если используются полноразмерные гены в первом случае и фрагменты генов, кодирующих домены основных антигенных детерминант — во втором). Пептидные вакцины получают и с помощью химического синтеза пептидов.

## ЛИТЕРАТУРА

- Andio R., D. Silvera, S. D. Suggett, P. L. Achacoso, C. J. Miller, D. Baltimore, M. B. Feinberg.** 1994. Engineering poliovirus as a vaccine vector for the expression of diverse antigens. *Science* 265: 1448-1451.
- Bittle J. L., R. A. Houghten, H. Alexander, T. M. Shinnick, J. G. Sutcliffe, R. A. Lerner, D. J. Rowlands, F. Brown.** 1982. Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. *Nature* 298: 30-33.
- Blancou J., M. P. Kieny, R. Lathe, J. P. Lecoq, P. P. Pastoret, J. P. Soulebot, P. Desmettre.** 1986. Oral vaccination of the fox against rabies using a live recombinant vaccinia vaccine. *Nature* 322: 373-375.
- Blasco R., B. Moss.** 1995. Selection of recombinant vaccinia viruses on the basis of plaque formation. *GeneW*: 157-162.
- Boothroyd J. C., P. E. Highfield, G. A. M. Cross, D. J. Rowlands, P. A. Lowe, F. Brown, T. J. R. Harris.** 1981. Molecular cloning of foot and mouth disease virus genome and nucleotide sequences in the structural protein genes. *Nature* 290: 800-802.
- Brown Г.** 1984. Synthetic viral vaccines. *Annu. Rev. A/kro&O/*. 38:221-235.
- Brown F.** 1985. Peptides as the next generation of foot-and-mouth disease vaccines. *Bio/Technology* 3:445-448.
- Burnette W. N.** 1990. The advent of recombinant pertussis vaccines. *Bio/Technology* 8: 1003-1005.
- Charles L, G. Dougan.** 1990. Gene expression and the development of live enteric vaccines. *Trends Biotechnol.* 8:117-121.
- Chatfield S. N., I. G. Charles, A. J. Makoff, M. D. Ozer, G. Dougan, D. Pickard, D. Slater, N. F. Fairweather.** 1992. Use of the *nirB* promoter to direct the *slnB* expression of heterologous antigens in *Salmonella* oral vaccine strains: development of a single-dose oral tetanus vaccine. *Bio/Technology* 10: 888-892.
- Chow M., R. Yabrov, J. Bittle, J. Hogle, D. Baltimore.** 1985. Synthetic peptides from four separate regions of the poliovirus type 1 capsid protein VP1 induce neutralizing antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 910-914.
- Clarke B. E., S. E. Newton, A. R. Carroll, M. J. Francis, G. Appleyard, A. D. Syred, P. E. Highfield, D. J. Rowlands, F. Brown.** 1987. Improved immunogenicity of a peptide epitope after fusion to hepatitis B core protein. *Nature* 330: 381-384.
- Cohen J.** 1993. Naked DNA points way to vaccines. *Science* 259: 1691-1692.
- Cremer K. J., M. Mackett, C. Wohlenberg, A. L. Notkins, B. Moss.** 1985. Vaccinia virus recombinant expressing herpes simplex virus type 1 glycoprotein D prevents latent herpes in mice. *Science*. 228: 737-740.
- DiMarchi R., G. Brooke, C. Gale, V. Cracknell, T. Doel, N. Mowat.** 1986. Protection of cattle against foot-and-mouth disease by a synthetic peptide. *Science* 232: 639-641.
- Ferguson M.** 1991. Progress towards rabies control. *Trends Biotechnol.* 9: 7—11.
- Finkelstein A., R. F. Silva.** 1989. Live recombinant vaccines for poultry. *Trends Biotechnol.* 7: 273-277.
- Flexner C., A. Hugin, B. Moss.** 1987. Prevention of vaccinia virus infection in immunodeficient mice by vector-directed IL-2 expression. *Nature* 330: 759 262

- Graham F. L.** 1990. Adenoviruses as expression vector and recombinant vaccines. *Trends Biotechnol.* 8: 85-87.
- Horwitz M. A., B.-W. E. Lee, B. J. Dillon, G. Harth,** 1995. Protective immunity against tuberculosis induced by vaccination with major extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 1530-1534.
- Jones T. R., S. L. Hoffman.** 1994. Malaria) vaccine development. *Clin. Microbiol. Rev.* 7: 303—310.
- Kaper J. B., H. Lockman, M. M. Baldini, M. M. Levine.** 1984. A recombinant live oral choiera vaccine. *Bio/Technology* 2: 345-349.
- Kaper J. B., H. Lockman, M. M. Baldini, M. M. Levine.** 1984. Recombinant nontoxinogenic *Vibrio choier-ae* strains as attenuated cholera vaccine candidates. *Nature* 308: 655-658.
- Kaper J. B., J. G. Morris, Jr., M. M. Levine.** 1995. Choiera. *Clin. Microbiol. Rev.* 8: 48-86.
- Kaslow D. C., S. N. Isaacs L. A. Quakyi, R. W. Gwadz, B. Moss, D. B. Keister.** 1991. Induction of *Plasmodium falciparum* transmission-blocking antibodies by recombinant vaccinia virus. *Science* 252: 1310-1313.
- Kupper H., W. Keller, C. Kurz, S. Forss, H. Schauer, R. Franze, K. Strohmaier, O. Marquardt, V. G. Zaslavsky, P. H. Hofschneidtr.** 1981. Cloning of cDNA of major antigen of fool and mouth disease virus and expression in *E. colt*. *Nature* 289: 555-559.
- Lasky L. A., D. Dowbenko, C. C. Simonsen, P. W. Berman.** 1984. Protection of mice from lethal herpes simplex virus infection by vaccination with a secreted form of cloned glycoprotein D. *Bio/Technology* 2: 527-532.
- Lowe R. S., P. M. Keller, B..! Ketch, A. J. Uavison, Y. Whang, A. J. Morgan, E. KicfT, R. W. Elfe.** 1987. Varicella-zoster virus as a live vector for the expression of foreign genes, *Proc. Natl. Acad. ScL USA* 84: 3896-3900.
- Mekalanos J. J., J. C. Sadoff.** 1994. Cholera vaccines: fighting an ancient scourge. *Science* 265: 1387-1389.
- Michel M.-L., H. L. Davis, M. Schleef, M. Mancini, P. Tiollais, R. G. Whalen.** 1995. DNA-mediated immunization to the hepatitis B surface antigen in mice: aspects of the humoral response mimic hepatitis B viral infection in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 5307-5311.
- Miner J. N., D. E. Hruby.** 1990. Vaccinia virus: a versatile tool for molecular biologists. *Trends Biotechnol* 8: 20-25.
- Moss B. 1991- Vaccinia virus: a tool for research and vaccine development, *Science* 252: 1662—1667.
- Nabel G. J., P. L. Feigner.** 1993. Direct gene transfer for immunotherapy and immunization. *Tnends Biotechnol.* 11:211-215.
- Newton S. M. C., C. O. Jacob, B. A. U. Stocker.** 1989. Immunoresponse to cholera toxin upitope inserted in *Salmonella* flagellin. *Science* 244: 70-72.
- Nussenzweig R. S., C. A. Long.** 1994. Malaria vaccines: multiple targets. *Science* 265: 1381—1383.
- Oehen S., H. Hengartner, R. M. Zinkernagel.** 1991. Vaccination for disease. *Science* 251: 195-197.
- Paoletti E., J. TarlagHa** January 1995. Interferon sensitive recombinant poxvirus vaccine. U.S. patent 5, 378,457.
- Ratafia M.** 1987. Worldwide opportunities in genetically engineered vaccines. *Bio/Technology* 5: N54-1158.
- Sizemore D, R., A. A. Branstrom, J. C. Sadoff.** 1995, Attenuated Shigella as a DNA delivery vehicle for DNA-mediated immunization. *Science* 270: 299-302.
- Stover C. K., V. F. de la Cruz, T. R. Fuerst, J. E. Buriein, L. A. Benson, L.T Bennett, G. P. Bansal, J. F. Young, M. H. Lee, G. F. Hatfull, S. B. Snapper, R. G. Barletta, W. R. Jacobs, Jr., B. R. Bloom.** 1991. New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature* 351: 456—460.
- Tang D.-C-, M. DeVit, S. A. Johnston.** 1992. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 356: 152-154.
- Tartaglia J., E. Paoletti.** 1988. Recombinant vaccinia virus vaccines. *Trends Biotechnol.* 6: 43-46.
- Titus R. Gm J. G. Gueiros-Filtio, L. A. R. De Freitas, S. M. Beverly.** 1995. Development of a safe live *Leishmania* vaccine line by gene replacement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 10267-10271.
- Uhner J. B., J. J. Donnelly, S. Parker, G. II. Rhodes, P. L. Feigner, V. J. Dwarki, S. H. Gromkowski, R. R. Deck, C. M, DeWitt, A. Friedman, L. A. I lawe, K. R. Leander, D. Martine/, H. C. Perry, J. W. Shiver, D. I., Montgomery, M. A. Liu.** 1993.

Heterologous protection against influenza by injection of DN A encoding a viral protein. *Science* 259: 1745-1749.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Опишите вкратце способ создания вакцины против бактерий, продуцирующих токсин.
2. Что ограничивает применение традиционных вакцин?
3. Предположим, что вы принимаете участие в работе международной организации по охране здоровья животных и вам нужно создать вакцину против крайне вирулентного вируса крупного рогатого скота. Известно, что геном представляет собой полиаденилированную линейную одноцепочечную РНК длиной 10 т. п. н. и содержит восемь разных генов. Вирус не имеет оболочки, его основной антигенной детерминантой является белок капсида (VP 2). Какую стратегию вы используете?
4. Какие подходы применяются при создании пептидных противовирусных вакцин?
5. Что представляет собой вирус коровьей оспы и как с его помощью можно получать уникальные живые рекомбинантные вакцины?
6. Предположим, что вы выделили РНК-содержащий вирус, вызывающий бешенство у скунсов и енотов. Как на основе этого очищенного вируса создать рекомбинантную вакцину, защищающую животных от бешенства?
7. Как работник Всемирной организации здравоохранения вы должны найти оптимальный способ искоренения бешенства в популяциях диких животных. Предположим, что у вас есть пептидная вакцина и вакцина на основе вируса коровьей оспы; выберите одну из них и обоснуйте ваше решение.
8. Как можно использовать в качестве вакцины бактерии со жгутиками?
9. Перечислите преимущества живой рекомбинантной вирусной вакцины перед неживой и субъединичной вакцинами.
10. Опишите несколько подходов, использованных при создании холерной вакцины.

## ГЛАВА 12

# Использование рекомбинантных микроорганизмов для получения коммерческих продуктов

До настоящего времени основной целью исследований в области молекулярной биотехнологии было получение различных белков. Однако технологию рекомбинантных ДНК можно использовать также для крупномасштабного производства многих ценных низкомолекулярных соединений — витаминов, аминокислот, антибиотиков и т. д.

При наличии эффективной системы экспрессии получение белка — продукта специфического гена — не составляет особого труда. Белок может представлять собой либо тот конечный продукт, который хотят получить (например, рестрицирующую эндонуклеазу), либо фермент, катализирующий определенную химическую реакцию (например, одну из реакций биосинтеза антибиотиков). Иногда в результате генетических манипуляций микроорганизм приобретает способность к синтезу нового фермента и может использоваться для получения *in vivo* низкомолекулярных соединений — витаминов, аминокислот, красителей, антибиотиков, предшественников различных биополимеров и т. д. Такой микроорганизм становится «фабрикой» по производству полезных метаболитов.

### Эндонуклеазы рестрикции

Развитие технологии рекомбинантных ДНК было бы невозможно, если бы в распоряжении исследователей не было нужных эндонуклеаз рестрикции (рестриктаз). В настоящее время в продаже имеется более 300 различных рестриктаз. Эти ферменты синтезируются самыми разными микроорганизмами: аэробными, анаэробными, фотосинтезирующими, диазотрофными, мезотрофными, термофильными, психрофильными, медленно- и быстрорастущими. Для культивирования каждого из них необходимо подобрать оптимальные условия ферментации: температуру, pH, состав среды, концентрацию кислорода — с тем чтобы максимизировать выход необходимого фермента. Чтобы не пришлось выращивать большое число разных микроорганизмов, готовить многокомпонентные среды, разрабатывать разные ферментеры и тратить время на подбор оптимальных условий роста для многочисленных организмов, часто клонируют гены эндонуклеаз рестрикции в *Escherichia coli*. Это позволяет стандартизовать условия получения необходимых продуктов. Кроме того, культура клеток *E. coli* быстро достигает высокой плотности и может быть приспособлена для сверхпродукции необходимого фермента.

Технология выделения и экспрессии чужеродных генов в *E. coli* и в некоторых других микроорганизмах достаточно хорошо отработана, однако не стоит забывать, что синтез гетерологичного белка в организме-хозяине может оказывать на него негативное влияние. Например, сверхпродукция такого белка может привести к истощению метаболических ресурсов хозяйского организма и отрицательно повлиять на его рост. Присутствие гетерологичного белка может оказаться даже губительным для клетки-хозяина. Так, сайты рестрикции имеются во всех молекулах ДНК, и если продуктом клонированного гена является эндонуклеаза рестрикции, то в отсутствие специальных защитных механизмов хозяйская ДНК будет расщепляться ею.



Микроорганизмы, синтезирующие эндонуклеазы рестрикции, выработали систему самозащиты: они метилируют одно или несколько оснований рестриктазного сайта, и расщепление ДНК в этом сайте гомологичной эндонуклеазой рестрикции блокируется. Грамотрицательные микроорганизмы имеют еще один механизм защиты: эндонуклеазы рестрикции у них локализованы в периплазматическом пространстве. Благодаря такой компартментализации происходит физическое разделение рестриктаз и ДНК и при этом обеспечивается свободный доступ метилирующего (модифицирующего) фермента к хромосомной ДНК. Кроме того, это защищает клетку от проникновения в нее любой чужеродной ДНК, например вирусной.

Один из подходов к решению проблемы деградации хозяйской ДНК гетерологичными эндонуклеазами рестрикции состоит в клонировании и экспрессии в реципиентном организме как гена фермента рестрикции, так и гена соответствующего модифицирующего фермента. Однако клонирование обоих этих генов в одном микроорганизме технически затруднено, если они расположены на хромосоме донорного организма далеко друг от друга. Кроме того, чтобы не допустить расщепления хозяйской ДНК эндонуклеазами рестрикции, метилирующий фермент после трансформации должен синтезироваться еще до начала синтеза рестриктазы.

На рис. 12.1 представлена стратегия выделения и клонирования в *E. coli* гена рестриктазы *PstI* грамотрицательной бактерии *Providencia stuartii*

1. ДНК *P. stuartii* расщепляют с помощью *HindIII* и встраивают фрагменты в *HindIII*-сайт плазмиды pBR322.

2. Рекомбинантными плазмидами трансформируют клетки *E. coli* HB101 и выращивают их в жидкой среде, а затем инфицируют бактериофагом  $\lambda$ . Если в хозяйской клетке экспрессируется ген фермента рестрикции, то она оказывается устойчивой к литическому действию фагов типа  $\lambda$ , ДНК которых активно расщепляется синтезируемой рестриктазой.

3. Трансформированные клетки, устойчивые к фагу  $\lambda$ , подвергают осмотическому шоку, чтобы высвободить периплазматические белки. Определяют активность рестриктазы *PstI* в белковом экстракте.

4. Положительные клоны тестируют на наличие *PstI*-метилирующей активности.

Один положительный клон, выявленный в этом эксперименте, содержал встроенный фрагмент ДНК длиной 4 т. п. н. с интактным опероном рестриктазы и метилазы *Art* и промотором *P. stuartii*. В клоне, несущем эту генетическую конструкцию, соблюдался естественный временной порядок синтеза: вначале синтезировался метилирующий фермент, затем эндонуклеаза рестрикции. Уровень экспрессии гена рестриктазы *PsA* в *E. coli* был примерно в 10 раз выше, чем в *P. stuartii*. Как и предполагалось, рестриктаза находилась в периплазматическом пространстве, а метилаза — в цитоплазме. Метод получения *PstI* клонированием соответствующего гена в *E. coli* гораздо более эффективен, чем выделение этого фермента из *P. stuartii*.

Для выделения генов, кодирующих ферменты рестрикции и модификации (метилирования), можно использовать также другой подход, который состоит в следующем,

1. Создают банк клонов ДНК организма-донора, продуцирующего известную эндонуклеазу рестрикции. Используемый при этом плазмидный вектор должен содержать по крайней мере один сайт узнавания для этой рестриктазы.

2. Трансформируют *E. coli* гибридными плазмидами.

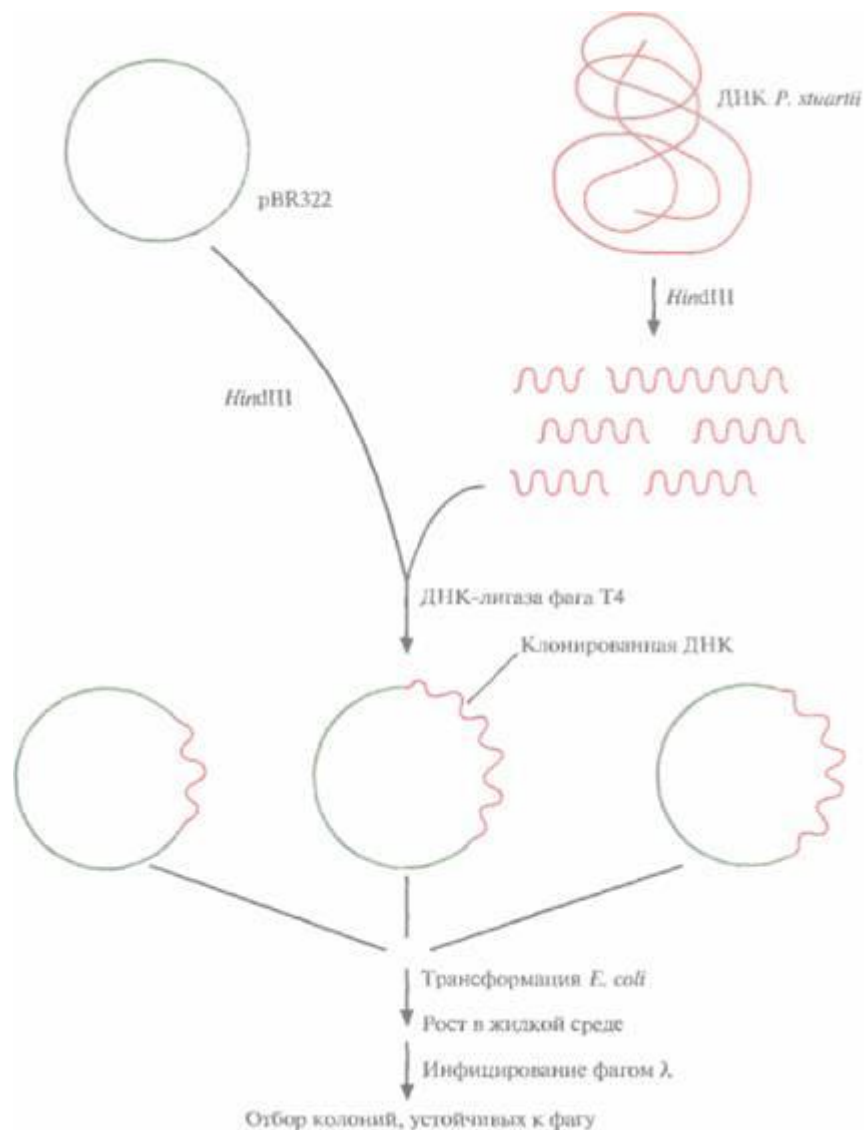
3. Из трансформированных клеток, выросших в жидкой селективной среде (т. е. из клеток, содержащих плазмиду), выделяют плазмидную ДНК.

4. Обработывают ее интересующей исследователя эндонуклеазой рестрикции,

5. Трансформируют *E. coli* плазмидными ДНК, обработанными эндонуклеазой рестрикции.

Ключевым моментом этого метода является то, что плазмидная ДНК клонов, несущих и экспрессирующих ген фермента модификации, оказывается устойчивой к расщеплению соответствующей эндонуклеазой рестрикции, поскольку сайты узнавания в ней метилированы.

Рис. 12.1. Клонирование гена рестриктазы *PstI* и отбор несущих его трансформированных бактериальных клеток. Хромосомную ДНК *P. stuartii* расщепляют *HindIII* и встраивают фрагменты в плазмиду pBR322. Трансформируют рекомбинантной плазмидой *E. coli*, выращивают клетки в жидкой среде и инфицируют фагом  $\lambda$ . Отбирают трансформанты, устойчивые к фагу; именно они несут и экспрессируют клонированный ген *PstI*.



Рассмотрим следующий пример. В плазмиду pBR322 встраивали *HindIII*-фрагменты ДНК *Desulfovibrio desulfuricans* и трансформировали ею клетки *E. coli*. Выделенную из трансформированных клеток плазмидную ДНК обрабатывали рестриктазой *DdeI*. Плазмиды, несущие и экспрессирующие ген метилирующего фермента, не расщеплялись, поскольку все восемь сайтов узнавания *DdeI* в pBR322 были метилированы. Смесь плазмид, обработанных *DdeI*, использовали для трансформации *E. coli*. Образование трансформантов, несущих ген функционального модифицирующего фермента *DdeI*, обеспечивали только целые кольцевые молекулы плазмидных ДНК. Остальные плазмиды были расщеплены эндонуклеазой рестрикции. Для того чтобы определить, какие клоны содержат и ген фермента модификации, и ген эндонуклеазы рестрикции, трансформанты тестировали на наличие в них активной рестриктазы *DdeI*. Описанный подход можно с успехом использовать для выделения гена любой рестриктазы, лишь бы он находился достаточно близко к гену соответствующего модифицирующего фермента и

был встроен в плазмидный вектор, имеющий по меньшей мере один сайт узнавания для данного фермента.

## Малые биологические молекулы

Используя технологию рекомбинантных ДНК, можно направленно изменять метаболизм микроорганизмов, вводя в них новые гены или модифицируя уже существующие. Основной целью таких изменений является создание рекомбинантного микроорганизма с новой ферментативной активностью, способного превращать существующий субстрат в ценный продукт, который обычно получают только сочетанием химических и микробиологических методов.

### Синтез L-аскорбиновой кислоты

В настоящее время для крупномасштабного производства L-аскорбиновой кислоты (витамина С) используют весьма трудоемкий процесс, включающий одну микробиологическую стадию и несколько химических; исходным субстратом для него является D-глюкоза (рис. 12.2). На последнем этапе этого процесса 2-кетоглюконовая кислота (2-KLG) превращается в кислых условиях в L-аскорбиновую кислоту. Биохимические исследования метаболизма различных микроорганизмов показали, что 2-KLG можно получить другим путем. Так, одни бактерии (*Acetobacter*, *Gluconobacter* и *Erwinia*) могут превращать глюкозу в 2,5-дикетоглюконовую кислоту (2,5-DKG), а другие (*Corynebacterium*, *Brevibacterium* и *Arthrobacter*), синтезирующие фермент 2,5-DKG-редуктазу, — преобразовывать 2,5-DKG в 2-KLG.

Используемый в настоящее время способ получения аскорбиновой кислоты можно усовершенствовать, если включить в него совместное культивирование указанных микроорганизмов для превращения глюкозы в 2-KLG. К сожалению, такое культивирование имеет свои трудности. Например, используемые микроорганизмы могут иметь разные оптимумы температуры и pH, могут различаться также состав среды и скорость роста. Иными словами, условия культивирования, оптимальные для одного организма, могут быть неприемлемы для другого, что приведет к спонтанному «вымыванию» из среды одного из них. В подобных случаях можно культивировать микроорганизмы последовательно (рис. 12.3), правда такой процесс трудно будет сделать непрерывным, если для роста микроорганизмов необходимы существенно разные среды. Наилучшим выходом из этой ситуации было бы создание одного микроорганизма, синтезирующего все ферменты, необходимые для превращения глюкозы в 2-KLG. *Erwinia herbicola* осуществляет превращение D-глюкозы в 2,5-DKG в несколько стадий, катализируемых разными ферментами, в то время как *Corynebacterium* sp. для превращения 2,5-DKG в 2-KLG необходима только одна стадия. Следовательно, наиболее простой способ создания одного микроорганизма, способного превращать D-глюкозу в 2-KLG, состоит в выделении гена 2,5-ОКО-редуктазы *Corynebacterium* sp. и введении его в *Erwinia herbicola*.

Первый шаг на этом пути состоит в выделении и очистке 2,5-DKG-редуктазы *Corynebacterium* sp. и определении последовательности ее первых 40 N-концевых аминокислот. Исходя из этих данных были синтезированы два 43-нуклеотидных гибрида зонда, соответствовавших разным частям белковой молекулы. Поскольку 71% нуклеотидов ДНК *Corynebacterium* sp. представляют собой либо G, либо C, зонды синтезировали таким образом, чтобы в третьем положении кодонов по возможности находились именно они. Это позволяло минимизировать число неспаренных оснований между зондами и искомой ДНК.

Синтезированные зонды использовали для скрининга банка клонов ДНК *Corynebacterium*, клоны, гибридизующиеся только с одним из зондов, исключали из дальнейшего рассмотрения, считая, что соответствующая ДНК не является искомой. Выделяли клон, содержащий ген 2,5-DKG-редуктазы, и секвенировали его. Нуклеотидные последовательности, расположенные до стартового кодона ATG, вырезали и заменяли их сигналами транскрипции и трансляции, функционирующими в *E. coli*, поскольку регуляторные последовательности грамположительных микроорганизмов типа *Corynebacterium* spp. не функционируют в клетках этого микроорганизма. Полученную конструкцию вводили в

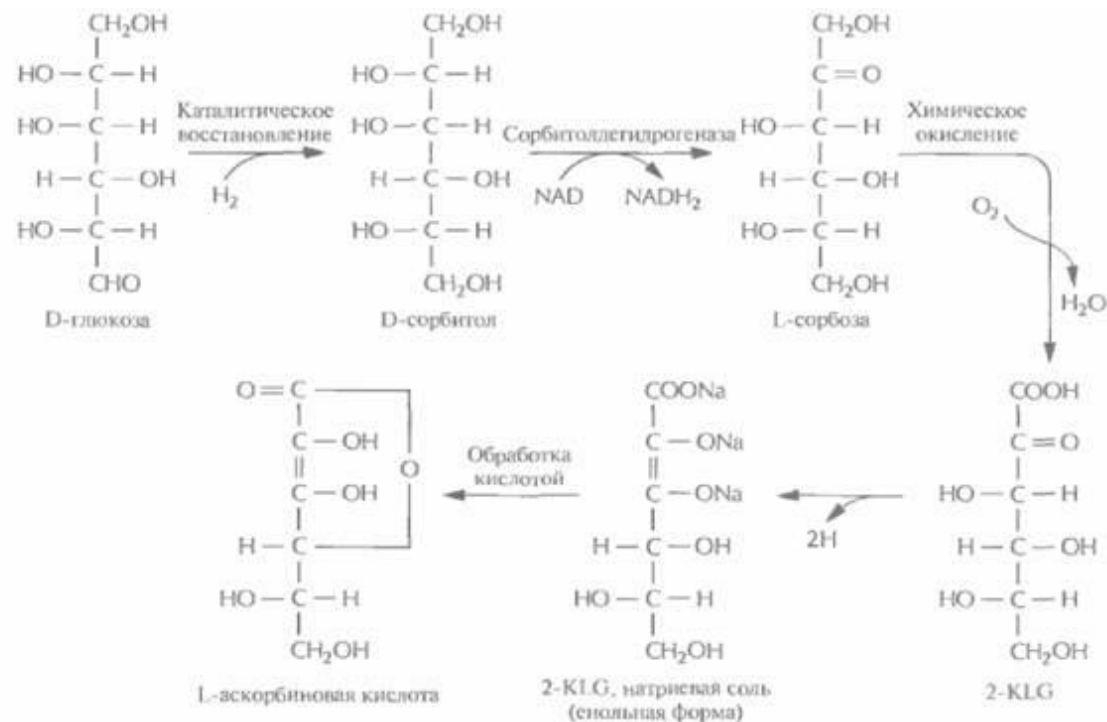


Рис. 12.2. Промышленный синтез L-аскорбиновой кислоты. Одна из стадий процесса, а именно превращение D-сорбитола в L-сорбозу, осуществляется при участии бактерии *Acetobacter suboxydans*, которая синтезирует фермент сорбитолдегидрогеназу. Остальные стадии представляют собой чисто химические реакции.

*E. coli* (при этом синтезировалась активная 2,5-DKG-редуктаза), а затем переклонировали в векторе с широким кругом хозяев и трансформировали им *Erwinia herbicola*.

Трансформированные клетки *Erwinia* активно превращали D-глюкозу непосредственно в 2-KLG, при этом собственные ферменты *Erwinia*, локализованные во внутренней мембране бактериальной клетки, преобразовывали глюкозу в 2,5-DKG, а 2,5-DKG-редуктаза, локализованная в цитоплазме, катализировала превращение 2,5-DKG в 2-KLG (рис. 12.4). Таким образом, с помощью генетических манипуляций метаболические реакции, протекающие в столь разных микроорганизмах, удалось осуществить в одном из них. Этот гибрид приобрел способность синтезировать конечный продукт комбинированного метаболического пути. Такой организм можно использовать как фабрику для производства 2-KLG, заменяющую первые три стадии в том процессе получения L-аскорбиновой кислоты, который используется в настоящее время (рис. 12.2).

Коммерческую ценность 2,5-DKG-редуктазы можно повысить, если произвести аминокислотные замены, повышающие каталитическую активность фермента и его термостабильность. В то время, когда был идентифицирован ген 2,5-DKG-редуктазы, аминокислотные остатки, участвующие в образовании активного центра этого фермента, еще не были установлены. Однако, исходя из данных об аминокислотной последовательности фермента, была воссоздана его вторичная структура, состоящая из восьми тесно расположенных параллельных  $\beta$ -слоев, перемежающихся восемью  $\alpha$ -спиралями, которые соединялись с  $\beta$ -слоями петлями разной длины (рис. 12.5). Такой характер укладки полипептидной цепи был установлен для 17 других ферментов с уже известной кристаллической структурой, и по аналогии с ними были идентифицированы три петли, возможно участвующие в связывании субстрата. С помо-

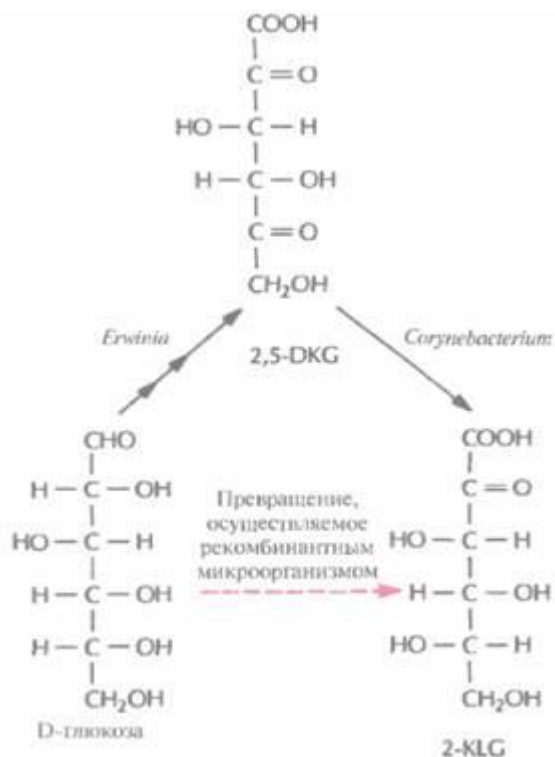


Рис. 12.3. Микробиологический синтез 2-KLG. *Erwinia* продуцирует три фермента, обеспечивающих синтез 2,5-DKG из D-глюкозы, а *Corynebacterium* - фермент, катализирующий превращение 2,5-DKG в 2-KLG. Таким образом, 2-KLG, непосредственный предшественник L-аскорбиновой кислоты, можно синтезировать из D-глюкозы совместным культивированием этих двух микроорганизмов. Альтернативный подход состоит в создании рекомбинантной бактерии *Erwinia*, экспрессирующей ген соответствующего фермента *Corynebacterium*.

щью олигонуклеотид-направленного мутагенеза были получены 12 мутантных белков, каждый из которых содержал одну аминокислотную замену в одной из петель. 11 мутантных форм 2,5-DKG-редуктазы обладали более низкой удельной активностью, чем нативный фермент, а 12-я, у которой остаток глутамина в положении 192 был заменен на аргинин, была примерно в два раза более активной. По данным кинетических исследований, повышение активности было связано с увеличением в 1,8 раз максимальной скорости ( $V_{max}$ ) и уменьшением на 25% константы Михаэлиса ( $K_M$ ) реакции, катализируемой ферментом. Замена глициновых остатков в положениях 55 и 57 на аланиновые позволила получить более термостабильный фермент по сравнению с нативной формой. Дальнейшие усилия будут, вероятно, направлены на получение фермента, сочетающего оба этих свойства.

### Синтез индиго

Множество бактерий, особенно бактерии вида *Pseudomonas*, способны утилизировать различные органические соединения типа нафталина, толуола, ксилола и фенола, которые являются для них единственным источником углерода. Очень часто гены ферментов, катализирующих расщепление этих органических соединений, располагаются в крупных природных плазмидах (длиной 50—200 т.п.н.). Чтобы ставить эксперименты с этими бактериями, в частности проводить целенаправленную модификацию генов ферментов, катализирующих те или иные метаболические реакции, приходится предпринимать детальные генетические и биохимические исследования, и нередко в ходе этих исследований делаются неожиданные и весьма интересные открытия. Рассмотрим следующий пример. Плазмида NAN7 содержит два разных оперона, которые позволяют несущим ее псевдомонадам использовать нафталин как единственный источник углерода. Для характеристики соответствующих генов расщепили плазмидную ДНК с помощью *Hind*III и лигировали фрагменты с линейаризованной *Hind*III плазмидой pBR322. Полученные гибридные молекулы ввели в клетки *E. coli* и отобрали трансформантов, устойчивых к ампициллину, но чувствительных к тетрациклину. Затем проверили всех трансформантов на способность образовывать нелетучие метаболиты — возможные продукты гидролиза радиоактивно меченного нафталина.

При исследовании одного из трансформантов, содержащего вставку длиной 10,5 т.п.н. и способного превращать нафталин в салициловую кислоту, обнаружилось, что минимальная ростовая среда, содержащая триптофан, приобретает синюю окраску. Тщательный анализ этого явления показал, что трансформированные клетки *E. coli* синтезировали краситель индиго. Синтез происходил в четыре стадии (рис. 12.6).

Рис. 12.4. Превращение D-глюкозы в 2-KLG рекомбинантной бактерией *Erwinia herbicola*. Все участвующие в этом процессе ферменты обозначены буквой E и последовательно пронумерованы, указана также их клеточная локализация.

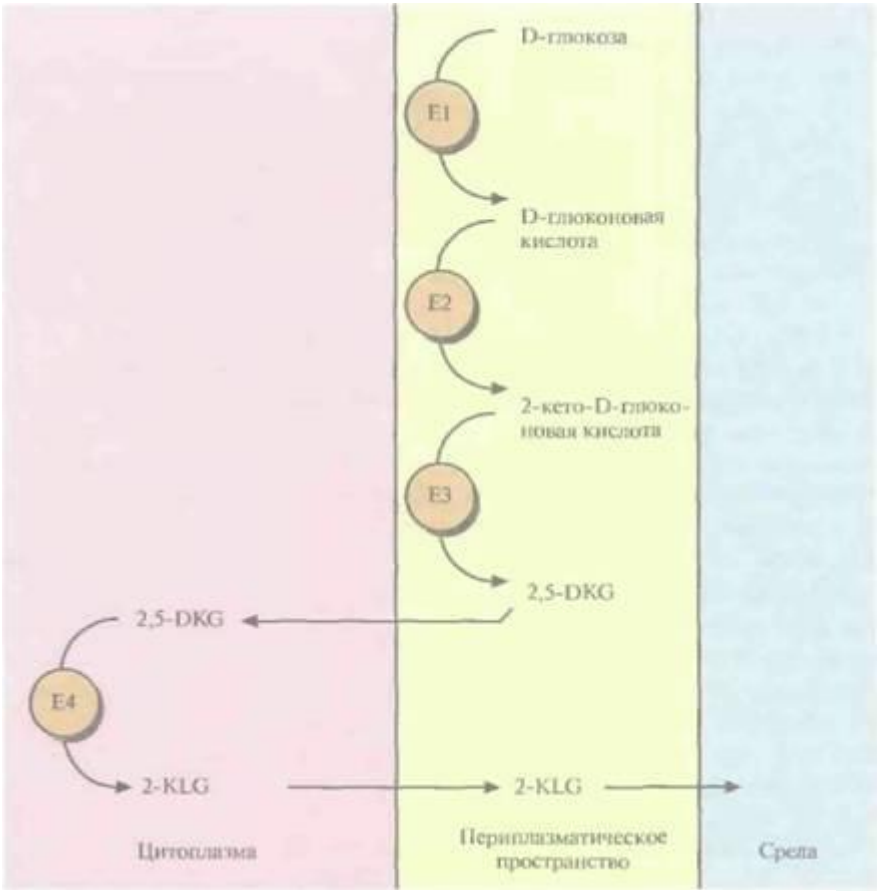
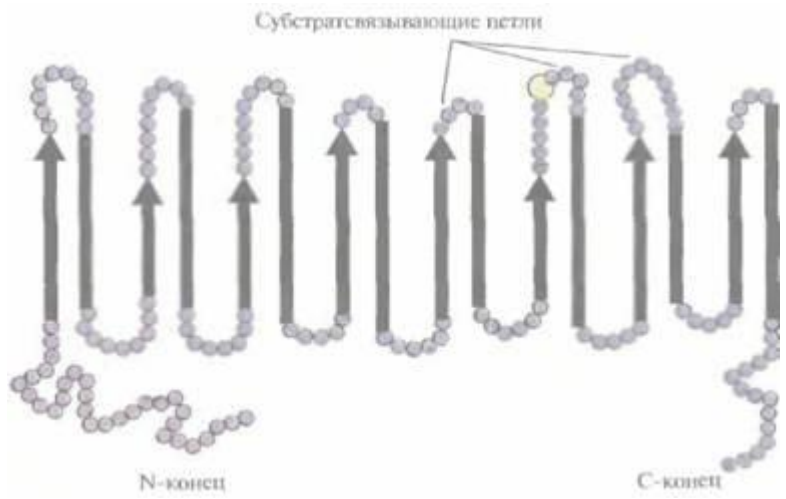


Рис. 12.5. Структура 2,5-DKG-редуктазы, воссозданная исходя из ее аминокислотной последовательности. Стрелки —  $\beta$ -слои, полосы —  $\alpha$ -спиральные участки, кружки аминокислотные остатки, находящиеся на N- и C-концах молекулы или соединяющие  $\beta$ -слои и  $\alpha$ -спирали. Показаны три петли, возможно, участвующие в связывании субстрата. Желтый кружок — 192-й аминокислотный остаток.





1. Превращение триптофана в индол с помощью триптофаназы, которая синтезируется в хозяйских клетках *E. coli*.

2. Окисление индола до *цис*-индол-2,3-дигидродиола под действием нафталиндиоксигеназы, которая кодируется ДНК, переклонированной из плазмиды NAH7.

3. Спонтанная дегидратация.

4. Окисление на воздухе с образованием индиго.

Таким образом, комбинация ферментов двух разных метаболических путей двух разных организмов привела к неожиданному синтезу красителя индиго. Введение в *E. coli* гена ксилороксидазы, содержащегося в плазмиде TOL, может обеспечить превращение триптофана в индоксил, спонтанно окисляющийся до индиго (рис. 12.6).

Индиго, синий пигмент, который применяется для окрашивания хлопка и шерсти, был впервые выделен из растений; сейчас его получают путем химического синтеза. По оценкам, в год производится примерно  $1,5 \cdot 10^7$  кг этого красителя на сумму около 200 млн. долл. Индиго окрашивают джинсовую ткань, и объем его продаж больше, чем любого другого красителя. Возможность получения индиго с помощью микроорганизмов позволяет разработать весьма эффективный и экономичный крупномасштабный микробиологический способ его производства, что дает возможность обойтись без использования таких токсичных веществ, как анилин, формальдегид и цианид, которые необходимы при химическом синтезе индиго. В настоящее время биотехнологи пытаются подобрать оптимальные условия выращивания больших количеств штамма *E. coli*, способного к синтезу индиго. Среди подбираемых параметров температура, pH и количество триптофана в среде, обеспечивающее максимальный выход

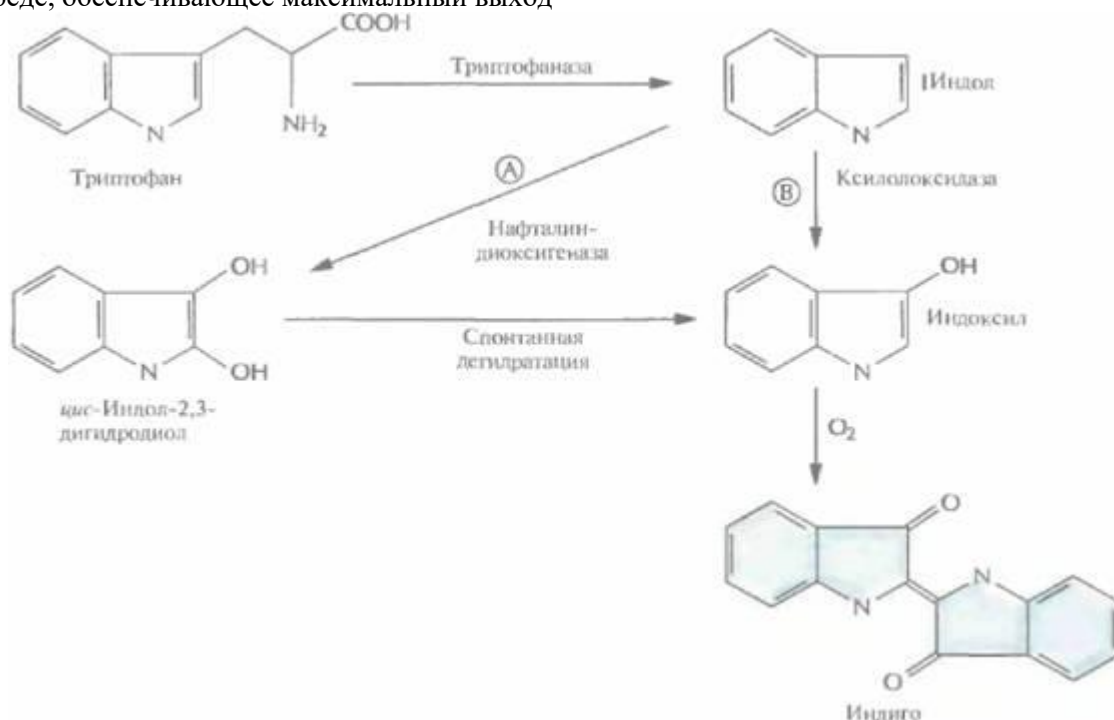


Рис. 12.6. Биосинтез индиго из триптофана, осуществляемый генетически модифицированной *E. coli*. Триптофаназа - один из ферментов, продуцируемых *E. coli*. Ген нафталиндиоксигеназы, катализирующей реакцию А, происходит из плазмиды NAH, а ген ксилороксидазы, катализирующей реакцию Б, — из плазмиды TOL. В трансформированных клетках *E. coli* индиго синтезируется либо по пути А, либо по пути Б, но не по ним обоим одновременно.

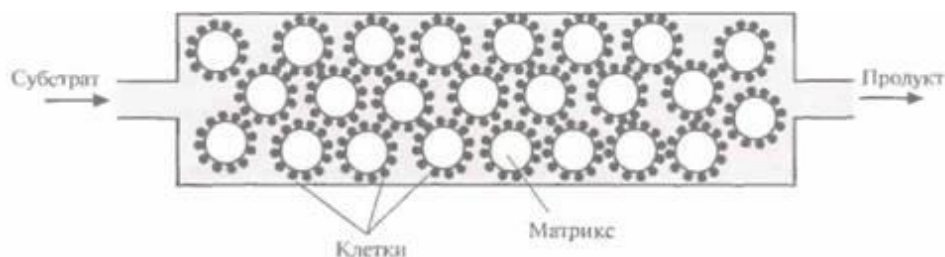


Рис. 12.7. Схематичное изображение биореактора, в котором можно было бы осуществлять синтез индиго с использованием рекомбинантных клеток *E. coli*. Клетки иммобилизованы на частицах твердого матрикса. В реактор непрерывно подается субстрат (триптофан) и непрерывно выводится продукт (индиго). Скорость переноса вещества через реактор лимитируется скоростью превращения субстрата в продукт.

продукта. Эта система еще не готова для коммерческого использования, но уже ясно, что микробиологический процесс мог бы проходить в биореакторе, в котором рекомбинантные *E. coli* химически иммобилизованы на твердой матрице (например, на целлюлозе или силикагеле). Реактор мог бы работать в непрерывном режиме, с поступлением триптофана с одной его стороны и удалением индиго с другой (рис. 12.7).

### Синтез аминокислот

Аминокислоты широко применяются в пищевой промышленности — в качестве усилителей вкуса и аромата, антиоксидантов и пищевых добавок; в сельском хозяйстве — в качестве кормовых добавок; в медицине — для терапии послеоперационных больных; в химической промышленности — в качестве исходных веществ при синтезе полимеров и производстве косметических средств (табл. 12.1). По оценкам, ежегодно в мире производится более 800 000 т аминокислот стоимостью более 5 млрд. долларов. При этом больше половины общего объема производства приходится на долю L-глутаминовой кислоты, которая используется для получения широко известного усилителя вкуса и аромата — глутамата натрия.

В промышленном масштабе аминокислоты получают в основном либо экстракцией из белковых гидролизатов, либо как продукты метаболизма двух неспорулирующих грамположительных почвенных бактерий, *Corynebacterium* или *Brevibacterium* spp. Обычно для повышения продуктивности этих микроорганизмов используется мутагенез с последующим отбором штаммов — сверхпродуцентов определенных аминокислот. Однако такой способ получения штаммов требует много времени, а эффективность его невелика. Альтернативный подход мог бы состоять в выделении и изменении специфических генов, кодирующих ключевые ферменты определенных биохимических реакций, на основании детальных биохимических данных об этих ферментах. Впрочем, такой генноинженерный подход может оказаться не столь простым. Так, в биосинтезе некоторых аминокислот могут участвовать несколько ферментов, которые активируются или ингибируются различными метаболитами, присутствующими в клетке. В такой ситуации трудно определить, какой фермент нужно модифицировать, чтобы увеличить выход конечного продукта. Кроме того, ученые пока не располагают исчерпывающими данными о биохимических свойствах указанных выше микроорганизмов, а соответствующие генноинженерные подходы находятся на стадии разработки. В частности, только создаются экспрессирующие векторы и методики трансформации для грамположительных организмов типа *Corynebacterium* и *Brevibacterium* spp.

Большинство плазмидных векторов с широким кругом хозяев реплицируются только в грамотрицательных микроорганизмах, поэтому необходимо создать векторы, специально предназначенные для экспрессии в *Corynebacterium* и *Brevibacterium* spp. Это могли бы быть челночные векторы *E. coli*—*Corynebacterium*. Та их часть, которая происходит из плазмид *E. coli*, может со-

Таблица 12.1. Применение аминокислот

| Аминокислота          | Применение/Свойства                                       |
|-----------------------|---|
| Аланин                | Усилитель вкуса и аромата                                 |
| Аргинин               | Лечение заболеваний печей и                               |
| Аспарагин             | Диуретик  |
| Аспарагиновая кислота | Усилитель вкуса и аромата; синтез подсластителей          |
| Валин                 | Растворы для внутривенных инъекций                        |
| Гистидин              | Лечение язв; антиоксидант                                 |
| Глицин                | Синтез подсластителей                                     |
| Глутамин              | Лечение язв   |
| Глутаминовая кислота  | Усилитель вкуса и аромата                                 |
| Изолейцин             | Растворы для внутривенных инъекций                        |
| Лейцин                | Растворы для внутривенных инъекций                        |
| Лизин                 | Кормовая добавка; пищевая добавка                         |
| Метионин              | Кормовая добавка  |
| Пролин                | Растворы для внутривенных инъекций                        |
| Серин                 | Косметическая промышленность                              |
| Тирозин               | Растворы для внутривенных инъекций: предшественник L-DOPA |
| Треонин               | Кормовая добавка  |
| Триптофан             | Растворы для внутривенных инъекций; антиоксидант          |
| Фенилаланин           | Инфузии; синтез подсластителей                            |
| Цистеин               | Производство хлеба; лечение бронхита; антиоксидант        |

          держать гены устойчивости к тетрациклину, хлорамфениколу или канамицину. Поскольку и *E. coli*, и *Corynebacterium* spp. чувствительны к данным антибиотикам, эти гены могли бы служить селективными маркерами для обоих микроорганизмов.

          Эффективный метод трансформации *C. glutamicum*, одного из видов *Corynebacterium*, часто используемых в такого рода экспериментах, до сих пор не разработан. Многие гены *C. glutamicum* неэффективно экспрессируются в *E. coli*. Поэтому для систем отбора, основанных на экспрессии гена (например, при комплементации), клетки *C. glutamicum* должны быть трансформированы полным банком клонов. К сожалению, частота трансформации при введении ДНК в *C. glutamicum* обычным способом или электропорацией очень низка. Ее можно существенно повысить, если для введения чужеродной ДНК использовать конъюгацию или удалить клеточные стенки трансформируемых клеток лизоцимом (использовать протопласты). Проникновение экзогенной плазмидной ДНК в протопласты облегчается в присутствии полиэтиленгликоля.

          Получены первые положительные результаты в увеличении выхода незаменимой аминокислоты триптофана, синтезируемой *C. glutamicum*. Для этого в клетки *C. glutamicum* дикого типа была введена вторая копия гена, кодирующего антранилатсинтазу, фермент, лимитирующий синтез триптофана (рис. 12.8). Ниже описан один из способов выделения этого гена.

          1. Библиотеку хромосомной ДНК *Brevibacterium flavum* клонировали в челночном векторе *C. glutamicum*—*E. coli* и ввели в мутантный штамм *C. glutamicum*, не синтезирующий активной антранилатсинтазы.

          2. Трансформантов отобрали по их способности расти в отсутствие антраниловой кислоты. Этим они отличались от мутантных нетрансформированных клеток.

          3. Вектор, содержащий ген антранилатсинтазы, перенесли в штамм *C. glutamicum* дикого типа.

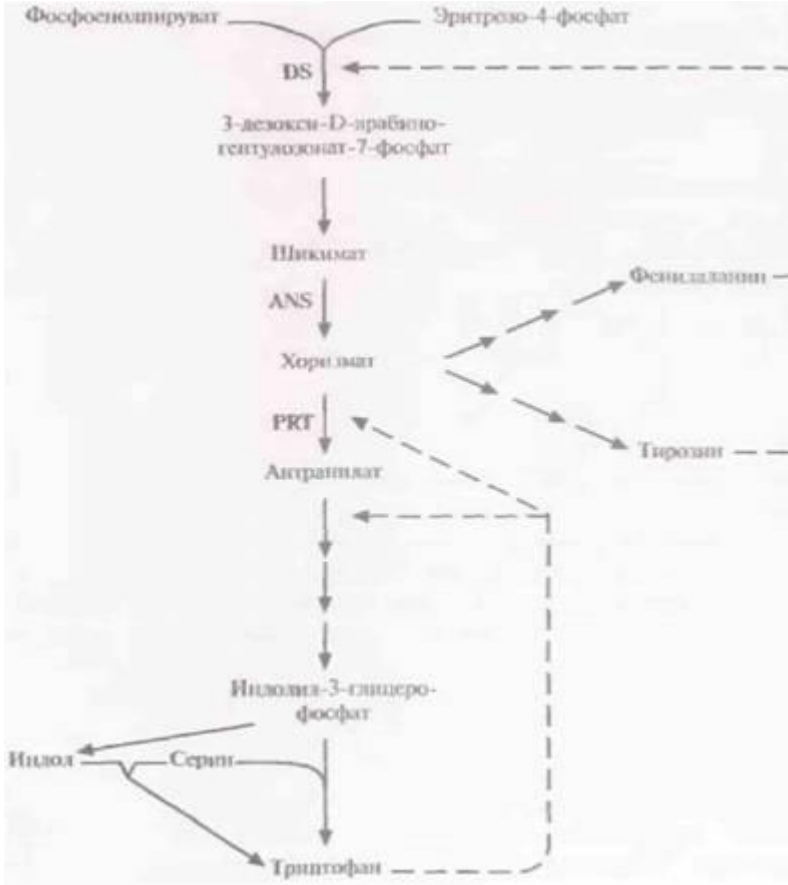
          В табл. 12.2 представлены результаты определения количества триптофана, синтезированного мутантным штаммом *C. glutamicum* и штаммом дикого типа, которые содержали или не содержали вектор с клонированным геном антранилатсинтазы. Как видно из таблицы, клони-

Таблица 12.2. Синтез триптофана некоторыми штаммами *C. glutamicum* при стандартных условиях роста<sup>1)</sup>

| Штамм                              | Концентрация триптофана, мг/мл |
|------------------------------------|--------------------------------|
| Мутантный штамм                    | 0,00                           |
| Мутантный штамм, содержащий вектор | 0,34                           |
| Дикий тип                          | 0,48                           |
| Дикий тип, содержащий вектор       | 1,12                           |

<sup>1)</sup> По данным Ozaki et al. U.S. parent 4,874,698<sub>т</sub> 1989.

Рис. 12.8. Упрощенная схема биосинтеза триптофана в клетках *C. glutamicum*. Сплошные линии — биосинтетические реакции, штриховые — ингибирование по типу обратной связи. В качестве побочного продукта образуется индол, который превращается в триптофан под действием триптофансинтазы β. DS — 3-дезоксид-арабиногептулозонат-7-фосфатсинтаза. ANS — антранилатсинтаза, PRT — антранилатфосфорибозилтрансфераза.



рованный ген практически полностью восстанавливал способность мутантного штамма синтезировать триптофан. Однако эффект введения этого гена в штамм дикого типа был еще сильнее: уровень синтеза триптофана в этом случае увеличивался примерно до 130%, что связано с более эффективным использованием доступных предшественников. Еще более высокий уровень синтеза триптофана достигался при введении в клетки *C. glutamicum* модифицированных генов трех ключевых ферментов: 3-дезоксид-арабиногептулозонат-7-фосфатсинтазы, антранилатсинтазы и антранилатфосфорибозилтрансферазы. Гены, кодирующие эти ферменты, благодаря внесенным в них мутациям стали нечувствительны к ингибированию конечным продуктом (ингибирование по типу обратной связи).

В качестве альтернативы для синтеза аминокислот можно использовать *E. coli*. Этот микроорганизм хорошо изучен, а генноинженерные методы работы с ним более или менее детально разработаны.

### Антибиотики

Со времени открытия пенициллина в конце 1920-х годов из различных микроорганизмов были выделены более 6000 антибиотиков, обладающих разной специфичностью и разным механизмом действия. Их широкое применение для лечения инфекционных заболеваний помогло сохранить миллионы жизней. Подавляющее большинство основных антибиотиков было выделено из грамположительной почвенной бактерии *Streptotnyces*, хотя их продуцируют также грибы и другие грамположительные и грамотрицательные бактерии. Ежегодно во всем мире производится 100 000 т антибиотиков на сумму

примерно 5 млрд. долларов, в том числе более 100 млн. долларов приходится на долю антибиотиков, добавляемых в корм скоту в качестве добавок или ускорителей роста.

По оценкам, каждый год ученые обнаруживают от 100 до 200 новых антибиотиков, прежде всего в рамках обширных исследовательских программ по поиску среди тысяч различных микроорганизмов таких, которые синтезировали бы уникальные антибиотики. Получение и клинические испытания новых препаратов обходятся очень дорого, и в продажу поступают только те из них, которые имеют большую терапевтическую ценность и представляют экономический интерес. На их долю приходится 1—2% всех обнаруживаемых антибиотиков. Большой эффект здесь может дать технология рекомбинантных ДНК. Во-первых, с ее помощью можно создавать новые антибиотики с уникальной структурой, оказывающие более мощное воздействие на определенные микроорганизмы и обладающие минимальными побочными эффектами. Во-вторых, генноинженерные подходы могут использоваться для увеличения выхода антибиотиков и соответственно для снижения стоимости их производства.

При создании рекомбинантных штаммов *Streptomyces* — основного микроорганизма, используемого для получения антибиотиков, — важно помнить, что трансформация и отбор трансформированных клеток не должны быть слишком сложными. Однако в отличие от *E. coli* *Streptomyces* существуют не в виде изолированных клеток, а в виде протяженных мицелл, поэтому перед трансформацией необходимо разрушить клеточную стенку и высвободить отдельные протопласты (рис. 12.9). Без этого будет невозможно отличить трансформированные клетки от нетрансформированных, поскольку видимые колонии на твердой среде будут образовываться из группы клеток, а не из индивидуальной клетки; соответственно колонии, растущие в присутствии селективного антибиотика, будут представлять собой смесь трансформированных и нетрансформированных клеток. Проникновение плазмидной ДНК в протопласты *Streptomyces* облегчается в присутствии полиэтиленгликоля. После трансформации протопласты сначала высевают на твердую среду, чтобы образовалась

клеточная стенка, а затем для отбора трансформированных клеток переносят на селективную среду, обычно содержащую либо неомицин, либо тиострептон.



Рис. 12.9. Схема трансформации и отбора рекомбинантных штаммов *Streptomyces*. Трансформированные клетки обозначены розовыми кружками, нетрансформированные — зелеными. ПЭГ — полиэтиленгликоль.

### Клонирование генов биосинтеза антибиотиков

Процесс биосинтеза одного антибиотика может состоять из 10—30 ферментативных реакций, так что клонирование всех генов его биосинтеза -задача не из легких. Один из подходов к выделению полного набора таких генов основан на трансформации одного или нескольких мутантных штаммов, не способных синтезировать данный антибиотик, банком клонов, созданным из хромосомной ДНК. штамма дикого типа. После введения банка клонов в мутантные клетки проводят отбор трансформантов, способных синтезировать антибиотик. Затем выделяют плазмидную ДНК клона, содержащего функциональный экспрессирующийся ген антибиотика [т. е. ген, восстанавливающий (комплементирующий) утраченную мутантным штаммом функцию], и используют ее в качестве зонда для скрининга другого банка клонов хромосомной ДНК штамма дикого типа, из которого отбирают клоны, содержащие нуклеотидные последовательности, которые перекрываются с последовательностью зонда. Таким образом идентифицируют, а затем клонируют элементы ДНК, примыкающие к комплементирующей последовательности, и воссоздают полный кластер генов биосинтеза антибиотика. Описанная процедура относится к случаю, когда эти гены сгруппированы в одном сайте хромосомной ДНК. Если же гены биосинтеза разбросаны в виде небольших кластеров по разным сайтам, то нужно иметь по крайней мере по одному мутанту на кластер, чтобы получить клоны ДНК, с помощью которых можно идентифицировать остальные гены кластеров.

Этот подход с успехом использовался для идентификации некоторых генов биосинтеза ундецилпродигиозина из *Streptomyces coelicolor* A3 (рис. 12.10). В этом случае комплементационный анализ основывается на сравнении цвета колоний: колонии микроорганизмов дикого типа имеют красный цвет, а колонии мутантных микроорганизмов — кремовый. Таким образом, в результате комплементации образуется красная колония.

Помимо комплементации, для идентификации генов биосинтеза антибиотиков могут использоваться и более прямые подходы. Так, с

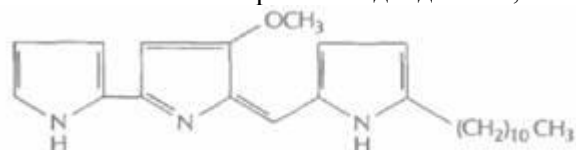


Рис. 12.10. Структурная формула ундецилпродигиозина.

помощью генетических или биохимических экспериментов можно идентифицировать, а затем выделить один или несколько ключевых ферментов биосинтеза, определить их N-концевые аминокислотные последовательности и, исходя из этих данных, синтезировать олигонуклеотидные зонды. Этот подход использовался для выделения из *Penicillium chrysogenum* гена синтетазы изопенициллина N. Этот фермент катализирует окислительную конденсацию  $\delta$ -(L- $\alpha$ -аминоадирил)-L-цистеинил-D-валина в изопенициллин N, ключевое промежуточное звено в биосинтезе пенициллинов, цефалоспоринов и цефамицинов (рис. 12.11).

### Синтез новых антибиотиков

Новые антибиотики с уникальными свойствами и специфичностью можно получить, проводя генноинженерные манипуляции с генами, участвующими в биосинтезе уже известных антибиотиков. Один из первых экспериментов, в ходе которого был получен новый антибиотик, состоял в объединении в одном микроорганизме двух немного различающихся путей биосинтеза антибиотика.

Одна из плазмид *Streptomyces*, pIJ2303, несущая фрагмент хромосомной ДНК *S. coelicolor* длиной 32,5 т.п.н., содержит все гены ферментов, ответственных за биосинтез из ацетата антибиотика актинородина, представителя семейства изохроманхиновых антибиотиков (рис. 12.12). Целую плазмиду и различные субклоны, несущие части 32,5 т.п.н.-фрагмента (например, pIJ2315), вводили либо в штамм AM-7161 *Streptomyces* sp., синтезирующий родственный антибиотик медеpmицин, либо в штамм B1140 или Tü22 *S. violaceoruber*, синтезирующие родственные антибиотики гранатицин и дигидрогранатицин.

Все указанные антибиотики являются кислотно-щелочными индикаторами, которые при-



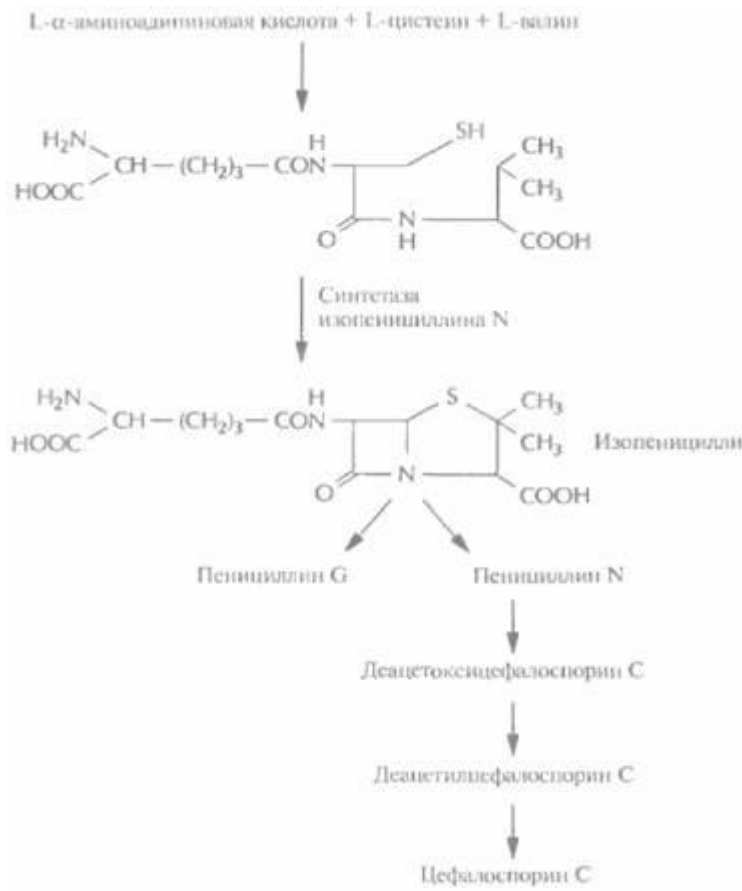


Рис. 12.11. Биосинтез ленициллинов и цефалоспоринов в *P. chrysogenum*. Синтетаза изопенициллина N катализирует синтез из δ-(L-α-аминоалилил)-L-цистеинил-D-валина изопенициллина N — предшественника пенициллина G, пенициллина N и цефалоспорина C.

дают растущей культуре характерный цвет, зависящий от pH среды (табл. 12.3). В свою очередь pH (и цвет) среды зависят от того, какое соединение синтезируется. Мутанты родительского штамма *S. coelicolor*, не способные синтезировать актинородин, бесцветные. Появление окраски после трансформации штамма AM-7161 *Streptomyces* sp. либо штаммов B1140 или Tü22 *S. violaceoruber* плазмидой, несущей все или несколько генов, кодирующих ферменты биосинтеза актинородина, свидетельствует о синтезе нового антибиотика (рис. 12.12, табл. 12.3), Трансформанты штамма AM-7161 *Streptomyces* sp. и штамма B1140 *S. violaceoruber*, содержащие плазмиду pJ2303, синтезируют антибиотики, кодируемые и плазмидой, и хромосомной ДНК. Однако при трансформации штамма Tü22 *S. violaceoruber* плазмидой pJ2303 наряду с актинородином синтезируется новый антибиотик — Дигидрогранатинодин, а при трансформации штамма AM-7161 *Sireptomuces* sp. плазмидой pJ2315 синтезируется еще один новый антибиотик — медевродин А.

В структурном отношении эти новые антибиотики мало отличаются от актинородина, медевермина, гранатицина и гидрогранатицина и, вероятно, образуются в том случае, когда промежуточный продукт одного пути биосинтеза служит субстратом для фермента другого пути. Когда будут детально изучены биохимические свойства различных путей биосинтеза антибиотиков, появится возможность создавать новые уникальные высокоспецифичные антибиотики, манипулируя генами, которые кодируют соответствующие ферменты.

**Разработка новых методов получения поликетидных антибиотиков**

Термин «поликетидные» относится к классу антибиотиков, которые образуются в результате

Таблица 12.3. Антибиотики, синтезируемые различными штаммами *Streptomyces*, в том числе штаммами, трансформированными плазмидами pIJ2303 и pIJ2315<sup>1)</sup>

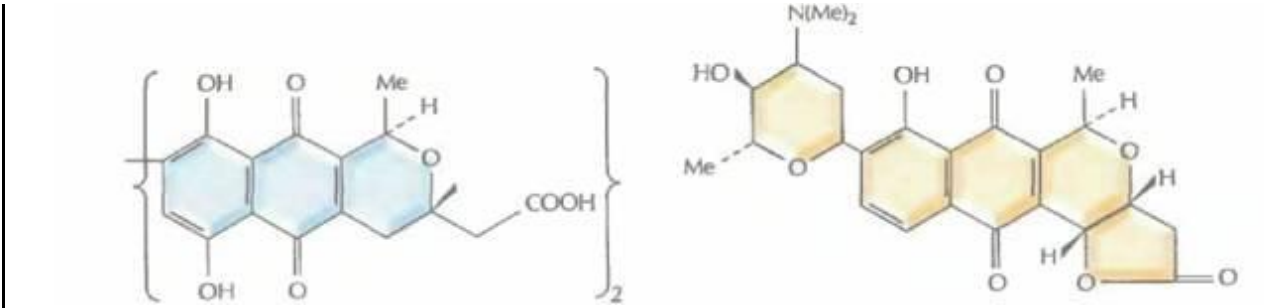
| Штамм/плазида                         | Цвет культуры |                 | Антибиотик(и)                               |
|---------------------------------------|---------------|-----------------|---|
|                                       | кислая среда  | щелочная среда  |   |
| <i>S. coelicolor</i>                  | Красный       | Синий           | Актинороллин                                |
| <i>Streptomyces</i> sp.               | Желтый        | Коричневый      | Медермицин                                  |
| <i>Streptomyces</i> sp./pIJ2303       | Красный       | Синий           | Медермицин, актинороллин                    |
| <i>Streptomyces</i> sp./pIJ2315       | —"            | Фиолетовый      | Медерролин А, медермицин                    |
| <i>S. violaceoruber</i> B1140         | —"            | Сине-фиолетовый | Гранатицин, дигидрогранатицин               |
| <i>S. violaceoruber</i> B1140/pIJ2303 | —"            | —"              | Гранатицин, дигидрогранатицин, актинороллин |
| <i>S. violaceoruber</i> T022          | —"            | —"              | Гранатицин, дигидрогранатицин               |
| <i>S. violaceoruber</i> T022/pIJ2303  | —"            | —"              | Дигидрогранатироллин, актинороллин          |

<sup>1)</sup> По данным работы Horwood et al., *Nature* 314: 642–644, 1985.

последовательной ферментативной конденсации карбоновых кислот типа ацетата, пропионата и бутирата. Некоторые поликетидные антибиотики синтезируются растениями и грибами, но большая их часть образуется актиномицетами в виде вторичных метаболитов. Прежде чем. проводить манипуляции с генами, кодирующими ферменты биосинтеза поликетидных антибиотиков, необходимо выяснить механизм действия этих ферментов.

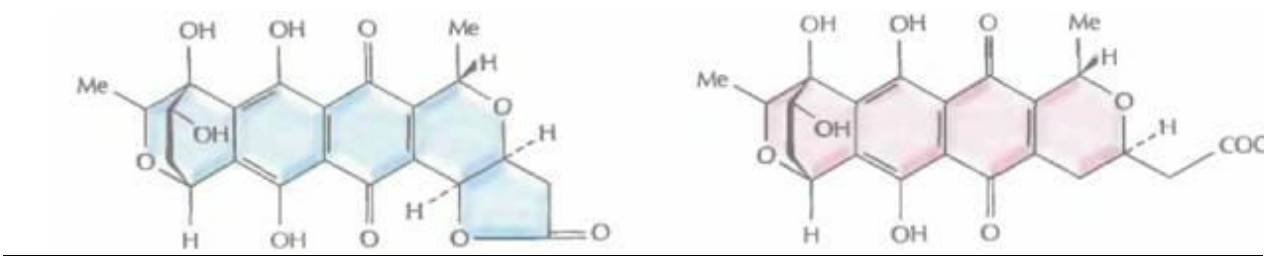
Поликетидные антибиотики синтезируются по тому же пути, что и длинноцепочечные жирные кислоты. В результате каждого цикла конденсации к растущей углеродной цепи добавляется β-кетогруппа. Процесс состоит из ряда повторяющихся стадий, включающих восстановление кетогруппы, дегидратацию и восстановление β-еноильных групп в растущей поликетидной цепи. Существуют два класса поликетидсинтаз — ферментных комплексов, ответственных за синтез поликетидных антибиотиков (рис. 12.13). Первый класс составляют синтазы, катализирующие реакции биосинтеза ароматических поликетидов; каждая синтаза представляет собой один полипептид с одним активным центром, который последовательно катализирует биосинтетические реакции (рис. 12.13, А). Второй класс включает синтазы, образованные несколькими полипептидами (А~Е на рис. 12.13, Б); каждый из них имеет свой активный центр и обладает специфической ферментативной активностью, катализирующей определенную реакцию биосинтеза.

Если каждый домен субъединицы многофункциональной поликетидсинтазы, обладающий ферментативной активностью, катализирует определенную реакцию, то утрата любой из активностей затронет только одну реакцию биосинтеза, а изменение домена с известной функцией приведет к предсказуемым изменениям структуры синтезируемого антибиотика. Так, детально изучив генетические и биохимические составляющие биосинтеза эритромицина в клетках *Saccharopolyspora erythraea*, удалось внести специфические изменения в гены, ассоциированные с биосинтезом этого антибиотика, и синтезировать производные эритромицина с другими свойствами. Вначале была определена первичная структура фрагмента ДНК 5, *erythraea* длиной 56т. п. н., содержащего кластер генов *ery*, затем двумя разными способами модифицирована эритромицинполикетидсинтаза. Для этого 1) удаляли участок ДНК, кодирующий β-кеторедуктазу, либо 2) вносили изменение в участок ДНК, кодирующий еноилредуктазу. Делеция β-кеторедуктазного гена приводила к накоплению промежуточного продукта, у которого к С-5-атому кольца была присоединена карбонильная группа, а не гидроксильная (рис. 12,14), а мутация в гене еноилредуктазы — к образованию двойной связи между атомами С-6 и С-7 (рис. 12.14). Из этих экспериментов следует, что если идентифицировать и охарактеризовать кластер генов, кодирующих ферменты биосинтеза определенного поликетидного антибиотика, то, внося в



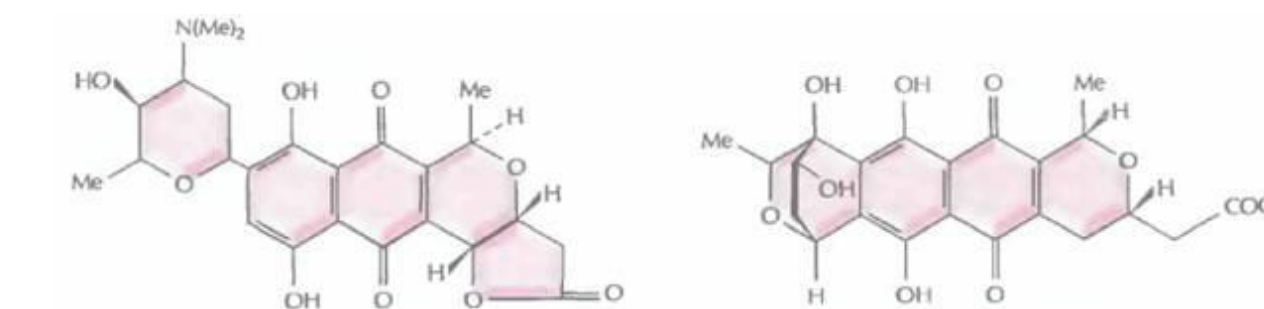
Актинородин

Медермицин



Гранатин

Дигидрогранатин



Медерродин А

Дигидрогранатиродин

Рис. 12.12. Структурные формулы различных изохроманхиноновых антибиотиков, синтезируемых штаммами *Streptomyces*. *S. coelicolor* дикого типа и плазмиды pIJ2303 кодируют актинородин; *Streptomyces* sp. синтезирует медермицин, а *S. violaceoruber* — гранатин и дигидрогранатин. Синтезируемые гибридные антибиотики — это медерродин А и дигидрогранатиродин.

них специфические изменения, можно будет направленно изменять структуру антибиотика. Кроме того, вырезая и соединяя те или иные участки ДНК, можно перемещать домены поликетидсинтазы и получать новые поликетидные антибиотики.

Все кластеры генов ароматических поликетидов содержат три гена, кодирующих так называемую минимальную поликетидсинтазу. Этот ферментный комплекс включает кетосинтазу (с ацилтрансферазным доменом), фактор, определяющий длину цепи, и ацилпереносящий белок. Минимальная поликетидсинтаза отвечает за синтез ароматического поликетидного остова, а его модификации осуществляются другими ферментами, действующими согласо-

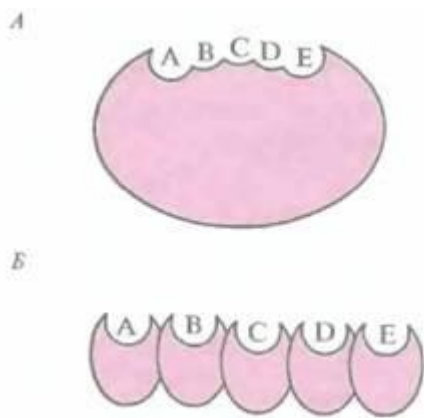


Рис. 12.13. Схематическое изображение структуры поликетидсинтазы ароматических поликетидов, у которой активный центр находится в одном полипептиде (А), и поликетидсинтазы, представляющей собой комплекс нескольких полипептидов с разными активными центрами (Б). Ферменты обоих типов содержат несколько доменов (А— Е), каждый из которых обладает собственной ферментативной активностью.

ванно с ней. Гены, кодирующие все эти ферменты, обычно организованы в один кластер (рис. 12.15). Каждый кластер генов кодирует синтез определенного антибиотика. С помощью обмена генами между кластерами были синтезированы два новых ароматических поликетидных антибиотика (рис. 12.16), что еще раз иллюстрирует возможности генной инженерии.

Усовершенствование производства антибиотиков

С помощью генной инженерии можно не только создавать новые антибиотики, но и увеличивать эффективность синтеза уже известных. Лимитирующим фактором в промышленном производстве антибиотиков с помощью *Streptomyces* spp. часто является количество доступного клеткам кислорода. Вследствие плохой растворимости кислорода в воде и высокой плотности культуры *Sireptomyses* его часто оказывается недостаточно, рост клеток замедляется и выход антибиотика снижается. Чтобы решить эту проблему, можно, во-первых, изменить конструкцию биореакторов, в которых выращивается культура *Streptomyces*, а во-вторых, используя методы генной инженерии, создать штаммы *Streptomyces*, более эффективно использующие имеющийся кислород. Эти два подхода не исключают друг друга.

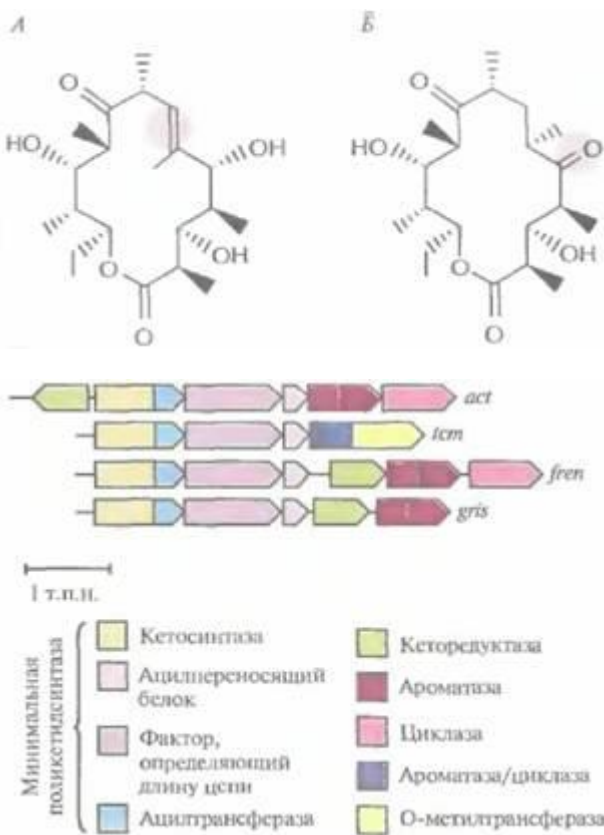


Рис. 12.14. Производные эритромицина, полученные генноинженерными методами. А. В результате мутации в гене еноилредуктазы образуется продукт с двойной связью между атомами С-6 и С-7 (цветной кружок). Б. Делеция гена β-кеторедуктазы сопровождается образованием производного с С-5-карбонильной, а не гидроксильной группой (цветной кружок). (По данным работы Kutz, Donadio, *Annu. Rev. Microbiol.* 47: 875-912, 1993.)

Рис. 12.15. Кластер генов биосинтеза ароматических поликетидных антибиотиков актинородина (*act*), тетраценомицина (*tcm*), френолицина (*fren*) и гризеузина (*gris*). Каждый кластер содержит гены, кодирующие минимальную поликетидсинтазу, которая отвечает за синтез поликетидного остова. Ферменты, кодируемые другими генами, катализируют реакции его модификации. Сужающийся «конец» гена указывает направление его транскрипции.

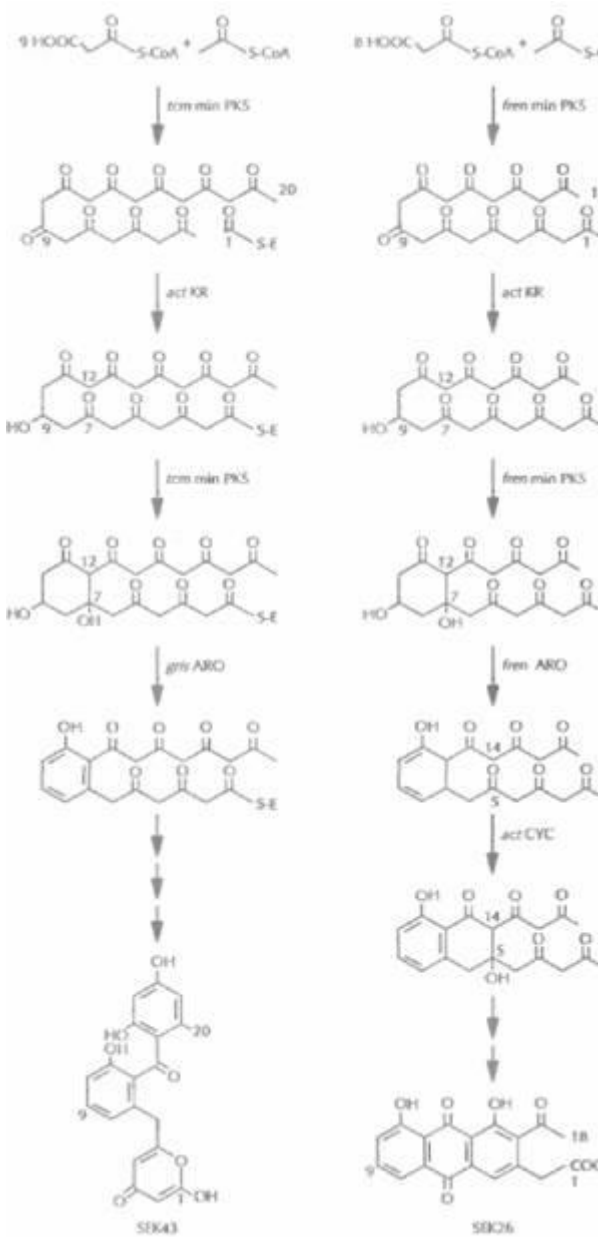


Рис. 12.16. Искусственно созданные пути биосинтеза поликетидных антибиотиков SEK43 и SEK26- Обозначения: *act* — актинородин, *tcm* — тетраценомицин, *fren* — френолицин, *gris* -гризеузин, *min PKS* — минимальная поликетидсинтаза, *KR* — β-кеторедуктаза. *ARO* -ароматаза, *CYC* — цикл а за.

Одна из стратегий, используемых некоторыми аэробными микроорганизмами для выживания в условиях недостатка кислорода, состоит в синтезе гемоглобинподобного продукта, способного аккумулировать кислород и доставлять его в клетки. Например, аэробная бактерия *Vitreoscilla* sp. синтезирует гомодимерный гемсодержащий белок, функционально подобный эукариотическому гемоглобину. Ген «гемоглобина» *Vitreoscilla* был выделен, встроен в плазмидный вектор *Streptomyces* и введен в клетки этого микроорганизма. После его экспрессии на долю гемоглобина *Vitreoscilla* приходилось примерно 0,1% всех клеточных белков *S. coelicolor* даже в том случае, когда экспрессия осуществлялась под контролем собственного промотора гена гемоглобина *Vitreoscilla*, а не промотора *Streptomyces*. Трансформированные клетки *S. coelicolor*, растущие

## ВАЖНАЯ ВЕХА

## Получение 2-кето-L-гулоната промежуточного продукта синтеза L- аскорбиновой кислоты — с помощью рекомбинантной бактерии *Erwinia herbicola*

S. Anderson, C. B. Marks, R. Lazarus. J. Miller, K. Stafford, J. Serymour, D. Light, W. Rastetter, D. Este» *Science* 230: 144-149, 1985

Для направленного изменения удается выделить нужный ген и ким образом, прежде чем прокариот, синтезирующих подобрать подходящие условия для идентифицировать ген, нужно было определенные метаболиты, в его экспрессии. Чтобы создать очистить соответствующий белок и принципе есть два пути. Во-первых, бактерию, синтезирующую 2-кето- частично секвенировать его, а затем можно изменить активность или L-гулоновую кислоту, на основании данных об содержание одного или нескольких непосредственного аминокислотной последовательности ферментов того или иного предшественника витамина С в сконструировать зонды для биосинтетического пути с тем, чтобы промышленном производстве гибридизации. Это была одна из увеличить продукцию нужного этого витамина, Андерсон и др. первых работ, относящихся к той метаболита. Во-вторых, в выделили из *Corynebacterium* ген области исследований, которую прокариотический геном можно фермента, катализирующего иногда называют инженерией ввести чужеродные гены, превращение 2,5-дикето-D- метаболизма. В такого рода кодирующие ферменты, которые, глюконовой кислоты в 2-кето-L- работах из одного микроорганизма используя эндогенный метаболит в гулоновую кислоту, и ввели этот в другой переносят гены, качестве субстрата, обеспечат ген в клетки *Erwinia* sp. — ответственные за какую-то часть синтез метаболита, изначально не бактерии, синтезирующей 2,5- метаболического пути, так что продуцируемого хозяйской клеткой. дикето-Dглюконовую кислоту из D- второй микроорганизм приобретает. Такого рода манипуляции глюкозы. Выделение этого гена способность синтезировать новые представляются достаточно осложнялось тем, что сам фермент метаболиты. простыми, однако далеко не всегда практически не был изучен. Та-

при низком содержании растворенного кислорода (примерно 5% от насыщающей концентрации), синтезировали в 10 раз больше актинородина на 1 г сухой клеточной массы и имели большую скорость роста, чем нетрансформированные. Этот подход можно использовать и для обеспечения кислородом других микроорганизмов, растущих в условиях недостатка кислорода. Исходным материалом при химическом синтезе некоторых цефалоспоринов — антибиотиков, обладающих незначительным побочным эффектом и активных в отношении множества бактерий, — является 7-аминоцефалоспорановая кислота (7ACA), которая в свою очередь синтезируется из антибиотика цефалоспорина С (рис. 12,11). К сожалению, природных микроорганизмов, способных синтезировать 7ACA, до сих пор не выявлено. Новый путь биосинтеза 7ACA был сконструирован включением специфических генов в плазмиду гриба *Acremonium chrysogenum*, который обычно синтезирует только цефалоспорин С. Один из этих генов был представлен кДНК гриба *Fusarium solani*, кодирующей оксидазу D-аминокислот, а другой происходил из геномной ДНК *Pseudomonas diminuta* и кодировал цефалоспоринацилазу. В плазмиде гены находились под контролем промотора *A. chrysogenum*. На первом этапе нового биосинтетического пути цефалоспорин С превращается в 7-β-(5-карбокси-5-оксопентанамид)цефалоспорановую кислоту (кето-AD-7ACA) при помощи оксидазы D-аминокислот (рис. 12.17). Часть этого продукта, вступая в реакцию с пероксидом водорода, одним из побочных продуктов, превращается в 7-р-(4-карбоксибутанамид)цефалоспорановую кислоту (GL-7ACA). И цефалоспорин С, и кето-AD-7ACA, и GL-7ACA могут подвергаться гидролизу цефалоспоринацилазой с образованием 7ACA, однако только 5% цефалоспорина С напрямую гидролизуются до 7ACA. Следовательно, для образования 7ACA с высоким выходом необходимы оба фермента.



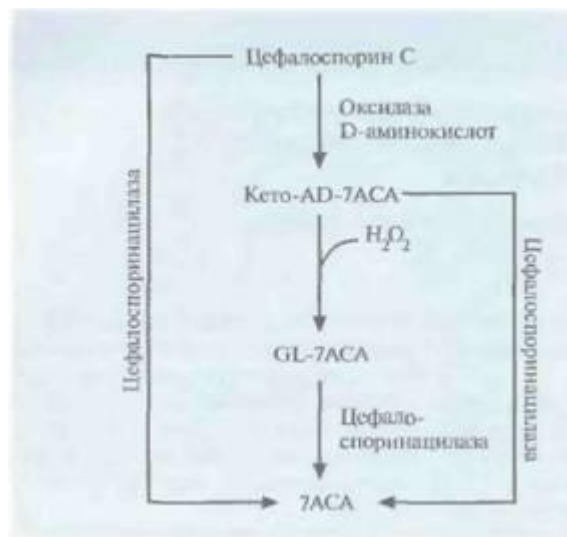


Рис. 12.17. Генетически сконструированный путь биосинтеза 7-аминоцефалоспоровой кислоты (7ACA) из цефалоспорина С. Ген оксидазы D-аминокислот выделен из гриба *F. solani*, а ген цефалоспорициназы - из бактерии *P. diminuta*.

## Биополимеры

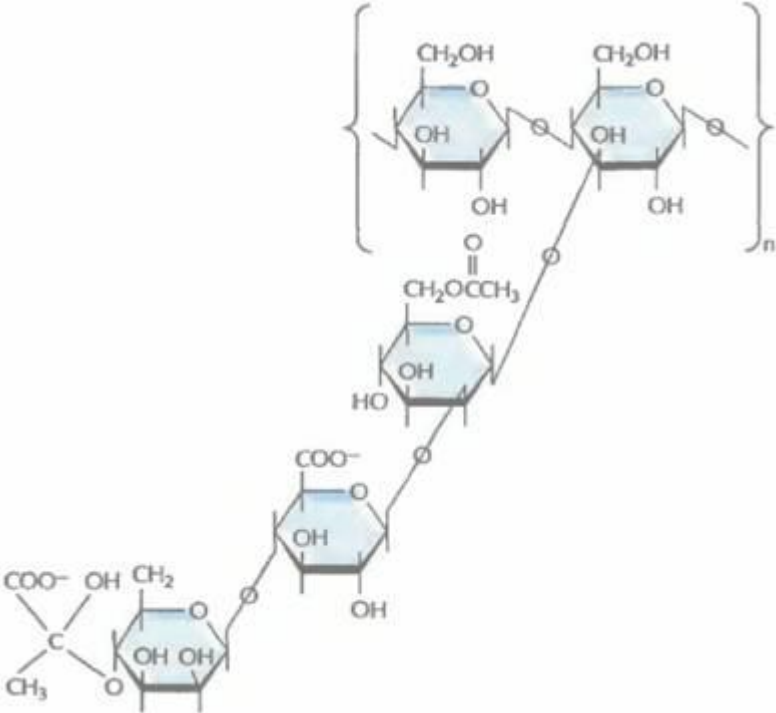
Биополимеры — это высокомолекулярные соединения, синтезируемые живыми организмами. Некоторые из них обладают ценными физическими и химическими свойствами и могут использоваться в пищевой, перерабатывающей и фармацевтической промышленности. С возникновением технологии рекомбинантных ДНК появилась возможность создавать новые биополимеры, заменять синтетические продукты их биологическими аналогами, модифицировать уже существующие биополимеры с целью улучшения их физических и структурных характеристик, повышать эффективность соответствующих промышленных процессов, уменьшать их стоимость.

### Создание рекомбинантной бактерии *Xanthomonas campestris* с целью получения ксантановой слизи

*Xanthomonas campestris* — грамотрицательная облигатно аэробная почвенная бактерия, синтезирующая ценный коммерческий биополимер ксантановую слизь, высокомолекулярный экзополисахарид. Его структурный каркас составляет линейная полимерная цепь из молекул глюкозы. К каждому второму глюкозному остатку присоединена трисахаридная боковая цепь, состоящая из одного остатка глюкуроновой кислоты и двух остатков маннозы (рис. 12,18). Ксантановая слизь имеет высокую вязкость, не разрушается в агрессивных физических и химических средах и по физическим и химическим свойствам напоминает пластик. В частности, ее можно использовать как стабилизирующий, эмульгирующий, загущающий или суспендирующий агент. Для успешного коммерческого производства ксантановой слизи необходимо выращивать *X. campestris* на недорогом и доступном источнике углерода. *X. campestris* дикого типа эффективно утилизирует глюкозу, сахарозу и крахмал, но не лактозу. При производстве сыра в большом количестве образуется такой побочный продукт, как сыворотка. Она состоит из воды (94—95%), лактозы (3,5—4%) и небольших количеств белка, минеральных веществ и низкомолекулярных органических соединений. Огромные количества сыворотки дает молочная промышленность, и ее утилизация — это большая проблема. Часто сыворотку сливают в реки и озера, что приводит к уменьшению в них количества доступного кислорода и гибели многих водных организмов. Транспортировка сыворотки к местам захоронения мусора обходится очень дорого, к тому же серьезную проблему создает риск загрязнения ею грунтовых вод. Наконец, большие средства уходят на удаление твердых компонентов сыворотки. Все это заставило попытаться найти способы выгодной переработки сыворотки.

Сыворотку можно использовать как источник углерода при выращивании ценных промышлен-

Рис. 12.18. Структурная формула полисахарида, образующего ксантановую слизь. Каркас составляет линейная полимерная цепь из молекул глюкозы. К каждому второму остатку присоединена трисахаридная боковая цепь.



ных микроорганизмов. Чтобы *X. campestris* приобрела способность расти на сыворотке, было проделано следующее. Гены *lacZY E. coli*, кодирующие ферменты β-галактозидазу и лактозо-пермеазу, встроили в плазмиду с широким кругом хозяев так, чтобы они находились под транскрипционным контролем промотора одного из бактериофагов *X. campestris*. Эту конструкцию ввели в *E. coli*, а затем перенесли из *E. coli* в *X. campestris* тройным скрещиванием. Трансформанты, содержащие плазмиду, синтезировали β-галактозидазу и лактозопермеазу, используя лактозу как единственный источник углерода, а также продуцировали в больших количествах ксантановую слизь, используя в качестве источников углерода глюкозу, лактозу и сыворотку (табл. 12.4). Подчеркнем еще раз, что *X. campesfris* дикого типа синтезирует много ксантановой слизи, только когда растет на глюкозе.

Выделение генов биосинтеза меланина

Меланины образуют многочисленное семейство различных поглощающих свет биополимеров; их синтеризуют животные, растения, бактерии и грибы. Эти пигменты можно было бы использовать при изготовлении солнцезащитных экранов и покрытий, в качестве добавки к косметическим средствам. В настоящее время меланины получают в небольших количествах либо экстракцией из природных источников, либо путем химического синтеза. С помощью технологии рекомбинантных ДНК, возможно, удастся создать недорогое крупномасштабное производство меланинов с различными физическими свойствами.

Таблица 12,4, Синтез ксантановой слизи в трансформированных клетках *X. campestris* и клетках дикого типа, растущих в среде с разными источниками углерода <sup>1)</sup>

| <i>X. campestris</i> | Количество ксантановой слизи, мкг/мл <sup>1)</sup> |              |               |
|----------------------|--|--------------|---------------|
|                      | 0,4% глюкоза                                       | 0,4% лактоза | 10% сыворотка |
| Дикий тип            | 3530   | 245          | 224           |
| Трансформант         | 3711   | 3608         | 4241          |

<sup>1)</sup> По данным работы Fu, Tseng, *Appl. Environ. Micibbioi.* Sfc 919—923, 1990.

<sup>2)</sup> Количество образующегося продукта выражено Б числе микрограммов на 1 мл культуры, растущей на минимальной среде в присутствии 0,4% глюкозы или 0,4% лактозы либо на разбавленной (10%) сыворотке, содержащей примерно 0, 4% лактозы. Трансформант содержит плазмиду, несущую гены *lacZY E. coli*.

Меланины -- это нерегулярные полимеры, состоящие из остатков индола, бензотиазола и аминокислот. Первый этап их биосинтеза катализируется медьсодержащим ферментом моно-оксигеназой тирозиназы и представляет собой окисление тирозина до дигидроксифенилаланинхинона. Последние этапы полимеризации не являются каталитическими реакциями и в зависимости от химической природы нехинонных соединений, включающихся в полимерную структуру, дают конечные продукты разных цветов: черного, коричневого, желтого, красного или фиолетового.

Выделены и охарактеризованы гены биосинтеза меланина в бактериальных клетках *Streptomyces antibioticus*. Они содержат две открытые рамки считывания (ORF), одна из которых кодирует тирозиназу (мол. масса 30 600), а вторая (ORF438) — белок (мол. масса примерно 14 800) с неизвестными функциями. Чтобы проверить, нужны ли оба этих гена для синтеза меланина, гены сначала переклонировали в экспрессирующий вектор *E. coli*, при этом одна конструкция содержала только ген тирозиназы, а другая — и ген тирозиназы, и ORF438 (рис. 12.19). Вектор, несущий ген тирозиназы, обеспечивал синтез больших количеств тирозиназы, чем вектор, содержащий оба указанных гена. Однако оказалось, что уровень тирозиназы не имеет особого значения, а для биосинтеза меланина необходимы продукты обоих генов. Возможно, белок, кодируемый ORF438, поставляет ионы меди неактивному предшественнику тирозиназы апотирозиназе, которая активируется в их присутствии. В естественных условиях после образования дигидроксифенилаланинхинона при участии тирозиназы в полимер включаются различные низкомолекулярные соединения (нехиноны). С учетом этого можно изменять химические и физические свойства меланина, синтезируемого в клетках *E. coli* с введенными в них ключевыми генами биосинтеза этого полимера, если добавлять в среду определенные низкомолекулярные соединения в разных количествах.

**Микробиологический синтез животного биополимера с адгезивными свойствами**

Весьма перспективной представляется также разработка недорогого способа получения белка с адгезивными свойствами, впервые выделенного из мидий *Mytilus edulis*. Этот водостойкий белок образует очень прочные нити, с помощью которых моллюски прикрепляются к разнообразным поверхностям. Сразу после секреции биополимера так называемой биссальной железой между полимерными цепями образуются многочисленные поперечные шивки, что затрудняет определение их аминокислотной последовательности. Это в свою очередь не позволяет установить нуклеотидную последовательность кодирующих их генов и синтезировать гибридизационные зонды. К счастью, удалось выделить внутриклеточный предшественник адгезивного белка (130 кДа-предшественник). Как показали биохимические исследования, он богат серином, треонином, лизином, пролином и тирозином. От 60 до 70% этих аминокислот содержат гидроксильную группу, при этом большинство остатков пролина и тирозина гидроксильрованы до 3- или 4-гидроксипролина (Нур) и 3,4-дигидроксифенилаланина (DOPA) соответственно. Кроме того, после определения аминокислотной последовательности выяснилось, что предшественник состоит в основном из повторяющихся декапепти-

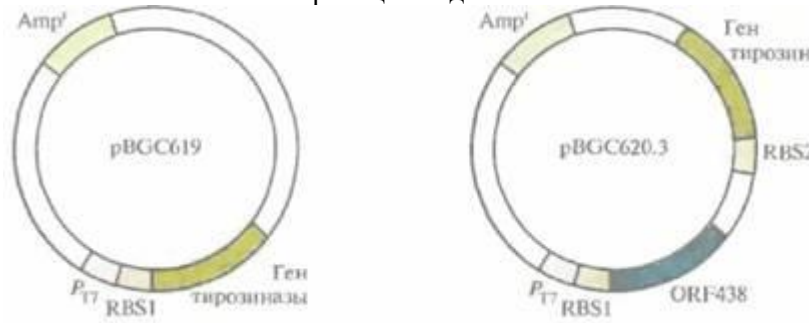


Рис. 12.19. Экспрессирующие плазмиды *E. coli*, несущие гены биосинтеза меланина. pBGC619 содержит ген тирозиназы, а pBGC620.3 — открытую рамку считывания (ORF438) для синтеза меланина и ген тирозиназы. Транскрипция клонированных генов осуществляется под контролем промотора P<sub>T7</sub> бактериофага T7. RBS1 и RBS2 — два разных сайта связывания рибосом. Обе плазмиды несут гены устойчивости к ампициллину (Amp<sup>r</sup>).

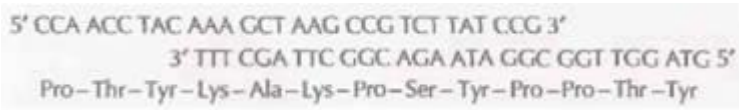


Рис. 12.20. Синтетический олигонуклеотид, послуживший основой для создания гена адгезивного белка, синтезируемого мидией *M. edulis*. Второй синтетический олигонуклеотид был синтезирован таким образом, чтобы после отжига с первым образовывался фрагмент двухцепочечной ДНК с липкими концами. Последующее лигирование с помощью ДНК-лигазы фага Т4 привело к образованию линейной ДНК, состоящей из представленных на рисунке повторов. Внизу дана аминокислотная последовательность полипептида, кодируемого этим повтором.

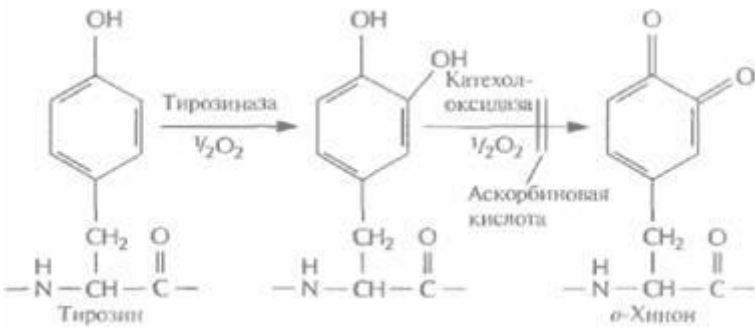
дов Ala-Lys-(Pro или Hyp)-Ser-(Tyr или DOPA)-Hyp-Hyp-Thr-DOPA-Lys.

Из библиотеки кДНК, которая была получена на основе мРНК, выделенной из биссальной железы, была изолирована кДНК 130 кДа-предшественника адгезивного белка. И адгезивный белок, и его кДНК обладают весьма необычными свойствами, затрудняющими клонирование и экспрессию соответствующих генов и получение функционального адгезивного белка. Во-первых, кДНК содержит большое число повторов, что повышает частоту гомологичной рекомбинации и вероятность утраты части клонированной последовательности. Во-вторых, поскольку примерно 70% всех аминокислот белка приходится на долю пролина, лизина и тирозина, вряд ли его удастся получить в большом количестве вследствие ограниченности внутриклеточного пула аминокил-тРНК.

Чтобы преодолеть все эти трудности, полноразмерную кДНК адгезивного белка или ее фрагменты встроили в дрожжевые экспрессирующие векторы и ввели эти векторы в дрожжевые клетки. После экспрессии были получены новые активные формы адгезивного белка мол. массой от 20 до 100 кДа, причем на их долю приходилось от 2 до 5% суммарного количества клеточных белков. Значительно более высокого уровня экспрессии удалось достичь после того, как был химически синтезирован ген адгезивного белка (рис. 12.20). Используя повторы ДНК, кодирующие декапептид адгезивного белка, создали синтетический ген длиной 600 п. н., который кодировал белок мол. массой примерно 25 кДа. Его основная повторяющаяся единица длиной 30 п. н. состояла из кодонов, оптимальных для экспрессии в *E. coli*, а эффективная экспрессия происходила, когда он находился под контролем промотора фага Т7. Большинство микроорганизмов обладают лишь ограниченной способностью осуществлять посттрансляционное гидроксилирование аминокислот, так что образующийся белок бывает не до конца гидроксилирован. Так, некоторые из его тирозиновых остатков не превращаются в DOPA, что снижает число образующихся поперечных сшивок. Чтобы решить эту проблему, была создана система гидроксилирования *in vitro*, в которой бактериальная тирозиназа в присутствии аскорбиновой кислоты гидроксилировала остатки тирозина (рис. 12.21). Аскорбиновую кислоту добавляли в реакционную смесь для того, чтобы предотвра-

Рис. 12.21.

Посттрансляционное гидроксилирование *in vitro* некоторых тирозиновых остатков адгезивного белка *M. edulis*. При участии тирозиназы тирозин превращается в DOPA, после чего он может быть окислен до *o*-хинона катехолоксидазой или тирозиназой. Окисление можно предотвратить добавлением аскорбиновой кислоты.



тить окисление остатков DOPA в о-хинон. Этот процесс должен строго контролироваться, поскольку он приводит к сшиванию субъединиц адгезивного белка. Как и многие другие клеи или адгезивы, адгезивный белок необходимо активировать непосредственно перед использованием.

При окислении предшественника адгезивного белка и образовании сшивок белок может связываться с разнообразными поверхностями -из стекла, полистирола, коллагена и т. д. Прочность и специфичность связывания можно изменять добавлением к смеси адгезивных белков до окисления и образования сшивок других белков. Это позволяет создавать клеи с уникальными свойствами, в том числе и такие, которые можно будет использовать в медицине, в частности в стоматологии.

### **Микробиологический синтез каучука**

Натуральный каучук, *цис*-1,4-полиизопрен, – это широко используемый биополимер, который получают из различных растений. Его биосинтез начинается с превращения простых Сахаров и включает 17 ферментативных реакций. В ходе последней из них происходит полимеризация изопентенилпирофосфата с образованием аллилпирофосфата.

Ввиду большой коммерческой ценности каучука были проведены исследования, направленные на то, чтобы выяснить, можно ли использовать для его получения рекомбинантные микроорганизмы. Прежде всего с помощью мРНК из растения *Hevea brasiliensis*, синтезирующего каучук, была создана соответствующая к ДНК-библиотека. Затем проведена гибридизация с коротким ДНК-зондом, синтезированным исходя изданных об аминокислотной последовательности одного из участков молекулы полимеразы каучука. Для того чтобы доказать, что клонированная кДНК действительно кодирует этот фермент, использовали антитела к очищенному ферменту. Теперь, используя этот клон кДНК, а также, возможно, другие гены биосинтеза каучука, можно попытаться синтезировать натуральный каучук микробиологическими методами. С другой стороны, с помощью этой кДНК можно также получить полимеразу каучука и создать каталитическую систему *in vitro*. В любом случае исследования, которые могли бы привести к разработке нового пути биосинтеза каучука, имеет смысл продолжить.

### **Микробиологический синтез полигидроксиалканоатов**

Полигидроксиалканоаты — это биodeградируемые полимеры, синтезируемые множеством микроорганизмов (прежде всего *Alcaligenes eutrophus*) и используемые ими как внутриклеточный источник углерода и энергии. Они обладают разными свойствами в зависимости от состава и могут применяться для получения биodeградируемых пластмасс, используемых, например, для изготовления упаковочного материала. По оценкам, годовой объем продаж биodeградируемых пластмасс составляет примерно 1,3 млрд. долларов.

Из всех полигидроксиалканоатов наиболее полно изучена и охарактеризована поли(3-гидроксимасляная кислота). Это относится как к самому полимеру, так и к кодирующим его синтез генам *A. eutrophus*. Поли(3-гидрокси-масляную кислоту), ее сополимер поли(3-гидроксibuтират-со-3-гидроксивалерат) и другой полиоксиалканоат, поли(3-гидроксивалериановую кислоту), получают в Великобритании в промышленном масштабе ферментацией при участии *A. eutrophus*.

Однако этот микроорганизм растет относительно медленно и использует лишь ограниченное число источников углерода, что делает производство довольно дорогим. Можно использовать другой путь: при перенесении генов биосинтеза этого полимера в *E. coli* получают быстрорастущие трансформанты, накапливающие в большом количестве (до 95% сухой массы клетки) поли(3-гидроксимасляную кислоту). Поли(3-гидроксимасляная кислота) синтезируется из ацетилСоА в три стадии, катализируемые тремя разными ферментами (рис. 12,22). Оперон, содержащий эти гены, был встроен в плазмиду в составе фрагмента длиной 5,2 т.п.н., однако в отсутствие селективного давления, например при росте в отсутствие антибиотиков, примерно половина клеток *E. coli* теряла данную плазмиду уже после 50 генераций. Это не очень существенно, когда масштабы культивирования малы, но становит-



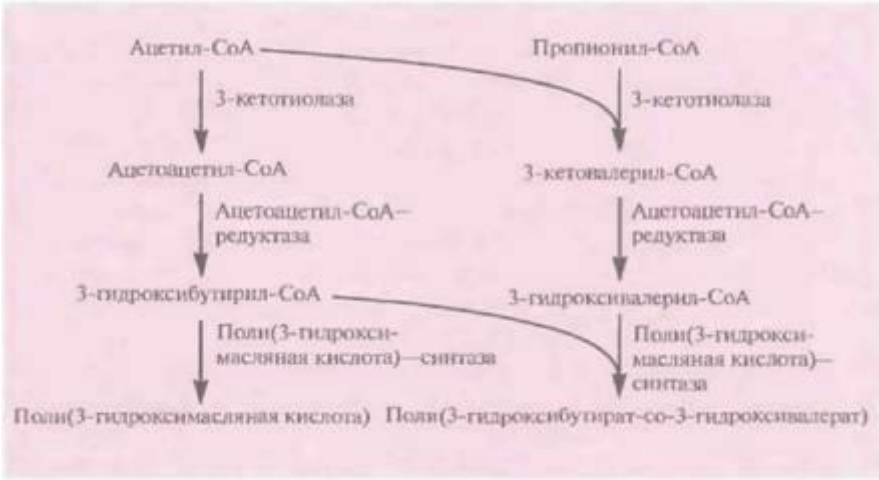


Рис. 12.22. Синтез поли(3-гидроксимасляной кислоты) из ацетил-СоА, Справа от стрелок указаны ферменты, катализирующие соответствующие реакции.

ся серьезной проблемой при крупномасштабной или непрерывной ферментации (см. гл. 16). Чтобы обойти эту трудность, в плазмиду, несущую оперон поли(3-гидроксимасляной кислоты), встроили локус *parB* из другой плазмиды, который обеспечивал стабилизацию плазмид, обуславливая гибель клеток, не содержащих плазмиды после сегрегации. Модифицированные плазмиды оставались стабильными даже при конститутивном синтезе поли(3-гидроксимасляной кислоты). Трансформанты *E. coli*, синтезирующие данный продукт, образовывали лишь очень небольшое количество ацетата, губительного для клеток, по-видимому, вследствие того, что весь избыточный ацетил-СоА превращался в поли(3-гидроксимасляную кислоту), а не в ацетат. Еще одно преимущество синтеза поли(3-гидроксимасляной кислоты) в *E. coli* состоит в том, что когда ее экстрагируют щелочным раствором хлорноватистокислого натрия (калия), то она разлагается в меньшей степени, чем при экстракции из *A. eutrophus*. По-видимому, это связано с тем, что большая часть полимера, синтезируемого в *E. coli*, находится в кристаллическом виде, в то время как в *A. eutrophus* — в аморфном. При этом полимеры, получаемые этими двумя способами, идентичны.

Поли(3-гидроксibuтират-со-3-гидроксивалерат) аналогичен по своим свойствам широко используемому полипропилену, так что получение его микробиологическими методами может представлять коммерческий интерес. Однако штаммы *E. coli*, в которых экспрессируются гены биосинтеза полимера, синтезируют только поли(3-гидроксимасляную кислоту), а не сополимер. Эту проблему можно решить, используя для экспрессии клетки *E. coli*, несущие мутации в локусах *fadR* и *atoC*. *fadR* ответствен за негативную регуляцию биосинтеза жирных кислот, а *atoC* — за позитивную регуляцию их поглощения. Роль локуса *faaR* в индукции биосинтеза сополимера неясна, но продукт гена *atoC* влияет на синтез белков, кодируемых генами *atoA* и *atoD* и облегчающих поглощение бактериями пропионата из культуральной среды. Последний превращается в пропионил-СоА и затем реагирует с ацетил-СоА с образованием 3-

Рис. 12.23. Микробиологический синтез поли(3-гидроксibuтирата-со-3-гидроксивалерата).





кетовалерил-СоА, который в свою очередь может превращаться в 3-гидроксивалерил-СоА, включаемый в сополимер (рис, 12.23),

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Бактерии можно не только использовать как «фабрики» для синтеза белков типа рестриктаз, но и получать с их помощью новые продукты, изменяя метаболизм бактериальных клеток введением 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. По имеющимся данным, создание новых метаболических путей не является технически неосуществимым. Этот подход поможет создать необычные, более эффективные пути синтеза самых разных соединений.

## ЛИТЕРАТУРА

- Anderson S., C. B. Marks, R. Lazarus, J. Miller, K. Stafford, J. Seymour, D. Light, W. Rastetter, D. Estell.** 1985. Production of 2-keto-L-gulonate, an intermediate in L-ascorbate synthesis by a genetically modified *Erwtnta herbicola*. *Science* 230: 144-149.
- Bailey L E.** 1991. Toward a science of metabolic engineering. *Science* 252: 1668-1675.
- Berry A.** 1996. Improving production of aromatic compounds in *Escherichia colt* by metabolic engineering. *Trends Biotechnol*, **14**: 250-256.
- Brooks J. E., F. D. Nathan, D. Landry, L. A. Sznyter, P. Waite-Ress, C. L. Ives, L. S. Moran, B. E. Slatko, J. E. Benner.** 1991. Characterization of the cloned *Bamiil* restriction modification system: Its nucleotide sequence, properties of the methylase, and expression in heterologous hosts. *Nucleic Acids Res.* **19**: Я41-850.
- Cohen C., D. Shiftman, M. Mcvarcch, V. Aharonowitz.** 1990. Microbial isopenicillin N synthase genes: structure, function, diversity and evolution. *Trends Biotechnol.* **8**: 105—111.
- della-Cioppa G., S. J. Ganger, G. G. Sverlow, T. H. Turpen, L. K. Grill.** 1990. Melanin production in *Escherichia coli* from a cloned tyrosinase gene. *Bio/Technology* **8**: 634-638.
- Ensley B. D., B. J. Ratzkin, T. D. Osslund, M. J. Simon, L. P. Wackelt, D. T. Gibson.** 1983. Expression of naphthalene oxidation genes in *Escherichia coli* results in the biosynthesis of indigo. *Science* **222**: 167-169.
- Flores N., J. Xiao, A. Berry, F. Bolivar, F. Vallc.** 19%. Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia colt*. *Nat. Biotechnol.* **14**: 620-623.
- Floss H. G.** 1987. Hybrid antibiotics—the contribution of the new gene combinations. *Trends Biotechnol.* **5**: 111-115.
- Fu J.-F., Y.-H. Tseng.** 1990. Construction of lactose-utilizing *Xanthomonas campestris* and pro-  
uiiidor. of >.u.ih.4; £.nr;: iVom whey, Лр;>:. *Environ. MicrobioL* **56**: 919-923.
- Hahn S. K., Y. K. Chang, S. Y. Lee.** 1995. Recovery and characterization of poly(3-hydroxybutyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophi* and recombinant *Escherichia coli*. *Appl, Environ. MicrobioL* **61**:34-39.
- Hillemann D., A. Puhler, W. Wollenen.** 1YU1. Gene disruption and gene replacement in *Streptomyces* via single stranded DNA transformation of integration vectors. *Nucleic Acids Res.* **19**:727-731.
- Hopwood D. A., M. J. Bibb, C. J. Bruton, K. F. Chater, J. S. Fcitelson, J. A. Gil.** 1983. Cloning *Streptomyces* genes for antibiotic production. *Trends Biotechnol.* **1**:42-48.
- Hopwood D. A., F. Malpartida, H. M. Kicsar, H. Ikeda, J. Duncan, I. Fujii, B. A. M. Rudd, H. G. Floss, S. Omura.** 1985. Production of hybrid antibiotics by genetic engineering. *Nature* **314**: 642-644.
- Howard K. A., C. Card, J. S. Benner, H. L. Callahan, R. Maunus, K. Silber, G. Wilson, J. E. Brooks.** 1986. Cloning the *Dde* restriction-

- modification system using a two-step method. *Nucleic Acids Res.* 14: 7939-7951.
- Hutchinson C. R., H. Decker, K. Madduri, S. L. Otten, L. Tang.** 1993. Genetic control of polyketide biosynthesis in the genus *Streptomyces*. *Antonie Leeuwenhoek* 61: 165—176.
- Hutchinson C. R.** 1994. Drug synthesis by genetically engineering microorganisms. *Bio/Technology* 12: 375-380.
- Hutchinson C. R., I. Fujii** 1995. Polyketide synthase gene manipulation: a structure-function approach in engineering novel antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol.* 49: 201-238.
- Iked M., K. Nakanishi, K. Kino, R. Katsumata.** 1994. Fermentative production of tryptophan by a stable recombinant strain of *Corynebacterium glutamicum* with a modified serine-biosynthetic pathway. *Bioscience Technol. Biochem.* 58: 674-678.
- Ischida M., K. Miwa, S. Nakamori, K. Sano.** December 1989. Process for producing L-tryptophan. U.S. patent 4, 885, 245.
- Isogai T., M. Fukagawa, I. Aramori, M. Iwami, H. Kojo, T. Ono, Y. Ueda, M. Kohsaka, H. Imanaka.** 1991. Construction of a 7-aminoccephalosporanic acid (7ACA) biosynthetic operon and direct production of 7ACA in *Acremonium chrysogenum*. *Bio/Technology* 9: 188-191.
- Katz L., S. Donadio.** 1993. Polyketide synthesis: prospects for hybrid antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol.* 47: 875-912.
- Kleinkauf H., H. von Dohren.** 1990. Antibiotics—cloning of biosynthetic pathways. *FEBS Lett.* 268:405-407.
- Krämer R.** 1996. Genetic and physiological approaches for the production of amino acids. *J. Biotechnol.* 45: 1-2 L
- Lazarus R. A., M. Hurle, S. Anderson, D. B. Powers.** December 1994. Enzymes for the production of 2-keto-L-gulonic acid. U.S. patent 5, 376, 544.
- Lee S. Y., H. N. Chang, Y. K. Chang.** 1994. Production of poly( $\beta$ -hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 721: 43-53.
- Lee S. Y., K. S. Yim, H. N. Chang, Y. K. Chang.** 1994. Construction of plasmids, estimation of plasmid stability, and use of stable plasmids for the production of poly( $\beta$ -hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 32:203-211.
- Lee S. Y., H. N. Chang.** 1995. Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli* strains: genetic and fermentation studies. *Can. J. Microbiol.* 41: 207-219.
- Magneto S. K., D. L. Lecnutaphong, J. A. DeModena, J. E. Curtis, J. E. BailOey, J. 1., Galazzo, D. E. Hughes.** 1991. Actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* and growth of *Streptomyces lividans* are improved by the expression of a bacterial hemoglobin. *Bio/Technology* 9:473-476.
- Martin J. F.** 1987. Cloning of genes involved in penicillin and cephalosporin biosynthesis. *Trends Biotechnol.* 5: 306-308.
- Mi-Daniel R., S. Ebert-Khosla, D. A. Hopwood, C. Khosla.** 1995. Rational design of aromatic polyketide natural products by recombinant assembly of enzymatic subunits. *Nature* 375: 549-554.
- Mermod N., S. Harayama, K. N. Timmis.** 1986. New route to bacterial production of indigo. *Bio/Technology* 4: 321-324.
- Ozaki A., R. Katsumata, T. Oka.** October 1989. Process for producing tryptophan. U.S. patent 4, 874, 698.
- Piekaruicz A., R. Yuan, D. C. Stein.** 1991. A new method for the rapid identification of genes encoding restriction and modification enzymes. *Nucleic Acids Res.* 19: 1831-1835.
- Rhic H. G., D. Dennis.** 1995. Role of *fadR* and *otoC*(Con) mutations in poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) synthesis in recombinant *pha + Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2487-2492.
- Salerno A. J., I. Goldberg.** 1993. Cloning, expression, and characterization of a synthetic analog to the bioadhesive precursor protein of the sea mussel *Mytilus edulis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39:221-226.
- Schwarzer A., A. Puhler.** 1991. Manipulation of *Corynebacterium glutamicum* by gene disruption and replacement. *Bio/Technology* 9: 84—87.
- Sikora L., A.** January 1991. DNA fragment encoding a rubber polymerase and its use, U.S. patent 4, 983, 729.
- Stachelhaus T., A. Schneider, M. A. Marahiel.** 1995. Rational design of peptide antibiotics by targeted replacement of bacterial and fungal domains, *Science* 269: 69-72.

**Strausberg R. L., R. P. Link.** 1990. Protein-based medical adhesives. *Trends biotechnol.* 8: 53—57.

**Terasawa M., M. Fukushima, Y. Kurusu, H. Yukawa.** 1990. L-Tryptophan production by the application of high expressed tryptophanase in *Escherichia coli*. *Process Biochem. Int.* **25**: 172-175.

**Walder R. Y., J. L. Hartley, J. E. Dondson, J. A. Wlder.** 1981. Cloning and expression of the *Pst*I restriction-modification system in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 1503-1507.

**Weber J. M., J. O. Leung, S. J. Swanson, K. B. Idler, J. B. McAlhane.** 1991. An erythromycin derivative produced by targeted gene disruption in *Saccharopolyspora erythraea*. *Science* 252: 114-117.

**Yim K. S., S. Y. Lee, H. N. Chang.** 1996. Synthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **49**:495-503.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Опишите стратегию выделения гена эндонуклеазы рестрикции *Eco*RI.
2. Опишите стратегию клонирования гена 2,5-DKG-редуктазы *Corynebacterium* в *Erwinia*. Почему это представляет интерес?
3. Предложите стратегию повышения коммерческой ценности клонированного гена 2,5-DKG-редуктазы.
4. Как синтезировать индиго в *E. coli*?
5. Как повысить количество триптофана, синтезируемого *Corynebacterium glutamicum*?
6. Предложите стратегию выделения генов, участвующих в биосинтезе антибиотика ундецилпродигиозина, который обычно синтезируется в *Streptomyces coelicolor*.
7. В чем состоит трудность трансформации различных разновидностей *Streptomyces*? Как ее преодолеть?
8. Как с помощью генной инженерии увеличить продукцию антибиотика данным штаммом *Streptomyces*?
9. Опишите один из подходов к созданию модифицированных вариантов неароматических поликетидных антибиотиков типа эритромицина.
10. Как адгезивный белок, обычно синтезируемый мидией *Mytilus edulis*, можно синтезировать в *E. coli*?
11. Опишите схему синтеза поли(3-гидроксимасляной кислоты) в *E. coli*.
12. Что такое сыворотка? Какие важные в промышленном отношении соединения можно из нее получить и каким образом?

# ГЛАВА 13.

## Биодеградация токсичных соединений и утилизация биомассы

Еще относительно недавно ни у кого не возникало сомнения в том, что окружающая среда — воздух, земля и вода — всегда будут эффективно «перерабатывать» бытовые, промышленные и сельскохозяйственные отходы. Теперь мы знаем, что это не так. Человечество столкнулось с двумя фундаментальными проблемами: переработкой отходов, постоянно образующихся в огромном количестве, и разрушением токсичных соединений, десятилетиями накапливавшихся на свалках, в воде и почве. Правительства разных стран пытались решить эти проблемы законодательным путем, однако к успеху это не привело.

В настоящее время проходит проверку целый ряд технологических, в том числе и биотехнологических, подходов, с помощью которых, возможно, удастся перерабатывать большие количества отходов (например, лигноцеллюлозы) и токсичные вещества. Предпринимаются попытки поощрять те предприятия, которые перерабатывают отходы производства и повторно используют содержащиеся в них полезные вещества.

Употребляемый нами здесь термин «биодеградация» относится к процессу разрушения отходов, попавших в окружающую среду, с помощью живых микроорганизмов, а термин «биомасса» — ко всей совокупности веществ и материалов — побочных продуктов пищевой и перерабатывающей промышленности, — которые раньше считались отходами, а теперь могут служить сырьем для производства многих экономически важных продуктов.

### Дегградация ксенобиотиков с помощью микроорганизмов

Проблема утилизации токсичных отходов сейчас стоит очень остро. В 1985 г. мировое производство лишь одного из загрязняющих окружающую среду химических веществ, пентахлорфенола, составило более 50 000 т. Раньше токсичные вещества разрушали, сжигая их или обрабатывая другими химикатами, однако это тоже приводило к загрязнению окружающей среды, а кроме того, обходилось очень дорого. В середине 1960-х гг. были обнаружены почвенные микроорганизмы, способные к дегградации ксенобиотиков (неприродных, синтетических химических веществ; от греч. *xenos*, чужой) — гербицидов, пестицидов, хладагентов, растворителей и т. д. Это открытие подтвердило правильность предположения о том, что микроорганизмы можно использовать для экономичного и эффективного разрушения токсичных химических отходов.

Основную группу почвенных микроорганизмов, разрушающих ксенобиотики, составляют бактерии рода *Pseudomonas*. Биохимические исследования показали, что разные штаммы *Pseudomonas* способны расщеплять более 100 органических соединений. Нередко один штамм использует в качестве источника углерода несколько родственных соединений.

В биодеградации сложной органической молекулы обычно участвуют несколько разных ферментов. Кодрующие их гены могут иметь хромосомную локализацию, но чаще входят в состав крупных (50—200 т. п. н.) плазмид (табл. 13.1), а

иногда обнаруживаются как в хромосомной, так и в плазмидной ДНК.

Бактерии, разрушающие негалогенированные ароматические соединения, как правило, превращают их в катехол (рис. 13.1) или протокатехоат (рис. 13.2), а затем, в ходе нескольких реакций окислительного расщепления, — в ацетил-СоА и сукцинат (рис. 13.3) или пируват и ацетальдегид (рис. 13.4). Эти последние соединения метаболизируются практически всеми микроорганизмами, Галогенированные ароматические соединения, основные компоненты большинства пестицидов и гербицидов, с помощью тех же ферментов разрушаются до катехола, протокатехоата, гидрохинона или их галогенированных производных, причем скорость их деградации обратно пропорциональна числу атомов галогена в исходном соединении. Дегалогенирование (отщепление замещающего атома галогена от органической молекулы), необходимое для детоксикации соединения, часто осуществляется в ходе неспецифической диоксигеназной реакции, путем замещения галогена в бензольном кольце на гидроксильную группу. Эта реакция может происходить как в ходе биodeградации исходного галогенированного соединения, так и потом.

**Метаболические пути биodeградации ксенобиотиков, созданные методами генной инженерии**

Некоторые микроорганизмы обладают природной способностью к деградации различных ксенобиотиков, однако следует иметь в виду, что: 1) ни один из них не может разрушать все органические соединения; 2) некоторые органические соединения в высокой концентрации подавляют функционирование или рост деградирующих их микроорганизмов; 3) большинство очагов загрязнения содержит смесь химикатов, и микроорганизм, способный разрушать один или несколько ее компонентов, может инактивироваться другими компонентами; 4) многие неполярные соединения адсорбируются частицами почвы и становятся менее доступными; 5) биodeградация органических соединений часто происходит довольно медленно. Часть этих проблем можно решить, осуществив конъюгационный перенос плазмид, которые кодируют ферменты разных катаболических путей, в один реципиентный штамм (рис. 13.5). Если две плазмиды содержат гомологичные участки, то между ними может произойти рекомбинация с образованием гибридной плазмиды, которая имеет больший размер и обладает свойствами исходных плазмид. Если же две плазмиды не содержат гомологичных участков и относятся к разным группам несовместимости, то они могут сосуществовать в одной бактерии.

*Перенос плазмид*

В 1970-х гг. Чакрабартти и его коллегами был создан первый бактериальный штамм, обладающий более широкими катаболическими возможностями. Он расщеплял большинство углеводов нефти и был назван «супербациллой». Для его получения использовали плазмиды, каждая из которых кодировала фермент, расщепляющий определенный класс углеводов: плазида САМ детерминировала деградацию камфары, ОСТ — октана, НАН — нафталина, ХYL — ксилола (рис. 13.5). Сначала путем конъюгации пере-

Таблица 13. 1. Плазмиды *Pseudomonas*, их размер и соединения, за разрушение которых ответственны кодируемые ими ферменты<sup>1)</sup>

| Плазида <sup>2)</sup> | Деградируемое соединение            | Размер плазмиды, т. п. н. |
|-----------------------|-------------------------------------|---------------------------|
| SAL                   | Салицилат                           | 69                        |
| SAL                   | Салицилат                           | 72                        |
| SAL                   | Салицилат                           | 83                        |
| TOL                   | Ксилол и толуол                     | 113                       |
| pJP1                  | 2,4 - дихлорфеноксиуксусная кислота | 87                        |
| pJP2                  | 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота   | 54                        |
| pJP3                  | 2,4- дихлорфеноксиуксусная кислота  | 78                        |
| CAM                   | Камфара                             | 225                       |
| XYL                   | Ксилол                              | 15                        |
| pAC31                 | 3,5-дихлорбензоат                   | 108                       |
| pAC25                 | 3-хлорбензоат                       | 102                       |
| pWWO                  | Ксилол и толуол                     | 176                       |
| НАН                   | Нафталин                            | 69                        |
| XYL-K                 | Ксилол и толуол                     | 135                       |

<sup>1)</sup> Из работы Cork, Krueger, *Adv. Appl. Microbiol.* 36: 1-66, 1991, с изменениями.

<sup>2)</sup> Плазмиды с одинаковым названием кодируют ферменты одного и того же катаболического пути, хотя могут быть получены в разных лабораториях и иметь разные размеры.

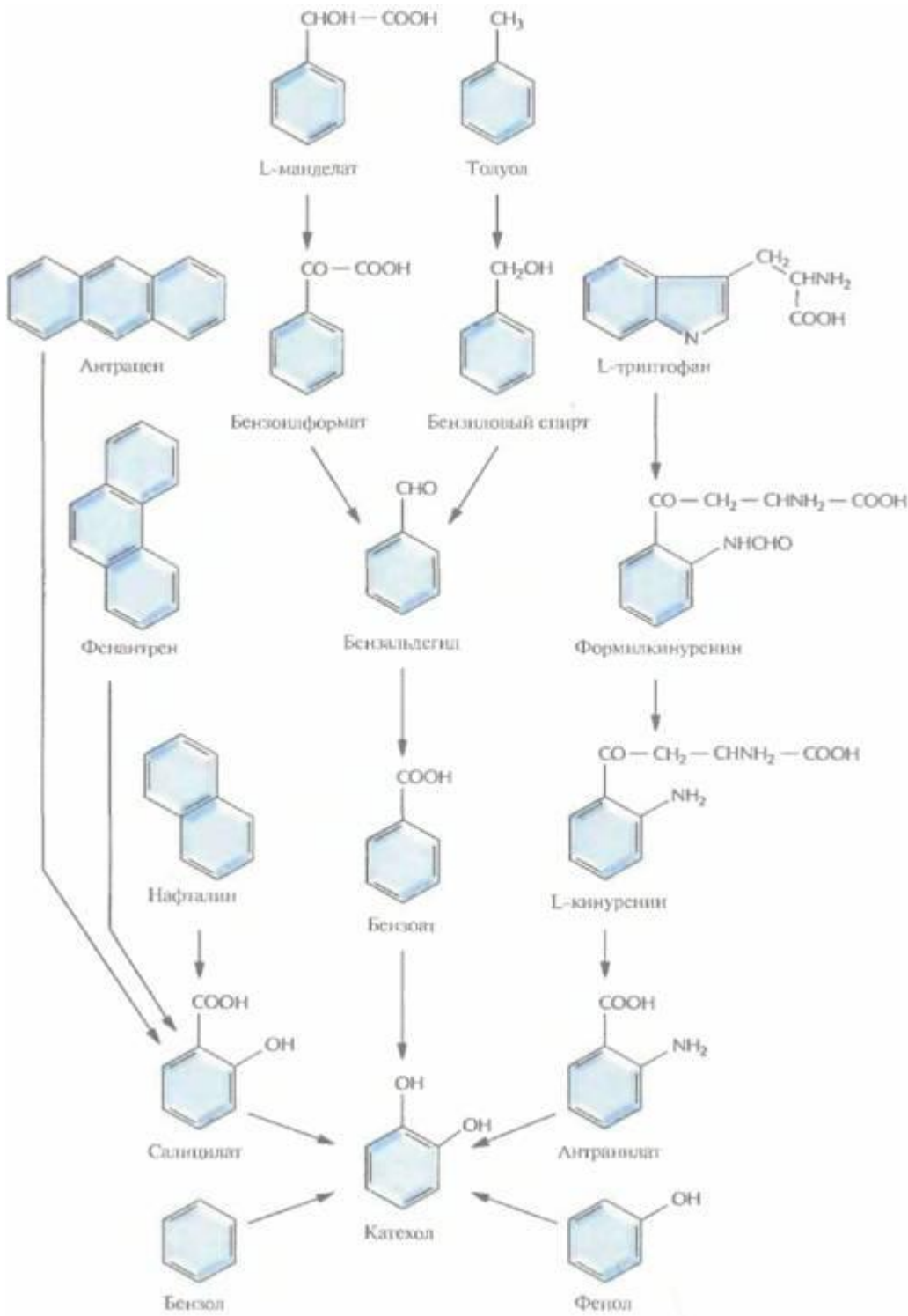


Рис. 13.1. Пути ферментативного превращения ароматических соединений в катехол бактериями, разрушающими ксенобиотики.



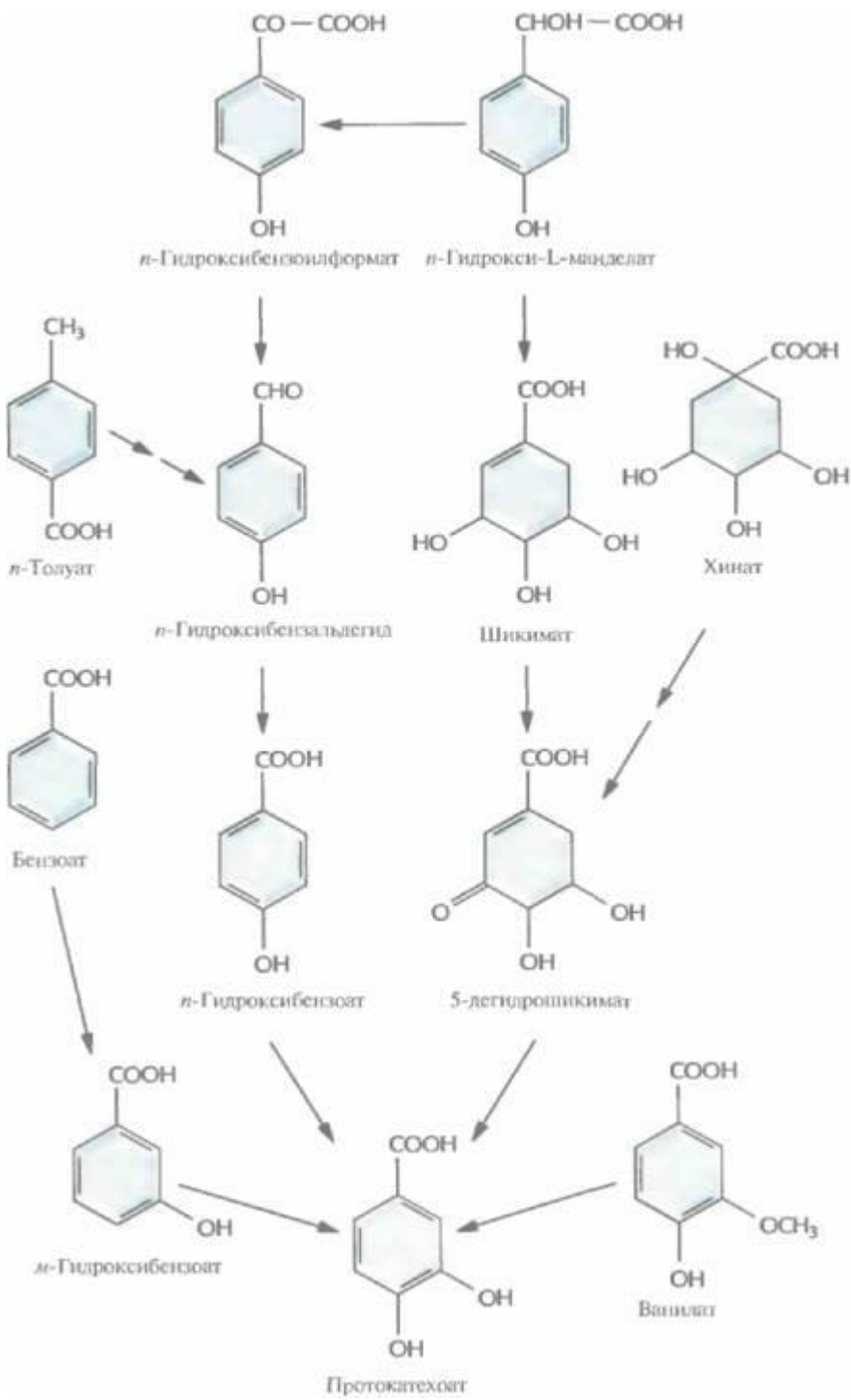
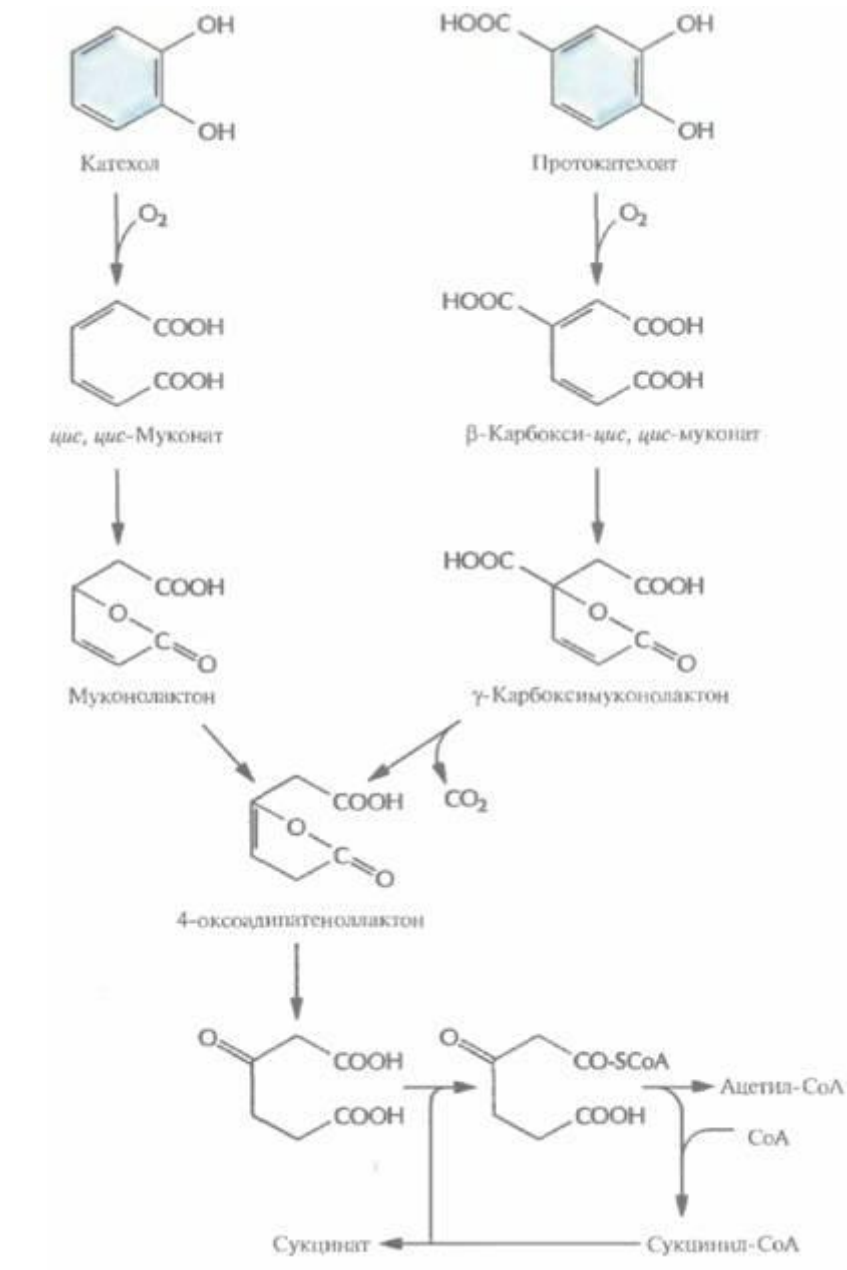


Рис. 13.2. Пути ферментативного превращения ароматических соединений в протокатехоат бактериями, разрушающими ксенобиотики.

Рис. 13.3. Путь орто-расщепления при ферментативном превращении катехола и протокатехоата в ацетил-CoA и сукцинат.



несли плазмиду SAM в штамм, несущий плазмиду ОСТ. Эти две плазмиды несовместимы (не могут существовать в одной клетке в виде отдельных плазмид), но в результате происходящей между ними рекомбинации образуется одна плазида, объединяющая их функции. Затем аналогичным путем плазмиду NAN перенесли в штамм, несущий плазмиду **XYL**. Эти плазмиды совместимы и могут сосуществовать в одной клетке-хозяине. И наконец, гибридную плазмиду перенесли в штамм, несущий плазмиды NAN и **XYL**. В результате всех этих манипуляций получили штамм, который растет на неочищенной нефти лучше исходных штаммов, взятых по отдельности или вместе.

Хотя сам этот штамм не использовали для ликвидации нефтяных загрязнений, он сыграл важную роль в становлении биотехнологиче-

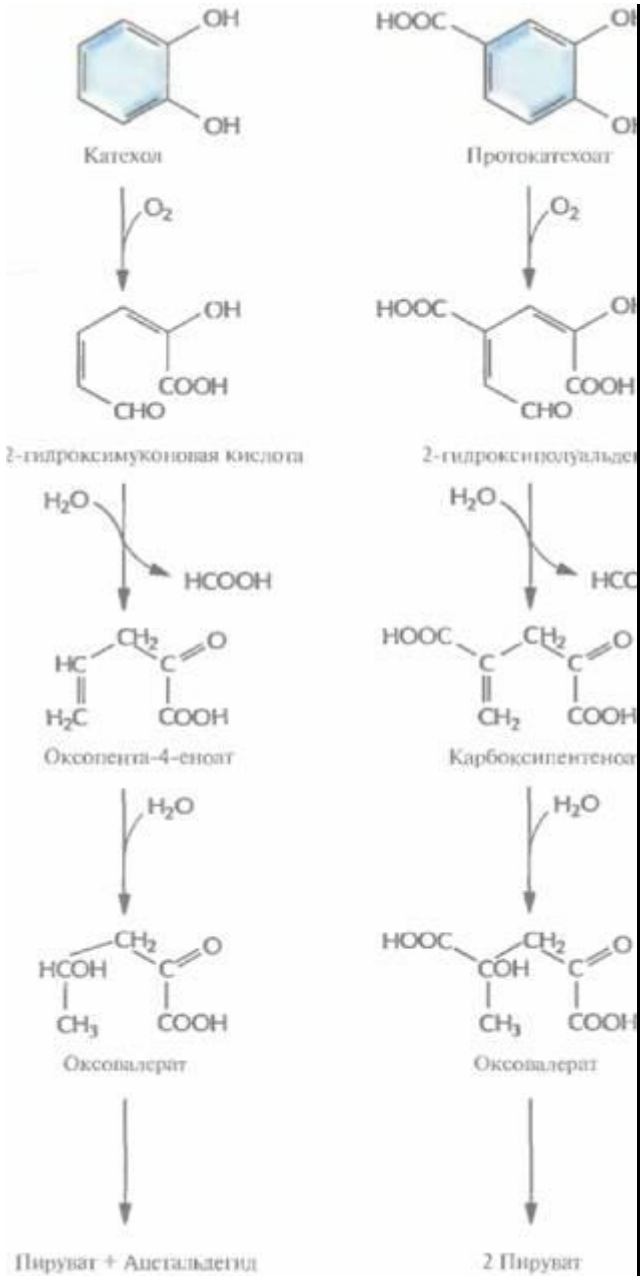


Рис. 13.4. Путь *мета*-расщепления при ферментативном превращении катехола и протокатехоата в пируват и ацетальдегид.

ской промышленности. Изобретатель «супербациллы» получил патент США, описывающий структуру данного штамма и возможности его применения. Это был первый патент, выданный за создание генетически модифицированного микроорганизма и подтвержденный Верховным судом США, который проиллюстрировал, что биотехнологические компании могут защищать свои изобретения точно так же, как химические и фармацевтические.

Большинство разрушающих ксенобиотики бактерий, модифицированных путем переноса плазм ид, являются мезофильными микроорганизмами (хорошо растут при 20—40 °С), а температура воды в загрязненных реках, озерах и океанах обычно лежит в диапазоне от 0 до 20 °С.

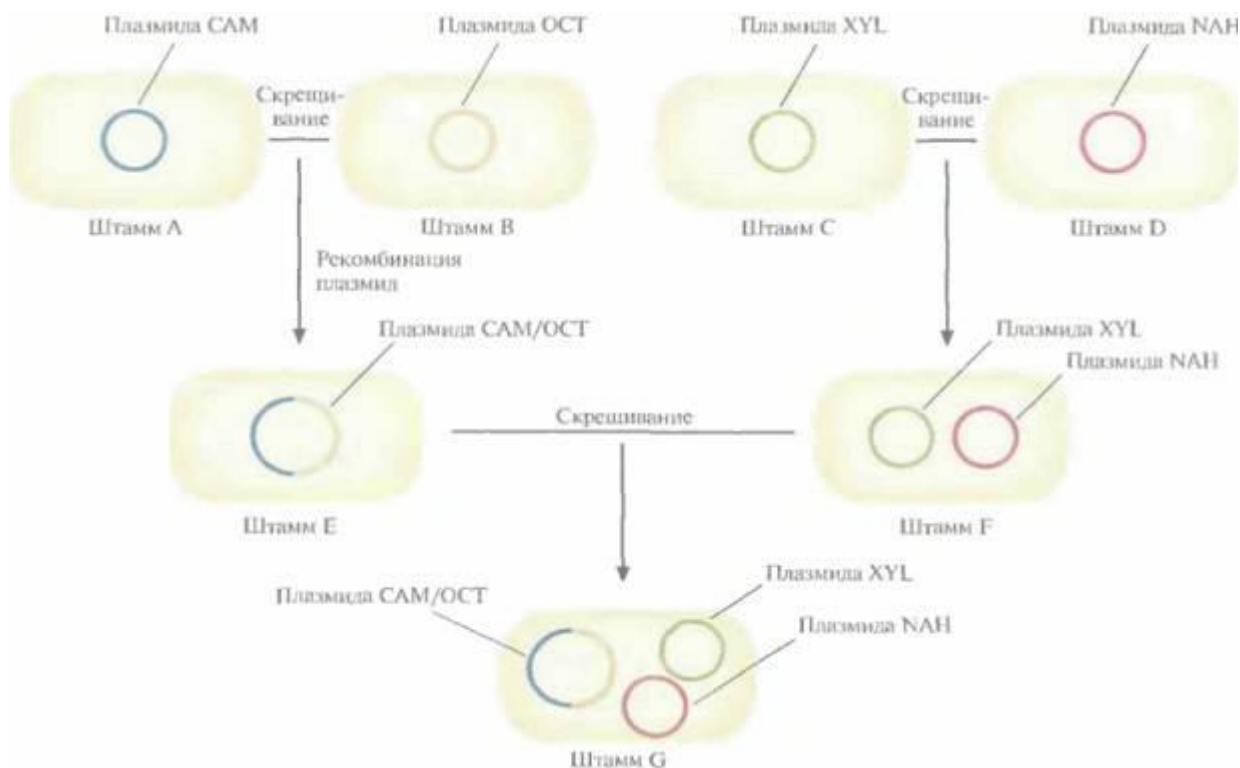


Рис. 13.5. Создание бактериального штамма, способного разрушать камфару, октан, ксилитол и нафталин. Штамм А, несущий плазмиду САМ (она детерминирует разрушение камфары), скрещивают со штаммом В, несущим плазмиду ОСТ (разрушение октана). При этом образуется штамм Е, который содержит гибридную плазмиду, образовавшуюся в результате гомологичной рекомбинации между исходными плазмидами и обладающую функциями каждой из них. Штамм С, содержащий плазмиду ХУЛ (разрушение ксилита), скрещивают со штаммом D, содержащим плазмиду НАН (разрушение нафталина), и получают штамм F, который несет обе эти плазмиды. Наконец, скрещивают штаммы Е и F, в результате чего образуется штамм G, содержащий плазмиды САМ/ОСТ, ХУЛ и НАН.

Чтобы проверить, можно ли создать бактерию, обладающую более широкими катаболическими возможностями и в то же время способную расти и развиваться при низких температурах, плазмиду TOL (детерминирует разрушение толуола) мезофильного штамма *Pseudomonas putida* перенесли с помощью конъюгации в психрофильный (с низким температурным оптимумом) штамм, утилизирующий салицилат при температуре, близкой к 0 °C. Трансформированный штамм содержал введенную в него плазмиду TOL и собственную плазмиду SAL, детерминирующую разрушение салицилата, и был способен утилизировать как салицилат, так и толуол в качестве единственного источника углерода при 0°C (табл. 13.2). Психрофильный штамм дикого типа (нетрансформированный) не мог расти при любой температуре, если единственным источником углерода был толуол (толуат). Эта работа показала принципиальную возможность создания психрофильных штаммов бактерий, эффективно разрушающих ксенобиотики в природных условиях, но для их реального получения необходимо провести дополнительные исследования,

### Изменение генов

Объединение разных метаболических путей в одном микроорганизме с помощью конъюгации - это лишь один из способов создания бактерий с новыми свойствами. Расширить их катаболические возможности можно и другим путем, модифицируя гены, кодирующие ферменты того или

Таблица 13.2. Время генерации дикого и трансформированного психрофильных штаммов *P. putida*, использующих в качестве единственного источника углерода салицилат или толуат, при разных температурах<sup>1)</sup>

| Температура, °С | Время генерации, ч                         |                              |   |
|-----------------|--|------------------------------|---|
|                 | штамм дикого типа, салицилат <sup>2)</sup> | трансформированный салицинат | штамм, трансформированный штамм, толуат |
| 37              | Не растет                                  | Не растет                    | Не растет                               |
| 30              | 2,2  | 2,5                          | 2,0                                     |
| 25              | 2,1  | 3,2                          | 1,3                                     |
| 20              | 2,6  | 3,8                          | 1,9                                     |
| 15              | 3,2  | 4,2                          | 2,9                                     |
| 10              | 6,3  | 5,6                          | 3,3                                     |
| 5               | 13,9                                       | 12,9                         | 12,2                                    |
| 0               | 18,6                                       | 18,1                         | 24,4                                    |

<sup>1)</sup> Из работы Kolenc et al, Appl. Environ. Microbiol. 54:638 Мl, 1988, с изменениями.  
<sup>2)</sup> Штамм дикого типа не может утилизировать толуат ни при какой температуре, поскольку у него отсутствуют необходимые для этого ферменты.

иного метаболического пути. Осуществимость этого подхода проверяли на примере плазмиды pWWO, 12 генов которой кодируют *мета*-расщепление толуола и ксилола. Обладающие этой плазмидой псевдомонады могут использовать в качестве источника углерода алкилбензоаты (рис. 13.6). Указанные гены входят в состав одного *xyl*-оперона, находящегося под контролем *P<sub>m</sub>*-промотора. Транскрипционная активность последнего находится под позитивным контролем продукта гена *xylS*, активируемого почти всеми субстратами данного метаболического пути (например, бензоатом и 3-метилбензоатом) (рис. 13.6). Детальный биохимический и генетический анализ показал, что несущие pWWO-плазмиду бактерии могут расщеплять 4-этилбензоат только до 4-этилкатехола, который инактивирует один из основных ферментов данного метаболического пути, катехол-2,3-диоксигеназу, являющуюся продуктом гена *xylE*, и поэтому не разрушается и накапливается в среде. Кроме того, 4-этилбензоат, в отличие от остальных алкилбензоатов, не активирует XylS-белок; поэтому, если он является единственным субстратом, *xyl*-оперон не транскрибируется. Для усовершенствования природной системы *мета*-расщепления алкилбензоатов необходимо решить две основные задачи: 1) предотвратить инактивацию катехол-2,3-диоксигеназы 4-этил-бензоатом; 2) индуцировать транскрипцию генов *xyl*-оперона в том случае, если единственным субстратом является 4-этилбензоат.

Для решения второй задачи был проведен поиск мутантной плазмиды. Для этого в плазмиду, несущую ген устойчивости к ампициллину, встроили ген устойчивости к тетрациклину, находящийся под контролем *P<sub>m</sub>*-промотора. В другую плазмиду, несущую ген устойчивости к ка-намицину, встроили ген *xylS*. Полученными конструкциями трансформировали *E. coli*, отобрали клетки, содержащие обе плазмиды, по признаку устойчивости к ампициллину и канамицину (рис. 13.7, А), обработали их мутагеном этилметансульфонатом и вырастили на среде, содержащей тетрациклин и 4-этилбензоат. Растущие на этой среде клетки содержат мутантный ген *xylS* и продуцируют измененный XylS-белок (S\*), который способен взаимодействовать с 4-этилбензоатом и активировать транскрипцию гена устойчивости к тетрациклину. Чтобы решить проблему инактивации катехол-2,3-диоксигеназы, мутантный ген *xylS* встроили в плазмиду с широким кругом хозяев, несущую ген устойчивости к канамицину, и ввели ее в клетки *P. putida*, содержащие плазмиду pWWO (рис. 13,7, Б). Трансформированные клетки высевали с высокой плотностью на чашки с минимальной средой, содержащей 4-этилбензоат в качестве единственного источника углерода, канамицин для отбора клеток с плазмидой и этилметансульфонат. Клетки, растущие на этой среде, вырабатывают измененную катехол-2,3-диоксигеназу, которая не ингибируется 4-этил-катехолом. Дополнительный анализ подтвер-

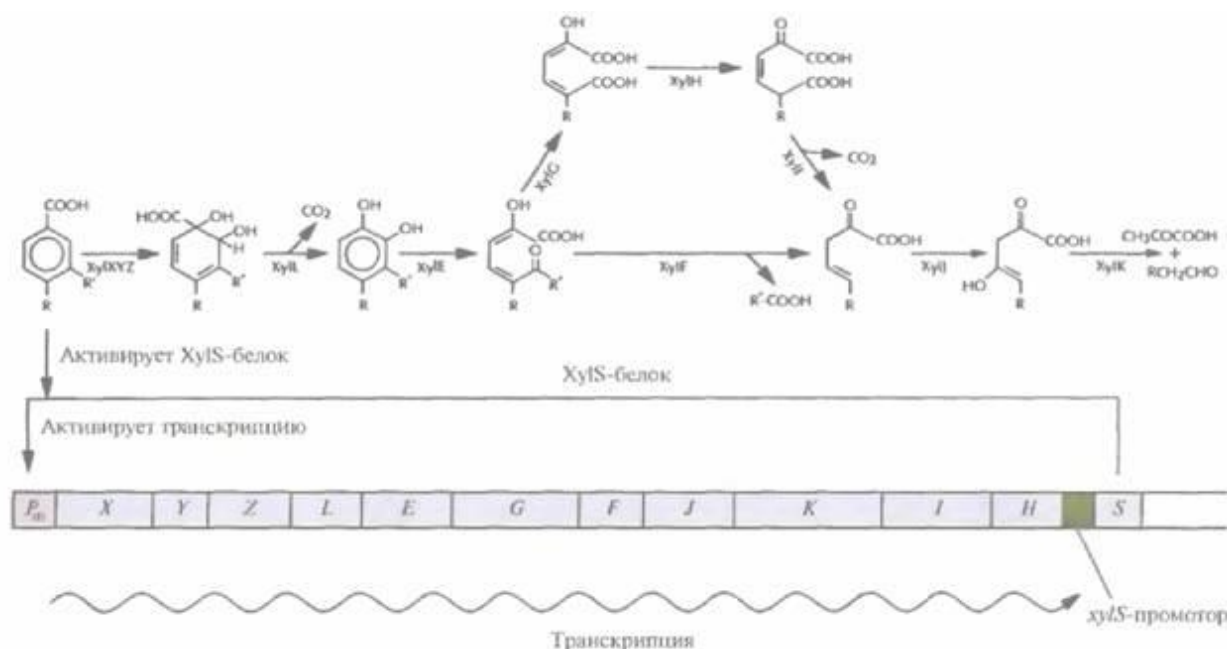


Рис. 13.6. Путь *мета*-расщепления толуола и ксилола и *xyl*-оперон плазмиды pWWO. *xyl*-Оперон находится под контролем  $P_m$ -промотора, который регулируется с помощью продукта гена *xylS*, в свою очередь активируемого одним из исходных субстратов. Гены *xylX*—*xylH* находятся под контролем  $P_m$ -промотора. Ген *xylS* не входит в состав оперона и экспрессируется конститутивно. Исходным субстратом может быть бензоат (R и R' — это H), 3-метилбензоат (R — это H, R' — это CH<sub>3</sub>), 3-этилбензоат (R — это H, R' — это CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) и 4-метилбензоат (R — это CH<sub>3</sub>, R' — это H). Гены *xylXYZ* кодируют толуолдиоксигеназу, *xylL* — дигидроксициклогексадиенкарбоксилатдегидрогеназу, *xylE* — катехол-2,3-диоксигеназу, *xylF* — гидролазу полуальдегида гидроксимуконной кислоты, *xylG* — дигидрогеназу полуальдегида гидроксимуконной кислоты, *xylH* — 4-оксалофтонат-таутомеразу, *xylI* — 4-оксалофтонатдекарбоксилазу, *xylJ* — 2-оксопента-4-еноатгидратазу, *xylK* — 2-оксо-4-гидроксипентонатаальдозу.

дил, что в гене катехол-2,3-диоксигеназы pWWO действительно произошла мутация и что два мутантных гена (*xylS* и ген катехол-2,3-диоксигеназы) обеспечивают расщепление 4-этилбензоата.

Оба модифицированных гена участвуют в процессе деградации всех субстратов данного метаболического пути. Поэтому стратегия, использованная для повышения эффективности расщепления 4-этилбензоата, применима и в случае других соединений: мутация, приводящая к гиперпродукции XylS-белка, может усиливать активацию  $P_m$ -промотора и повышать скорость разрушения субстрата; кроме того, можно избирательно модифицировать  $P_m$ -промотор, чтобы он стал более сильным, сохранив способность взаимодействовать с XylS-белком. Таким образом, проведенная работа показывает, что вполне реально усовершенствование того или иного катаболического пути с помощью технологии рекомбинантных ДНК, традиционного мутагенеза и соответствующих методов отбора.

Одним из наиболее распространенных веществ, загрязняющих почву и воду, является трихлорэтилен, широко использующийся в качестве растворителя и обезжиривающего средства. Он длительное время остается в окружающей среде и считается канцерогеном. Кроме того, анаэробные почвенные бактерии могут дегалогенировать его, превращая в еще более токсичное соединение винилхлорид.

Было показано, что некоторые штаммы *P. putida*, разрушающие ароматические соединения, такие как толуол, разрушают и трихлорэтилен. С помощью проведенных генетических исследований удалось установить, что для полной детоксикации трихлорэтилена не нужны все ферменты *мета*-расщепления ксилола и толуо-



Л

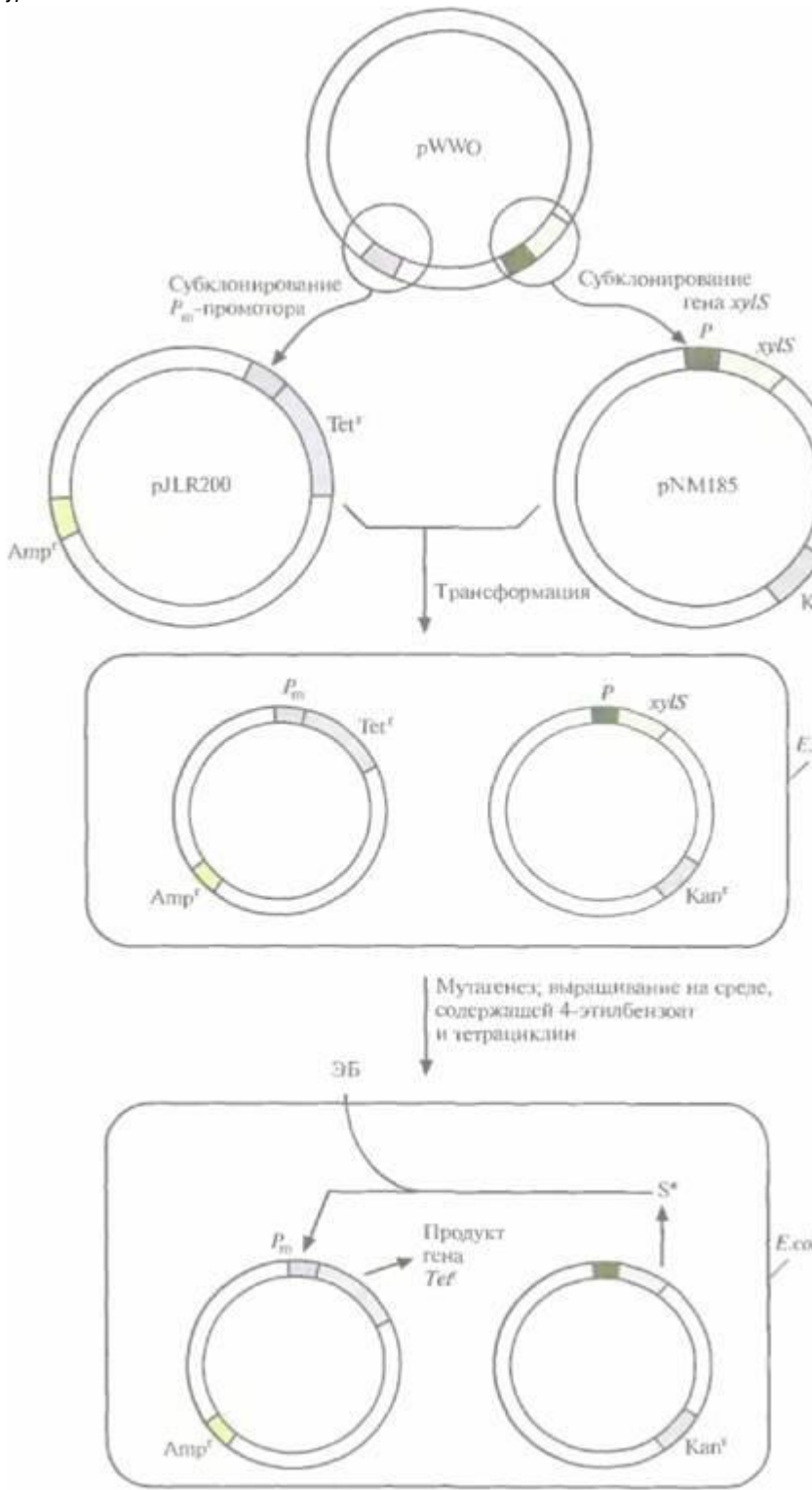
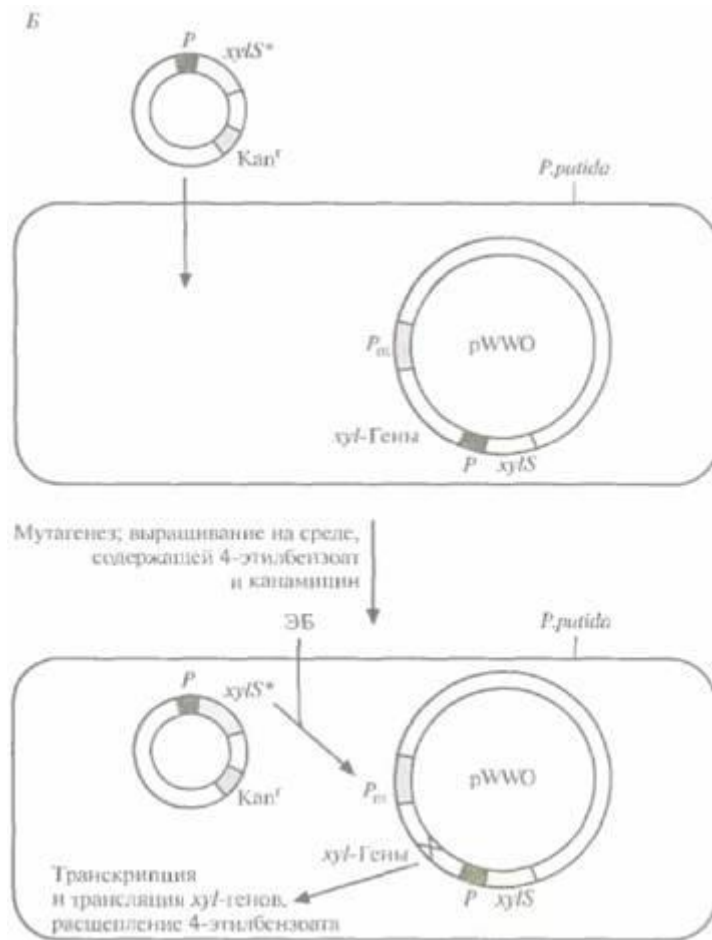


Рис. 13.7. А. Создание системы синтеза XylS- белка, активируемого 4-этилбензоатом. Сначала заменяют промотор гена устойчивости к тетрациклину в плазмиде pBR322 P<sub>m</sub>-промотором и получают плазмиду pJLR200. Затем ген xylS с собственным промотором встраивают в плазмиду с широким кругом хозяев, несущую ген устойчивости к канамицину. Полученными плазмидами трансформируют E. coli. Отбирают трансформированные клетки по признаку устойчивости к ампициллину и канамицину и подвергают мутагенному действию этилметансульфоната. В клетках, несущих мутантный ген xylS (S\*), XylS-белок активируется 4-этилбензоатом (ЭБ), активируя в свою очередь P<sub>m</sub>-промотор, поэтому они могут расти на среде, содержащей 4-этилбензоат и тетрациклин.

Рис. 13.7. (Продолжение) Б. Создание системы синтеза модифицированной катехол2,3-диоксигеназы, которая не ингибируется 4-этилкатехолом. Штамм *P. putida*, несущий плазмиду pWWO, трансформируют плазмидой с широким кругом хозяев, содержащей мутантный ген *xylS\**, продукт которого активирует  $P_m$ - промотор. Проводят химический мутагенез трансформированных клеток и выращивают их на минимальной среде, содержащей 4-этилбензоат и канамицин. Клетки, растущие на этой среде, содержат мутантный ген катехол2,3-диоксигеназы (мутация X в середине *xyl*-оперона).



ла, достаточно лишь толуолдиоксигеназы, которая в норме катализирует реакцию окисления толуола до *цис*-толуолдигидродиола.

Образование функциональной толуолдиоксигеназы кодируется четырьмя генами (рис. 13.8, А). Их выделили и экспрессировали в *E. coli* под контролем сильного индуцибельного *tac*-промотора, который активируется изопропил-β-D-тиогалактопиранозидом (ИПТГ), в результате чего трихлорэтилен разлагается до безвредных соединений. Исходная скорость деградации трихлорэтилена в *E. coli* ниже, чем в *P. putida*, но она сохраняется в *E. coli* дольше. С этим различием может быть связана меньшая, чем у *P. putida*, чувствительность *E. coli* к повреждающему действию трихлорэтилена.

В одном из вариантов этого эксперимента был создан рекомбинантный штамм *Pseudomonas*, в котором были объединены элементы двух разных катаболических путей. Бактериальные штаммы, способные разрушать бифенил, содержат бифенилдиоксигеназу. В состав этого ферментного комплекса входят состоящая из двух субъединиц терминальная диоксигеназа, ферредоксин и ферредоксинредуктаза. По своей структуре и функции бифенилдиоксигеназа сходна с толуолдиоксигеназой, однако утилизирующие бифенил псевдомонады не могут расти на толуоле, а штаммы, утилизирующие толуол, не растут на бифениле. После того как в штамме KF715 *P. putida* ген *bphAq*, кодирующий большую субъединицу бифенилдиоксигеназы, был

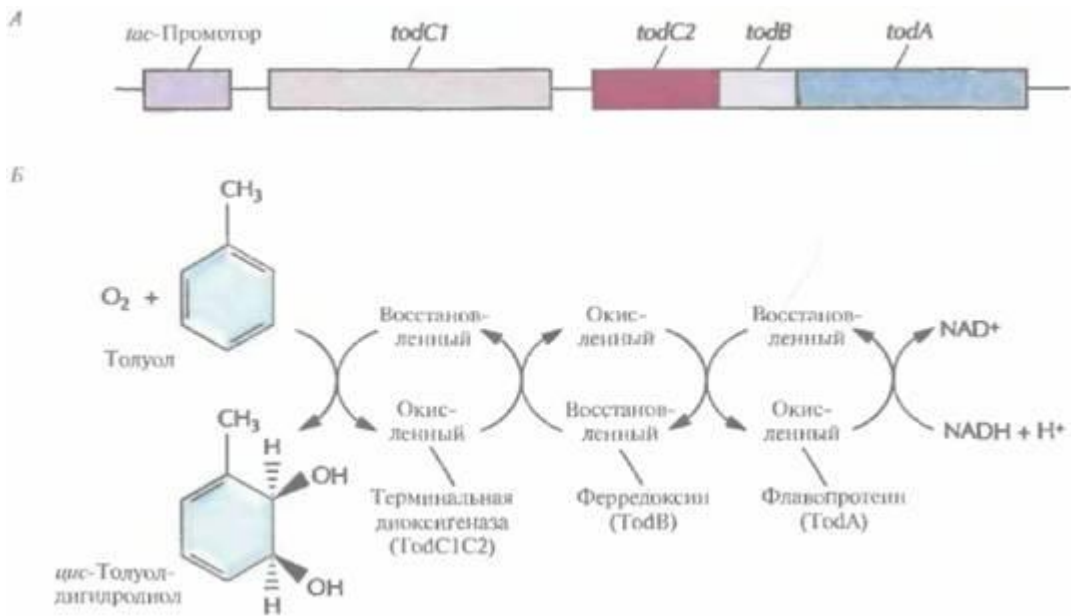


Рис. 13.8. А. Клонированный оперон толуол диоксигеназы, находящийся под контролем *tac*-промотора *E. coli*. Образование толуолдиоксигеназы обеспечивают четыре гена (*todA*, *todB*, *todC1* и *todC2*). Ген *todA* кодирует флавопротеин, который акцептирует электроны с восстановленного никотинамидадениндинуклеотида (NADH) и переносит их на ферредоксин. Последний кодируется геном *todB* и восстанавливает терминальную диоксигеназу, кодируемую генами *todC1* и *todC2*. Эти гены эквивалентны генам *xylXYZna* рис. 13.6. Б. Превращение толуола в *cis*-толуолдигидродиол в результате совместного действия Tod-белков.

заменен с помощью гомологичной рекомбинации на кодирующий большую субъединицу толуолдиоксигеназы ген *todC1* из штамма F1 *P. putida*, получили штамм, способный эффективно разрушать трихлорэтилен (табл. 13.3). Кроме того, этот штамм растет на многих ароматических соединениях, а следовательно, есть возможность создания микроорганизмов, способных разрушать сразу несколько разных соединений.

Утилизация крахмала и сахаров

Крахмал, основной резервный полисахарид растений, представляет собой смесь гомополимеров D-глюкозы — как линейных (амилоза), так и разветвленных (амилопектин). Молекула амилозы состоит из 1·10<sup>2</sup>—4·10<sup>5</sup> остатков D-глюкозы, соединенных α-1,4-связями (рис. 13.9, А), а амилопектина - из коротких (17—23 остатков D-глюкозы, соединенных Таблица 13.3. Рост родительских и рекомбинантного штаммов *Pseudomonas* на разных ароматических соединениях <sup>1)</sup>

| Штамм                                   | Рост на <sup>2)</sup> |               |         |         |                |
|---|-----------------------|---------------|---------|---------|----------------|
|   | бифениле              | дифенилметане | толуоле | бензоле | трихлорэтилене |
| <i>P. putida</i> KF715                  | +++                   | +++           | -       | -       | -              |
| <i>P. putida</i> F1                     | -                     | -             | +++     | +++     | +              |
| <i>P. putida</i> KF715-D5 <sup>3)</sup> | ++                    | +             | +++     | +++     | +++            |

<sup>1)</sup> Из работы Suyama et al, *J. Bacterial.* 178: 4039-4046, 19%, с изменениями.  
<sup>2)</sup> Обозначения: +++ хороший рост; ++ умеренный рост; + плохой рост; — очень плохой рост или нет роста.  
<sup>3)</sup> Штамм KF715-D5 *P. putida* получен путем замены гена *bphA1* в штамме KF715 на ген *todC1* из штамма F1.

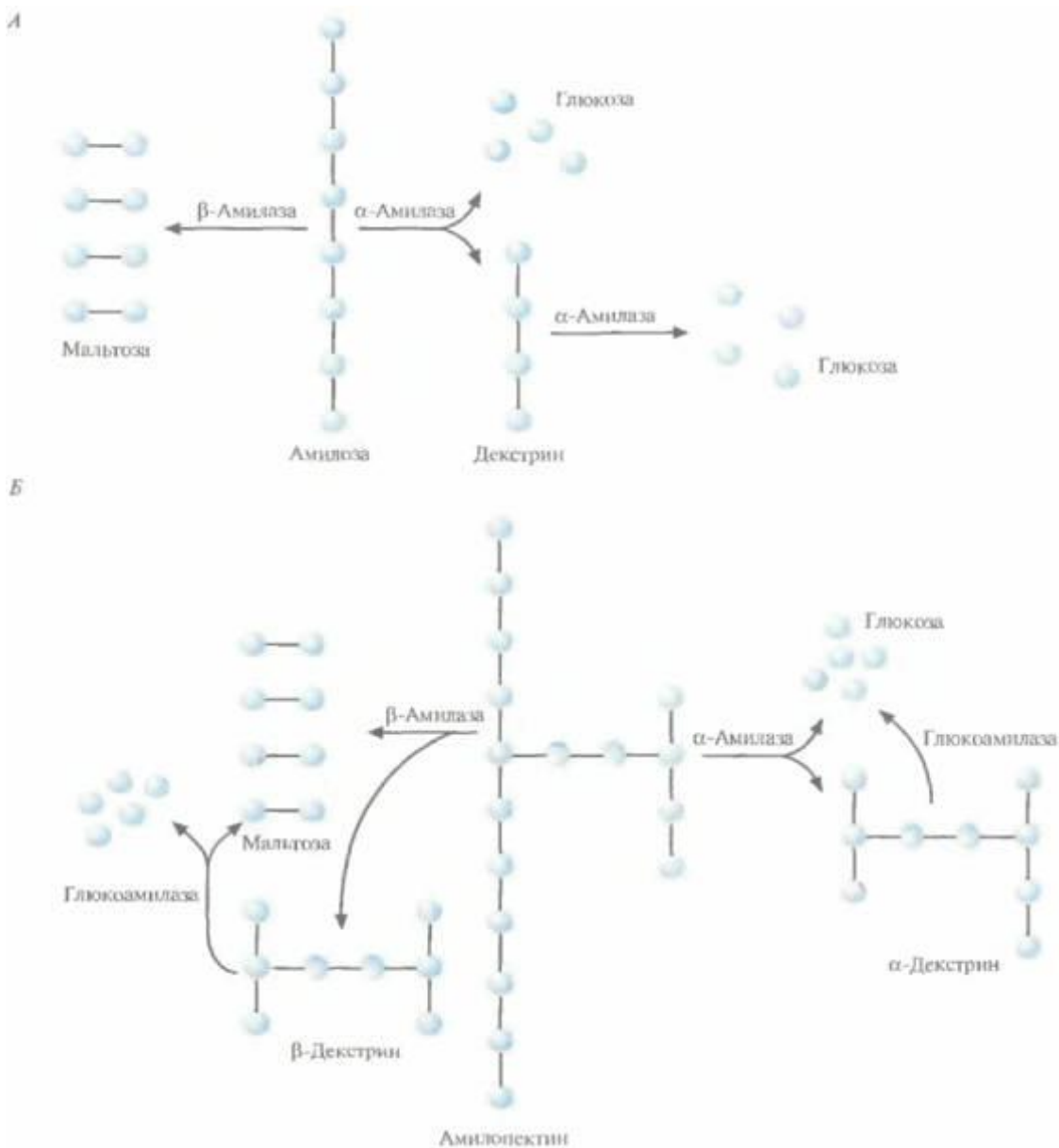


Рис. 13.9. А. Ферментативный гидролиз амилозы. Б. Ферментативный гидролиз амилопектина. Голубые кружки — остатки D-глюкозы.

а-1,4-связями) линейных цепей, соединенных 1,6- и 1,3-связями и формирующих сильно разветвленную структуру, содержащую  $1 \cdot 10^4$ — $4 \cdot 10^7$  остатков глюкозы (рис. 13.9, Б). Степень разветвления и соотношение между амилозой и амилопектином варьируют в зависимости от вида и возраста растения, из которого был получен крахмал.

*Промышленное производство фруктозы и этанола*

Крахмал широко используется в пищевой промышленности и пивоварении; при этом его сначала гидролизуют до низкомолекулярных компонентов, а затем превращают в другие соединения, преимущественно во фруктозу и этанол. Основ-



Рис. 13.10. Промышленное производство фруктозы и этанола из крахмала.

ные ферменты, необходимые для гидролиза крахмала и дальнейших превращении, —  $\square$ -амилаза, глюкоамилаза и глюкоизомераза. Их стоимость составляет примерно 30% общей стоимости всех ферментов, применяемых в настоящее время в промышленности.

Промышленное производство фруктозы и этанола из крахмала — это многоступенчатый процесс, включающий следующие ферментативные и неферментативные стадии (рис. 13.10).

1. Желирование молотого зерна (обычно кукурузного, содержание крахмала в котором составляет примерно 40%). Для этого зерно обрабатывают паром под давлением, в результате чего разрушаются крахмальные зерна и крахмал становится доступным для последующего ферментативного гидролиза. Получаемый продукт имеет желеобразную консистенцию.

2. Ожижение. Желированный крахмал охлаждают до 50—60 °С и добавляют  $\alpha$ -амилазу. При этом происходит гидролиз доступных  $\alpha$ -1,4-связей и образуются низкомолекулярные полисахариды. Высокая температура повышает эффективность проникновения фермента в желированный крахмал и увеличивает скорость гидролиза,

3. Осахаривание (полный гидролиз) низкомолекулярных полисахаридов (как линейных, так и разветвленных) до молекул глюкозы. Происходит под действием глюкоамилазы.

Конечным продуктом такой обработки является глюкоза, из которой затем можно получить этанол (с помощью дрожжевой ферментации) или фруктозу (с помощью глюкоизомеразы). Благодаря высокой эффективности последнего процесса вместо сахарозы при приготовлении пищи и в пивоварении в Северной Америке используют более дешевую фруктозу. Крахмал при промышленном производстве фруктозы обычно получают из кукурузы, поэтому его конечный продукт называют кукурузным сиропом с высоким содержанием фруктозы или просто сиропом с высоким содержанием фруктозы, хотя он состоит из примерно равных долей фруктозы и глюкозы.

Фермент  $\alpha$ -амилаза гидролизует  $\alpha$ -1,4-связи в молекулах амилозы и аминопектина случайным образом, при этом образуется смесь глюкозы, мальтозы (два остатка глюкозы, соединенные  $\alpha$ -1,4-связью), мальтотриозы (три остатка глюкозы, соединенные  $\alpha$ -1,4-связью) и ряд  $\alpha$ -декстринов, которые представляют собой фрагменты амилопектиновых цепей с поперечными сшивками (рис. 13.9).  $\alpha$ -Амилазу можно выделять из многих микроорганизмов, но для промышленных целей ее обычно получают из *Bacillus amyloliquefaciens*.

Иногда для расщепления крахмала вместо  $\alpha$ -амилазы или одновременно с ней используют  $\beta$ -амилазу, которая гидролизует каждую вторую  $\alpha$ -1,4-связь, начиная с концов цепей амилозы и амилопектина, в результате чего образуются остатки мальтозы и различные  $\beta$ -декстрины.

Фермент глюкоамилаза гидролизует  $\alpha$ -1,3-,  $\alpha$ -1,4- и  $\alpha$ -1,6-связи. Однако  $\alpha$ -1,4-связи она гидролизует менее эффективно, чем  $\square$ -амилаза, и поэтому обычно используется совместно с

## Получение мультиплазмидных микроорганизмов, способных утилизировать несколько соединений

А. М. Чакрабартти *U.S. paten* 4,259,444,1981

До появления технологии пути разрушали определенное бретенне получило в марте рекомбинантных ДНК одним из органическое соединение. Взяв 1981 г., почти через девять лет с способов переноса генетического четыре разные бактерии, он создал момента подачи заявления, патент материала из одного один микроорганизм, содержащий США. После того как Верховный микроорганизма в другой была плазмиды, которые обуславливали суд США вынес решение в пользу конъюгация. Такой механизм деградацию камфары, октана, Чакрабартти, создание обеспечивал перенос из клетки в салицилата и нафталина. Эта микроорганизмов с помощью клетки целых плазмид. А. М., работа была новаторской и очень генноинженерных методов было Чакрабартти, проводивший интересной не только с научной признано изобретением, которое эксперименты по переносу точки зрения (следует учесть, что можно было патентовать наравне с плазмид-"разрушительниц», т. е. она была проведена в начале 1970- другими. Это решение суда и плазмид, кодирующих все х гг., до появления большинства последующая выдача патента ферменты пути биодеградации генноинженерных методов). Она сыграли не менее важную роль, определенного соединения, сыграла ключевую роль в чем сам научный эксперимент, сконструировал штамм, официальном признании стимулировав развитие содержащий несколько таких биотехнологии, поскольку данное биотехнологической плазмид. Кодируемые изо- промышленности. плазмидными генами ферменты каждого катаболического

ней. Основная функция глюкоамилазы — расщепление поперечных сшивок в молекуле декстрина с превращением его в глюкозу. Этот и другие ферменты используются для уменьшения доли углеводов (декстринов) в нормальных сортах пива и получения так называемых светлых и сухих сортов. Обработку глюкоамилазой обычно проводят перед ферментацией, однако эти два процесса можно объединить. Глюкоамилазу синтезируют многие микроорганизмы, но обычно ее получают из грибов *Aspergillus niger*.

### Повышение эффективности производства фруктозы и этанола

Стоимость производства этанола или фруктозы из молотого зерна в основном определяется стоимостью ферментов, которые обычно используются однократно. Поэтому разработка новых подходов недорогого широкомасштабного производства этих ферментов может существенно снизить стоимость конечных продуктов. Этого можно достичь несколькими способами.

- Использовать для сверх продукции ферментов быстрорастущие рекомбинантные микроорганизмы, утилизирующие недорогой субстрат. Это будет дешевле, чем получать ферменты из природных микроорганизмов.
- Использовать разновидности  $\alpha$ -амилазы (встречающиеся в природе или созданные методами генной инженерии), которые обладают более высокой активностью и позволяют проводить ожигение при 80—90 °С. Это ускорит гидролиз желированного крахмала и сэкономит энергию, расходуемую на его охлаждение до температуры, при которой обычно проводят гидролиз.
- Модифицировать гены  $\alpha$ -амилазы и глюкоамилазы таким образом, чтобы кодируемые ими ферменты имели одинаковые оптимумы температуры и рН. Это позволит совместить этапы ожигения и осахаривания.
- Найти или создать фермент, который будет эффективно расщеплять необработанный крахмал, что позволит исключить этап желирования и сэкономит большое количество энергии.
- Создать такой микроорганизм для ферментации, который будет синтезировать и секретировать глюкоамилазу, что устранил необходимость ее добавления в процессе ферментации.



В настоящее время проводятся исследования, которые покажут, возможна ли разработка таких подходов.

Гены, кодирующие  $\alpha$ -амилазу, были выделены из многих микроорганизмов, в том числе из *B. amyloliquefaciens* и термофильной бактерии *B. stearothermophilus*. Для этого экстрагировали их хромосомную ДНК, частично гидролизовали ее рестрицирующей эндонуклеазой *Sau3A*I и встроили в обработанную рестриктазой *Bam*HI плазмиду pUB110, которая содержит уникальный *Bam*HI-сайт и несет ген устойчивости к канамицину. Полученным банком клонов трансформировали не обладающие  $\alpha$ -амилазной активностью клетки *B. subtilis*, отобрали трансформированные клетки по признаку устойчивости к канамицину и тестировали их на способность к синтезу и секреции  $\alpha$ -амилазы при помощи иод-крахмального теста. Для этого чашки с колониями, образованными трансформантами при 65 °C на содержащей крахмал твердой среде, поместили в пары иода. Колонии, продуцирующие  $\alpha$ -амилазу, были окружены четко различимым гало, что свидетельствовало о гидролизе крахмала вблизи них. Положительный иод-крахмальный тест указывает на транскрипцию гена  $\alpha$ -амилазы под контролем своего промотора (вектор не содержит промотора) и на наличие сигнала, необходимого для секреции (молекулы субстрата велики и не могут проникнуть в клетку). Возможность получения генов  $\alpha$ -амилазы из разных источников позволила исследователям внести в них изменения, необходимые для того, чтобы эти гены можно было использовать в конкретных промышленных процессах.

Возможность исключения этапа осахаривания при производстве этанола из крахмала была доказана следующим образом. Выделенную из грибов *Aspergillus awamori* полноразмерную кДНК глюкоамилазы встроили в одну из плазмид *Saccharomyces cerevisiae* так, чтобы она находилась под контролем промотора и регуляторных последовательностей терминации транскрипции гена енолазы дрожжей (*ENO1*). «Лабораторный» штамм *S. cerevisiae*, трансформированный этой плазмидой, приобрел глюкоамилазную активность и мог превращать растворимый крахмал в этанол.

К сожалению, некоторые свойства этого штамма (чувствительность к высокой концентрации этанола, неэффективность экспрессии кДНК глюкоамилазы, поддержание плазмид только при определенном давлении отбора) делают его непригодным для промышленного использования. Однако эти недостатки удалось устранить. Во-первых, продукцию глюкоамилазы повысили примерно в 5 раз, удалив из плазмиды область отрицательной регуляции *ENO1*-промотора длиной 175 п. н. Во-вторых, из плазмиды удалили «дрожжевой» сайт инициации репликации и встроили в нее сегмент ДНК, гомологичный участку дрожжевой хромосомы, превратив ее тем самым в интегрирующий вектор, который встраивается в дрожжевую хромосому и стабильно поддерживается в клетке. В-третьих, в качестве клетки-хозяина для модифицированной таким образом плазмиды использовали другой штамм *S. cerevisiae* (пивные дрожжи), устойчивый к высокой концентрации этанола,

В результате получили два новых штамма дрожжей, которые гидролизуют и ферментируют растворимый крахмал более эффективно, чем близкие к *S. cerevisiae* природные амилолитические (гидролизующие крахмал) дрожжи *S. diastaticus* (табл. 13.4). «Пивной» штамм *S. cerevisiae* с встроенным в хромосому геном глюкоамилазы действовал более эффективно, чем «лабораторный» с тем же геном в составе многокопийной плазмиды, что, по-видимому, свидетельствует о ее нестабильности и утрате введенного гена глюкоамилазы. Как «лабораторный», так и «пивной» штаммы *S. cerevisiae* до введения в них гена глюкоамилазы не могли утилизировать растворимый крахмал. Плазмидная и интегрированная кДНК глюкоамилазы *A. awamori* находилась под контролем регуляторных последовательностей гена *ENO1*, откуда была удалена область отрицательной регуляции длиной 175 п. н. Для поддержания плазмиды создавалось определенное селективное давление.

Для повышения продукции глюкоамилазы в хромосомную ДНК грибов *A. niger* встроили несколько копий ее гена. Оказалось, что активность глюкоамилазы не коррелирует с числом копий гена, но сильно зависит от того, в какой участок хромосомы они были встроены. Таким образом, простого увеличения числа копий гена

Таблица 13.4. Расщепление растворимого крахмала (25%, в/о) разными штаммами дрожжей<sup>1)</sup>

| Штамм                     | Утилизация углеводов, % | Производство этанола, г/л | Выход этанола, г/г субстрата |
|---------------------------|-------------------------|---------------------------|------------------------------|
| «Лабораторный»            | 5                       | <0,1                      | 0                            |
| «Лабораторный» + плаزمида | 68                      | 75,6                      | 0.41                         |
| «Пивной»                  | <1                      | 3,1                       | 0                            |
| «Пивной» + встроенный ген | 93                      | 118,2                     | 0,48                         |
| <i>B. diastaticus</i>     | 43                      | 44,2                      | 0,38                         |

<sup>1)</sup> Из работы Cole et al., *BioTechnology* 6: 417—421, 1988, с изменениями.

недостаточно для повышения продукции активного фермента.

Фермент глюкозоизомеразу следовало бы назвать ксилозо/глюкозоизомеразой, поскольку основная катализируемая им реакция — это превращение пятиуглеродного моносахарида D-ксилозы в D-ксилулозу, а реакция изомеризации D-глюкозы в D-фруктозу является побочной. Ксилозо/глюкозоизомераза имеет более низкую каталитическую константу  $k_{cat}$  и более высокую константу связывания  $K_M$  для глюкозы, чем для ксилозы; это означает, что ксилоза прочнее связывается с ферментом и быстрее превращается в ксилулозу, чем глюкоза превращается во фруктозу.

С помощью внутриклеточных ферментов, к которым относится ксилозо/глюкозоизомераза, не удастся получать продукты такой же степени чистоты и в таком же количестве, как в случае внеклеточных (секретируемых) ферментов. Большинство ферментов, используемых в промышленных процессах, не подвергаются тщательной очистке, а в препарате внеклеточного фермента обычно содержится гораздо меньше белковых примесей, чем в экстракте внутриклеточного. Кроме того, для получения экстракта внутриклеточного фермента необходимо отделить клетки от культуральной среды, механически их разрушить и удалить образовавшиеся фрагменты. Все это повышает стоимость конечного продукта - ксилозо/глюкозоизомеразы. Чтобы решить эту проблему, можно иммобилизовать фермент на твердом носителе и использовать его многократно.

Изомеризация глюкозы с образованием фруктозы — обратимая реакция, конечное содержание образующейся в ее ходе фруктозы находится в прямой зависимости от температуры, которая в большинстве производственных процессов составляет примерно 60 °С. Повысив температурный оптимум и термостабильность ксилозо/глюкозоизомеразы, можно увеличить выход фруктозы.

Термофильная бактерия *Thermus thermophilus* продуцирует ксилозо/глюкозоизомеразу, которая сохраняет свою активность и остается стабильной при 95°С, а потому представляется весьма перспективной для промышленного использования. К сожалению, природный штамм *T. ihermophilus* вырабатывает ее в небольшом количестве. Чтобы устранить этот недостаток, выделили ген ксилозо/глюкозоизомеразы *71 tfter-mophilus* и осуществили его экспрессию в *E. coli* и *B. brevlis* с использованием разных промоторов и разных сайтов связывания с рибосомой (табл. 13.5). В последней из представленных в табл. 13.5 систем фермент вырабатывался в количестве, более чем в 1000 раз превышающем исходное, что позволяет использовать ее для промышленного получения фруктозы.

Есть еще одна возможность — повысить субстратную специфичность фермента. В одной из серий экспериментов с помощью сайт-специфического мутагенеза заменяли нуклеотиды, кодирующие одну или две аминокислоты ксилозо/глюкозоизомеразы термофильной бактерии *Clostridium thermosulfurogenes*. Выбор сайтов для модификации основывался на данных об участии соответствующих аминокислот в связывании субстрата. Замена триптофана в положении 139 на фенилаланин или валина в положении 186 на треонин привела к повышению каталитической эффективности ( $k_{cat}/K_M$ ) фермента в отношении глюкозы в 1,7 и 2,6 раза соответственно (табл. 13.6) и к ее уменьшению для ксилозы в 2 и 7 раз. При одновременной замене двух аминокислот каталитическая эффективность в отношении глюкозы повысилась в 5,7 раза, а в от-

Таблица 13.5. Активность ксилозо/глюкозоизомеразы *T. thermophilus* в разных бактериях<sup>1)</sup>

| Бактерия <sup>2)</sup> | Число копий плазмиды | Промотор               | Сайт связывания с рибосомой | Ферментативная активность, ЕД/л |
|------------------------|----------------------|------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| <i>T. thermophilus</i> | Нет                  | <i>T. thermophilus</i> | <i>T. thermophilus</i>      | 20                              |
| <i>E. coli</i>         | 200                  | <i>E. coli lac</i>     | <i>T. thermophilus</i>      | 190                             |
| <i>E. coli</i>         | 20                   | <i>E. coli tac</i>     | <i>T. thermophilus</i>      | 1 790                           |
| <i>E. coli</i>         | 20                   | <i>E. coli tac</i>     | <i>E. coli</i>              | 3 260                           |
| <i>E. coli</i>         | 20                   | Фак T7 f10             | <i>E. coli</i>              | 7 050                           |
| <i>B. brevis</i>       | 20                   | <i>B. brevis cwp</i>   | <i>T. thermophilus</i>      | 1 400                           |
| <i>B. brevis</i>       | 20                   | <i>B. brevis cwp</i>   | <i>B. brevis</i>            | 25 000                          |

<sup>1)</sup> Из работы Dekker et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36: 727–732, 1992, с изменениями.  
<sup>2)</sup> Данные, приведенные в первой строке, относятся к природному штамму, продуцирующему данный фермент. Все остальные штаммы получены путем трансформации и содержат ген ксилозо/глюкозоизомеразы *T. thermophilus* в составе мультикопийной плазмиды.

Таблица 13.6. Каталитическая эффективность природной и мутантных форм ксилозо/глюкозоизомеразы *C. thermosulfurogenes*<sup>1)</sup>

| Замены аминокислот          | Каталитическая эффективность $k_{cat}/K_M$ , мин <sup>-1</sup> ·мМ <sup>-1</sup> |          |
|-----------------------------|--|----------|
|                             | глюкоза  | фруктоза |
| Нет (природная)             | 5,8  | 97,2     |
| Trp-139 → Phe               | 15   | 13,6     |
| Val-186 → Thr               | 9,7  | 55,4     |
| Trp-139 → Phe/Val-186 → Thr | 32,9   | 21,6     |

<sup>1)</sup> Из работы Meng et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88.:4015-4019. 1991. с измененными.

ношении ксилозы снизилась в 4,5 раза. Таким образом, двойная замена привела к тому, что фермент, который исходно был в 17 раз активнее в отношении ксилозы, стал в 1,5 раза активнее в отношении глюкозы. Изменение специфичности и повышение термостабильности ксилозо/глюкозоизомеразы, которого удалось достичь, позволит использовать ее для промышленного превращения глюкозы во фруктозу,

*Zymomonas mobilis*

Сбраживание субстрата при промышленном производстве этанола осуществляют в основном с помощью *S. cerevisiae*, но вместо нее можно было бы использовать бактерию *Zymomonas mobilis*. Это грамотрицательная палочка, которая сбраживает глюкозу, фруктозу и сахарозу с относительно большим выходом этанола (табл. 13.7). По-видимому, это связано со снижением ее пролиферации (прироста биомассы) в ходе ферментации и уменьшением количества расходуемого на это субстрата, который теперь идет на образование этанола. Расщепляя 1 моль глюкозы, дрожжи вырабатывают 2 моля АТР, а использующая другой метаболический путь *Zymomonas* — 1 моль. Исторически сложилось так, что *Zymomonas* использовали для ферментации при производстве алкогольных напитков в тропических странах (например, в Мексике для производства напитка, называемого пулька, который содержит 3—5% спирта и вырабатывается из сока агавы).

Основное различие между *Zymomonas* и *S. cerevisiae* как продуцентами этанола заключается в скорости его образования. У *Zymomonas* она гораздо выше (табл. 13.7). Однако существуют некоторые биологические и технические ограни-

Таблица 13. 7. Сравнение *Z. mobilis* и *S. cerevisiae* как продуцентов этанола<sup>1)</sup>

| Показатель <sup>1)</sup>   | Значение для:     |                      |
|--|-------------------|----------------------|
|  | <i>Z. mobilis</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| Превращение сахара в этанол, %   | 96                | 96                   |
| Максимальная концентрация этанола. %                                       | 12                | 12                   |
| Скорость продукции этанола, г · 5,67 г <sup>-1</sup> · ч <sup>-1</sup>     |                   | 0,67                 |
| Объемная скорость продукции этанола, г · л <sup>-1</sup> · ч <sup>-1</sup> | 200               | 29                   |
| Допустимая концентрация сахара, %  | >40               | >40                  |
| Диапазон рН  | 3,5-7,5           | 2-6,5                |
| Оптимальная температура, °C  | 25-30             | 30-38                |

<sup>1)</sup> Из работы Buchholz et al., *Trends Bivtechnol.* 5: 199-204, 1987.  
<sup>2)</sup> Скорость продукции этанола умеряли в стандартных условиях ферментации, объемную скорость — в непрерывной культуре.

чения, не позволяющие использовать *Zymomonas* для промышленного производства этанола: 1) небольшое число углеродных субстратов, которые она может использовать для синтеза этанола; 2) проблемы, возникающие при поддержании в ней клонирующих векторов с широким кругом хозяев, а значит, и чужеродных генов; 3) природная устойчивость к наиболее распространенным антибиотикам, что не позволяет при проведении экспериментов по клонированию использовать стандартные маркерные системы устойчивости к антибиотикам.

Несмотря на все это ученым удалось встроить и экспрессировать в *Zymomonas* некоторые чужеродные гены. Большинство проведенных экспериментов были направлены на расширение спектра утилизируемых ею субстратов. Так, в *Zymomonas* были введены гены ферментов, гидролизующих лактозу, крахмал, целлюлозу, ксилозу и целлобиозу. Трансформированные клетки экспрессировали все эти гены, но в большинстве случаев не могли использовать перечисленные выше субстраты в качестве единственного источника углерода. Придать *Zymomonas* новые катаболические свойства оказалось весьма непросто, хотя по крайней мере в одном случае удалось использовать этот микроорганизм для получения этанола из отходов, содержащих ксилозу.

В самом начале работы по созданию штаммов *Z. mobilis*, способных расти и продуцировать этанол с использованием ксилозы в качестве субстрата, в эту бактерию ввели гены глюкозо/ксилозоизомеразы и ксилулокиназы — ферментов, необходимых для утилизации ксилозы. Но полученные трансформанты не могли использовать образующиеся при расщеплении ксилозы пентозы (ксилулозо-5-фосфат, рибулозо-5-фосфат и рибозо-5-фосфат). Поэтому на следующем этапе в *Z. mobilis* ввели плазмиду, несущую два синтетических оперона, один из которых кодировал два фермента, расщепляющих ксилозу, а другой — два фермента, метаболизирующих пентозу (транскетолазу и трансальдолазу) (рис. 13.11). Транскрипция генов первого оперона находилась под контролем сильного конститутивного промотора гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы *Z. mobilis*, а второго — под контролем промотора гена енолазы *Z. mobilis*. Эти два синтетических оперона встроили в челночный вектор *E. coli*—*Z. mobilis*, которым и трансформировали *Z. mobilis*. Как и ожидалось, трансформированные клетки утилизировали ксилозу и преобразовывали пентозы до фруктозо-6-фосфата и глицеральдегид-3-фосфата, которые затем превращались в этанол по пути Энтнера—Дудороффа. Более того, трансформанты эффективно росли на глюкозе, ксилозе и их смеси и превращали ксилозу в этанол с большим выходом последнего. Эта работа продемонстрировала возможность генноинженер-

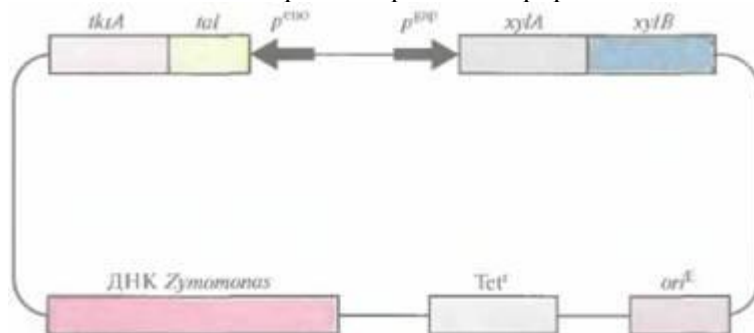


Рис. 13.11. Челночный вектор *Zymomonas*—*E. coli*, несущий два оперона, один из которых содержит гены ферментов, необходимых для утилизации ксилозы (*xylA* и *xylB*), а другой — гены ферментов, участвующих в метаболизме пентозы (*tktA* и *tal*). Стрелками указано направление транскрипции с каждого промотора  $p^{eno}$  - промотор гена енолазы,  $p^{gap}$  промотор гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, *xylA* ген ксилозоизомеразы, *xylB*- ген ксилулокиназы, *tktA* - ген транскетолазы, *tal*- ген трансальдолазы.  $Tet^r$  - ген устойчивости к тетрациклину,  $ori^E$  - точка инициации репликации *E. coli*. ДНК *Zymomonas* содержит собственную точку инициации репликации.

ной модификации *Z. mobilis* для создания микроорганизма — продуцента этанола, который использовал бы в качестве источника углерода ксилозу, побочный продукт деревообрабатывающей и целлюлозно-бумажной промышленности.

*Получение силоса*

Такие сельскохозяйственные культуры, как кормовые злаки, кукуруза и люцерна, широко используются в качестве корма для скота, поэтому очень важно обеспечить правильные условия их хранения в течение многих месяцев. Традиционно для этого применяют природные молочнокислые бактерии, для которых растительный материал служит субстратом при синтезе молочной и уксусной кислот. Эти кислоты подавляют рост других микроорганизмов, способствуя сохранению кормовой растительной массы (силоса). Если молочнокислые бактерии присутствуют на свежем растительном материале в небольшом количестве, нужно добавить бактериальный посевной материал (обычно *Lactobacillus plantarum*). К сожалению, эта мера оказывается малоэффективной в том случае, когда растительная культура содержит недостаточное для поддержания роста бактерий и производства молочной кислоты количество водорастворимых углеводов.

Для создания бактерии, способной осуществлять эффективную ферментацию растительного материала, встроили ген α-плазмиды «не силосного» штамма *L. amylovorus* в хромосомный ген конъюгированной гидролазы желчных кислот (*cbh*) одного из штаммов *L. plantarum* (рис. 13.12). Этот ген кодирует фермент, который активируется при попадании бактерии в кишечник животного и, следовательно, не нужен при образовании силоса. Данная работа представляет собой первый шаг на пути создания штаммов *L. plantarum*, способствующих более эффективному образованию силоса из сельскохозяйственных культур, содержащих много крахмала, таких как люцерна.

Утилизация целлюлозы

Структурный каркас почти всех наземных растений состоит из полимеров: лигнина, гемицеллюлозы и целлюлозы. Объединяясь в разные

Таблица 13.8. Состав разных лигноцеллюлозных материалов<sup>1)</sup>

| Сырье                       | Содержание, % |           |               |
|-----------------------------|---------------|-----------|---------------|
|                             | лигнин        | целлюлоза | гемицеллюлоза |
| Сосновая древесина          | 27,8          | 44,0      | 26,0          |
| Березовая древесина         | 19,5          | 40,0      | 39,0          |
| Багасса сахарного тростника | 18,9          | 33,4      | 30,0          |
| Рисовая солома              | 12,5          | 32,1      | 24,0          |
| Хлопок                      | Не содержит   | 80-95     | 5-20          |

<sup>1)</sup> Из работы Brown, Philos. Trans. R. Soc, Lond. B, 300: 305- 322. 1983.

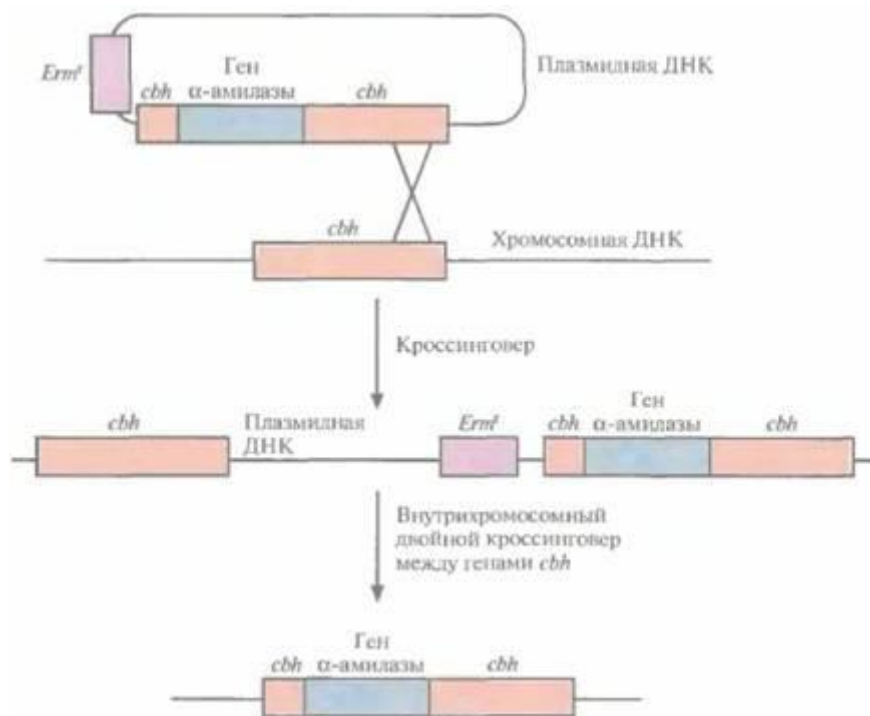
пропорциях, они образуют лигноцеллюлозный материал (табл. 13.8), на долю которого приходится основная часть биомассы, остающейся в огромном количестве в виде отходов сельского хозяйства, деревообрабатывающей промышленности и других отраслей хозяйственной деятельности человека. Эти отходы необходимо переработать или использовать в качестве промышленного сырья. С этой точки зрения лигноцеллюлозные материалы можно разделить на три класса.

- Сами растения, специально выращиваемые для получения целлюлозы, строительных материалов или корма для скота (хлопок, древесина, сено),
- Растительные отходы, остающиеся после сбора и переработки урожая и после обработки древесины (солома, рисовая шелуха, багасса сахарного тростника, древесная щепа, опилки и т. д.).
- Бытовые отходы (использованные бумага, картон и т. д.).

Компоненты лигноцеллюлозы

Лигнин — глобулярный нерегулярный нерастворимый полимер (мол. масса МО 000), состоящий из остатков фенилпропана (рис, 13.13), Молекулы этого ароматического вещества при образовании лигнина соединяются друг с другом случайным образом с помощью разных химических связей, не поддающихся ферментативному гидролизу или химическому расщеплению. У расте-

Рис. 13.12. Введение гена  $\alpha$ -амилазы и хромосому *L. plantarum*. Ген  $\alpha$ -амилазы встраивают в ген *cbh* челночной плазмиды *E. coli*—*L. plantarum*, которой затем трансформируют клетки *L. plantarum*. В результате кроссинговера между *cbh*-локусами плазмидной и хромосомной ДНК образуются клоны *L. plantarum*, устойчивые к эритромицину и обладающие  $\alpha$ -амилазной активностью. При выращивании трансформированных клеток в течение достаточно длительного времени (не менее 30 генераций) в неселективных условиях может произойти внутривхромосомный двойной кроссинговер, приводящий к элиминации гена устойчивости к эритромицину *Erm<sup>r</sup>*, хромосомного гена *cbh* и плазмидной ДНК.



ний лигнин образует комплекс с гемицеллюлозой, в который заключены проводящие пучки. Лигнин обуславливает ригидность растений, а также их устойчивость к механическим повреждениям и действию микробов.

Гемицеллюлозы -- это короткоцепочечные гетерогенные полимеры, состоящие из гексозных (шестиуглеродные сахара, такие как глюкоза, манноза и галактоза) и пентозных (пятиуглеродные сахара, такие как ксилоза и арабиноза) единиц. Все гемицеллюлозы можно разделить на три основных типа: ксиланы, остов которых состоит из молекул поли- $\beta$ -1,4-ксилана с присоединенными к ним арабинозой, глюкуроновой и арабиноглюкуроновой кислотами; маннаны, состоящие из глюкоманнанов и галактоманнанов; арабиногалактаны. Тип гемицеллюлозы обычно зависит от ее происхождения; так, ксиланы обычно содержатся в твердых сортах древесины, а глюкоманнаны — в мягких.

Целлюлоза, наиболее простой компонент лигноцеллюлозы, является самым распространенным природным полимером. Его длинные цепи состоят из остатков D-глюкозы, соединенных  $\beta$ -1,4-связями (рис. 13.14). При гидролизе из целлюлозы, как и из крахмала, образуется глюкоза, но сами эти исходные вещества имеют разное строение. Крахмал — запасная энергия молекула, остатки глюкозы в которой соединены так, что полимерные цепи не могут располагаться упорядоченно и образуют сетчатую структуру, легко пропускающую воду; поэтому он растворяется в воде и легко гидролизуется амилазами и глюкоамилазами. В целлюлозе полимерные цепи упакованы так, что образуется кристаллоподобная структура, непроницаемая для воды; поэтому целлюлоза не растворяется в воде и устойчива к гидролизу.

Целлюлоза — очень ценный материал, из которого можно получать множество продуктов (например, этанол). Но сначала необходимо высвободить ее из комплекса с лигнином и гемицеллюлозой. Для этого можно обработать лигноцеллюлозный материал сильной кислотой или сильной щелочью либо подвергнуть его действию высоких температуры и давления. В лю-



бом случае необходимые для этого энергетические затраты существенно повысят стоимость конечного продукта.

Годовое производство лигноцеллюлозы огромно, поэтому ведется непрерывный поиск более эффективных способов ферментативного расщепления целлюлозы (и, в меньшей степени, гемицеллюлозы). Кроме того, разрабатываются методы избирательного химического и ферментативного расщепления лигнина.

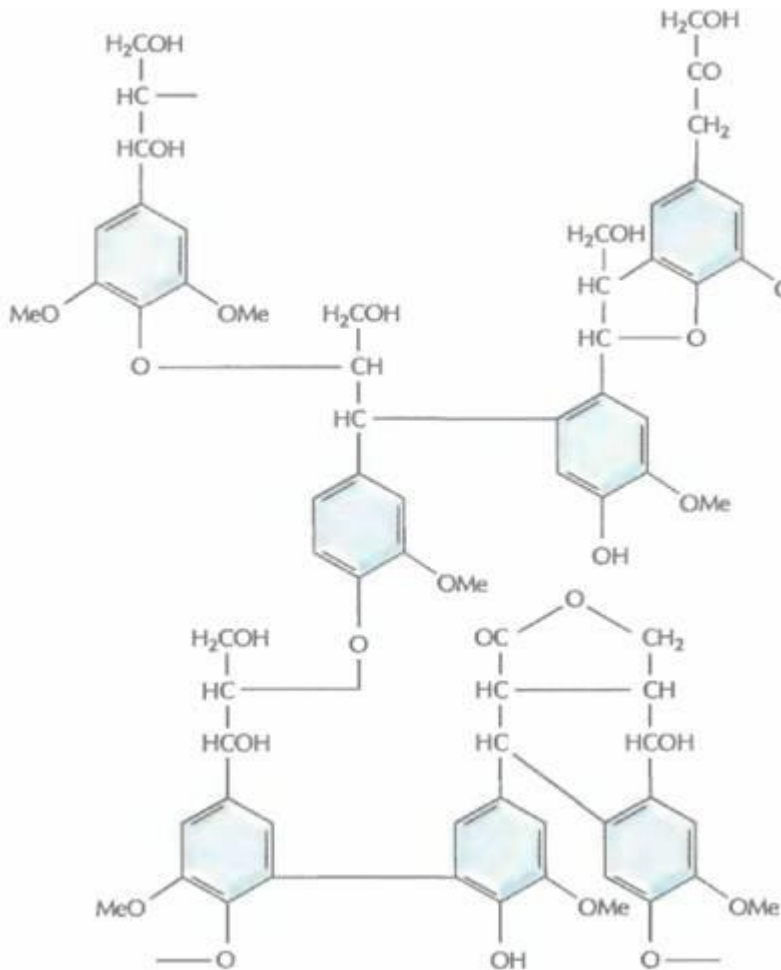


Рис. 13.13. Структура лигнина. Представлены лишь некоторые из возможных способов соединения остатков фенилпропана (шестиуглеродного ароматического соединения, содержащего алкильную группу).

***Выделение прокариотических целлюлозных генов***

Многие бактерии и грибы способны расщеплять целлюлозу благодаря совместному действию нескольких ферментов, называемых целлюлазами.

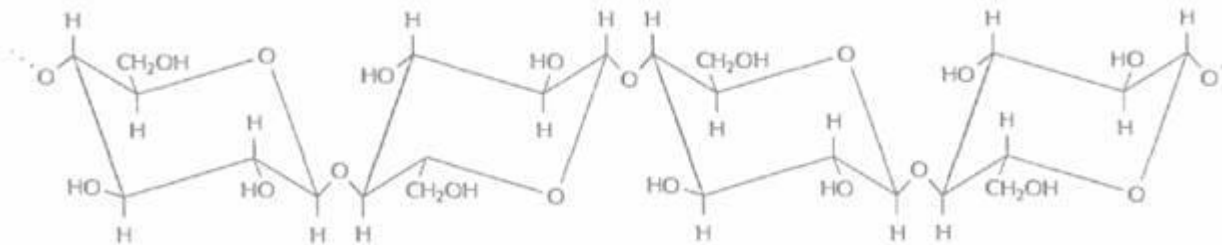


Рис. 13.14. Сегмент полимерной цепи целлюлозы. Остатки глюкозы соединены  $\beta$ -1,4-связями «голова к хвосту».

У некоторых микроорганизмов они входят в состав целлюлосомы — белкового комплекса, находящегося на клеточной поверхности. Эти ферменты следующие:

- эндоглюканаза, которая гидролизует  $\beta$ -1,4-связи между соседними остатками глюкозы в неплотно упакованных областях целлюлозы, образуя разрывы в середине цепи (рис. 13.15)
- экзоглюканаза, которая расщепляет разорванные целлюлозные цепи с нередуцирующих концов с образованием глюкозы, целлобиозы (два остатка глюкозы) и целлотриозы (три остатка глюкозы)
- целлобиогидролаза, которая часто присутствует в целлюлолитических грибах и является разновидностью экзоглюканазы, отщепляющей фрагменты из 10 и большего числа ос-

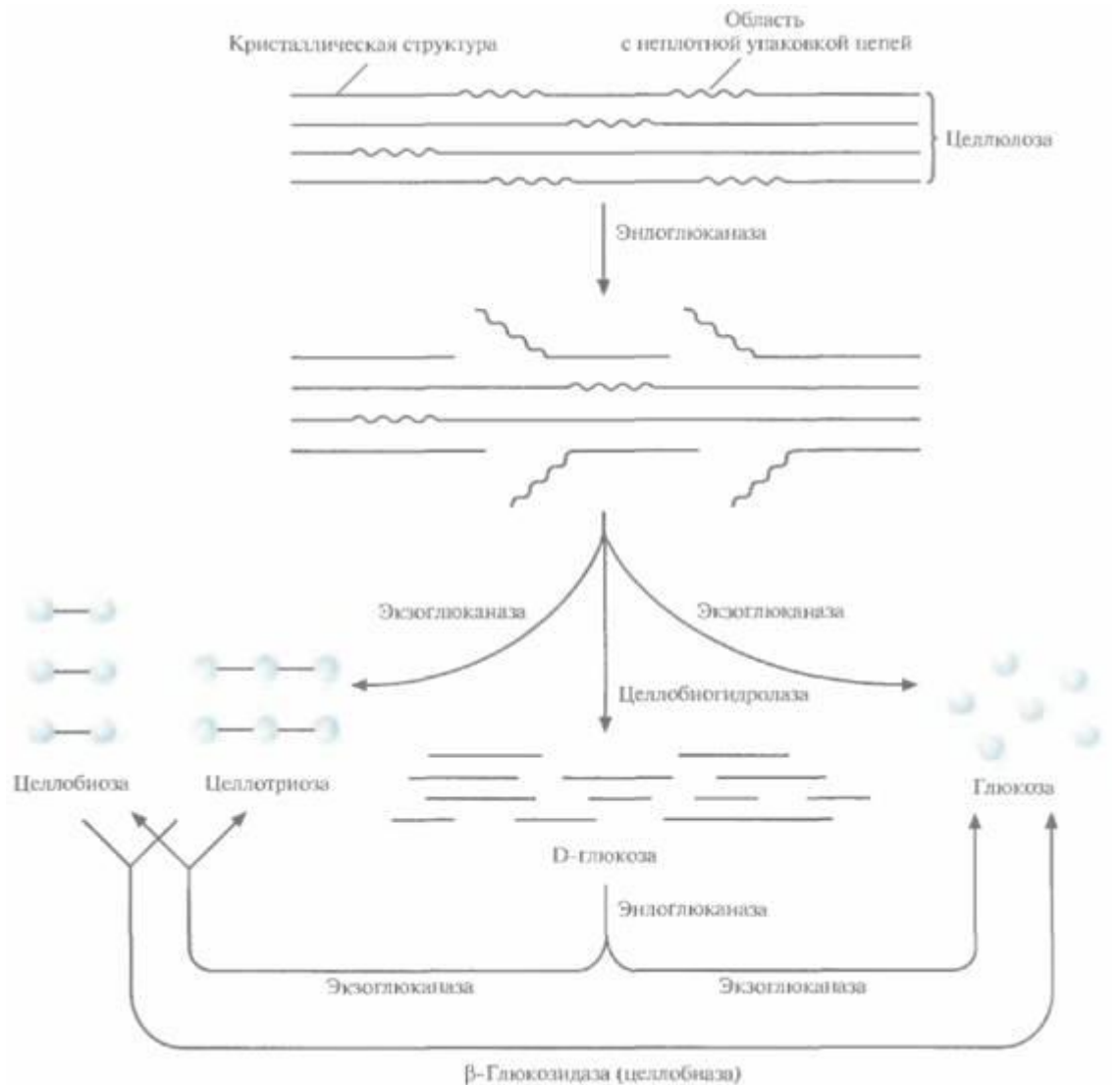


Рис. 13.15. Биодеградация целлюлозы. Гидролиз цепей начинается с расщепления эндоглюканазой  $\beta$ -1,4-связей в неплотно упакованных областях. Затем экзоглюканаза(ы) и целлобиогидролаза(ы) отщепляют олигосахариды с нередуцирующего конца частично гидролизованных цепей. Далее  $\beta$ -глюкозидаза катализирует превращение целлобиозы и целлотриозы в глюкозу.

татков глюкозы с нередуцирующих концов молекул целлюлозы

- $\beta$ -глюкозидаза, или целлобиаза, которая катализирует превращение целлобиозы и целлотриозы в глюкозу (рис. 13.15).

Расщепление целлюлозы с помощью целлюлолитических микроорганизмов происходит медленно и часто не до конца. Поэтому были предприняты попытки создать с помощью генной инженерии микроорганизмы, обладающие более высокой целлюлазной активностью. Для этого выделили про- и эукариотические гены, кодирующие отдельные ферменты целлюлазного комплекса.

Прокариотические эндоглюканазные гены клонировали и идентифицировали с помощью следующего простого, но эффективного подхода.

1. Клонированием в *E. coli* создали банк ДНК-клонов целлюлолитического прокариотического организма и выращивали рекомбинантные клетки в течение 12 ч на твердой среде, содержащей селективный антибиотик.

2. Образовавшиеся колонии покрыли слоем агара, содержащего карбоксиметилцеллюлозу (КМК), растворимое производное целлюлозы, и инкубировали при 37 °C еще несколько часов. За это время произошло частичное расщепление молекул КМК, находящихся вблизи колоний, которые синтезируют и секретируют эндоглюканазу. Трансформированные клетки, синтезирующие, но не секретирующие эндоглюканазу, не способны расщеплять данный субстрат, молекулы которого из-за большого размера не проникают в клетку.

3. Те области, где произошел гидролиз КМК, выявляли с помощью не токсичного для бактерий красителя конго красного и раствора хлорида натрия. Конго красный избирательно связывается с целлюлозой, окрашивая ее в красный цвет, и слабо связывается с низкомолекулярными сахарами, окрашивая их в желтоватый цвет. Обработка хлоридом натрия стабилизирует цвет. Колонии, продуцирующие секретируемую эндоглюканазу, были окружены желтым гало, а фон, создаваемый нерасщепленной КМК, имел красный цвет.

С помощью этого подхода были выделены гены эндоглюканазы из *Streptomyces*, *Clostridium*, *Thermoanaerobacter*, *Thermomonospora*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Cellvibrio*, *Ruminococcus*, *Cellulomonas*, *Fibrobacter* и *Bacillus*.

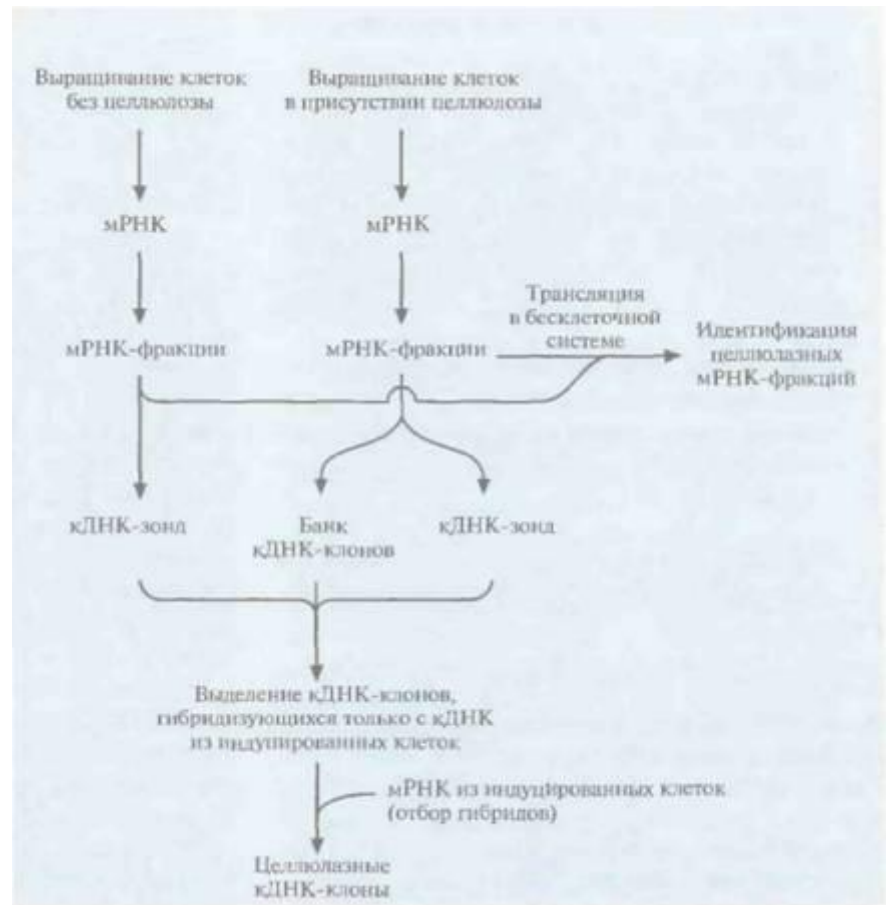
Для выявления рекомбинантных клонов, синтезирующих экзоглюканазу, использовали иммунный скрининг, позволяющий идентифицировать белок-мишень с помощью специфичных к нему антител; секреция белка при этом необязательна. Рекомбинантные клетки лизировали *in situ* (парами хлороформа), перенесли цитоплазматические белки на нейлоновый или нитроцеллюлозный фильтр и провели иммунологический тест. Используемый при этом метод реплик позволил сохранить жизнеспособные клетки для дальнейших исследований.

Прокариотические  $\beta$ -глюкозидазные гены выделяли с помощью трансформации *E. coli* банком ДНК-клонов, полученным из продуцирующего данный фермент микроорганизма, и отбора трансформантов, способных расти на минимальной среде с целлобиозой в качестве единственного источника углерода. Клоны, проявляющие  $\beta$ -глюкозидазную активность, можно также выявлять с помощью среды, содержащей хромогенный субстрат (например, 5-бром-4-хлор-3-индол- $\beta$ -D-глюкопиранозид), или целлобиозного агара Мак-Конки; в этих условиях колонии окрашиваются в красный цвет.

### **Выделение эукариотических целлюлазных генов**

Скрининг кДНК- или геномных библиотек с помощью гибридизации с гетерологичным зондом не очень эффективен при идентификации целлюлазных генов, поскольку их нуклеотидные последовательности довольно сильно различаются у разных организмов. Поэтому нужны новые подходы для выделения мРНК целлюлолитических ферментов из грибов или растений. К сожалению, эти мРНК составляют лишь небольшую часть суммарной мРНК, поэтому приходится обогащать библиотеки этими мРНК или кДНК и элиминировать кДНК-клоны, не несущие последовательности-мишени. Для выделения некоторых генов эукариотических целлюлаз использовали метод «дифференциальной гибридизации», суть которого состоит в следующем (рис. 13. 16).

Рис. 13.16. Идентификация кДНК-клонов, кодирующих эукариотические целлюлазы, с помощью дифференциальной гибридизации.



1. Выделяют мРНК из клеток, выращенных на среде без целлюлозы (неиндуцированных клеток), и клеток, которые для увеличения продукции целлюлаз были выращены в присутствии целлюлозы или ее производных (индуцированных клеток).

2. Каждую популяцию мРНК фракционируют в градиенте плотности сахарозы. Проводят трансляцию мРНК каждой фракции в бесклеточной системе на основе ретикулоцитов кролика или зародышей пшеницы. Определяют мол. массу соответствующих белков и проводят иммунологический тест, с тем чтобы идентифицировать фракцию (или фракции), содержащую мРНК целлюлазы. Разделяют продукты трансляции в полиакриламидном геле и выявляют полосы, происходящие от индуцированных клеток и отсутствующие для неиндуцированных; материал этих полос и представляет собой белки, синтез которых был индуцирован целлюлозой.

3. мРНК-фракции индуцированных клеток, детерминирующие синтез целлюлаз, и их «партнеры» в градиенте плотности сахарозы мРНК неиндуцированных клеток по отдельности используют в качестве матриц для синтеза кДНК.

4. кДНК индуцированных клеток клонируют в плазмидном или фаговом векторе, вводят в *E. coli*, высевая на чашки, делают реплики и проводят скрининг, используя в качестве гибридизационных зондов радиоактивно меченную кДНК фракций из индуцированных и не индуцированных клеток. Клоны, гибридизующиеся с кДНК индуцированных и не гибридизующиеся с кДНК неиндуцированных клеток, могут содержать целлюлазные

гены, поэтому проводят их дальнейшее изучение.

5. Чтобы доказать, что позитивные кДНК-клоны действительно кодируют целлюлазы, их ДНК гибридируют с суммарной мРНК индуцированных клеток, проводят трансляцию гибридивавшейся мРНК *in vitro* в бесклеточной системе и идентифицируют полученные продукты с помощью антител, специфичных к ферментам целлюлазного комплекса,

6. Определяют нуклеотидную последовательность каждого позитивного кДНК-клона и устанавливают, какие клоны кодируют одинаковые, а какие — разные белки целлюлазного комплекса.

Эту схему можно использовать для выделения любых индуцибельных эукариотических генов.

### *Манипуляции с целлюлозными генами*

Клонированные целлюлазные гены можно использовать в разных целях: для облегчения очистки рекомбинантных белков с помощью связывающего целлюлозу домена; для получения коммерческих продуктов (например, этанола) из целлюлозных отходов с помощью микроорганизмов, в которые встроены целлюлазные гены.

Молекула целлюлазы обычно состоит из трех доменов; каталитического, шарнирного, часто обогащенного остатками пролина, серина и треонина, и связывающего целлюлозу. Каталитический и связывающий домены функционируют независимо друг от друга. Такое разделение функций можно использовать, включив нуклеотидную последовательность связывающего целлюлозу домена в состав химерного гена, другая часть которого кодирует представляющий коммерческий интерес белок. Чтобы очистить полученный белок, его экстракт пропускают через колонку, набитую целлюлозой. С целлюлозой связывается только гибридный белок; его элюируют и удаляют «целлюлозный» домен протеолизом. Эта система сходна с иммуноаффинной хроматографией, но обходится дешевле.

Большинство целлюлазных генов исходно клонировали и экспрессировали в *E. coli*, но их можно ввести в другие микроорганизмы и получить новые штаммы с полезными свойствами. Так, *S. cerevisiae* и *Z. mobilis*, эффективно преобразующие в этанол простые сахара (например, глюкозу) после введения им целлюлазных генов, могли бы превращать целлюлозу непосредственно в этанол. Для проверки этой гипотезы провели ряд исследований.

В одной из серий экспериментов гены эндо-и экзоглюканазы бактерии *Cellulomonas fimi*, каждый из которых находился под контролем промотора и сигнальной последовательности *S. cerevisiae*, субклонировали в плазмидном векторе и ввели в *S. cerevisiae*. Некоторые трансформанты секретируют оба фермента в культуральную среду с эффективностью примерно 70% и частично расщепляли целлюлозу, входящую в состав фильтровальной бумаги и предварительно обработанных древесных стружек. Скорость и степень гидролиза этих субстратов возрастала при добавлении в смесь β-глюкозидазы, расщепляющей целлобиозу до глюкозы, но полного гидролиза целлюлозы не происходило. Это связано с существованием двух регуляторных механизмов, действующих по принципу обратной связи: накапливающаяся целлобиоза ингибирует гидролиз целлюлозы, а глюкоза ингибирует расщепление целлобиозы. Ген β-глюкозидазы выделили из грибов *Trichoderma reesei*, клонировали в мультিকопийной плазмиде и вновь ввели в *T. reesei*. Трансформированный штамм продуцировал β-глюкозидазу в 5,5-кратном избытке и расщеплял производное целлюлозы авицел (Avicel) на 33% быстрее, чем нетрансформированный штамм. Это подтверждает данные о том, что β-глюкозидаза облегчает ферментативное расщепление целлюлозы, и позволяет предположить, что для создания более эффективных целлюлолитических микроорганизмов нужно встроить в уже существующие штаммы гены β-глюкозидазы.

Эндоглюканазные гены можно использовать не только для получения из целлюлозных отходов полезных веществ, но и для других целей. Если ввести ген эндоглюканазы, находящийся под контролем конститутивного промотора актинового гена дрожжей, в винные дрожжи, можно усилить аромат получаемого вина. Это связано с повышением содержания в нем как минимум 12 летучих соединений, в том числе

этилпропионата, 2-бутанола, изоамилацетата, изоамилонового спирта и изомасляной кислоты. С помощью такой генетической модификации можно стабилизировать процесс ферментации и создать такие штаммы дрожжей, которые будут производить вина с определенными свойствами.

Исследовалась также возможность использования целлюлазпри промышленной биопереработке бумажных отходов в этанол. Для этого отходы частично расщепляли целлюлазами при 45 °С, а затем, не удаляя целлюлаз, проводили ферментацию высвободившейся глюкозы с помощью *S. cerevisiae* при 37 °С. Основываясь на полученных результатах, рассчитали, что этот подход позволит получить 400 л этанола из 1 т бумажных отходов. Если все 100 млн. т бумажных отходов, ежегодно образующихся в Северной Америке, превратить в этанол и использовать его в качестве топлива, можно сэкономить примерно 16% бензина.

Белок одноклеточных организмов

Белок одноклеточных организмов (БОО) — термин, принятый для обозначения белковых продуктов, синтезируемых монокультурой микробных клеток и использующихся в качестве пищевых добавок или корма для скота. Вопрос об использовании микробной биомассы в качестве источника белка рассматривается вполне серьезно. Это связано не только с дефицитом продовольствия в общемировом масштабе, но и с тем, что содержание белка в большинстве микроорганизмов весьма велико: на его долю приходится примерно 60-80% сухой массы клетки. Кроме того, благодаря высокому содержанию метионина, лизина, витаминов и важных минералов БОО обладает более высокой пищевой ценностью, чем некоторые виды пищи растительного и животного происхождения. Но широкое применение БОО сдерживается по ряду причин,

- Высокое содержание нуклеиновых кислот, что может представлять опасность при некоторых патологических состояниях.
- Возможное присутствие в продуктах токсичных веществ, адсорбированных из субстрата (например, тяжелых металлов) или вырабатываемых самим микроорганизмом (например, микотоксинов), и связанная с этим необходимость проведения дорогостоящих контрольных анализов.
- Низкая скорость разрушения микробных клеток в пищеварительном тракте, что может вызвать расстройство пищеварения или аллергические реакции.
- Более высокая стоимость БОО по сравнению с другими белковыми продуктами, например с белками сои.

Для получения БОО использовали многие микроорганизмы (бактерии, дрожжи, грибы, водоросли, актиномицеты) и различные субстраты (табл. 13.9). Впервые крупномасштабное производство БОО было налажено в Германии во время Первой мировой войны: на патоке в качестве источника углерода и солях аммония в качестве источника азота выращивали *S. cerevisiae* и добавляли их в супы и колбасные изделия для повышения содержания белка.

До 1973 г. нефть была довольно дешевым продуктом, а ее запасы считались практически неограниченными. В связи с этим сразу несколько крупных нефтяных компаний разработали проект по производству БОО из нефти и продуктов ее переработки. Но цены на нефть росли, и интерес к этим проектам пропал. В 1970-х гг. компания Imperial Chemical Industries (ICI) разработала непрерывный процесс ферментации метанола с помощью бактерии *Methylophilus methylotrophus* для коммерческого производства белка прутина. Эта бактерия использует метан (точнее, метанол) в качестве ос-

Таблица 13.9. Субстраты и микроорганизмы, использующиеся при производстве БОО

| Субстрат            | Микроорганизм                       | Микроорганизм |
|---------------------|-------------------------------------|---------------|
| Диоксид углерода    | <i>Spirulina maxima</i>             | Цианобактерии |
| Сыворотка (лактоза) | <i>Kluyveromyces fragilis</i>       | Дрожжи        |
| Алканы нефти        | <i>Candida lipolytica</i>           | Дрожжи        |
| Целлюлозные отходы  | <i>Chaetomium cellulolyticum</i>    | Грибы         |
| Метан (метанол)     | <i>Methylophilus methylotrophus</i> | Бактерии      |



нового субстрата. В 1979 г. был построен завод с самым большим в мире работающим в непрерывном режиме эрлифтным ферментером, способным производить до 50 000 т БОО в год. Но несмотря на инвестиции ICI, составившие более 200 млн. долл., и серьезные инженерные и биотехнологические успехи, к 1987 г. на этой установке было произведено лишь незначительное количество БОО, поскольку его получение с помощью *M. methylotrophus*; оказалось невыгодным.

В последнее время интерес к БОО появился снова; теперь это связано с утилизацией различных отходов (например, целлюлозы и сыворотки). В одних случаях предполагается использовать природные микроорганизмы, и других - микроорганизмы, созданные методами генной инженерии. Но так или иначе, перспективы развития производства БОО будут определяться не природой микроорганизмов, а экономическими соображениями. Возможно, рентабельность производства удастся повысить, если БОО будут получать из побочных продуктов утилизации отходов. Для того чтобы разработать экономичный процесс производства БОО из отходов, необходимо изучить кинетику роста, метаболизм, возможности генетического манипулирования и безопасность многих микроорганизмов, а также вкусовые качества синтезируемых ими продуктов.

Разработан новый подход, с помощью которого можно будет обеспечивать крупный рогатый скот белком, обогащенным незаменимыми аминокислотами. Простое добавление белков R корм — дорогостоящий и не особенно эффективный способ, поскольку белки и аминокислоты разрушаются бактериями рубца еще до того, как животное успеет их использовать. Кроме того, основное количество белка они получают не с кормом; его поставляют присутствующие в рубце микроорганизмы. Рацион животных можно обогатить, если направленно модифицировать эти бактерии. Для этого сначала был синтезирован белок с высоким содержанием остатков метионина, треонина, лизина и лейцина. Он состоял из 100 аминокислот, 57 из которых были незаменимыми, и имел стабильную  $\alpha$ -спиральную конфигурацию. Затем с помощью 14 частично перекрывающихся олигонуклеотидов синтезировали его ген и сшили его с геном белка, связывающего мальтозу; полученный гибридный ген экспрессировали в *E. coli* под транскрипционным контролем *tac*-промотора. На долю гибридного белка приходилось примерно 12% суммарного внутриклеточного белка. Теперь нужно выяснить, будет ли этот белок синтезироваться в достаточном количестве присутствующими в рубце бактериями. Если этот подход окажется успешным, то он станет основой уникальной системы непрерывного обеспечения крупного рогатого скота незаменимыми аминокислотами.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Биодеградация — это процесс разрушения микроорганизмами веществ, загрязняющих окружающую среду. Многие бактерии рода *Pseudomonas* несут плазмиды, кодирующие ферменты, которые катализируют расщепление ароматических и галогенсодержащих органических соединений. В большинстве случаев одна плазида содержит гены ферментов одного специфического катаболического пути. Объединяя плазмиды разных штаммов *Pseudomonas* в одном хозяине, можно создать организм, способный к деградации нескольких соединений. Кроме того, с помощью генетических манипуляций можно расширить спектр субстратов, разрушаемых с помощью определенного ферментативного пути.

Под биомассой здесь понимается вся совокупность веществ и материалов, побочных продуктов пищевой и перерабатывающей промышленности, которая может служить сырьем для получения ценных продуктов. Производство этанола или фруктозы из молотого зерна происходит в несколько ферментативных стадий. Участвующие в этих процессах ферменты часто используются однократно. Чтобы повысить эффективность ферментативных реакций и снизить стоимость процессов, исследователи занимаются клонированием и исследованием свойств бактериальных генов, кодирующих термостабильные, обладающие высокой каталитической активностью и устойчивые к действию спирта ферменты,

Для повышения эффективности промышленного производства этанола в бактерию

*Zymomonas mobilis* были введены гены, благодаря экспрессии которых она могла использовать в качестве источника углерода широкий спектр соединений. Предприняты первые шаги на пути создания штаммов *Lactobacillus plantarum*, способных эффективно расщеплять крахмал, содержащийся в большом количестве в такой важной сельскохозяйственной культуре, как люцерна.

При переработке растительного материала часто образуется большое количество лигноцеллюлозных отходов, которые раньше не находили применения. Сейчас лигноцеллюлоза служит сырьем для получения углеродсодержащих соединений, в первую очередь глюкозы, которые можно использовать в других процессах. Лигноцеллюлоза — это комплекс из лигнина, гемицеллюлозы и целлюлозы, не подверженный действию ферментов без предварительной обработки. Проводимые в последнее время исследования были направлены в основном на изучение механизма расщепления целлюлозы с образованием глюкозы. Клонированы и охарактеризованы гены эндоглюканаз, экзоглюканаз и  $\beta$ -глюкозидаз многих микроорганизмов, но пока не определен набор ферментов, осуществляющих масштабное эффективное расщепление целлюлозы *in vitro*.

Некоторые виды биомассы (например, сыворотка, целлюлозные отходы) и продукты переработки нефти могут служить субстратом при культивировании микроорганизмов. Предполагалось, что эти чистые культуры, а также их продукты (так называемый белок одноклеточных организмов, БОО) можно будет использовать в качестве пищевых добавок или корма для скота. К сожалению, вследствие дороговизны получаемых продуктов, их невысоких вкусовых качеств, а иногда и токсичности производство БОО оказалось экономически нецелесообразным. Однако есть надежда, что с помощью генетических манипуляций все-таки удастся создать систему, позволяющую получать дешевые биологические добавки на основе БОО.

## ЛИТЕРАТУРА

- Barnett C. C.** 1991. Cloning and amplification of the gene encoding an extracellular  $\beta$ -glucosidase from *Trichoderma reesei*: evidence for improved rates of saccharification of cellulosic substrates. *Bio/Technology* 9: 562-567.
- Beauregard M., C. Dupont, R. M. Teather, M. A. Iefford.** 1995. Design, expression, and initial characterization of MB1, a de novo protein enriched in essential amino acids. *Bio/Technology* 13: 974-981.
- Béguin P.** 1990. Molecular biology of cellulose degradation. *Annu. Rev. Microbiol.* 44: 219—248.
- Brown D. E.** 1983. Lignocellulose hydrolysis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* £300: 305-322.
- Buchholz S. E., M. M. Dooley, D. E. Eveleigh.** 1987. *Zymomonas*—alcoholic enigma. *Trends Biotechnol.* 5: 199-204.
- Buchholz S. E., D. E. Eveleigh.** 1990. Genetic modification of *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Adv.* 8: 547-581.
- Chakrabarty A. M.** March 1981. Microorganisms having multiple compatible degradative energy-generating plasmids and preparation thereof. U.S. patent 4,259,444.
- Cole G. E., P. C. McCabe, D. Intow, D. H. Gelfand, A. Ben-Bassat, M. A. Innis.** 1988. Stable expression of *Aspergillus awamori* glucoamylase in distiller's yeast. *Bio/Technology* 6: 417-421.
- Cork D. J., J. P. Krueger.** 1991. Microbial transformation of herbicides and pesticides. *Adv. Appl. Microbiol.* 36: 1—66.
- Dekker K., A. Sugiura, H. Vamagata, K. Sakaguchi, S. Udaka.** 1992. Efficient production of thermostable xylose isomerase in *Escherichia coli* and *Bacillus brevis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36: 727-732.
- Eveleigh D. E.** 1987. Cellulase: a perspective. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* B 321: 435-447.
- Fitzsimons A., P. Hols, J. Jore, R. J. Leer, M. J. Connell, J. Delcour.** 1994. Development of an amylolytic *Lactobacillus plantarum* silage strain expressing the *Lactobacillus amylovorus*  $\alpha$ -amylase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3529-3535.
- Ghosal D., I.-S. You, D. K. Chatterjee, A. M. Chakrabarty.** 1985. Microbial degradation of halogenated compounds. *Science* 228:135—142.
- Click B. R., J. J. Pasternak.** 1989. Isolation, characterization and manipulation of cellulase genes. *Biotechnol. Adv.* 7: 361-386.
- Innis M. A., M. J. Holland, P. C. McCabe, G. E. Cole, V. P. Wittman, R. Tal, K. W. K. Watt,**

- D. H. Gelfand, J. P. Holland, J. H. Meade.** 1985. Expression, glycosylation and secretion of an *Aspergillus* glucoamylase by *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 228: 21-26.
- Kallio P., A. Palva, I. Palva.** 1987. Enhancement of  $\alpha$ -amylase production by integrating and amplifying the  $\alpha$ -amylase gene of *Bacillus amyloliquefaciens* in the genome of *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27: 64-71.
- Kennedy J. F., V. M. Cabalda, C. A. White.** 1988. Enzymic starch utilization and genetic engineering. *Trends Biotechnol.* 6: 184—189.
- Knowles J., P. Lehtovaara, T. Teeri** 1987. Cellulase families and their genes. *Trends Biotechnol.* 5: 255-261.
- Kolenc R. J., W. E. Inniss, B. R. Click, C. W. Robinson, C. I. Mayfield.** 1988. Transfer and expression of mesophilic plasmid-mediated degradative capacity in a psychrotrophic bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 638—641.
- Kumar V., S. Raimakrishnan, T. T. Teeri, J. K. C Knowles, B. S. Hartley.** 1992. *Saccharomyces cerevisiae* cells secreting an *Aspergillus niger*  $\beta$  galactosidase grow on whey permeate. *Bio/Technology* 10: 82-85.
- Lamed R., J. Nainiark, E. Morgenstern, E. A. Bayer.** 1987. Specialized cell surface structures in cellulolytic bacteria. *J. Bacteriol.* 169: 3792-3800.
- Lynd L. R., J. H. Cushman, R. J. Nichols, C. E. Wyman.** 1991. Fuel ethanol from cellulosic biomass. *Science* 251: 1318-1323.
- Meng M., C. Lee, M. Bagdasarian, J. G. /cikus.** 1991. Switching Substrate preference of thermophilic xylose isomerase from D-xylose to D-glucose by redesigning the substrate binding pocket. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4015-4019.
- Pérez-González J. A., R. Gonzales, A. Querol, J. Sentira, D. Ramon.** 1993. Construction of a recombinant wine yeast strain expressing  $\beta$ -(1,4)-endoglucanase and its use in microvinification processes. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2801-2806.
- Quax W. J., N. T. Mrabet, R. G. M. Luiten, P. W. Schuurhuizen, P. Stanssens, I. Lasters.** 1991. Enhancing the thermostability of glucose isomerase by protein engineering. *Bio/Technology* 9: 738-742.
- Ramos J. L., A. Wasserfallen, K. Rose, K. N. Timmis.** 1987. Redesigning metabolic routes: manipulation of TOL plasmid pathway for catabolism of alkyl-benzoates. *Science* 235: 593-596.
- Suyama A., R. Iwakiri, N. Kimura, A. Nishi, K. Nakamura, K. Furukawa.** 1996. Engineering hybrid pseudomonads capable of utilizing a wide range of aromatic hydrocarbons and of efficient degradation of trichloroethylene. *J. Bacteriol.* 178: 4039-4046.
- Timmis K. N., R. J. Steffan, R. Unterman.** 1994. Designing microorganisms for the treatment of toxic wastes. *Annu. Rev. Microbiol.* 48: 525-557.
- Verdoes J. C., A. D. van Diepeningen, P. J. Punt, A. J. M. Debets, A. H. Stouthamer, C. A. M. J. J. van den Hondel.** 1994. Evaluation of molecular and genetic approaches to generate glucoamylase overproducing strains of *Aspergillus niger*. *J. Biotechnol.* 33: 165-175.
- Wayman M., S. (Chen, K. Doan.** 1992. Bioconversion of waste paper to ethanol. *Process Biochem.* 27: 239-245.
- Windass J. D., M. J. Worsey, E. M. Pioli, D. Ptohi, P. T. Barth, K. T. Atherton, E. C. Dart, D. Byrom, K. Powell, P. J. Senior.** 1980. Improved conversion of methanol to single cell protein by *Methylophilus methylotrophus*. *Nature* 287: 396-401.
- Winter R. B., K.-M. Yen, B. D. Ensley.** 1989. Efficient degradation of trichloroethylene by a recombinant *Escherichia coli*. *Bio/Technology* 7: 282-285.
- Witholt B., M.-J. de Smet, J. Kingma, J. B. van Beilen, M. Kok, R. G. Lageveen, G. Eggink.** 1990. Bioconversions of aliphatic compounds by *Pseudomonas oleovorans* in multiphase bioreactors: background and economic potential. *Trends Biotechnol.* 8:46-52.
- Wong W. K. R., C. Curry, R. S. Parekh, S. R. Parekh, M. Wayman, R. W. Davies, D. G. Kilburn, N. Skipper.** 1991. Wood hydrolysis by *Cellulomonas fimi* endoglucanase and exoglucanase coexpressed as secreted enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bio/Technology* 6: 713-719.
- Wharig M., C. Eddy, K. Deanda, M. Finkelstein, S. Picataggio.** 1995. Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*. *Science* 267: 240—243.

Zylstra G. J., L. P. Wackett, D. T. Gibson. 1989. Trichloroethylene degradation by *Escherichia coli* containing the cloned *Pseudomonas putida* FI toluene dioxygenase genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 3162-3166.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Как следует модифицировать *P. putida*, чтобы получился штамм, эффективно разрушающий трихлорэтилен?
2. Опишите процедуру клонирования целлюлазных генов грибов.
3. Как используются  $\alpha$ -амилаза и глюкоамилаза в промышленном производстве этанола? Какие манипуляции с кодирующими эти ферменты генами следует провести, чтобы повысить эффективность процесса?
4. Что представляет собой фермент глюкоизомераза? В чем состоит ее ценность? Как и зачем можно модифицировать кодирующий ее ген?
5. Опишите достоинства и недостатки использования *Zymomonas mobilis* вместо *Saccharomyces cerevisiae* при производстве этанола. Как повысить эффективность промышленного использования *Z. mobilis*?
6. Как с помощью генноинженерных методов модифицировать *Z. mobilis*, чтобы можно было использовать этот микроорганизм для производства этанола из ксилозы?
7. Взяв три штамма *Pseudomonas*., один из которых использует фенол в качестве единственного источника углерода при 0 °C, второй расщепляет антрацен с образованием катехола при 35 °C, а третий расщепляет *n*-толуол с образованием протокатехоата при 35 °C, предложите стратегию создания штамма, который сможет использовать в качестве единственного источника углерода фенол, антрацен или *n*-толуол при 0 °C.
8. Как модифицировать штамм *Pseudomonas*, несущий плазмиду pWWO и не способный расщеплять 4-этилбензоат, чтобы он мог утилизировать это соединение?
9. Предложите стратегии выделения прокариотических эндоглюканазных и  $\beta$ -глюкозидазных генов.
10. Что такое «супербацилла»?
11. Как повысить эффективность образования силоса, проводя манипуляции с *Lactobacillus plantarum*?
12. Как следует модифицировать бактерии рубца, чтобы они обеспечивали крупный рогатый скот незаменимыми аминокислотами?

## ГЛАВА 14.

# Бактерии, стимулирующие рост растений

Скорость роста и урожайность растений в естественных условиях зависят от их генотипа, доступности питательных веществ, наличия в почве полезных микроорганизмов и отсутствия патогенных (так называемых фитопатогенов, от *phyto* — растение). Одни виды полезных природных почвенных бактерий и грибов оказывают прямое действие, другие опосредованное. Первые поставляют растениям соединения, стимулирующие их рост, вторые подавляют размножение патогенных почвенных микроорганизмов, предотвращая их негативное влияние на растение.

К основным механизмам стимуляции роста растений микроорганизмами «прямого действия» относятся: 1) фиксация атмосферного азота, который затем используется растением; 2) образование легко усваиваемых форм железа и фосфора и/или поглощение из почвы и доставка этих полезных минеральных веществ в растения; 3) синтез фитогормонов, вызывающих пролиферацию растительных клеток. Опосредованная стимуляция роста растения каким-либо штаммом полезного микроорганизма проявляется через предотвращение роста фитопатогенного почвенного микроорганизма, который МОГ бы отрицательно влиять на нормальный рост и развитие растения. Такое действие называется антибиозом и может заключаться либо в истощении полезным микроорганизмом лимитирующего субстрата, либо в синтезе и секреции соединения, препятствующего росту фитопатогена.

Последние генетические эксперименты по созданию штаммов микроорганизмов, способных более эффективно стимулировать рост растений, были направлены в основном на решение следующих четырех проблем.

- Молекулярные механизмы фиксации азота. Цель всех исследований состояла в том, чтобы оценить возможности повышения уровня фиксации азота микроорганизмами и, следовательно, снизить количество вносимых в почву химических удобрений.
- Образование корневых клубеньков симбиотическими бактериями. Целью этих исследований было создание рекомбинантных бактерий, способных конкурировать с природными симбиотическими бактериями.
- Микробиологический синтез веществ, хелатирующих железо (сидерофоров). Есть надежда, что удастся получить штаммы микроорганизмов, подавляющие рост фитопатогенов.
- Микробиологический синтез фитогормонов. Эти исследования проводились для того, чтобы создать штаммы бактерий, синтезирующие и секретирующие определенные количества фитогормонов, которые ускоряли бы рост растений.

Исследования в этой области проводятся главным образом на бактериях, а не на грибах. Отчасти это обусловлено тем, что полезные грибы не удастся вырастить в культуре, поэтому с ними трудно работать в лабораторных условиях, а кроме того, невозможно получить эти организмы в количестве, достаточном для инокуляции.

### Фиксация азота

Азот ( $N_2$ ) — газ, на долю которого приходится примерно 80% (по объему) воздуха, которым мы дышим. Растения или животные не могут использовать его непосредственно для синтеза не-

обходимых им биологических азотсодержащих соединений типа аминокислот и нуклеотидов; предварительно азот должен быть включен в состав аммиака (фиксирован). Это требует больших энергетических затрат, поскольку тройная связь в молекуле  $N_2$  ( $N \equiv N$ ), которую необходимо предварительно разорвать, чрезвычайно прочная. Энергия для биологической фиксации азота высвобождается при гидролизе больших количеств аденозинтрифосфата (АТФ). Для химического (промышленного) превращения  $N_2$  в аммиак используют высокие температуру и давление.

Для удовлетворения потребностей пищевой промышленности в сельскохозяйственной продукции ежегодно требуется более 100 млн. т связанного азота. Примерно половину этого количества составляют синтетические (химически синтезированные) удобрения, а большую часть второй половины растения получают от азотфиксирующих (дiazотрофных) бактерий типа *Rhizobium*, *Frankia*, *Azospirillum*, *Azotobacter* и цианобактерий. Ни один из эукариотических организмов не способен связывать азот.

Благодаря применению химических удобрений удалось значительно повысить урожайность сельскохозяйственных культур, однако их продолжительное использование приводит к загрязнению почвы и истощению запасов в ней питательных веществ. К тому же химические удобрения становятся все более дорогими. Все это стимулировало поиск альтернативных источников связанного азота, в частности создание штаммов diaзотрофных микроорганизмов, которые могли бы служить «бактериальными удобрениями».

Способностью к фиксации азота обладают самые разные бактерии, и многие из них в принципе могут использоваться как удобрения. Однако до тех пор, пока не будет показано, что бактериальные удобрения столь же эффективны, как и химические, вряд ли удастся преодолеть консерватизм производителей сельскохозяйственной продукции и изменить используемые в настоящее время подходы. Например, вторая по экономической значимости и по занимаемым площадям сельскохозяйственная культура в США — соя — формирует симбиотические отношения с бактерией *Bradyrhizobium japonicum*. В результате такого симбиоза бактерии обеспечивают растение связанным азотом, а сами получают от него легко усваиваемые формы углерода, образующиеся при фотосинтезе. После инокуляции растений некоторыми штаммами *B. japonicum* конечный выход растительной биомассы может возрасти на 25—50% и никаких добавок химически связанного азота больше не потребуется. Примерно 50% сои выращивается в нескольких регионах США, при этом везде используется в общем сходная технология. Но лишь небольшую часть этой культуры в настоящее время обрабатывают *B. japonicum*. Фермеры до сих пор полагаются на природные штаммы *B. japonicum* и химические удобрения.

Репутация бактериальных удобрений весьма сомнительна. В 1950-х годах в СССР более 10 млн. га сельскохозяйственных угодий обрабатывались смесью diaзотрофных бактерий, состоящей в основном из *Azotobacter chroococcum* и *Bacillus megaterium*. При этом примерно в 60% случаев урожайность различных зерновых повысилась на 10—20%. Однако эти полевые испытания оказались некорректными и невоспроизводимыми; многие исследователи выразили сомнения в правильности полученных результатов, и использование бактериальных инокулятов в качестве удобрений не получило развития. Однако проблемы экономического характера, необходимость предотвращения загрязнения окружающей среды, появление новых технологий привели к тому, что ученые вновь обратились к изучению возможности использования бактериальных удобрений.

Микроорганизмы, которые применяются в настоящее время в сельском хозяйстве, принадлежат в основном к двум родам: *Rhizobium* и *Bradyrhizobium*. Это грамотрицательные палочкообразные жгутиковые бактерии, находящиеся в симбиозе с бобовыми. Каждый вид *Rhizobium* и *Bradyrhizobium* специфичен в отношении лишь небольшого числа видов растений и не взаимодействует с растениями, не являющимися его природными хозяевами (табл. 14.1).

На определенной стадии жизненного цикла *Rhizobium* проникает в клетки корня растения и инициирует комплекс изменений, приводящих к формированию корневого клубенька. Бактерии внутри корневого клубенька быстро проли-



Таблица 14, 1, Специфичность видов *Rhizobium* и *Bradyrhizobium* в отношении разных растений

| Бактерия   | Растение-хозяин                                  |
|--|--|
| <i>Bradyrhizobium japonicum</i>                    | Соя  |
| <i>Rhizobium meliloti</i>                          | Люцерна  |
| <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> | Клевер   |
| <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>   | Горох, фасоль                                    |
| <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> | Фасоль обыкновенная, фасоль золотистая           |
| <i>Rhizobium loti</i>                              | Лотос  |
| <i>Rhizpbium huakuii</i>                           | <i>Astragalus sinicus</i>                        |
| <i>Rhizobium ciceri</i>                            | Турецкий горох                                   |
| <i>Rhizobium tropici</i>                           | <i>Leucaena</i> spp., <i>Macroptilium</i> spp.   |
| <i>Rhizobium galegae</i>                           | <i>Galega officinalis</i> . <i>G. orientalis</i> |
| <i>Rhizobium fredii</i>                            | Соя  |
| <i>Rhizobium</i> sp. штамм NGR 234                 | Тропические бобовые                              |
| <i>Rhizobium elti</i>                              | Фасоль обыкновенная, фасоль золотистая           |
| <i>Bradyrhizobium elkanii</i>                      | Соя  |

ферируют и находятся в форме, не имеющей клеточной стенки. Клубеньковые бактерии связывают атмосферный азот с помощью фермента нитрогеназы. Структурные и биохимические взаимодействия между симбионтами - *Rhizobium* и растением-хозяином — весьма сложны и взаимовыгодны. Внутри клубенька нитрогеназа защищена от токсического действия атмосферного кислорода двумя способами. Во-первых, кислород практически не проникает в клубенек. Во-вторых, содержание кислорода внутри клубенька регулируется белком леггемоглобином. Гемовый компонент этого кислородсвязывающего белка синтезируется бактерией, а глобиновая часть молекулы кодируется геномом растения. Растение обеспечивает бактерии необходимыми для роста связанными формами углерода, образующимися при фотосинтезе, а растение извлекает выгоду из этих симбиотических отношений, получая от бактерии связанный азот.

Нитрогеназа

Интерес к диазотрофам как к биологическим удобрениям возродился после того, как были разработаны методы выделения и модификации генов, и это стимулировало изучение биохимических и молекулярно-биологических механизмов фиксации азота. Ученые надеялись, что благодаря этим исследованиям удастся создать более эффективные азотфиксирующие микроорганизмы, способствующие повышению урожайности сельскохозяйственных культур, а некоторые исследователи даже предполагали ввести бактериальные гены фиксации азота непосредственно в растения, чтобы такие растения могли сами фиксировать азот. И хотя эти чересчур смелые планы не удалось осуществить, процесс фиксации азота был детально изучен, так что возможность генноинженерного усовершенствования некоторых диазотрофов стала более реальной.

Компоненты

Все известные нитрогеназы содержат два кисло-родчувствительных компонента: I и II. Компонент I — это комплекс из двух α-субъединиц (массой примерно 50 000 Да каждая), двух β-субъединиц (примерно 60 000 Да каждая), 24 молекул железа, двух молекул молибдена и железо-молибденового кофактора, обозначаемого FeMoCo (рис. 14.1). Компонент II состоит из двух α-субъединиц (примерно 32 000 Да каждая) и из неизвестного числа молекул железа, причем его α-субъединицы не аналогичны таковым в компоненте I. Для фиксации азота необходимы оба компонента, комплекс магния и АТФ, а также источник восстановительных эквивалентов:

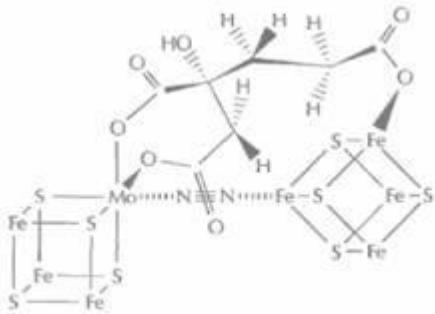
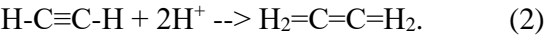


Рис. 14.1. Предполагаемая структура железомолибденового кофактора, связанного с молекулой азота (N<sub>2</sub>).

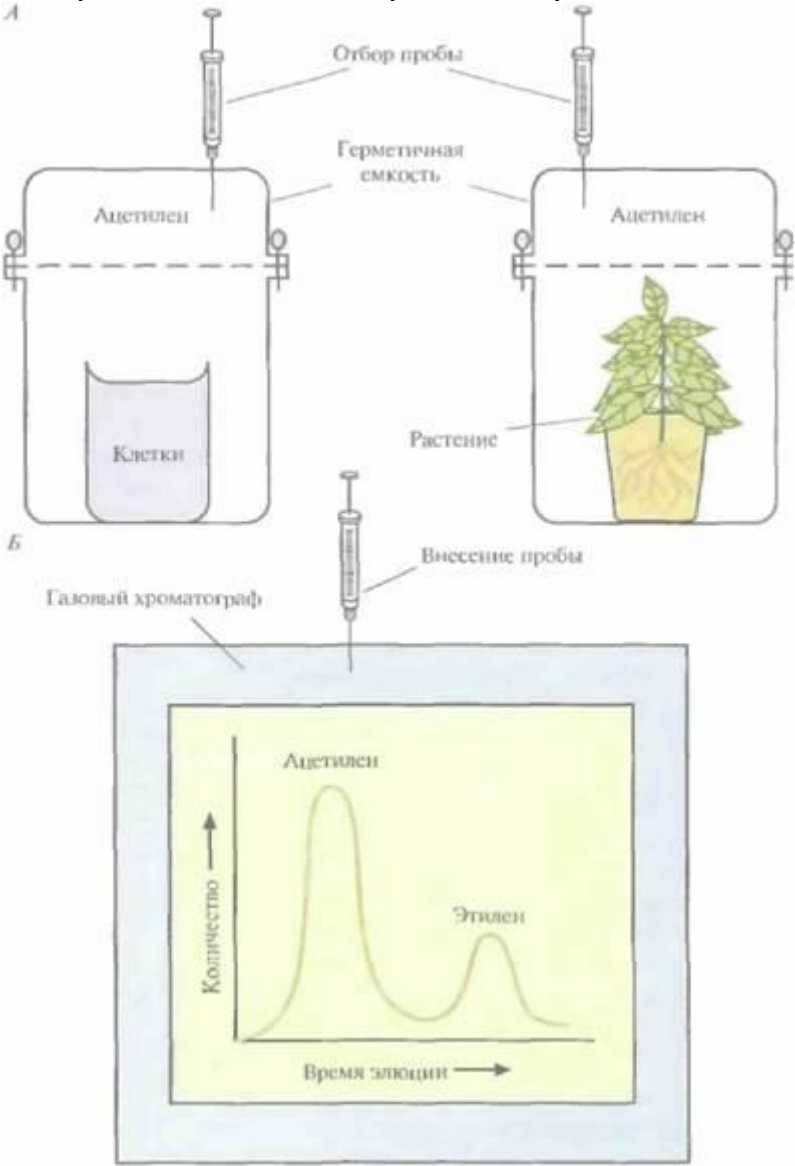
Помимо фиксации азота, нитрогеназа катализирует также восстановление газообразного ацетилена до этилена:



Определяя с помощью газовой хроматографии количество синтезированного этилена, можно оценивать активность нитрогеназы. Определения можно проводить на целых клетках в растворе (рис. 14.2), на бактериях, ассо-

циированных с корнями растений, на грубых экстрактах клеток или на высокоочищенных препаратах фермента. Компонент I катализирует собственно восстановление N<sub>2</sub>, а компонент II служит донором электронов. Оба они чрезвычайно чувствительны к кислороду и при слишком высоких его концентрациях быстро и необратимо инактивируются. Функционирование нитрогеназы зависит также от 15—20 вспомогательных белков. Роль некоторых из них состоит в передаче электронов

Рис. 14.2. Определение активности нитрогеназы по восстановлению ацетилена до этилена. А, Бактерии (в культуре или ассоциированные с корнями растения), синтезирующие нитрогеназу, либо препарат очищенного фермента (не показано) помещают в герметичную емкость в атмосферу ацетилена. Б. Из емкости периодически отбирают пробы и методом газовой хроматографии измеряют количество ацетилена и этилена. Активность нитрогеназы пропорциональна количеству образовавшегося этилена.



компоненту II, а также в биосинтезе железомолибденового кофактора.

*Генная инженерия кластера генов нитрогеназы*

Фиксация азота — очень сложный процесс, требующий согласованного действия множества разных белков. Поэтому вряд ли можно было ожидать, что вся генетическая информация, необходимая для фиксации азота, будет содержаться в каком-то одном фрагменте ДНК и что этот фрагмент удастся вычленить из генома диазотрофного микроорганизма и перенести в недиазотрофный организм. Следует еще учесть, что физиологические условия в организме реципиента должны быть подходящими для функционирования активной нитрогеназы. Более приемлемый способ выделения генов азотфиксации (*nif*-генов) состоял в том, чтобы идентифицировать и охарактеризовать те клоны библиотеки ДНК дикого типа, которые восстанавливают способность различных мутантов данного микроорганизма фиксировать азот. Такой метод называется генетической комплементацией.

Первые *nif*-гены, идентифицированные методом комплементации, были выделены из банка клонов диазотрофией бактерии *Klebsiella pneumoniae*. Эта хорошо изученная энтеробактерия, которая обнаруживается в почве и воде, а также в кишечнике человека. Схема выделения состоит в следующем (рис. 14.3).

1. Клетки *K. pneumoniae* обрабатывают такой дозой мутагена, чтобы выживаемость составила примерно 0,1—1,0%. Некоторые из мутантных клеток, способные расти на минимальной среде, содержащей источник связанного азота типа NH<sub>4</sub>Cl, но не в отсутствие связанного азота, вероятно, несут мутацию в *nif*-гене; их обозначают Nif<sup>-</sup>.

2. Используя экспрессирующие плазмидные векторы с широким кругом хозяев, создают банк клонов хромосомной ДНК *K. pneumoniae* дикого типа (Nif<sup>+</sup>) и поддерживают его в *E. coli*.

3. Проводят конъюгацию Nif<sup>-</sup>-клеток *K. pneumoniae* с клетками *E. coli*, несущими банк клонов в плазмидных векторах.

4. Трансформированные клетки *K. pneumoniae*, приобретшие фенотип Nif<sup>+</sup>, отбирают, высевая их на минимальную среду, не содержащую источника связанного азота. В этих условиях растут только Nif<sup>-</sup>-клетки *K. pneumoniae* с плазмидой, кодирующей белок, который отсутствует или не функционирует в Nif<sup>-</sup>-мутанте.

Фрагмент ДНК в плазмиде, комплементирующий хромосомную мутацию Nif<sup>-</sup>, содержит *nif*-ген, который можно детально охарактеризовать и использовать для выделения других *nif*-генов.

Для выделения других генов, участвующих в фиксации азота, применяли два подхода. Во-первых, использовали банк клонов *K. pneumoniae* для комплементации независимо возникающих Nif<sup>-</sup>-мутантов, увеличивая тем самым вероятность того, что в каждом случае будет выделен другой *nif*-ген. Во-вторых, выделенные *nif*-гены использовали в качестве гибридизационных зондов для скрининга банка клонов хромосомной ДНК *K. pneumoniae*, несущих большие вставки (от 7 до 30 т. п. н.), исходя из того, что у прокариот гены одного пути биосинтеза обычно образуют кластеры.

В результате всесторонних исследований был идентифицирован и охарактеризован весь набор *nif*-генов *K. pneumoniae*. Эти гены организованы в один кластер длиной примерно 24 т. п. н. (рис. 14.4), который содержит семь отдельных оперонов, кодирующих в общей сложности 20 разных белков (табл. 14.2). Для того чтобы образовалась активная нитрогеназа, все *nif*-гены

Таблица 14.2. Гены *K. pneumoniae*, участвующие в фиксации азота, и кодируемые ими белки (или функции)

| <i>nif</i> -Ген      | Белок (функция)                        |
|----------------------|--|
| <i>D</i>             | α-Субъединица компонента I нитрогеназы |
| <i>K</i>             | β-Субъединица компонента I нитрогеназы |
| <i>H</i>             | Компонент II нитрогеназы               |
| <i>F</i>             | Флаводоксин                            |
| <i>J</i>             | Пируват: флаводоксин оксидоредуктаза   |
| <i>Q, B, N, E, V</i> | Синтез FeMoCo                          |
| <i>M</i>             | Процессинг редуктазы динитрогеназы     |
| <i>A</i>             | Активатор                              |
| <i>L</i>             | Репрессор                              |
| <i>S</i>             | Созревание компонента I                |
| <i>W, Z, T, Y, U</i> | Другие, менее изученные функции        |

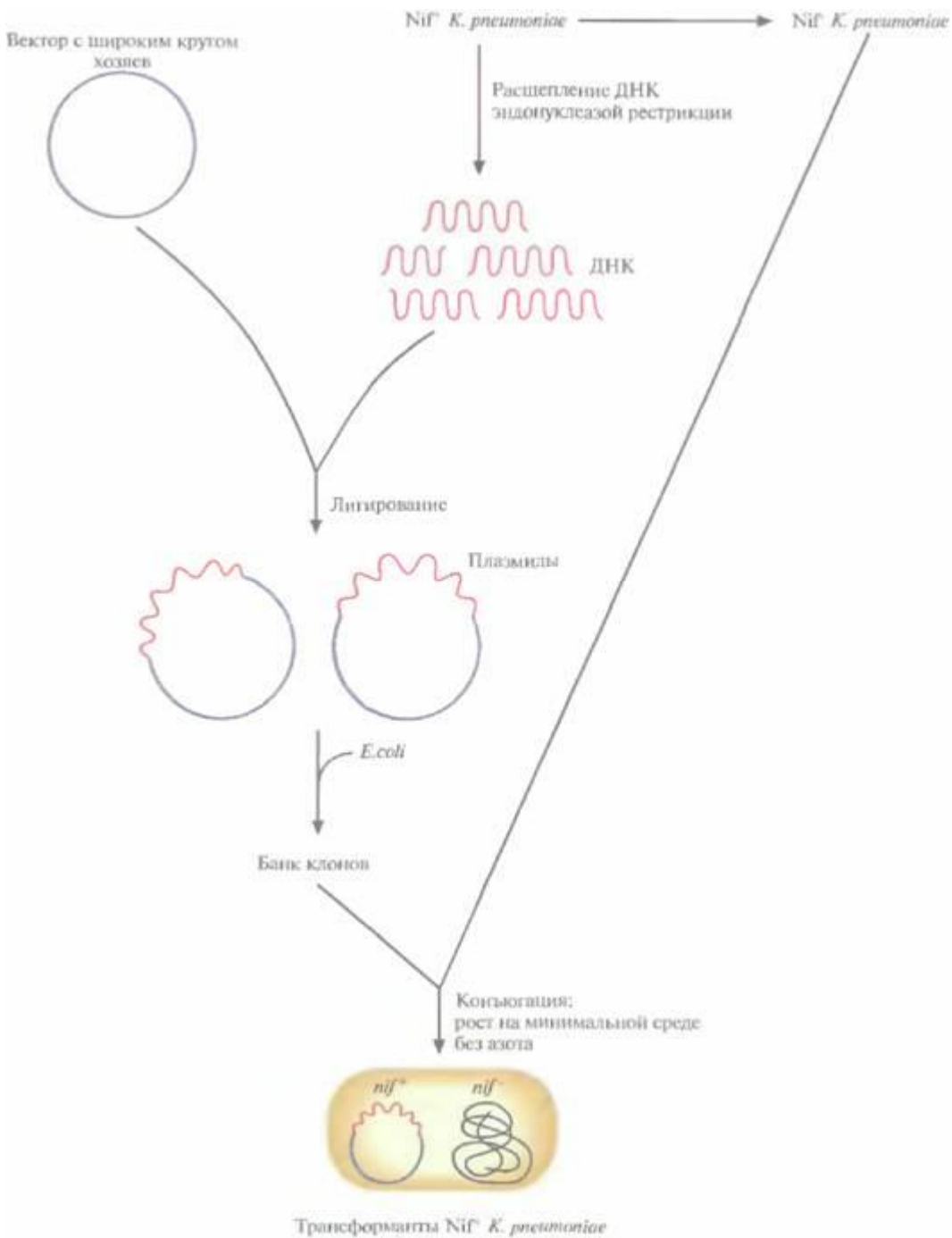


Рис. 14.3. Выделение *nif*-генов методом генетической комплементации. Для комплементации *Nif<sup>-</sup>*-штамма *K. pneumoniae* используется банк клонов ДНК *Nif<sup>+</sup>*-клеток. Трансформированные клетки отбирают по их способности расти на минимальной среде, не содержащей связанного азота.

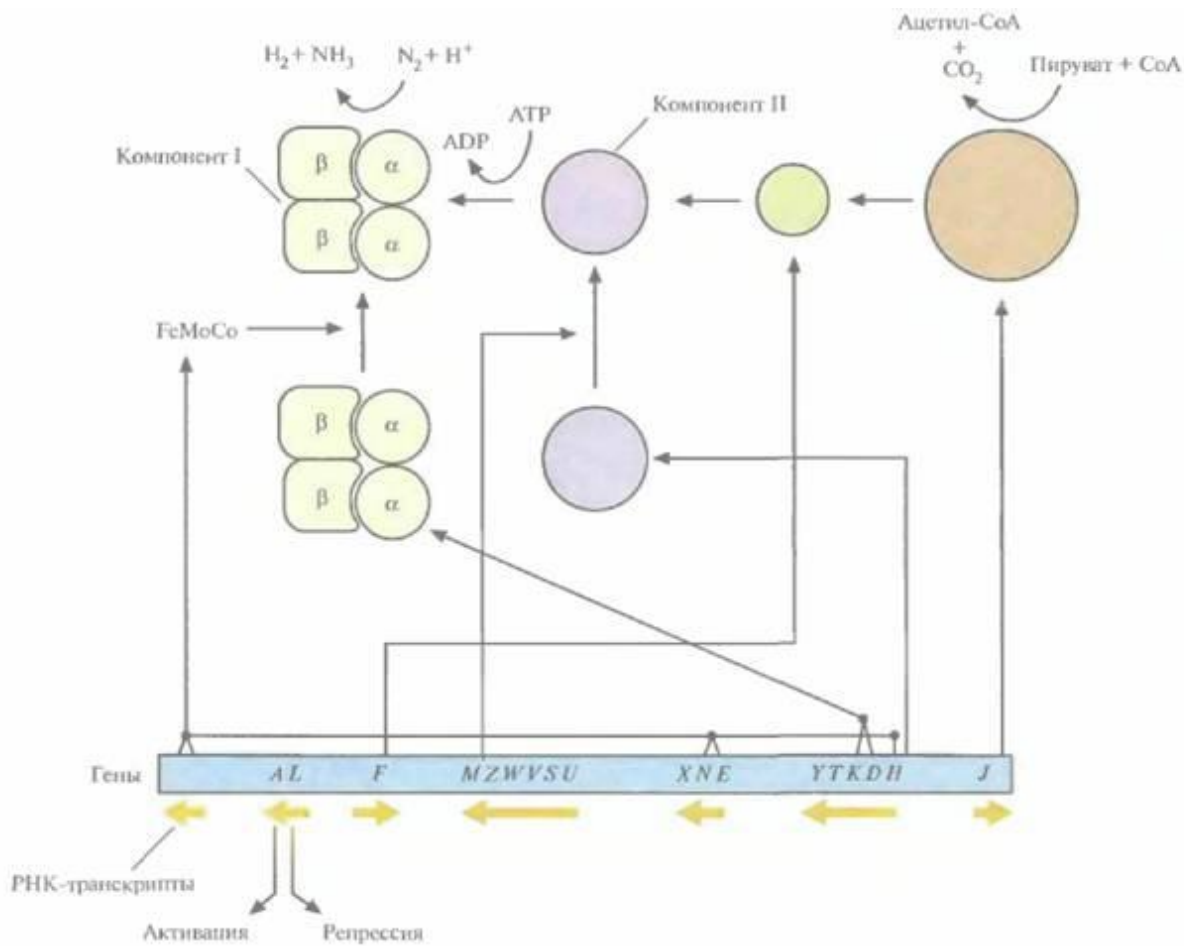


Рис. 14.4. Расположение *nif*-генов в кластере и некоторые кодируемые ими функции. Гены обозначены заглавными буквами; красная стрелка под каждой из групп этих букв обозначает специфический *nif*-оперон и указывает направление его транскрипции. Стрелки, отходящие от обозначений генов, показывают, какое участие в фиксации азота принимают продукты некоторых из этих генов. F — флаводоксин, FO — пируват : флаводоксин оксидоредуктаза.

должны транскрибироваться и транслироваться одновременно (под регуляторным контролем *nifA*- и *nifL*-генов). Белок NifA — это активатор транскрипции всех *nif*-оперонов, кроме своего собственного. Он связывается со специфической последовательностью ДНК (5'-TGT-N<sub>10</sub>-ACA-3'), которая находится в каждом промоторе каждого *nif*-оперона. Сайт связывания белка NifA находится примерно в 80—150 нуклеотидах перед каждым сайтом инициации транскрипции. Перед началом транскрипции с *nif*-промотора связавшийся с ДНК белок NifA взаимодействует со специфическим белком инициации транскрипции  $\sigma^{54}$ . Белок NifL — репрессор. В присутствии либо кислорода, либо связанного азота он действует как антагонист NifA и в результате ингибирует транскрипцию всех других *rtif*-генов.

Роль *K. pneumoniae* в общем биологическом процессе связывания азота не является основной. Поэтому в целях модификации процесса фиксации азота почвенными бактериями, представляющими большой интерес с точки зрения стимуляции роста растений, были кло-

нированы и охарактеризованы *nif*-гены из других источников. При этом *nif*-гены *K. pneumoniae* использовались в качестве гибридационных зондов для выделения соответствующих генов из банков клонов других diaзотрофных микроорганизмов. Большинство diaзотрофов имеет сходный набор генов, кодирующих аппарат фиксации азота, и последовательности ДНК этих генов у разных организмов мало различаются.

Принимая во внимание результаты молекулярно-генетических исследований, вероятно, можно повысить уровень фиксации азота diaзотрофными бактериями, модифицируя *nifA*- и *nifL*-гены. После введения с помощью методов генной инженерии дополнительных копий *nifA*-гена в штамм *Rhizobium meliloti* растения люцерны, зараженные этим рекомбинантным штаммом, достигали больших размеров и давали больше биомассы, чем растения, обработанные нетрансформированным штаммом. По-видимому, аналогичным образом можно поступить с *nifL*-геном, так чтобы белок NifL (негативный регуляторный фактор) стал бы менее чувствительным к присутствию связанного азота. При таком нарушении регуляции микроорганизм поставлял бы больше азота своему симбиотическому партнеру. Однако имеющиеся данные указывают на то, что не все азотфиксирующие организмы синтезируют белок NifL (у некоторых из них существенные области NifL могут быть составной частью NifA), так что подобный подход не является универсальным. Кроме того, увеличение количества азота, которое может фиксировать микроорганизм, приводит к увеличению количества энергии (обычно в форме связанного углерода), необходимой для обеспечения метаболизма. Следовательно, рекомбинантный микроорганизм может оказаться неспособным стимулировать рост растения просто вследствие замедления своего роста.

Имея в виду всю сложность процесса фиксации азота микроорганизмами, можно сделать вывод, что простого введения в недiazотрофную клетку-реципиент одного или двух *nif*-генов недостаточно для того, чтобы она приобрела способность связывать азот. Более того, даже введение в геном растений полного кластера *nif*-генов длиной 24 т. п. н. не даст необходимого эффекта, поскольку при той концентрации кислорода, которая характерна для растительной клетки, нитрогеназа инактивируется. Если же концентрацию кислорода понизить, то растительная клетка вероятнее всего погибнет. Но в первую очередь попытки создания растительных клеток, способных связывать азот, требуют решения фундаментальных проблем транскрипции, трансляции и регуляции. Например, трудно представить, как будет осуществляться регуляция фиксации, поскольку у растений нет промоторов, с которыми связывался бы белок NifA. Следовательно, в таком трансгенном растении транскрипция *nif*-генов не будет инициироваться. Кроме того, чтобы реагировать на уровень связанного азота в клетке, все *nif*-гены должны находиться под контролем отдельных промоторов, поскольку растительные клетки неспособны процессировать мультигенные транскрипты. Учитывая все сказанное выше, приходится констатировать, что создание растений, способных фиксировать азот, вряд ли возможно.

## Гидрогеназа

Нежелательная побочная реакция фиксации азота — восстановление нитрогеназой  $H^+$  до  $H_2$  (газообразный водород), в ходе которой энергия (в форме АТФ) расходуется на образование водорода, который в конечном счете просто улетучивается. В результате только от 40 до 60% всего потока электронов, проходящих через нитрогеназный комплекс, передается на  $N_2$ , что значительно уменьшает эффективность процесса фиксации азота. В принципе, если бы  $H_2$  мог превратиться обратно в  $H^+$ , потери энергии были бы ниже, и процесс фиксации азота стал бы более эффективным. Устранить же эту побочную реакцию прямым путем невозможно, поскольку она обусловлена особенностями химического строения активного центра нитрогеназы, и если попытаться блокировать ее, изменив структуру фермента, то неизбежно произойдет и уменьшение активности нитрогеназы.

## Метаболизм водорода

В середине 1970-х годов было показано, что некоторые штаммы *Bradyrhizobium japonicum* могут расти в микроаэрофильных условиях (при



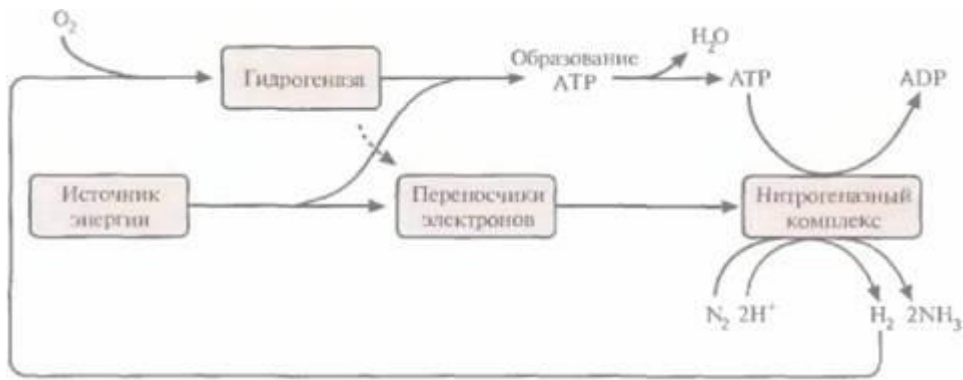


Рис. 14.5. Рециркуляция газообразного водорода - побочного продукта фиксации азота. Нитрогеназа катализирует образование водорода, используя энергию гидролиза АТР, а гидрогеназа катализирует его утилизацию.

низкой концентрации кислорода), используя в качестве источника энергии водород. Для этого они синтезируют фермент гидрогеназу, способную превращать атмосферный H<sub>2</sub> в H<sup>+</sup> (рис. 14.5). Чтобы проверить, можно ли с помощью этих штаммов влиять на рост сои, растения инфицировали *B. japonicum*, синтезирующими гидрогеназу (Hup<sup>+</sup>). Растения давали большую биомассу и усваивали больше азота, чем те, которые были заражены Hup<sup>-</sup>-штаммами, даже несмотря на более высокий уровень нитрогеназной активности последних (табл. 14.3). По результатам этого и аналогичных экспериментов был сделан вывод, что наличие системы ассимиляции водорода у симбиотических diaзотрофов типа *B. japonicum* повышает их способность стимулировать рост растений, по-видимому, в результате связывания и рециркуляции газообразного водорода, образующегося в клубеньках при участии нитрогеназы (рис. 14.5).

Несмотря на выгоды, которые получает растение от симбиоза с diaзотрофным микроорганизмом, обладающим системой повторного использования водорода, в природных условиях такая система при участии штаммов *Rhizobium* встречается редко. Согласно результатам тестирования, представленным в табл. 14,4, большинство рассмотренных природных штаммов *Rhizobium* и *Bradyrhizobium* имеют фенотип Hup<sup>-</sup>. Было проверено по несколько штаммов каждого из указанных видов, а для *B. japonicum* их было более 1400. Ясно, что как только удастся достаточно подробно изучить генетическую природу гидрогеназной системы и идентифицировать соответствующие гены, коммерческие Hup<sup>-</sup>-штаммы *Rhizobium* будут первыми кандидатами на превращение в штаммы с фенотипом Hup<sup>+</sup>.

Модификация генов гидрогеназ

На изучение гидрогеназ как diaзотрофных, так и недiazотрофных микроорганизмов в послед-

Таблица 14.3. Относительная активность нитрогеназы и гидрогеназы и способность *B. japonicum* Hup<sup>+</sup> (SR) и трех Hup<sup>-</sup> -мутантов (SRI, SR2 и SR3) стимулировать рост растений<sup>1) 2)</sup>

| Штамм <i>B. japonicum</i> | Относительная активность нитрогеназы | Относительная активность гидрогеназы | Относительная сухая масса растения | Относительное содержание азота |
|---------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------|
| SR                        | 1,00                                 | 1,00                                 | 1,00                               | 1,00                           |
| SRI                       | 1,27                                 | 0,01                                 | 0,81                               | 0,93                           |
| SR2                       | 1,13                                 | 0,01                                 | 0,74                               | 0,91                           |
| SR3                       | 1,23                                 | 0,01                                 | 0,65                               | 0,85                           |

<sup>1)</sup> Из работы Albrecht et al. *Science* 203: 1255-1257, 1979.

<sup>2)</sup> Активность нитрогеназы оценивали по зависимости количества ацетилена, восстановленного до этилена, от времени; активность гидрогеназы определяли при помощи водородного электрода. Сухая масса растения включает массу листьев и корней. Содержание азота рассчитывали как долю сухой массы, приходящуюся на азот. Все величины нормированы относительно таковых для родительского штамма.

Таблица 14.4. Доля природных штаммов *Rhizobium* и *Bradyrhizobium*, у которых есть система ассимиляции водорода (Hup<sup>+</sup>)<sup>1)</sup>

| Бактерия   | Штаммы Hup <sup>+</sup> , % |
|--|-----------------------------|
| <i>Rhizobium leguminosarum</i>                     | 9,3                         |
| bv. <i>leguminosarum</i>                           |                             |
| <i>Rhizobium meliloti</i>                          | 21                          |
| <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> | 0                           |
| <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> | 0                           |
| <i>Bradyrhizobium japonicum</i>                    | 21                          |
| <i>Bradyrhizobium</i> sp.                          | 91                          |

<sup>1)</sup> Из работы Evans et al. *Anna. Rev. Microbiol.* 41: 335-361, 1987.

ние 20 лет было затрачено много усилий, и тем не менее строение и функции этих ферментов до конца не установлены. Многие микроорганизмы синтезируют более одной гидрогеназы, при этом часто они состоят больше чем из одной полипептидной цепи. Одни гидрогеназы только связывают атмосферный водород, в то время как другие при соответствующих условиях могут также синтезировать его. Из всего этого следует, что вряд ли для преобразования штамма Hup<sup>-</sup> *Rhizobium* в Hup<sup>+</sup> будет достаточно простого включения в его геном гена одной из гидрогеназ. Включенный ген(ы) должен кодировать все субъединицы фермента, который должен быть совместим с электронтранспортной системой организма-хозяина.

Наиболее распространенная стратегия выделения генов гидрогеназ — генетическая комплементация. Первый из таких генов, ген мембраносвязанной гидрогеназы *E. coli*, был идентифицирован методом комплементации у мутантной *E. coli*, неспособной синтезировать активную гидрогеназу, с использованием банка клонов ДНК *E. coli* дикого типа, созданного с помощью плазмиды pBR322. Мутант, содержащий дефектную мембраносвязанную гидрогеназу, не рос на минимальной среде в присутствии формиата, при этом активность эндоплазматической гидрогеназы оставалась неизменной. Трансформированные клетки, способные расти на такой среде, проверяли на присутствие в них активной гидрогеназы. Трансформант, у которого активность гидрогеназы восстановилась до такого же уровня, как у штамма дикого типа, содержал плазмиду, кодирующую белок мол. массой примерно 60 000 Да, что соответствует мол. массе одной из субъединиц мембраносвязанной гидрогеназы *E. coli*. Дальнейшие исследования показали, что в гидрогеназную систему *E. coli* входит множество генов.

Затем были идентифицированы гидрогеназные гены (*hup*) *B. japonicum*; для этого использовался банк клонов ДНК дикого типа, созданный с помощью космидного вектора pLAFRI с широким кругом хозяев, и мутанты Hup<sup>-</sup> *B. japonicum*. Присутствие гидрогеназы, связывающей атмосферный водород, в трансформированных мутантных клетках Hup<sup>-</sup> определяли по способности активного фермента восстанавливать метиленовый синий в атмосфере водорода. Более детальное исследование показало, что *hup*-гены *B. japonicum* образуют по крайней мере два, а возможно, и три оперона, охватывающих примерно 15 т.п.н., причем *hup*-гены *Rhizobium leguminosarum* аналогичны таковым *B. japonicum* как в отношении нуклеотидной последовательности, так и в том, что касается организации генов. Таким образом, идентифицированные *hup*-гены *B. japonicum* можно использовать в качестве гибридизационных зондов для поиска гомологичных генов из банка клонов *R. leguminosarum*.

После идентификации *hup*-генов *R. leguminosarum*, несмотря на всю сложность гидрогеназной системы, удалось «переместить» ее из Hup<sup>+</sup>-штамма *R. leguminosarum* в штамм Hup<sup>-</sup> (табл. 14.5). Растения бобов, на которых образовывали клубеньки бактерии рекомбинантного Hup<sup>+</sup>-штамма *R. leguminosarum*, росли быстрее и содержали больше азота, чем растения, инокулированные Hup<sup>-</sup>-штаммом (табл. 14.5).

Работы по исследованию генов гидрогеназ не вызвали столь большого интереса, как исследования *nif*-генов, и тем не менее они убедительно продемонстрировали целесообразность применения методов генной инженерии для повышения способности diaзотрофных микроорганизмов стимулировать рост растений. Теперь нужно проверить, приведет ли введение *hup*-генов в геномы других diaзотрофных микроорганизмов (как несимбиотических, так и симбиотических) к такому же эффекту.

Гидрогеназная система может применяться не только для повышения эффективности фиксации азота. Так, очищенную гидрогеназу можно использовать для преобразования и запаса-

Таблица 14.5. Рост растений и ассимиляция азота после введения генов *hup* в *Hup<sup>-</sup>*-штамм *R. leguminosarum*<sup>1)</sup>

| Фенотип                | Относительная сухая масса растения | Относительное содержание азота | Относительная площадь листа | Относительная концентрация азота |
|------------------------|------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| <i>Hup<sup>-</sup></i> | 1,00                               | 1,00                           | 1,00                        | 1,00                             |
| <i>Hup<sup>+</sup></i> | 1,35                               | 1,52                           | 1,53                        | 1,15                             |

<sup>1)</sup> Из работы Brewin, Johnston, U.S. patent 4,567,146, январь 1986.

ния солнечной энергии; регенерации кофакторов, принимающих участие в промышленных ферментативных процессах; синтеза специфических химических соединений, требующего участия Н<sub>2</sub> в качестве восстановителя; для удаления трития из воды, которая использовалась для охлаждения реакторов атомных электростанций; для синтеза Н<sub>2</sub> из органических отходов; получения водородно-кислородных топливных ячеек. Однако, несмотря на то что уже идентифицировано и охарактеризовано более дюжины генов гидрогеназ, пока ни один из них не использовался для крупномасштабного синтеза этих ферментов.

Образование клубеньков

Конкуренция среди организмов, образующих клубеньки

Одна из основных задач сельскохозяйственной биотехнологии — создание с помощью методов генной инженерии штаммов *Rhizobium*, которые повышали бы урожайность растений более эффективно, чем природные штаммы. Многие имеющиеся на рынке штаммы-инокулянты -превосходные азотфиксаторы — были созданы путем мутагенеза и последующего отбора, однако они в недостаточной степени стимулируют образование клубеньков на корнях растения-хозяина в условиях конкуренции с природными штаммами *Rhizobium*, уже присутствующими в почве. И наоборот, многие природные штаммы с успехом выдерживают конкуренцию с лабораторными штаммами, но малоэффективны в отношении фиксации азота. Таким образом, для того чтобы можно было реально использовать имеющиеся на рынке инокулирующие штаммы, необходимо либо повысить их способность образовывать клубеньки, либо устранить природные штаммы *Rhizobium*.

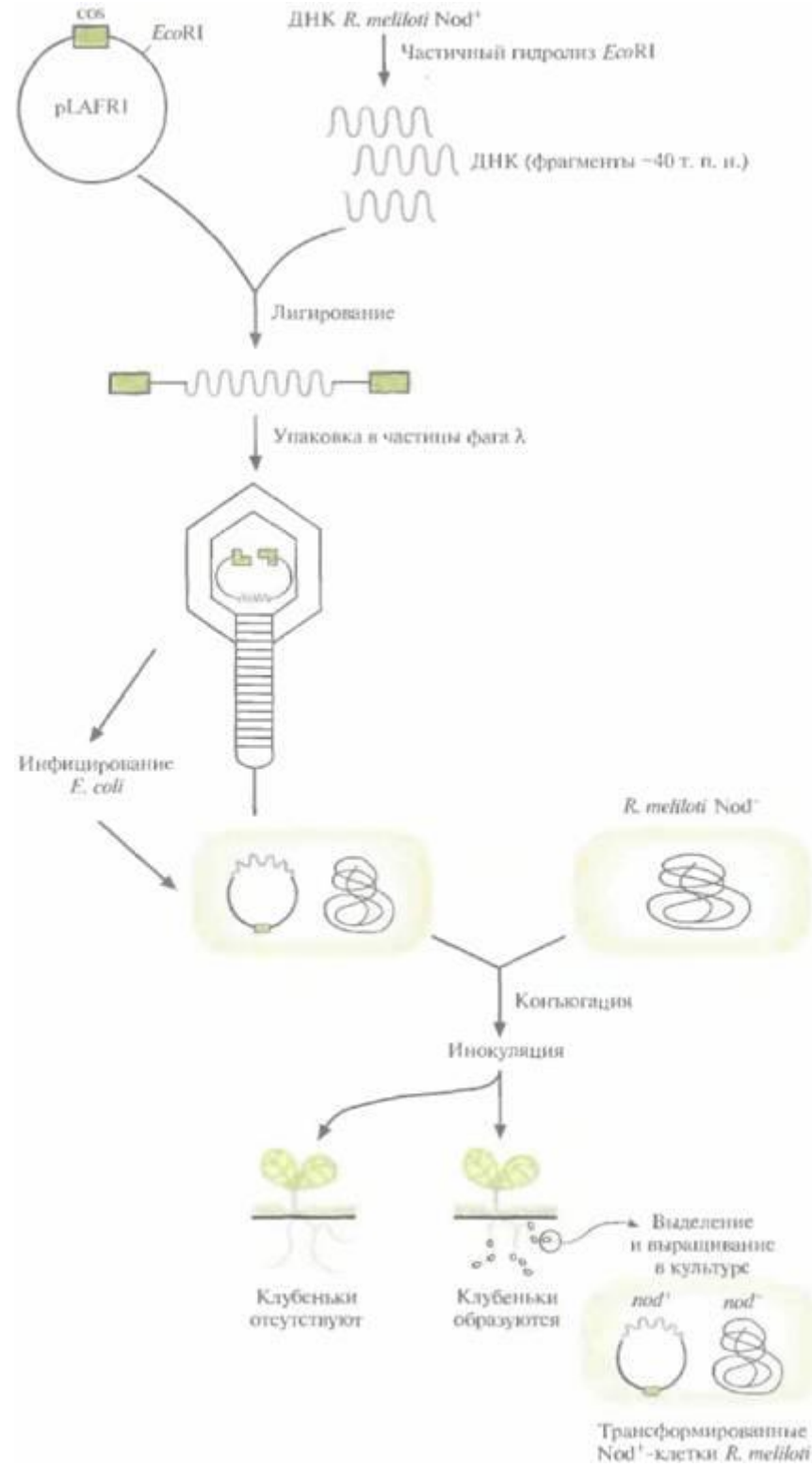
Были проведены исследования, направленные на определение генетической основы «конкурентоспособности» природных штаммов, с тем чтобы затем попытаться ввести соответствующие гены в штаммы-инокулянты.

Манипуляции с генами образования клубеньков

Для идентификации генов образования клубеньков (*nod*-генов)вновь использовали генетическую комплементацию. Не способный образовывать клубеньки (*Nod<sup>-</sup>*) мутантный штамм *R. meliloti* трансформировали банком клонов хромосомной ДНК *R. meliloti* дикого типа и выделяли колонии, приобретшие способность образовывать клубеньки на корнях люцерны (рис. 14.6). Стратегия заключалась в следующем.

- 1, С помощью частичного гидролиза ДНК *R. meliloti* рестриктазой *EcoRI* и встраивания фрагментов длиной до 40 т. п. н. в уникальный *EcoRI*-сайт космиды pLAFR1 с широким кругом хозяев был создан банк клонов хромосомной ДНК *R. meliloti* дикого типа (*Nod<sup>+</sup>*).
- 2, Рекомбинантные плазмиды упаковали в частицы фага λ, ввели в *E. coli*, а затем перенесли в клетки *Nod<sup>-</sup>*-штамма *R. meliloti* при помощи конъюгации. Вектор содержал ген устойчивости к тетрациклину, который можно было использовать как селективный маркер и в случае *E. coli*, и в случае *R. meliloti*.
- 3, После конъюгации суспензии, содержащие от 200 до 300 трансформированных клеток *R. meliloti*, проверяли на способность инициировать образование клубеньков у стерильных растений люцерны. Ожидалось, что этой способностью будут обладать только транс-

Рис. 14.6. Идентификация генов образования клубеньков *R. meliloti*. ДНК *R. meliloti* дикого типа встраивают в космиду pLAFRI с широким кругом хозяев, упаковывают в частицы фага λ и вводят в *E. coli*. Банк клонов переносят из *E. coli* в Nod<sup>-</sup>-штамм *R. meliloti* при помощи конъюгации. Растения люцерны инокулируют трансформированными *R. meliloti* Nod<sup>-</sup>: растения, образующие корневые клубеньки, инфицированы *A. meliloti* Nod<sup>+</sup>, клетки которых, по-видимому, несут комплементирующий ген образования клубеньков в составе космидного вектора. Из корневых клубеньков выделяют трансформированные Nod<sup>+</sup>-клетки *R. meliloti*.



форманты, которые несут и экспрессируют ген, комплементирующий дефект образования клубеньков в клетках *R. meliloti*.

4. Из клубеньков выделили бактерии, вызывающие образование клубеньков, а из бактерий -вектор, несущий комплементирующий ген. Содержащую этот ген большую вставку переклонировал и и провели дальнейший анализ,

5. Идентифицированный ген образования клубеньков использовали в качестве зонда для обнаружения фланкирующих его участков хромосомной ДНК *R. meliloti* в геномной библиотеке.

В результате этих весьма трудоемких экспериментов удалось охарактеризовать весь набор генов образования клубеньков *R. meliloti*. Детальные биохимические и генетические исследования показали, что образование клубеньков и его регуляция — это сложные процессы, в которых задействованы продукты большого количества генов (примерно 20; табл. 14.6). Одни

из этих генов высококонсервативны (одинаковы у всех микроорганизмов, образующих клубеньки), другие видоспецифичны. Их можно сгруппировать в три отдельных класса: консервативные, видоспецифичные и регуляторный ген *nodD*. Так, *nodABC-гены* одинаковы у всех видов *Rhizobium* и структурно взаимозаменяемы; у большинства видов они образуют один оперон.

Установлено, что процесс образования клубеньков включает несколько этапов. Сначала продукт конститутивно экспримирующегося гена *nodD* связывается с молекулой флавоноида, секретируемого клетками корней растения-хозяина. Флавоноиды — это растительные фенольные соединения, структурную основу которых составляют два ароматических кольца, соединенных друг с другом трехуглеродным мостиком. Они выполняют в растениях разные функции, в частности отвечают за их пигментацию и участвуют в защите от грибов и насекомых. Связывание флавоноидов с белком NodD -

Таблица 14.6. Некоторые белки, кодируемые генами образования клубеньков *Rhizobium*, и их возможные функции

| Белок | Характеристика <sup>1)</sup>  |
|-------|---|
| NodA  | Консервативен, локализован в плазматической мембране, вместе с NodB стимулирует клеточное деление |
| NodB  | Консервативен, локализован в плазматической мембране, вместе с NodA стимулирует клеточное деление |
| NodC  | Консервативен, локализован в наружной мембране, хитинсинтаза                                      |
| NodD  | Консервативен, активатор транскрипции, синтез конститутивен                                       |
| Nod E | Локализован в плазматической мембране, β-кетоацилсинтаза  |
| NodF  | Локализован в цитоплазме, ацилпереносящий белок   |
| NodG  | Видоспецифичен, дегидрогеназа   |
| NodH  | Видоспецифичен, сульфотрансфераза   |
| NodIJ | Консервативен, локализован в плазматической мембране, участвует в секреции полисахарида оболочки  |
| Nod K | Влияет на инициацию образования клубеньков некоторыми штаммами <i>Bradyrhizobium</i>              |
| NodL  | Локализован в плазматической мембране, ацетилтрансфераза  |
| NodM  | D- глюкозаминсинтаза  |
| NodN  | Функция неизвестна  |
| NodO  | Секретируется, гемолизин  |
| Mod P | Комплекс с NodQ, АТР-сульфурилаза   |
| NodQ  | Комплекс с NodP, АТР-сульфурилаза   |
| NodS  | Метилтрансфераза  |
| NodT  | Локализован в наружной мембране, участвует в секреции   |
| NodU  | Функция неизвестна  |
| NodX  | Видоспецифичен  |

<sup>1)</sup> Если биохимические или генетические данные о функции белка отсутствуют, то ему приписывают такие же функции, как у белка с гомологичной аминокислотной последовательностью. Разные штаммы *Rhizobium* содержат разные наборы этих белков. Слово «консервативен» означает, что белок выполняет одинаковую функцию у всех видов *Rhizobium*.

## Идентификация генов образования клубеньков *Rhizobium meliloti* путем прямой комплементации Nod<sup>+</sup>-мутантов

S. R. Long, W. J. Buikenia, F. M. Ausubel *Nature* 298: 485-488, 1982

Идентификация гена в Когда Лонг и др. решили мерно 23 т. п. н.), стабильно отсутствие гетерологичного зонда идентифицировать гены поддерживающиеся в или какой-либо информации об образования клубеньков из некоторых грамотицательных этом гене — задача не из легких. *Rhizobium meliloti*, ни одного бактериях. Благодаря большому В таких случаях часто приходится подобного гена охарактеризовано размеру вставки увеличивалась разрабатывать принципиально не было. Практически ничего не вероятность того, что другие гены, новую схему отбора. В ее основе было известно о том, каким участвующие в образовании может лежать иммунологическая образом множество генов клубеньков, будут находиться в идентификация искомого белка, участвуют в этом процессе или одном фрагменте с определение его активности, ДНК- какие белки они кодируют. комплементирующей гибридизация с Прежде чем идентифицировать последовательностью ДНК. После олигонуклеотидным зондом, гены образования клубеньков, эти переноса косм ид при помощи нуклеотидная последовательность ученые выделили и конъюгации в *R. meliloti* которого была определена исходя охарактеризовали несколько трансформированные бактерии из данных о частично мутантов *R. meliloti*, не способных проверяли на способность секвенированной аминокислотной образовывать клубеньки. Однако вызывать образование клубеньков последовательности очищенного эти эксперименты не дали у люцерны. Проведенные ранее искомого белка, или исследователям ключ к эксперименты показали, что даже комплементация мутантов. Очень объяснению функций указанных одна бактерия, способная часто после идентификации генов. Поэтому они попытались образовывать клубеньки, на фоне гена, кодирующего отобрать гены образования 10<sup>4</sup> «дефектных» бактерий может определенную функцию, можно клубеньков, способные вызвать образование клубеньков у выделить аналогичные гены из комплементировать полученных растений люцерны. Бактерии с других организмов, используя ими мутантов *R. meliloti*. Работа космиями, содержащими первый выделенный ген в осложнялась еще и тем, что в то комплементирующую качестве гетерологичного зонда время банки клонов почти всегда последовательность, выделяли для ДНК-гибридизации. создавали и поддерживали в *E. coli* непосредственно из клубеньков. Результативность данного подхода *colt*. Для создания банка клонов *R. meliloti* Так были впервые зависит от близости нуклеотидных *meliloti* и его дальнейшего идентифицированы гены последовательностей зонда и переноса в мутантные штаммы *R. meliloti* образования клубеньков и искомого гена. Эта стратегия *meliloti*, не способные разработана четкая и эффективная оправдывает себя в случае образовывать клубеньки, схема отбора. Сконструированный консервативных в эволюционном исследователи для начала создали Лонгом и др. космидный вектор с плане генов, например генов, космидный вектор с широким широким кругом хозяев в кодирующих белки, которые кругом хозяев, в который можно дальнейшем неоднократно участвуют в фиксации азота, но в было встраивать длинные использовался в других работах. большинстве случаев она фрагменты ДНК (при- малоприспособна.

один из ключевых моментов идентификации растения-хозяина, поскольку каждый вид *Rhizobium* узнает ограниченное число флавоноидных структур, а каждая разновидность растений синтезирует свой специфический набор этих молекул. Одни штаммы, например *R. leguminosarum* biovar (bv.) *trifolii*, имеют очень узкий круг хозяев, поскольку узнают только несколько видов флавоноидов, а у других штаммов, например у NGR234 *Rhizobium* sp., круг хозяев очень широк.

Присоединение молекул флавоноида активирует белковый продукт NodD, по-видимому, вызывая его конформационное изменение. Далее комплекс флавоноид—NodD связывается с промоторным участком генов образования клубеньков, называемым *nod*-блоком. Этот участок расположен перед всеми генами образования клубеньков, кроме гена *nodD*, и запускает их транскрипцию.

Гены *nodABC* кодируют белки, которые вызывают набухание и скручивание корневых во-



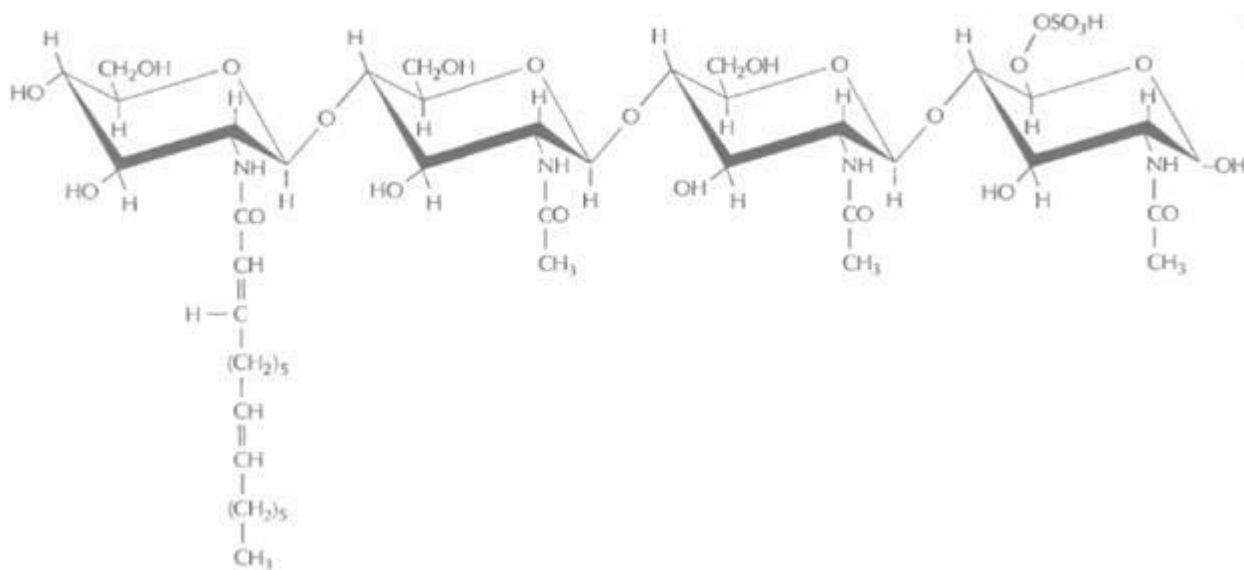


Рис. 14.7. Предполагаемая структура олигосахаридного фактора NodRm-1. Это соединение обуславливает специфический ответ растения-хозяина, в том числе скручивание и деформацию корня.

лосков, что считается первым шагом инфицирования корня растения бактерией. Вместе растение и бактерии синтезируют некий олигосахаридный фактор, который модифицируется генным продуктом NodH, а возможно, и продуктами NodQ и NodP. Этот фактор, обозначаемый NodRm-1 (рис. 14.7), обуславливает специфический ответ растения-хозяина, в том числе скручивание и деформацию корня.

В зависимости от штамма *Rhizobium* или *Bradyrhizobium*, в конце концов синтезируется примерно 20 дополнительных продуктов *nod*-генов. Вместе с некоторыми белками, кодируемыми растениями, они участвуют в формировании клубенька.

Чтобы выяснить роль каждого из идентифицированных *nod*-генов, необходимо провести дополнительные исследования; кроме того, не исключено, что со временем обнаружатся новые *nod*-гены. Например, секвенирование ДНК и компьютерный анализ показали, что у медленнорастущей формы *Bradyrhizobium* sp, область ДНК между *nodD*- и *nodABC*-генами содержит открытую рамку считывания, а у быстрорастущей формы этой последовательности нет. Открытую рамку считывания обозначили *nodK*. При инокуляции растений штаммом *Bradyrhizobium* sp. с мутантным *nodK*-геном (NodK) клубеньки на них начинают образовываться на 5 дней раньше, чем у растений, зараженных штаммом дикого типа; при этом число клубеньков удваивается, а урожайность растений увеличивается на 120%.

К настоящему времени не удалось разработать простых генетических подходов, которые позволяли бы использовать *nod*-гены для повышения конкурентоспособности инокулирующих штаммов *Rhizobium*. Впрочем, можно изменить видоспецифичность бактерий путем переноса *nodD*-гена из штамма *Rhizobium* с широкой специфичностью в один из штаммов с узкой специфичностью. Так или иначе, ясно, что образование клубеньков — весьма сложный процесс, и для дальнейшего увеличения конкурентоспособности штаммов *Rhizobium* потребуются всесторонние исследования с использованием методов генной инженерии.

## Биоконтроль патогенных микроорганизмов

Бактерии, стимулирующие рост растений, могут оказывать свое действие прямо или косвенно. Прямая стимуляция обычно состоит в поставке

растению какого-либо соединения, синтезируемого бактерией (это может быть, например, связанный азот), или растительного гормона. Кроме того, бактерии могут облегчать поглощение растением из окружающей среды некоторых веществ, например железа или фосфора. Косвенная стимуляция заключается в том, что бактерии уменьшают или предотвращают вредное влияние одного или нескольких фитопатогенных организмов — грибов или бактерий. Фитопатогены могут уменьшать урожайность сельскохозяйственных культур на 25—100%, что наносит огромный ущерб. Обычно для борьбы с ними используют химикаты. К сожалению, в большинстве случаев симптомы заболеваний у растений не проявляются достаточно долго, до тех пор, пока изменения в окружающей среде не вызовут пролиферацию бактерий и не приведут к быстрому развитию болезни и к уничтожению всего урожая. Контроль таких обширных эпидемий трудноосуществим и требует больших денежных затрат.

Многие химикаты, используемые для борьбы с фитопатогенами, представляют опасность для животных и человека; они накапливаются в природных экосистемах и долго сохраняются в них. Поэтому было бы целесообразно заменить химические способы подавления патогенных микроорганизмов биологическими, более «благоприятными» для среды. Один из биологических подходов к контролю фитопатогенов заключается в создании трансгенных растений, устойчивых к одному или нескольким патогенным микроорганизмам (этот подход обсуждается в гл. 18). Были также предприняты попытки использовать в качестве инструмента биоконтроля бактерии, стимулирующие рост растений. Такие бактерии синтезируют соединения, которые можно использовать для уменьшения ущерба, наносимого растениям фитопатогенами. В их числе — сидерофоры и антибиотики, а также различные ферменты. Впрочем, несмотря на всю перспективность этого подхода, почти все исследования пока проводились в лабораторных условиях, ростовых камерах или в оранжереях. Окончательный же вывод о пользе той или иной стратегии, основанной на использовании какого-то конкретного механизма, можно будет сделать только после полевых испытаний.

### *Сидерофоры*

Железо — один из наиболее распространенных на Земле элементов, абсолютно необходимых живым организмам. Однако в той форме, в какой железо присутствует в почве, оно не может прямо использоваться микроорганизмами. Дело в том, что его преобладающей природной формой являются трехвалентные ионы. Их растворимость очень мала — при pH 7,4 она равна примерно  $10^{-18}$  М, и этого количества абсолютно недостаточно для поддержания роста микроорганизмов. Чтобы выжить в таких условиях, почвенные микроорганизмы синтезируют и секретируют небольшие низкомолекулярные железосвязывающие соединения мол. массой примерно 400—1000 Да, известные под названием сидеро-форов (рис. 14.8). Они эффективно связывают Fe(III) и транспортируют его к клеткам микроорганизмов, где оно связывается с клеточными рецепторами и попадает внутрь клеток. Здесь железо высвобождается и может использоваться микроорганизмом.

Бактерии, стимулирующие рост растений, подавляют пролиферацию фитопатогенных грибов, синтезируя сидерофоры, которые связывают большую часть Fe(III), находящегося в слое почвы, непосредственно прилегающем к корню растения (в ризосфере). Фитопатогенные грибы тоже синтезируют сидерофоры, но они обычно обладают более низким сродством к железу, чем сидерофоры, синтезируемые стимулирующими рост растений бактериями. Это позволяет последним одерживать верх в конкурентной борьбе с фитопатогенными грибами за имеющееся железо.

В отличие от фитопатогенных микроорганизмов, растения, как правило, не страдают от локального истощения железа в почве в результате поглощения его бактериями, стимулирующими рост растений. Большинство растений могут расти при значительно меньших концентрациях железа, чем микроорганизмы. Кроме того, есть данные, что железо, связанное бактериальными сидерофорами, может ассимилироваться растениями и использоваться ими для своих нужд.

Поскольку связывание железа бактериальными сидерофорами может одновременно приводить к подавлению пролиферации самых

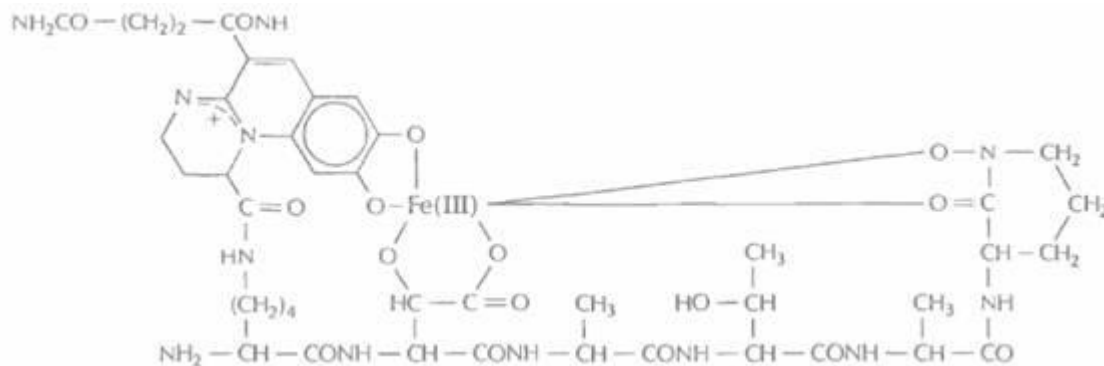


Рис. 14.8. Структура сидерофора псевдобактина, продуцируемого штаммом *Pseudomonas* B10. С одной молекулой сидерофора связан один ион Fe(III).

разных фитопатогенных микроорганизмов, исследуется возможность использования их для создания более эффективных систем биоконтроля.

Многие стимулирующие рост растений флуоресцирующие псевдомонады секретируют сидерофор, представляющий собой линейный гексапептид, который состоит из чередующихся L-и D-аминокислот и связанного флуоресцентного хромофора (рис. 14.8). Один из таких сидерофоров, так называемый псевдобактин, обладает сродством к Fe(III)  $\cong 10^{25}$  л · моль<sup>-1</sup>. Сходные сидерофоры синтезируют все флуоресцирующие псевдомонады.

Предприняты также первые попытки исследовать синтез псевдобактина у стимулирующей рост растений бактерии *Pseudomonas putida* WCS358. С помощью мутагенеза были получены 28 мутантов этого микроорганизма, не способных синтезировать сидерофор. Их отбор осуществляли по: 1) отсутствию флуоресценции в УФ-свете; 2) неспособности к росту в присутствии дипиридила — вещества, связывающего большую часть железа в культуральной среде. При очень малых концентрациях ионов железа растут только те клетки, которые синтезируют сидерофоры. Был создан банк клонов ДНК *P. putida* WCS358 с помощью космидного вектора pLAFRI с широким кругом хозяев и путем конъюгации осуществлена трансформация всех 28 мутантных форм. Трансформанты были проверены на способность к флуоресценции в УФ-свете и/или способность к росту в присутствии дипиридила. Идентифицированы тринадцать

разных комплементирующих космидных клонов со средним размером вставки 26 т. п. н. Детальные исследования показали, что эти клоны соответствуют по крайней мере пяти отдельным кластерам генов.

Один из этих кластеров был исследован более детально. Его минимальная длина составила примерно 33,5 т. п. н., он содержал пять оперонов по крайней мере с семью отдельными генами. Таким образом, как и фиксация азота и образование клубеньков, биосинтез сидерофоров — это сложный процесс. Поскольку каждый сидерофор кодируется несколькими генами, получение рекомбинантных бактерий, способных синтезировать модифицированный сидерофор, — задача не из легких. К счастью, есть другие способы повысить эффективность использования бактерий, стимулирующих рост растений, в качестве инструмента биоконтроля. Например, можно расширить круг узнаваемых одним бактериальным штаммом комплексов железо—сидерофор, так чтобы один рекомбинантный штамм мог узнавать и использовать сидерофоры, синтезируемые другими почвенными микроорганизмами, повышая тем самым свою конкурентоспособность. Для этого были клонированы гены рецепторов комплекса железо—сидерофор одной из бактерий, стимулирующих рост растений, и введены в другие штаммы.

### Антибиотики

Один из наиболее эффективных механизмов, которые используют стимулирующие рост растений бактерии для подавления пролиферации

фитопатогенов, — синтез антибиотиков. Так, псевдомонады, использующиеся для биоконтроля, синтезируют такие антибиотики, как агроцин 84, агроцин 434, 2,4-диацетилфлороглюцинол, гербиколин, оомицин, феназины, пиолутеорин и пирролнитрин.

Способность бактерий, стимулирующих рост растений, подавлять пролиферацию фитопатогенов можно повысить, если ввести в эти бактерии гены, кодирующие биосинтез антибиотиков, которые обычно синтезируются другими бактериями. Это позволит расширить спектр фитопатогенов, рост которых способна подавлять одна бактерия. Более того, ограничивая размножение других почвенных микроорганизмов, секретирующие антибиотик бактерии, стимулирующие рост растений, облегчают свою собственную пролиферацию, поскольку уменьшается число конкурентов за ограниченные пищевые ресурсы, а с помощью методов генной инженерии со временем удастся увеличить выход бактериальных антибиотиков.

Синтез большинства противогрибковых метаболитов, продуцируемых псевдомонадами, по-видимому, контролируется белком, который действует как общий регулятор транскрипции; следовательно, уровень синтеза антибиотика можно повысить изменением общей регуляции. Например, в случае *Pseudomonas fluorescens* CHA0 его удалось повысить с помощью трансформации микроорганизма вектором, несущим ген «домашнего хозяйства» *rpoD*, который кодирует  $\sigma^{70}$ -субъединицу РНК-полимеразы. Рекомбинантный штамм лучше защищал корни растений огурца от повреждений, вызываемых грибом *Pythium ultimum* (табл. 14.7). В другом исследовании синтез антибиотика пиолутеорина тем же микроорганизмом стимулировали инактивацией генов *pqq*, участвующих в биосинтезе пирролхинолинхинона — кофактора различных гидрогеназ. Механизм такой стимуляции до конца не установлен; возможно, в результате мутации поток метаболитов от других реакций биосинтеза переключается на биосинтез пиолутеорина.

В настоящее время на рынке имеется только один рекомбинантный микроорганизм, использующийся для биоконтроля: *Agrobacterium radiobacter* K84. Этот штамм продается в Австра-

Таблица 14.7. Влияние дополнительных копий *rpoD*-гена *Pseudomonas fluorescens* CHA0 на способность этой бактерии защищать корни растений огурца от повреждений, вызываемых патогенным грибом *Pythium ultimum*<sup>1)</sup>

| Бактерия,<br>стимулирующая<br>рост растений                             | Средняя масса свежего корня, мг <sup>2)</sup> |                                    |
|---|---|------------------------------------|
|   | в отсутствие<br><i>P. ultimum</i>             | в присутствии<br><i>P. ultimum</i> |
| Отсутствует   | 382   | 44                                 |
| <i>P. fluorescens</i> CHA0  | 386   | 177                                |
| <i>P. fluorescens</i> CHA0,<br>содержащая вектор                        | 365   | 146                                |
| <i>P. fluorescens</i> CHA0,<br>содержащая вектор<br>с геном <i>rpoD</i> | 371   | 335                                |

<sup>1)</sup> Из работы Schneider et al., J. Bacteriol. 177: 5387–5392, 1995.  
<sup>2)</sup> В отсутствие *P. fluorescens* CHA0 наблюдается значительное замедление роста корней, обусловленное влиянием патогенного гриба *P. ultimum*. Когда плазмидный вектор, которым трансформировали *P. fluorescens* CHA0, содержал ген *rpoD*, защитный эффект бактерий был гораздо больше. Массу корней определяли после выращивания растений в определенных условиях в течение 2 нед.

лии начиная с 1989 г. как средство борьбы с корончатым галлом — болезнью, которую вызывает *Agrobacterium tumefaciens*. Заболеванию подвержены миндаль и косточковые плодовые деревья, такие как персики. *A. radiobacter* синтезирует антибиотик агроцин 84, токсичный для *A. tumefaciens*. Однако при случайном попадании в него плазмиды от *A. radiobacter*, содержащей гены биосинтеза агроцина 84, могут возникнуть агроцинустойчивые штаммы *A. tumefaciens*. Чтобы избежать этого, из плазмиды pAgK84, несущей гены биосинтеза агроцина 84, был удален участок, ответственный за перенос плазмиды (рис. 14.9). В результате штамм *A. radiobacter* больше не мог передавать рекомбинантную агроциновую плазмиду патогенным агробактериям, но сохранял способность к биоконтролю.

Ферменты

Некоторые бактерии, стимулирующие рост растений, синтезируют такие ферменты, как хитиназа, р-1,3-глюканаза, протеаза и липаза, которые разрушают клеточную стенку грибов. В одном из экспериментов удалось снизить частоту возникновения болезней, вызываемых фитопатогенными грибами *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* и *Pythium ultimum*, с помощью штамма *Pseudomonas cepacia*, синтезирующего

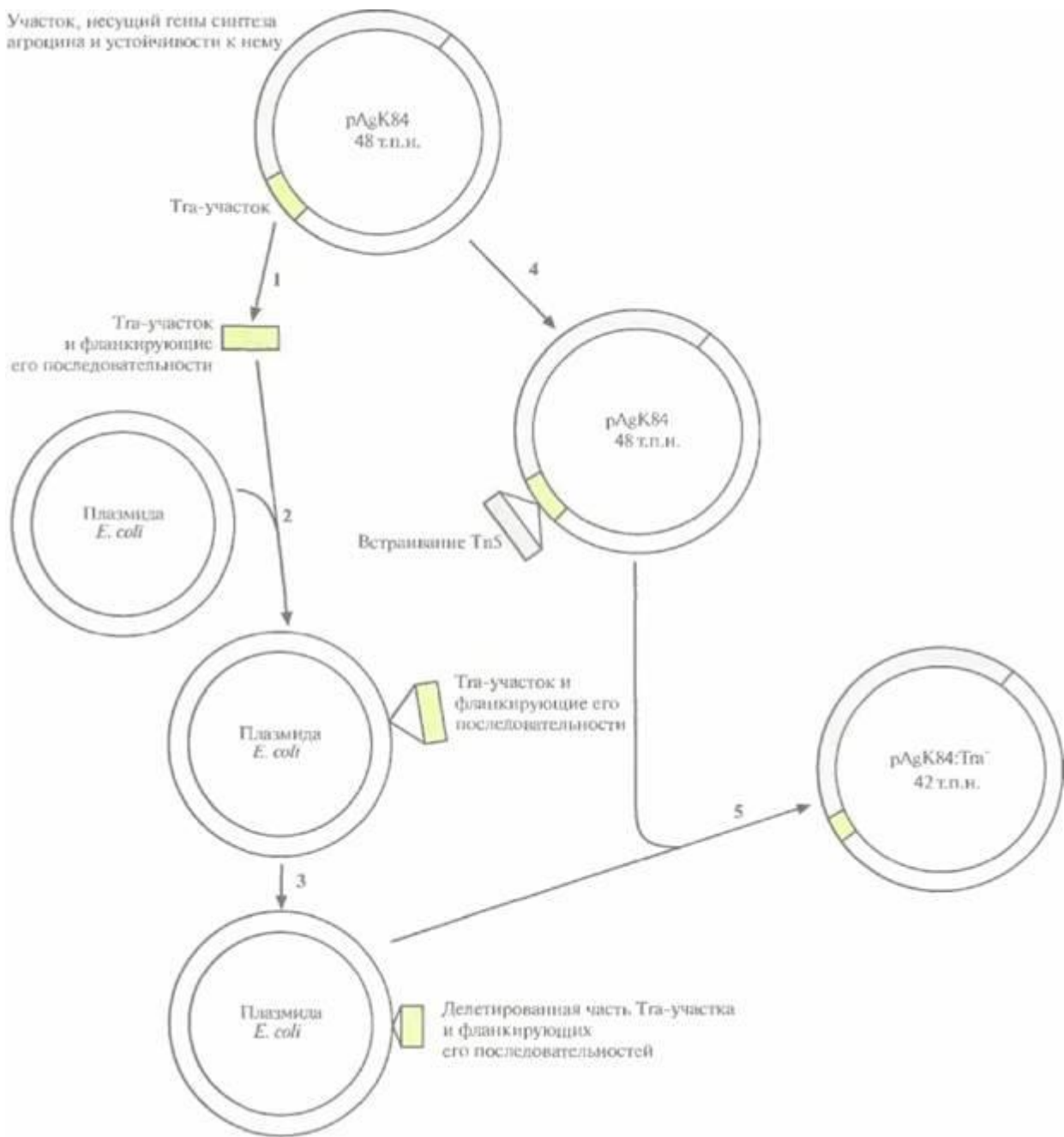


Рис. 14.9. Конструирование неспособной к переносу (Tet<sup>r</sup>) модификации плазмиды рAgK84 *A. radiobacter*, кодирующей гены биосинтеза агроцина 84 и гены устойчивости к нему. Используя рестрикционную карту рAgK84, из плазмиды вырезали (1) фрагмент, который содержал участок Tга, ответственный за перенос, вместе с фланкирующими его последовательностями, и встроили его в плазмиду *E. coli* (2). С помощью рестриктазной обработки из клонированного фрагмента удалили примерно 80% Tга-участка и часть фланкирующих его последовательностей (в сумме примерно 6 т.п.н.) (3). Осуществили гомологичную рекомбинацию между плазмидой *E. coli*, содержащей «урезанный» Tга-участок, и плазмидой рAgK84, которая содержала встроенный в Tга-участок транспозон Tn5 с геном устойчивости к канамицину (4). Получили несколько производных плазмиды рAgK84 с частично удаленным Tга-участком (5), Tet<sup>r</sup>-плазмиды рAgK84 больше не могла передаваться другой агробактерии в ходе конъюгации, но все еще была способна детерминировать синтез агроцина 84 и обеспечивать устойчивость к нему. Рисунок выполнен без соблюдения масштаба.



фермент  $\beta$ -1,3-глюканазу, который разрушал грибной мицелий. В ходе других исследований было показано, что противогрибковая активность трех штаммов *Enterobacter agglomerans*, стимулирующих рост растений, обусловлена наличием у них комплекса из четырех разных полипептидов, которые, действуя совместно, расщепляют хитин клеточной стенки грибов. Эти бактерии хорошо защищали растения хлопчатника от заражения *Rhizoctonia solani*. В то же время Tn5-мутанты *E. agglomerans*, не продуцирующие активной хитиназы, не были способны защитить растения от патогенных грибов.

Многие бактериальные ферменты, разрушающие клеточную стенку грибов, в том числе хи-тиназа и  $\beta$ -глюканаза, кодируются одним геном. Было бы разумно выделить эти гены и ввести их бактериям, стимулирующим рост растений, с тем чтобы получить штаммы, синтезирующие, например, и антибиотики, и ферменты, разрушающие клеточную стенку грибов. Были проведены эксперименты, в которых ген хитиназы, выделенный из бактерии *Serratia marcescens*, был перенесен в клетки *Trichoderma harzianum* и *R. meliloti*. Оба трансформированных микроорганизма синтезировали хитиназу и обладали повышенной противогрибковой активностью. При введении гена хитиназы *S. marcescens* в штамм *P. fluorescens*, стимулирующий рост растений, был получен трансформант, стабильно секретирующий хитиназу и эффективно подавляющий размножение фитопатогенного гриба *Rhizoctonia solani*.

### **Образование кристаллов льда и антифризные белки**

Некоторые патогенные поражающие листья бактерии типа *Pseudomonas syringae* синтезируют при низких температурах специфические белки, служащие центрами образования кристаллов льда на поверхности листа при температурах ниже нуля. По мере своего роста кристаллы прокалывают растительные клетки и необратимо повреждают растение, а бактерии получают в свое распоряжение питательные вещества, высвободившиеся из разрушенных растительных клеток. Если белки — центры кристаллизации на поверхности листа — отсутствуют, то непродолжительные ночные заморозки могут и не принести вреда растению, поскольку образование кристаллов льда в цитоплазме растительной клетки обычно начинается при температуре на несколько градусов ниже точки замерзания (т. е. происходит ее переохлаждение). Чтобы предотвратить кристаллизацию на листьях таких культур, как земляника, можно еще до заморозков распылить над растениями мутантные бактерии *P. syringae*, не способные синтезировать белки — центры кристаллизации. Такие мутантные формы могут быть созданы с помощью технологии рекомбинантных ДНК или обычного мутагенеза с последующим отбором, и они при достаточной концентрации вытеснят бактерии дикого типа.

Одним из важных условий эффективности биоконтроля патогенных микроорганизмов с помощью бактерий, стимулирующих рост растений, является способность этих бактерий к распространению в естественных условиях. В Канаде, скандинавских странах и на севере США они должны сохранять жизнеспособность в условиях долгих холодных зим, а весной размножаться при относительно низких температурах почвы (~5—10 °C). Поскольку микроорганизмы используют разные адаптивные стратегии выживания в неблагоприятных условиях, можно попытаться сконструировать с помощью генной инженерии рекомбинантные бактерии, оптимально приспособленные к низким температурам. Недавно было показано, что некоторые почвенные бактерии (а среди них встречаются и такие, которые стимулируют рост растений) могут размножаться при 5 °C и секретировать в окружающую среду антифризные белки при низких температурах. Такие белки регулируют образование кристаллов льда внутри бактериальной клетки. Хотя в их присутствии кристаллы все же формируются, они не достигают больших размеров и не разрушают клетки. Как только будут идентифицированы гены бактериальных антифризных белков, их можно будет перенести в клетки бактерий, стимулирующих рост растений, с тем чтобы получить трансформированные бактерии, устойчивые к низким температурам. Пока нет никаких данных о наличии связи между антифризной активностью бактерий и механизмом, обеспечивающим их выживание при низких температурах. Очень ин-



тересно проверить, является ли синтез антифризного белка частью адаптивной стратегии, используемой некоторыми бактериями для обеспечения устойчивости к холоду.

## Стимуляция роста растений свободноживущими бактериями

Бактерии, стимулирующие рост растений, оказывают свое действие несколькими способами: 1) фиксируют атмосферный азот, который затем используется растением; 2) синтезируют сидерофоры, которые солюбилизируют и связывают железо из почвы и обеспечивают им растительные клетки; 3) синтезируют фитогормоны, ускоряющие разные стадии роста; 4) солюбилизируют минеральные вещества (такие, как фосфор), которые затем используются растением; 5) синтезируют ферменты, способные регулировать уровень растительных гормонов. Каждая бактерия, стимулирующая рост растений, может использовать один или несколько из этих механизмов.

Фиксация азота вносит совсем небольшой вклад в тот положительный эффект, который дают бактерии, стимулирующие рост растений. Не все такие бактерии являются диазотрофами, а многие из них усваивают лишь ограниченное количество азота.

Для поглощения железа из почвы некоторые растения используют бактериальные комплексы железо—сидерофор; без этого их рост в большинстве случаев был бы сильно замедлен. Однако, несмотря на то что бактериальные сидерофоры несомненно вносят вклад в питание растений и, следовательно, в их рост, этот эффект, как правило, не очень велик.

Как именно бактерии, стимулирующие рост растений, способствуют поглощению растением таких минеральных веществ, как фосфор, до конца не установлено. Высказывалось предположение, что у растений, обработанных стимулирующими их рост бактериями, лучше развивается корневая система, а потому они более эффективно поглощают из почвы нужные им вещества, т. е. влияние бактерий носит опосредованный характер. Однако эксперименты с *Azospirillum* показали, что этот организм увеличивает поглощение именно минеральных веществ, возможно, синтезируя и секретируя органические кислоты, которые растворяют и связывают некоторые из этих веществ.

Очень часто различные эффекты бактерий, стимулирующих рост растений, объясняют способностью их к синтезу фитогормонов. Большинство исследований в этой области относится к выяснению роли одного из классов фитогормонов — ауксинов. Наиболее распространенный и лучше всего охарактеризованный ауксин это индолил-3-уксусная кислота (ИУК). Она стимулирует как быстрые ответы (например, удлинение растительных клеток), так и длительные (ускорение деления и дифференцировки). Растения тоже могут синтезировать ауксин. Часто это не позволяет определить, какой именно ауксин дает необходимый эффект: бактериальный или растительный. Тем не менее можно утверждать, что бактерии, стимулирующие рост растений, оказывают свое действие именно через изменение гормонального баланса в растениях.

Недавно обнаружилось, что многие бактерии, стимулирующие рост растений, синтезируют фермент, способный регулировать уровень растительного гормона этилена. Этот фермент, 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат(АЦК)—дезаминаза, гидролизует АЦК, который является непосредственным предшественником этилена при биосинтезе в растениях. Одно из объяснений роли этого фермента состоит в следующем. Бактерия связывается с оболочкой семени или с корнями растения, а затем поглощает и гидролизует АЦК, понижая концентрацию этилена в тканях растения. Во многих растениях этилен стимулирует прорастание семян и выводит их из состояния покоя; однако, если после прорастания уровень этилена оказывается слишком высоким, удлинение корней замедляется. Таким образом, бактериальная АЦК—дезаминаза предотвращает уменьшение скорости роста корней, и растение развивается быстрее. Кроме того, многие бактерии, стимулирующие рост растений, синтезируют ИУК, а избыток ИУК, не израсходованный на стимуляцию удлинения растительных клеток или ускорение деления, активирует АЦК-синтазу, что приводит к повышению концентрации этилена. Присутствие активной АЦК—дезаминазы препятствует накоп-

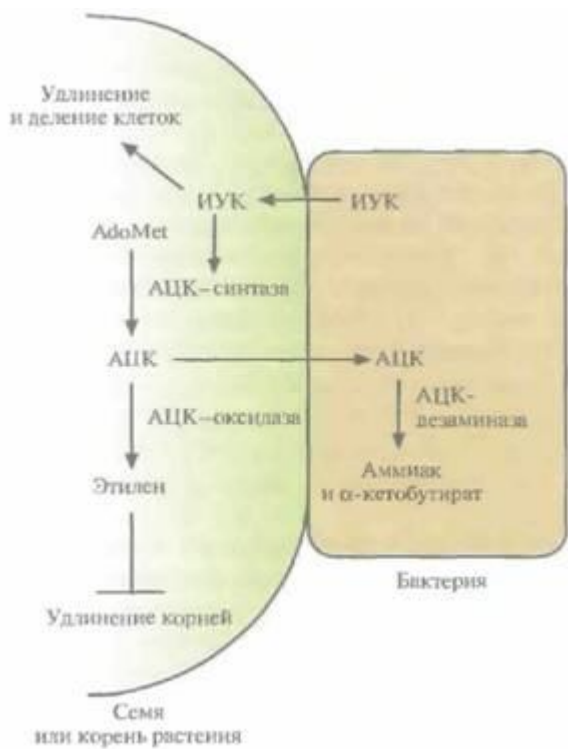


Рис. 14. 10. Схематическое изображение механизма, с помощью которого бактерии, стимулирующие рост растений, снижают концентрацию этилена в растительных тканях и тем самым предотвращают ингибирование роста корней. Бактериальная клетка, прикрепившаяся к поверхности семени или корня развивающегося растения, синтезирует и секретирует индолил-3-уксусную кислоту (ИУК), стимулирующую рост растения. Попадая в растение, бактериальная ИУК (вместе с ИУК, синтезируемой самим растением) стимулирует либо деление растительной клетки и ее удлинение, либо фермент АЦК-синтазу, который катализирует превращение S-аденозилметионина (AdoMet) в АЦК. Значительная часть АЦК вместе с другими малыми молекулами, обычно содержащимися в семенном или корневом экссудате, экскретируется корнями растения или семенами, поглощается бактерией и гидролизуется АЦК-деаминазой до аммиака и α-кетобутирата. В результате количество АЦК вне растения снижается. Чтобы сохранить равновесие между АЦК внутри и снаружи, растение секретирует его больше. Соответственно его концентрация, а следовательно, и концентрация этилена в растительных тканях уменьшается. (Из работы Glick et al., *J. Theor. Biol.*, in press.)

лению АЦК даже при высоких концентрациях ИУК, так что концентрация этилена не повышается до уровня, при котором замедляется рост растения (рис. 14.10). После детального изучения механизмов, с помощью которых бактерии, стимулирующие рост растений, оказывают свое действие, появится возможность создавать рекомбинатные микроорганизмы, способные стимулировать рост самых разных растений в различных условиях.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Многие почвенные микроорганизмы обладают способностью стимулировать рост растений. Были исследованы молекулярные механизмы, лежащие в основе этой стимуляции, с тем чтобы выяснить, можно ли использовать полезные почвенные бактерии вместо химических удобрений. Полезные бактерии могут оказывать свое влияние непосредственно, поставляя растениям фиксированный азот, хелатированное железо, фитогормоны или облегчая поглощение ими фосфора. Но влияние может быть и опосредованным, через подавление роста фитопатогенных микроорганизмов.

Из всех бактерий, стимулирующих рост растений и уже использующихся в сельском хозяйстве, наиболее детально изучены члены семейства *Rhizobium* и *Bradyrhizobium*. Эти микроорганизмы вступают в сложные облигатные симбиотические отношения со строго определенными растениями.

Молекулярные основы фиксации азота всесторонне исследовались на *K. pneumoniae*, которая может служить модельной системой для изучения симбиотических бактерий семейств *Rhizobium* и *Bradyrhizobium*. Детально охарактеризована нитрогеназа, азотфиксирующий фермент. Молекулярно-генетические исследования показали, что фиксация азота бактериями — это сложный процесс; в нем участвует семь координированное регулируемых оперонов, кодирующих в общей сложности 20 разных белков. Это делает пока невозможным создание с помощью методов генной инженерии растений, которые могли бы сами усваивать азот, и других азотфиксирующих бактерий.

Азотфиксирующий фермент нитрогеназа, используя энергию гидролиза АТФ, катализирует образование газообразного водорода (H<sub>2</sub>). Некоторые штаммы *Rhizobium* синтезируют фермент гидрогеназу. Он катализирует превращение *in vivo* H, в H<sup>+</sup>, что увеличивает эффек-

тивность фиксации азота. Если штамм содержит неактивную гидрогеназу, его способность фиксировать азот и стимулировать рост растения уменьшается. С учетом всего сказанного выше были предприняты попытки ввести клонированные гены гидрогеназ в штаммы *Rhizobium*, вступающие в симбиотические отношения с сельскохозяйственными культурами. По предварительным данным, проводя генноинженерные модификации генов гидрогеназ, можно создать штаммы *Rhizobium*, обладающие более высокой способностью стимулировать рост растений.

Вступая в симбиотические отношения с растениями, штаммы *Rhizobium* стимулируют образование на их корнях клубеньков, где и происходит размножение этих бактерий и фиксация азота. Разумно было предположить, что, если с помощью методов генной инженерии удастся создать бактерии, способствующие образованию большего количества клубеньков, конкурентоспособность инокулирующих штаммов *Rhizobium* в борьбе за место на корнях растений-симбионтов повысится по сравнению со штаммами дикого типа. К сожалению, обнаружилось, что в образовании клубеньков участвует множество разных генов, и эта сложность затрудняет проведение соответствующих молекулярно-генетических экспериментов.

Опосредованная стимуляция роста растений бактериями состоит в защите растений от повреждений, вызываемых фитопатогенными грибами или бактериями. Такая защита осуществляется при участии специфических соединений, синтезируемых бактериями, которые стимулируют рост растений: сидерофоров, антибиотиков, других малых молекул и различных ферментов. Некоторые другие продукты синтеза, в частности фитогормоны и АЦК—дезаминаза, влияют на рост растений непосредственно. Есть надежда, что когда-нибудь гены биосинтеза всех перечисленных соединений можно будет использовать для создания бактерий — более эффективных стимуляторов роста растений.

## ЛИТЕРАТУРА

- Adams M. W. W., L. E. Mortenson, J. S. Chen.** 1981. Hydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* **594**: 105-176.
- Albrecht S. L., R. J. Maier, F. J. Hanus, S. A. Russell, D. W. Emerich, H. J. Evans.** 1979. Hydrogenase in *Rhizobium japonicum* increases nitrogen fixation by nodulated soybeans. *Science* **203**: 1255-1257.
- Arp D. J.** 1990. H<sub>2</sub> cycling in N<sub>2</sub> fixation: past, present, and future outlook, p. 67—76. In P. M. Gresshoff, L. E. Roth, G. Stacey, W. E. Newton (ed.), *Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives*. Chapman & Hall, New York, N.Y.
- Bar-Ness E., Y. Chen, Y. Hadar, H. Marschner, V. Römhild.** 1991. Siderophores of *Pseudomonas putida* as an iron source for dicot and monocot plants, p. 271-281. In Y. Chen, Y. Hadar (ed.), *Iron Nutrition and Interactions in Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Cantrell M. A., R. A. Haugland, H. J. Evans.** 1983. Construction of a *Rhizobium japonicum* gene bank and use in isolation of a hydrogen uptake gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 181-185.
- Chet I., J. Inbar.** 1994. Biological control of fungal pathogens, *Appl Biochem. Biotechnol.* **48**: 37-43.
- Crosa J. H.** 1989. Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. *Microbiol. Rev.* **53**: 517-530.
- Evans H. J., A. R. Harker, H. Papen, S. A. Russell, F. J. Hanus, M. Zuber.** 1987. Physiology, biochemistry, and genetics of the uptake hydrogenase in *Rhizobia*. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**: 335-361.
- Fischer H.-M.** 1994. Genetic regulation of nitrogen fixation in *Rhizobia*. *Microbiol. Rev.* **58**: 352-386.
- Glick B. R.** 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* **41**: 109-117.
- Glick B. R., Y. Bashan.** 1997. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. *Biotechnol. Adv.* **15**: 353-378.
- Glick B. R., C. B. Jacobson, M. M. K. Schwar/c, J. J. Pasternak.** 1994. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase mutants of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 do not stimulate canola root elongation. *Can. J. Microbiol.* **40**: 911-915.
- Glick B. R., D. M. Penrose, J. Li.** A model for the lowering of plant ethylene concentrations by

plant growth-promoting bacteria. / *Theor. Bbl.*, in press.

**Glick B. R.,** Zeisler, A. M. Banaszuk, J. D. Friesen, W. G. Martin. 1981. The identification and partial characterization of a plasmid containing the gene for the membrane-associated hydrogenase from *E. coli*. *Gene* 15: 201-206.

**Gresshoff P. IVL,** L. E. Roth, G. Stacey, W. E. Newton (ed.). 1990. *Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives*. Chapman & Hall, New York, N.Y.

**Hennecke H.** 1990. Nitrogen fixation genes involved in the *Bradyrhizobium japonicum*-soybean symbiosis. *FEBS Lett.* 268: 422-426.

**Higashi S.** 1993. ( $\phi$ ) $\phi$ KA/доём/т- $\phi$ la $\phi$ 1 communications involved in infection and nodulation. *J. Plant Res.* 106:201-211.

**Jones D. A., M. H. Ryder, B. G. Clare, S. K. Farrand, A. Kerr.** 1988. Construction of a Tra — deletion mutant of a pAgK84 to safeguard the biological control of crown gall. *Mol. Gen. Genet.* 212:207-214.

**Kloepper J. W., R. Lifshitz, M. N. Schroth.** 1988. *Pseudomonas* inoculants to benefit plant production. *ISI Atlas Sei. Anim. Plant Set.* 60-64.

**Layva A., J. M. Palacios, T. Mozo, T. Ruiz-Argüeso.**

1987. Cloning and characterization of hydrogen uptake genes from *Rhizobium leguminosarum*. *J. Bacteriol.* 169: 4929-4934.

**Lerouge P., P. Roche, C. Faucher, F. Maillat, G. Truchet, J. C. Promé, J. Dénaric.** 1990. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a su 1  $\phi$  hated and acy la ted oligosaccharide signal. *Nature* 344: 781—784.

**Long S. R., V. J. Buikema, F. M. Ausubet.** 1982. Cloning of *Rhizobium meliloti* nodulation genes by direct complementation of Nod $\sim$  mutants. *Nature* 298: 485-488.

**Lynch J. M.** 1990. Beneficial interactions between microorganisms and roots. *Biotechnol. Adv.* 8: 335-346.

**Marugg J. D., M. van Spanje, W. P. M. Hoekstra, B. Schippers, P. J. Weisbeek.** 1985. Isolation and analysis of genes involved in siderophore biosynthesis in plant-growth-stimulating *Pseudomonas putida* WC358. *J. Bacteriol.* 164: 563-570.

**Marugg J. D., H. B. Nielander, A. J. G. Horrevoets, I. van Megen, I. van Genderen, P. J. Weisbeek.**

1988. Genetic organization and transcriptional

analysis of a major gene cluster involved in siderophore biosynthesis in *Pseudomonas putida* WCS358. *J. Bacteriol.* 170: 1812-1819.

**Morris R. O.** 1986. Genes specifying auxin and cytokinin biosynthesis in phytopathogens. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37: 509-538.

**Mylona P., K. Pawlowski, T. Bisseling.** 1995. Symbiotic nitrogen fixation. *Plant Cell* 7: 869-885.

**Nap J.-P. M. T. Bisseling.** 1990. Developmental biology of a plant-prokaryote symbiosis: the legume root nodule. *Science* 250: 948-954,

**Neilands J. B., S. A. Leong.** 1986. Siderophores in relation to plant growth and disease. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37: 187-208.

**O'Sullivan D. J., F. O'Gara.** 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol. Rev.* 56: 662-676.

**Paau A. S.** 1991. Improvement of *Rhizobium* inoculants by mutation, genetic engineering, and formulation. *Biotechnol. Adv.* 9: 173-184.

**Patten C. L., B. R. Click.** 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can. J. Microbiol.* 42: 207-220.

**Peters J. W., K. Fischer, D. R. Dean.** 1995. Nitrogenase structure and function: a biochemical-genetic perspective. *Annu. Rev. Microbiol.* 49: 335-366.

**Rossen L., E. (). Davis, A. W. B. Johnston.** 1987. Plant-induced expression of *Rhizobium* genes involved in host specificity and early stages of nodulation. *Trends BioL Sei.* 12:430-433.

**Schnider U., C. Keel, C. Blumer, J. Troxler, G. Defago, D. Haas.** 1995. Amplification of the housekeeping sigma factor in *Pseudomonas fluorescens* CHAO enhances antibiotic production and improves biocontrol abilities. *J. Bacteriol.* 177: 5387-5392.

**Spaink H. P., C. A. Wijfelfran, E. Pees, R. J. H. Okker, B. J. J. Lugtenberg.** 1987. *Rhizobium* nodulation gene *nodD* as a determinant of host specificity. *Nature* 328: 337-340.

**Sprent J. I.** 1986. Benefits of *Rhizobium* to agriculture. *Trends Biotechnol.* 4: 124-129.

**Stacey G.** 1995. *Bradyrhizobium japonicum* nodulation genetics. *FEMS Microbiol. Lett.* 127: 1-9.

**Sun X., M. Griffith, J. J. Pasternak, B. R. Click.** 1995. Low temperature growth, freezing survival

and production of antifreeze protein by the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Can. J. Microbiol.* **41**: 776-784. **van Rhijn P., J. Vanderleyden.** 1995. The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol. Rev.* 59: 124—142.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Предположим, что у вас есть штамм *Rhizobium japonicum*, способный усваивать азот и вступающий в симбиотические отношения с растениями сои. Какой подход вы использовали бы для идентификации кластера генов, кодирующих образование клубеньков, при условии, что у вас нет зонда для гибридизации с *nod*-генами?
2. Что такое гидрогеназа? Как с ее помощью можно повысить урожайность люцерны?
3. Предложите стратегию идентификации всех генов *Azotobacter vinelandii*, участвующих в связывании азота, имея в виду, что у вас нет *nif*-генов других микроорганизмов, которые можно было бы использовать в качестве гибридизационных зондов.
4. Как, по вашему мнению, повлияет внесение мутаций в *nifA*- или *nifL*-гены на количество фиксируемого данным организмом азота?
5. Обсудите возможность создания рекомбинантных растений, способных фиксировать азот.
6. Предложите схему выделения генов гидрогеназы.
7. Что такое сидерофоры? Каким образом, модифицируя гены сидерофоров, можно повысить способность бактерий стимулировать рост растений?
8. Предложите схему идентификации генов биосинтеза сидерофоров.
9. В чем преимущество микробиологических удобрений перед химическими?
10. Как с помощью методов генной инженерии повысить эффективность *Agrobacterium radiobacter* как инструмента биоконтроля?
11. Какие ферменты, секретируемые стимулирующими рост растений бактериями, обуславливают их «биоконтролирующие» свойства? Каков механизм действия этих ферментов?



# ГЛАВА 15.

## Микробные инсектициды

Из всех классов животных класс насекомых — самый многочисленный: число описанных видов приближается к 1 млн. Насекомые могут наносить огромный ущерб урожаю сельскохозяйственных культур, а некоторые из них являются переносчиками болезней человека и животных. В 1940-х гг. было синтезировано множество химических инсектицидов, позволяющих контролировать численность популяций насекомых-вредителей. Самым известным из них был дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ). Это хлорорганическое соединение синтезировали в 1870-х гг., но в качестве инсектицида стали применять лишь в конце 1930-х гг. ДДТ оказался высокоэффективным средством борьбы со многими насекомыми-вредителями. Как и другие хлорорганические соединения, он оказывает парализующее действие на нервную систему и мышечные ткани насекомых. К настоящему времени синтезированы и широко применяются другие хлорорганические соединения, такие как дильдрин, альдрин, хлордан, линдан, токсофен.

Еще один класс химических инсектицидов — фосфорорганические соединения, включающие малатион, паратион и диазинон. Фосфорорганические инсектициды первого поколения были разработаны как боевые отравляющие вещества. Теперь их используют для контроля численности насекомых. Их действие основано на ингибировании ацетилхолинэстеразы, которая гидролизует нейромедиатор ацетилхолин. Инсектициды этого класса нарушают функционирование мотонейронов и нейронов мозга насекомого.

В США к началу 1960-х гг. химическими инсектицидами обрабатывалось около 50 млн. га сельскохозяйственных угодий. Примерно в это время было показано, что хлорорганические (в большей степени) и фосфорорганические (в меньшей степени) инсектициды оказывают вредное воздействие на человека, животных и экосистемы. Это воздействие может проявляться немедленно или спустя длительное время. Хлорорганические соединения (в частности, ДДТ) сохраняются в окружающей среде от 15 до 20 лет и накапливаются во все возрастающих концентрациях. Биоаккумуляция химических инсектицидов в жировых тканях многих организмов уже привела к пагубным последствиям. Так, в Северной Америке были практически истреблены многие виды птиц: сапсаны, ястребы-перепелятники, белоголовые орланы, бурые пеликаны, ушастые бакланы.

Со временем основные насекомые-вредители становились все более устойчивыми ко многим химическим инсектицидам, и это привело к тому, что к 1950-м гг. для контроля их численности пришлось использовать более высокие концентрации инсектицидов. Кроме того, было показано, что химические инсектициды действуют не избирательно, т. е. наряду с насекомыми-вредителями они уничтожают и полезных насекомых, а в некоторых случаях гораздо эффективнее уничтожают естественных врагов насекомых-вредителей, чем самих вредителей. Зачастую это приводило к весьма неожиданным результатам; обработка вызывала увеличение численности насекомых-вредителей.

С учетом этого все последние 20 лет проводились интенсивные поиски альтернативных способов контроля численности насекомых-вредителей. Прежде всего исследователи обратились к



природным инсектицидам, синтезируемым различными микроорганизмами и растениями. Дело в том, что эти соединения, как правило, высокоспецифичны и подвергаются быстрой биодegradации, поэтому устойчивость к ним вырабатывается медленно. К сожалению, они не очень эффективны, а их получение обходится дорого, что ограничивает возможность их широкого применения. Есть надежда, что все эти проблемы удастся решить с помощью технологий рекомбинантных ДНК. Теперь для увеличения эффективности микробиологических инсектицидов исследователи могут проводить манипуляции с генами, которые кодируют их биосинтез. В частности, речь может идти о генах инсектицидов, вырабатываемых бактерией *Bacillus thuringiensis* или бакуловирусами насекомых; эти инсектициды безопасны, специфичны и весьма эффективны.

Рынок пестицидов огромен: в настоящее время на их производство во всем мире ежегодно расходуется более 20 млрд. долларов, и эта цифра быстро растет. При этом на долю биопестицидов, главным образом инсектицидов *B. thuringiensis*, приходится всего 1% этой суммы, но по прогнозам дальнейший прогресс в этой области будет связан именно с биопестицидами.

**Токсин, синтезируемый *Bacillus thuringiensis***

*Механизм действия и использование*

Под «микробным инсектицидом» иногда понимается микроорганизм, либо синтезирующий какое-либо токсичное вещество, избирательно действующее на определенных насекомых, либо инфицирующий насекомое-мишень и приводящий к его гибели. Наиболее изученные, наиболее эффективные и наиболее часто используемые микробные инсектициды — бактерии *B. thuringiensis*. Они представлены множеством штаммов и подвидов (subsp.), и каждый из них синтезирует токсин, специфичный в отношении определенных насекомых (табл. 15.1). Например, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* токсичен для личинок чешуекрылых (в том числе моли и бабочек), для личинок толстоголовки, мермитид и гусениц листовертки-почкоеда елового. *B. thuringiensis* subsp. *ismelensis* уничтожает двукрылых: комаров и мошек. *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* (также известный как *son diego*) эффективен в отношении жесткокрылых, в том числе колорадского жука и хлопкового долгоносика. Описаны и другие штаммы *B. thuringiensis*, каждый из которых токсичен для определенных насекомых.

Инсектицид (белковый токсин) *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* и других штаммов находится в клетке в виде так называемого параспорального кристалла — структуры, которая образуется во время споруляции бактерий. Никакой особенной биологической функции эта структура не несет. На ее долю приходится от 20 до 30% сухой массы спорующей культуры и состоит она главным образом из белка (~95%) и некоторого количества углеводов (~5%). Кристалл — это на самом деле некий белковый агрегат, диссоциирующий на субъединицы в слабой щелочи. Субъединицы можно далее диссоциировать in vitro обработкой β-меркаптоэтанолом, кото-

Таблица 15.1. Некоторые свойства инсектицидных токсинов, синтезируемых разными штаммами *B. thuringiensis*<sup>1)</sup>

| Штамм <i>B. thuringiensis</i> или подвид | Класс  | Мол. масса протоксина, кДа | Насекомое-мишень       | Серотип |
|--|--------|----------------------------|------------------------|---------|
| <i>berliner</i>                          | CryI   | 130-140                    | Чешуекрылые            | 1       |
| <i>kurstaki</i> КТО, HD-1                | CryI   | 130-140                    | Чешуекрылые            | 3       |
| <i>entomocidus</i> 6.01                  | CryI   | 130-140                    | Чешуекрылые            | 6       |
| <i>aizawai</i> 7.29                      | CryI   | 130-140                    | Чешуекрылые            | 7       |
| <i>aizawai</i> IC 1                      | CryI   | 135                        | Чешуекрылые, двукрылые | 7       |
| <i>kurstaki</i> HD-I                     | CryII  | 71                         | Чешуекрылые, двукрылые | 3       |
| <i>tenebrionis</i> ( <i>san diego</i> )  | CryIII | 66-73                      | Жесткокрылые           | 8       |
| <i>morrisoni</i> PG 14                   | CryIV  | 125-145                    | Двукрылые              | 8       |
| <i>israelensis</i>                       | CryIV  | 68                         | Двукрылые              | 14      |

<sup>1)</sup> Из работы Lerechus el al., p. 37— 69, in Enlwistle et al., (ed.). *Bacillus thuringiensis, an Environmental Biopesticide: Theory und Practice*, 1993.



Рис. 15.1. Схематическое изображение параспорального кристалла *B. thuringiensis*, состоящего из белкового протоксина CryI. Каждая белковая субъединица имеет мол. массу 250 кДа и содержит два полипептида мол. массой 130 кДа каждый. Молекулярные массы определяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле; приведены округленные значения. Превращение протоксина (130 кДа) в активный токсин (68 кДа) происходит только в слабощелочных условиях (pH 7,5—8) в присутствии специфической протеиназы (протеиназы). Именно эти условия реализуются в кишечнике насекомого.

рый восстанавливает дисульфидные связи (рис. 15.1).

Все инсектицидные токсины, выделенные из множества штаммов *B. thuringiensis*, в соответствии с их токсичностью можно сгруппировать в четыре основных класса: CryI, CryII, CryIII и CryIV. Белки CryI токсичны для чешуекрылых, CryII - для чешуекрылых и двукрылых, CryIII - для жесткокрылых, CryIV — для двукрылых. Классы можно разделить далее на подклассы (A, B, C, ...) и подгруппы (a, b, c, ...) согласно нуклеотидным последовательностям генов соответствующих токсинов. Например, класс генов *cryI* включает шесть подклассов (от *cryIA* до *F*), а подкласс *cryIA* — три подгруппы [от *cryIA(a)* до (c)]. Кроме того, в соответствии с иммунологическими особенностями выделяют примерно 30 разных серотипов *B. thuringiensis* (табл. 15.1). Каждый серотип отличается от другого специфическим набором антигенных детерминант на поверхности клеток определенного штамма *B. thuringiensis*.

В параспоральном кристалле инсектицид обычно находится в неактивной форме; при солюбилизации кристалла белок высвобождается в форме протоксина, предшественника активного токсина. Протоксин класса токсинов CryI имеет мол. массу примерно 130 кДа (рис. 15.1). После заглатывания насекомым параспорального кристалла протоксин активируется в кишечнике в условиях щелочного pH (7,5—8,0) и под действием специфических пищеварительных протеиназ превращается в активный токсин с мол. массой примерно 68 кДа (рис. 15.1). В таком виде он встраивается в мембрану эпителиальных клеток кишечника насекомого и образует ионный канал, через который, как полагают, происходит утечка значительной части клеточного АТР (рис. 15.2). Примерно через 15 мин после формирования такого ионного канала клеточный метаболизм блокируется, насекомое перестает питаться, происходит обезвоживание

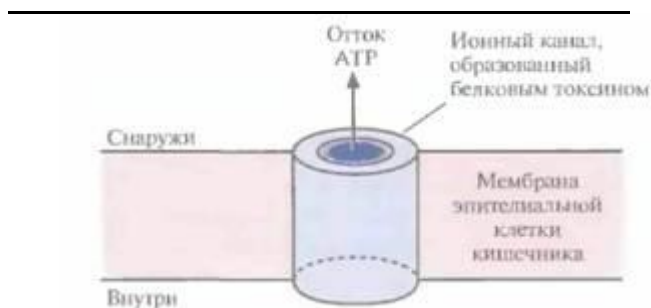


Рис. 15.2. Встраивание токсина *B. thuringiensis* в мембрану эпителиальной клетки кишечника насекомого и образование ионного канала.

организма и в конечном счете наступает смерть. Поскольку превращение протоксина в активный токсин происходит только в условиях щелочного pH и в присутствии определенных протеиназ, вероятность вредного воздействия токсинов на человека и сельскохозяйственных животных мала.

Способ действия токсинов *B. thuringiensis* налагает некоторые ограничения на область их применения. Чтобы убить насекомое, *B. thuringiensis* обязательно должен попасть в его кишечник, в противном случае никакого эффекта не будет. *B. thuringiensis* чаще всего распыляют, причем бактерии обычно смешивают с аттрактантами насекомых, чтобы повысить вероятность того, что насекомое-вредитель проглотит токсин. Однако для насекомых, обитающих в тканях растений или на корнях, токсин *B. thuringiensis* при такой обработке вряд ли будет представлять какую-либо опасность. С учетом всего этого были предприняты попытки разработать другие стратегии защиты растений от таких вредителей. Один из подходов состоит в создании трансгенных растений, несущих и экспрессирующих ген токсина *B. thuringiensis* и, следовательно, защищенных от насекомых-вредителей в течение всего периода вегетации.

Второе ограничение, налагаемое на применение токсина *B. thuringiensis*, связано с тем, что этот токсин действует на насекомое, находящееся только на определенной стадии развития. Именно в этот момент и должна проводиться обработка.

Штамм *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* был выделен в 1901 г., но интерес к нему как к ценному коммерческому продукту возник лишь в 1951 г., а за последние десять лет эта бактерия стала основным инструментом контроля численности гусениц листовертки-почкоеда елового в Канаде. В 1979 г. лишь над 1% лесов Канады, обрабатываемых инсектицидами с целью уничтожения этого насекомого (что соответствует примерно 2 млн. га), распыляли *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*; остальные площади обрабатывали химическими инсектицидами. К 1986 г. масштабы использования *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* возросли до 74%. В других странах *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* используют для борьбы с коконопрядом, непарным шелкопрядом, мертвимидами, совкой капустной и бражником. Основное препятствие на пути еще более широкого применения *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* состоит в его дороговизне: стоимость такого препарата в 1,5—3 раза выше, чем химических инсектицидов.

Для биоконтроля численности насекомых-вредителей распыляют  $1,5 \cdot 10^9$  —  $2,5 \cdot 10^9$  спор *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* на каждый квадратный метр обрабатываемого участка. Обработку проводят в тот период, когда число личинок в популяции насекомого-мишени максимально, поскольку параспоральные кристаллы чувствительны к солнечному свету и быстро разрушаются. В лабораторных условиях на свету за 24 ч разлагается более 60% остатков триптофана в белках па-распорального кристалла, а в окружающей среде в зависимости от освещенности кристаллы могут сохраняться от одних суток до одного месяца. Такая нестабильность инсектицидного протоксина подразумевает, что появление устойчивых к нему насекомых маловероятно.

Однако в том случае, когда *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* использовали в качестве инсектицида в условиях малой освещенности (например, в зернохранилищах), через несколько поколений появлялись устойчивые к токсину насекомые. Одна из причин такой передаваемой по наследству устойчивости заключается в изменении мембранного белка клеток кишечника, в норме выполняющего функцию рецептора токсина *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Возможно, она возникает вследствие того, что в этих условиях протоксин не разрушается и служит фактором отбора. Из всего этого следует, что появления насекомых, устойчивых к *B. thuringiensis*

subsp. *kurstaki*, проще всего избежать, если ограничить применение данного микроорганизма полевыми условиями. Впрочем, имея в виду масштабы использования *B. thuringiensis*, нельзя исключить, что может произойти его накопление в среде в количестве, достаточном для того, чтобы вступил в действие механизм отбора. А поскольку *B. thuringiensis* используется все более широко в разных регионах, вероятность появления популяций устойчивых насекомых будет увеличиваться.

### Идентификация генов токсинов

Для создания штаммов *B. thuringiensis*, более эффективно синтезирующих инсектициды и имеющих широкий круг хозяев, нужно было идентифицировать и охарактеризовать ген(ы) протоксина, и в первую очередь выяснить, где они локализованы: в плазмиде или в хромосомной ДНК. Чтобы проверить гипотезу плазмидной локализации, штамм *B. thuringiensis*, продуцирующий токсин, можно конъюгировать со штаммом, не обладающим инсектицидной активностью. Передача хромосомной ДНК во время конъюгации происходит крайне редко, и если «дефектный» штамм приобретает способность синтезировать инсектицид, значит, токсинные гены локализованы в плазмиде.

Для идентификации гена, кодирующего протоксин, используют обычную методику. *B. thuringiensis* выращивают в культуре и лизируют клетки. Выделяют суммарную клеточную ДНК и центрифугируют ее в градиенте плотности CsCl, чтобы разделить плазмидную и хромосомную ДНК. Если гены протоксинов входят в состав генома, создают банк клонов хромосомной ДНК. Если же они содержатся в плазмиде, то плазмидную ДНК фракционируют по размерам центрифугированием в градиенте плотности сахарозы. Это обогащает ту плазмидную фракцию, которая послужит в дальнейшем исходным материалом для идентификации генов протоксинов (рис. 15.3).

Ген протоксина *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* находится на одной из семи плазмид длиной 2,0; 7,4; 7,8; 8,2; 14,4; 45 и 71 т. п. н. Чтобы определить, в какой именно, проводили центрифугирование плазмидной ДНК в градиенте плотности сахарозы. Были выделены три фракции, в кото-



Рис. 15.3. Выделение и фракционирование плазмид, одна из которых несет ген протоксина.

рых концентрировались малые (2,0 т. п. н.), средние (7,4; 7,8; 8,2 и 14,4 т. п. н.) и большие (45 и 71 т. п. н.) плазмиды. Малые плазмиды из рассмотрения были исключены, поскольку они не могли кодировать белок мол. массой 130 кДа. Длина нуклеотидной последовательности, кодирующей белок такого размера, должна превышать 4,0 т. п. н. Средние и большие плазмиды подвергли частичному гидролизу рестрицирующей эндонуклеазой *Sau3AI* и фрагменты встроили в *Bam*HI-сайт плазмиды pBR322. Полученными рекомбинантными плазмидами трансформировали клетки *E. coli*, а затем провели иммунологический скрининг по следующей схеме:

1. Колонии клеток перенесли с агара на нитроцеллюлозный фильтр.
2. Перенесенные клетки частично лизировали органическими растворителями.
3. Все сайты неспецифического связывания первых и вторых антител на фильтре блокировали с помощью бычьего сывороточного альбумина (БСА).
4. Обработанные БСА фильтры инкубировали с кроличьими антителами к искомому инсектициду.
5. Отмывали фильтры от несвязавшихся антител и обрабатывали  $^{125}\text{I}$ -меченным А-белком *Staphylococcus aureus*, который взаимодействует с Fc-фрагментом связанных антител.
6. Области на фильтре, которые соответствуют колониям, активно синтезирующим инсектицид, выявляли с помощью радиоавтографии.

Используя идентифицированный ген протоксина в качестве гибридизационного зонда, установили, что соответствующая нуклеотидная последовательность содержится в плазмиде *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* длиной 71 т. п. н. Аналогичная схема клонирования и скрининга использовалась для идентификации генов токсинов, локализованных в плазмидах или (реже) в хромосомной ДНК других штаммов *B. thuringiensis*.

### *Генная инженерия генов токсинов B. thuringiensis*

После идентификации токсинового гена *B. thuringiensis* была определена первичная структура кодируемого им белка. Сравнение аминокислотных последовательностей разных белковых токсинов показало, что белки некоторых штаммов имеют одинаковый домен, ответственный за токсичность. Кроме того, был субклонирован сегмент полной кодирующей последовательности, с которого синтезировался укороченный белок, в полной мере сохранивший свою токсичность. Таким образом, при последующих генноинженерных манипуляциях могут использоваться интактный ген токсина, его фрагмент или химически синтезированный олигонуклеотид.

В естественных условиях большинство протоксинов *B. thuringiensis* синтезируются только во время споруляции, т. е. параспоральный кристалл образуется только на определенной стадии развития микроорганизма. Если бы экспрессия гена токсина происходила во время всего жизненного цикла, можно было бы существенно увеличить количество получаемого токсина и уменьшить время его синтеза. Кроме того, это позволило бы сделать синтез токсина *непрерывным* процессом и тем самым значительно удешевить продукт, поскольку для непрерывной ферментации используют небольшие, а потому менее дорогие биореакторы и оборудование, чем для периодической (более подробно см. об этом в гл. 16).

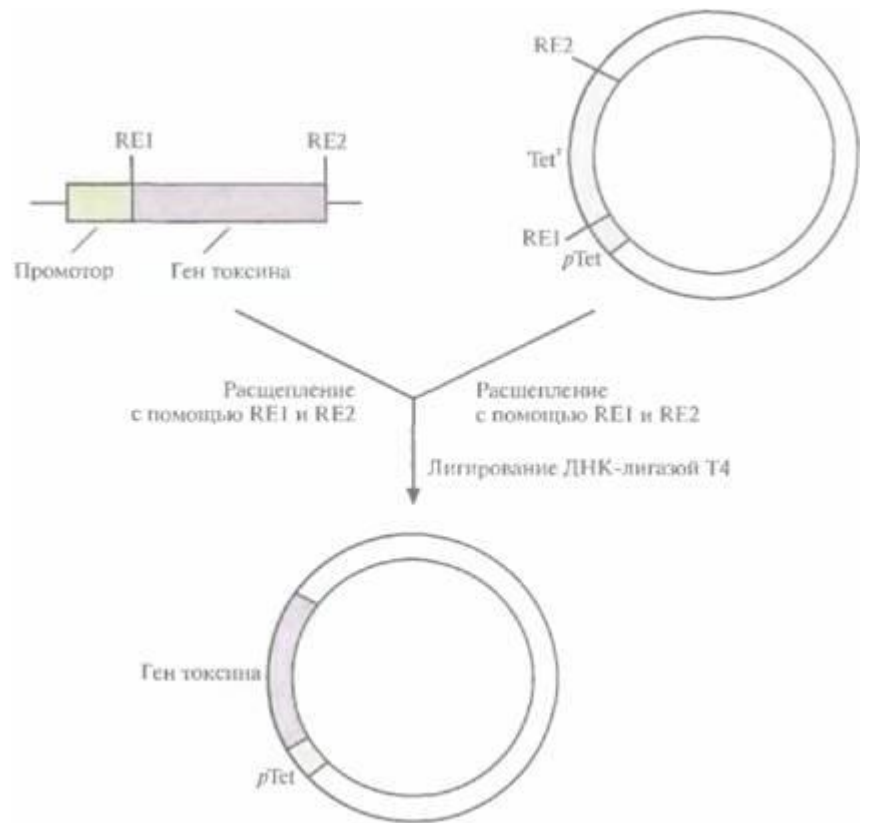
Во время споруляции *B. thuringiensis* специфический фактор инициации транскрипции (сигма-фактор) связывается с промоторами генов, функционирующих только на этой стадии жизненного цикла бактерии, так что синтезируются матричные РНК (мРНК), специфичные для споруляции. Следовательно, чтобы добиться непрерывной экспрессии инсектицидного гена (генов) *B. thuringiensis*, необходимо поместить его (их) под контроль промотора, функционирующего в течение всего жизненного цикла.

Для этого фрагмент ДНК, содержащий ген токсина без его собственного промотора, встроили в плазмиду так, чтобы он находился под контролем активного конститутивного промотора гена устойчивости к тетрациклину, который ранее был вырезан из плазмиды *Bacillus cereus* и введен в *B. thuringiensis*. На всех этапах развития микроорганизма непрерывно синтезировался полноценный токсичный белок (рис. 15.4). Кроме того, когда этой конструкцией трансформировали мутантный штамм *B. thuringiensis*, не способный к споруляции, токсин все равно синтезировался. При этом процесс был гораздо более эффективным, чем в случае *B. thuringiensis* дикого типа: количество получаемого продукта было больше, а израсходованное количество субстрата и время синтеза - значительно меньше.

Дальнейшее усовершенствование этой системы могло бы состоять во введении токсинового гена, экспрессирующегося в течение всего жизненного цикла, в хромосомную ДНК штамма *B. thuringiensis*, не способного к споруляции. Это гарантировало бы сохранность гена при непрерывной ферментации, что не всегда достигается



Рис. 15.4. Клонирование фрагмента гена токсина *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* под контролем промотора гена устойчивости к тетрациклину (*pTet*). Из выделенного гена *B. thuringiensis* удаляют его собственный промотор с помощью рестриктаз RE1 и RE2. Полученный фрагмент встраивают в плазмидный вектор рядом с промотором *pTet* вместо гена устойчивости к тетрациклину, удаленного с помощью рестриктаз RE1 и RE2, и лигируют при участии ДНК-лигазы фага T4.



при его плазмидной локализации вследствие нестабильности плазмиды.

В отличие от большинства других токсигенов (*cry*) *B. thuringiensis*, экспрессия гена *cryIII<sup>A</sup>* в норме контролируется «негативным» промотором, а не промотором, специфичным для споруляции. Ген *cryIII<sup>A</sup>* кодирует токсин, эффективный в отношении личинок жесткокрылых. В результате трансформации мутантного штамма *B. thuringiensis*, не способного образовывать споры, плазмидой, несущей клонированный ген *cryIII<sup>A</sup>*, токсин синтезировался более эффективно и был более стабильным, чем при его синтезе в штамме дикого типа. Получив этот результат, ученые предположили, что суперэкспрессии других *cry*-генов, обычно экспрессирующихся только во время споруляции, можно достичь, если поместить их под контроль промотора *cryIII<sup>A</sup>* и трансформировать получившейся конструкцией мутантный штамм *B. thuringiensis*) не способный к споруляции.

Урожаю многих сельскохозяйственных культур наносят ущерб сразу несколько видов насекомых, поэтому чрезвычайно полезным было бы создание микробиологических инсектицидов, направленных против широкого спектра насекомых-вредителей. Токсин широкого спектра действия можно получить двумя путями: 1) переносом гена данного токсина (например, токсина, эффективного в отношении двукрылых) в штамм *B. (thuringiensis*, синтезирующий другой видоспецифичный токсин (например, эффективный в отношении жесткокрылых); 2) соединением частей двух генов разных видоспецифичных токсинов с образованием последовательности, кодирующей уникальный токсин двойного действия (гибридный токсин).

Чтобы проверить возможность получения токсина с широким спектром действия, встроили гены токсинов *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* и *tenebrionis* в челночные векторы, способные реп-



Клонирование и экспрессия гена, кодирующего токсин *Bacillus thuringiensis*, в *Escherichia coli*

Н. Е. Schnepf, Н. R. Whiteley  
*Proc. Nail. Acad. Sei. USA* 78: 2893-2897, 1981

Уже давно известно, что водить скрининг гут не узнавать субъединицы параспоральный кристалл, трансформантов *E. coli*, несущих солюбилизованного кристалла, образующийся в спорах *B. ДНК B. thuringiensis*, с помощью состоящие из *thuringiensis*, обладает иммунологических методов с негликозилированного белка, инсектицидной активностью, использованием антител к целому однако эту проблему удалось однако прошли многие годы, кристаллу или путем определения решить. В конце концов были прежде чем были найдены инсектицидной активности получены трансформанты *E. coli*, условия его солюбилизации и экстрактов трансформантов. К которые несли ген токсина *B. выделен чистый белковый токсин*. тому времени были получены *thuringiensis* и были токсичны в Кроме того, хотя были некоторые указания на то, что отношении определенных обнаружены штаммы *B. гены токсинов* расположены в насекомых. Клонирование первого *thuringiensis*, не способные плазмиде, поэтому были выделены гена токсина *B. thuringiensis* четко образовывать параспоральные и фракционированы плазмиды, показало, что эти гены достаточно кристаллы, детальных протоколов возможно несущие нужные гены. просто получить, и послужило генетической трансформации еще Высказывались предположения, стимулом к более активным не существовало. Поэтому, когда что антитела к целому кристаллу, поискам новых штаммов *B. Шнепф и Уайтли* решили в котором белковые молекулы *thuringiensis* и к исследованиям идентифицировать токсиновые гликозилированы, мо- биохимии биоинсектицидов. гены *B. thuringiensis*, им пришлось про-

лицироваться и в *A. thuringiensis*, и в *Esclierichia coli*. Затем такие генетические конструкции ввели с помощью электропорации в *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*, *kurstaki*, *israelensis* и *tenebrionis*. Токсичность полученных трансформированных штаммов проверяли на личинках трех отрядов насекомых.

Во всех случаях токсичность, обусловливаемая собственным хозяйским токсиновым геном (генами), сохранялась, а в большинстве случаев введенный ген обусловливал специфичность токсического действия, характерную для штамма, откуда он был выделен (табл. 15.2). Кроме того, один из экспериментов дал совсем уж удивительный результат: при введении гена токсина *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* в *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* получились трансформанты, в какой-то степени токсичные для *Pieris brassicae* (капустницы белой), на которую не действовал ни один из продуктов исходных генов.

Плазмидные векторы, несущие клонированные *cry*-гены, часто оказываются нестабильными в *B. thuringiensis*: даже в отсутствие селективного давления все они или их часть утрачиваются. Интересно, что при этом в природе большинство *cry-re* нов локализуются именно в плаزمидах. Нестабильность плазмид еще раз убеждает в целесообразности интеграции клонированного *cry*-гена (генов) с хромосомной ДНК. Рассмотрим один успешный пример такой интеграции.

Таблица 15.2. Токсичность природных и рекомбинантных подвидов *B. thuringiensis* для насекомых *Pieris brassicae* (капустница), *Aedes aegypti* (комар) и *Phaedon cochleariae* (жук)<sup>1)</sup>

|                    |                    | Токсичность дая <sup>2)</sup> |              |                |
|--------------------|--------------------|-------------------------------|--------------|----------------|
| Хозяйская ДНК      | Введенная ДНК      | <i>Pieris</i>                 | <i>Âedes</i> | <i>Phaedon</i> |
| <i>aizawai</i>     | Нет                | ++                            | +            | —              |
| <i>israelensis</i> | Нет                | —                             | ++           | —              |
| <i>israelensis</i> | <i>aizawai</i>     | ++                            | ++           | —              |
| <i>israelensis</i> | <i>tenebrionis</i> | +                             | ++           | ++             |
| <i>kurstaki</i>    | Нет                | ++                            | +            | —              |
| <i>kurstaki</i>    | <i>tenebrionis</i> | ++                            | +            | ++             |
| <i>tenebrionis</i> | Нет                | —                             | —            | ++             |
| <i>tenebrionis</i> | <i>aizawai</i>     | ++                            | +            | +              |

<sup>1)</sup> Из рабогы Crickmore et al *Biochem J.*270: 133— 136 1990.  
<sup>2)</sup> Обозначения: ++ повреждены от 0 до 5% листьев (для *Phaedon* и *Pieris*) или наблюдается 100%-ная гибель насекомых в течение 1 ч (*Aedes*); + повреждены от 5 до 50% листьев (*Phaedon* и *Pieris*) или наблюдается гибель от 50 до 100% насекомых в -течение 24 ч (*Aedes*); — повреждены более 50% листьев (*Phaedon* и *Pieris*) или ни одно насекомое не погибает в течение 24 ч (*Aedes*). Эксперименты проводили на листьях капусты (для *Pieris*) или репы (для *Phaedon*).

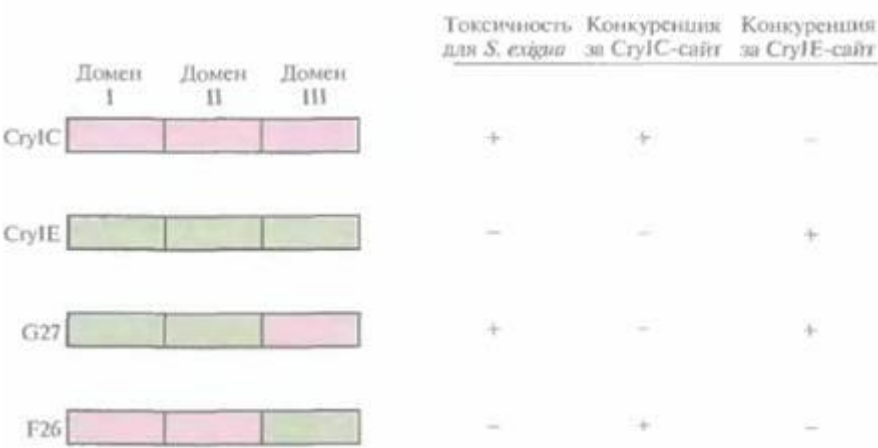
Штамм *B. thuringiensis subsp. kurstaki* обычно содержит пять разных генов токсинов: *cryIA (a)*, *cryIA (b)*, *cryIA (c)*, *cryIIA* и *cryIIB*. Их продукты токсичны для различных чешуекрылых, но не эффективны против *Spodoptera spp.* В хромосомную ДНК штамма *B. thuringiensis subsp. kurstaki* встроили ген *cryIC*, обычно присутствующий только у *B. thuringiensis subsp. aizawai* и *subsp. entomocidus*. Трансформированный штамм *B. thuringiensis subsp. kurstaki* был в шесть раз более эффективен в отношении личинок *Spodoptera exigua*, чем штамм дикого типа.

Как мы уже говорили, другой способ получения токсина широкого спектра действия состоит в слиянии кодирующих участков генов двух разных токсинов. Эта возможность была проверена в лаборатории. Было создано несколько гибридных токсинов, действующих только на чешуекрылых; некоторые из этих токсинов были более эффективны, чем продукты каждого из исходных генов, а в одном случае гибридный белок обладал абсолютно новой биологической активностью.

За токсическое действие белка Cry ответственны три домена. Домен I, локализованный в N-концевой области белковой молекулы, обеспечивает специфическое связывание токсина с рецептором на поверхности эпителиальных клеток кишечника насекомого. Домен III, расположенный в С-концевой области молекулы, предположительно и отвечает за токсичность. Устойчивость к токсинам *B. thuringiensis* обычно обуславливается мутационным изменением (изменениями) рецепторного белка (белков) на поверхности клеток кишечника насекомого, приводящим к тому, что рецептор перестает узнавать Cry-белок. Однако, если модифицировать ген токсина так, чтобы токсин мог связываться с другими поверхностными белками, то вероятность возникновения устойчивости уменьшится.

Белки CryIC и CryIE токсичны для чешуекрылых, но обладают разной видоспецифичностью: CryIC действует на *S. exigua*, *Mamestra brassicae* и *Manduca sexta*, в то время как CryIE — только на *M. sexta*. В одной из лабораторий был создан гибридный белок CryIC-CryIE, токсичность которого проверялась на разных насекомых. Была исследована также его способность связываться с различными рецепторами (рис. 15.5). Гибридный токсин G27, содержащий домен III белка CryIC, был токсичен для личинок *S. exigua*, хотя связывался только с CryIE-рецептором, но не с рецептором CryIC, И наоборот, гибридный токсин F26 не оказывал действия на личинок *S. exigua*, хотя и связывался с CryIC-рецептором. Поскольку токсичные для *S. exigua* белки CryIC и G 27 связываются с разными рецепторами на поверхности клеток кишечника насекомого, одновременная или поочередная обработка *S. exigua* двумя этими токсинами может уменьшить вероятность появления устойчивого к ним штамма, поскольку для этого необходимо, чтобы мутационные изменения произошли одновременно в двух разных белках.

Рис. 15.5. Токсичность белков CryIC, CryIE и гибридных токсинов G27 и F26 и специфичность их связывания с рецепторами. Специфичность связывания определяли в экспериментах по взаимодействию токсина с рецептором. К комплексу белкового рецептора на поверхности клеток кишечника *S. exigua* и изотопно меченного токсина добавляли немеченые CryIC или CryIE и определяли связывание меченого токсина. (Из работы Bosch et al., *Bio/Technotogy* 12:915-918,1994.)



Инсектицид, продуцируемый *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, проявляет свои токсические свойства, когда он попадает в кишечник личинок комара. Если же этот токсин, находящийся в виде параспоральных кристаллов, распылить над водой, то кристаллы быстро утонут, и токсин будет исключен из пищевой цепи личинок комара. Чтобы решить эту проблему, можно ввести ген токсина в организм, который служит пищей для личинок комаров. Это могут быть, например, фотосинтезирующие цианобактерии *Synechocystis* и *Synechococcus* spp., которые размножаются в поверхностном слое воды, где достаточно солнечного света и где обычно обитают личинки.

Еще один организм, который можно использовать для экспрессии генов токсинов *B. thuringiensis*, — бактерия *Caulobacter crescentus*, широко распространенная в водной среде, где живут личинки комаров. Инсектицид, синтезированный трансформированными цианобактериями или *C. crescentus*, в лабораторных условиях был токсичен для личинок комара. Однако в полевых условиях трансформированные цианобактерии и *C. crescentus* быстро погибали, а уровень экспрессии клонированных генов был очень низок.

В качестве организма-хозяина для чужеродных *cry*-генов, кодирующих токсичные для комаров белки, можно использовать также грамотрицательную аэробную бактерию *Asticcacaulis excentricus*, обитающую у поверхности водоемов. Были проведены эксперименты, в которых *A. excentricus* трансформировали плазмидным вектором с широким кругом хозяев, который нес гены белковых токсинов *Bacillus sphaericus* (бактерии, аналогичной *B. thuringiensis*). Гены находились под контролем промотора *tac1*, одного из вариантов *tac*-промотора. Полученный трансформант синтезировал белковые токсины мол, массой 51 и 42 кДа и был практически столь же токсичен для личинок комаров *Anopheles* и *Culex*, как природные высокотоксичные штаммы *B. sphaericus*. Однако в отличие от *B. sphaericus* в случае с *A. excentricus* не возникало проблем, связанных с распылением над водоемами. Кроме того, культивирование *A. excentricus* обходится гораздо дешевле, поскольку этот микроорганизм растет на более простой среде, чем

*B. sphaericus* и *B. thuringiensis*. Для него характерна низкая протеиназная активность, так что токсин не подвергается немедленной деградации, *A. excentricus* хорошо адаптирована к таким условиям, как относительно высокая интенсивность УФ-света. Однако, прежде чем применять рекомбинантные бактерии *A. excentricus* для контроля популяций комаров в природных условиях, необходимо убедиться, что встроенные гены токсинов не содержат последовательностей, детерминирующих устойчивость к антибиотикам.

Инсектициды, продуцируемые *B. thuringiensis*, при их нанесении на листья и стебли не действуют на насекомых, повреждающих корни растений. Чтобы обойти эту трудность, можно ввести ген токсина *B. thuringiensis* в штамм одного из видов бактерий, которые обитают в слое почвы, непосредственно прилегающем к корням (в ризосфере). Такие рекомбинантные бактерии, внесенные в почву, будут секретировать инсектицидный токсин прямо в ризосферу и защищать корни от насекомых все то время, в течение которого они остаются в почве. Это устраняет необходимость многократной обработки растений биологическими или химическими инсектицидами,

Ген токсина *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* был встроен в хромосомную ДНК штамма *Pseudomonas fluorescens*, который образует колонии на корнях кукурузы, следующим образом (рис. 15.6).

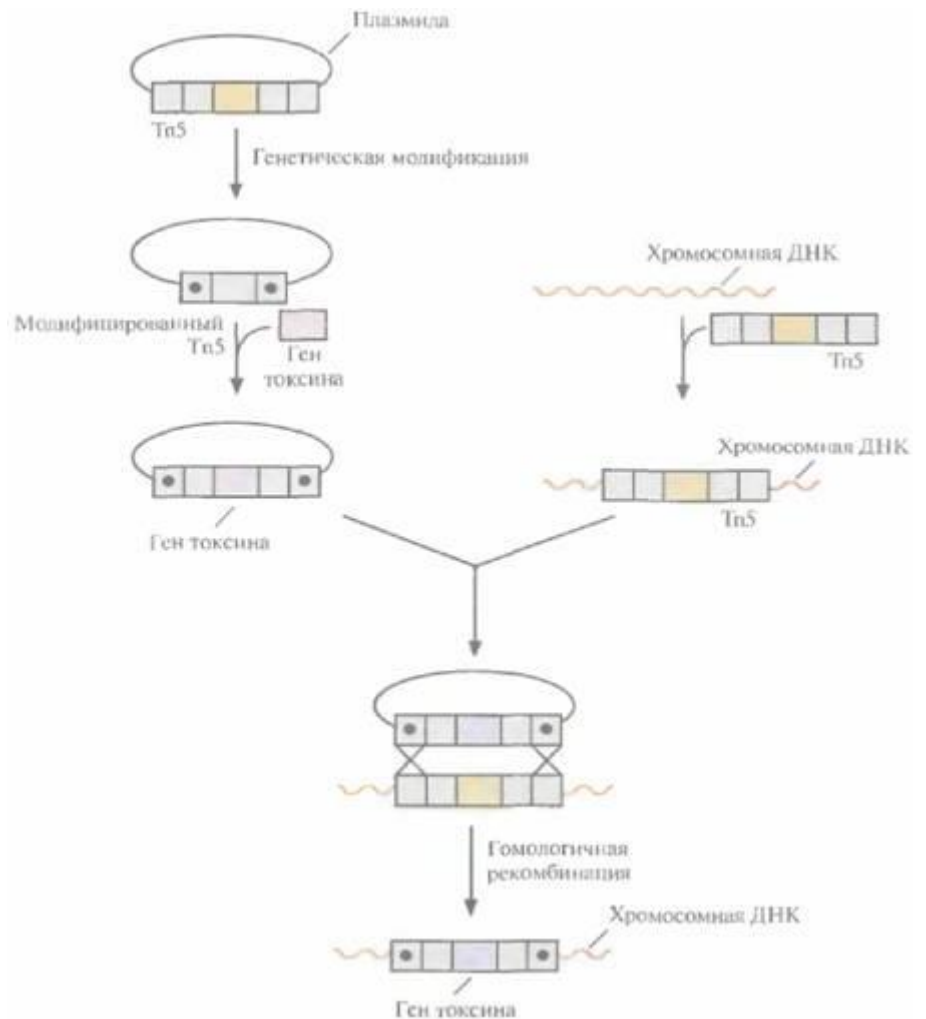
1. Транспозон Tn5 встроили в плазмиду и генетически модифицировали его левую и правую фланкирующие последовательности и удалили ген транспозазы. Такой модифицированный транспозон не может вырезаться из плазмиды даже с помощью экзогенной транспозазы.

2. Ген токсина *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* встроили в середину модифицированного транспозона Tn5 так, чтобы он находился под контролем конститутивного промотора.

3. Транспозон Tn5 дикого типа встроили в хромосомную ДНК штамма *P. fluorescens*, обитающего на корнях.

4. Плазмиду, несущую модифицированный транспозон Tn5 со встроенным геном токсина, ввели в бактерию, в хромосомную ДНК которой был встроен транспозон Tn5 дикого типа.

Рис. 15.6. Получение рекомбинантного штамма *P. fluorescens*, в чей хромосомный ДНК встроено ген токсина *B. thuringiensis*. Ген встраивают в не способный к вырезанию транспозон Tn5, локализованный в плазмиде. Такую конструкцию вводят в штамм *P. fluorescens*, содержащий в своей хромосомной ДНК транспозон Tn5 дикого типа. В результате гомологичной рекомбинации не способный к вырезанию транспозон Tn5, несущий ген токсина *B. thuringiensis*, оказывается встроенным в хромосому *P. fluorescens*.



5. Осуществили гомологичную рекомбинацию с помощью двойного кроссинговера между не способным к транспозиции Tn5-элементом, несущим ген токсина, и «плазмидным» транспозоном Tn5 дикого типа, интегрированным в хромосому. В результате интеграции измененный транспозон Tn5 с геном токсина оказался встроенным в хромосомную ДНК, а транспозон Tn5 дикого типа был элиминирован.

В таком виде ген токсина вряд ли утратится при крупномасштабном выращивании рекомбинантных микроорганизмов в лабораторных условиях или после их переноса в окружающую среду. Кроме того, вероятность передачи такого гена другим микроорганизмам в окружающей среде очень мала. Как показали предварительные исследования, рекомбинантный штамм *P. fluorescens* токсичен для личинок бражника. Теперь планируется проверить способность этого рекомбинантного микроорганизма минимизировать повреждения корней насекомыми-вредителями в оранжереях и в полевых условиях.

Гены токсинов *B. thuringiensis* вводили в хромосомную ДНК самых разных микроорганизмов. Так, гены *cryIA (c)* были введены в ДНК *P. fluorescens*, которые защищают растения са-

харного тростника от *Eldana saccharina*. Трансформация этим геном бактерии *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*, обычно обитающей в ксилеме бермудской травы, приводит к тому, что реком-бинантные бактерии приобретают способность защищать растения кукурузы от мотылька кукурузного (*Ostrinia nubilalis*).

Бакуловирусы как инструмент биоконтроля

Механизм действия

Бакуловирусы -- палочкообразные вирусы с двухцепочечным ДНК-геномом, инфицирующие разнообразных беспозвоночных. Различные подгруппы этого семейства патогенны для таких отрядов насекомых, как чешуекрылые, перепончатокрылые, двукрылые, сетчатокрылые, ручейники, жесткокрылые и равнокрылые. Некоторые из них играют важную роль в контроле численности определенных насекомых-вредителей в природных условиях. Бакуловирусы использовали в Северной Америке, начиная с 1930-х гг., до появления химических пестицидов в 1960-х гг., для борьбы с вредителями лесов, в том числе с пилильщиком еловым (*Neodiprion sertifer*), и продолжают применять, хотя и в меньшем масштабе, для контроля популяций непарного шелкопряда (*Lymantria dispar*) {табл. 15.3}.

Вирион бакуловируса имеет цилиндрический нуклеокапсид, в котором заключена его ДНК. Попад в ядро инфицированной клетки, бакуло-

Таблица 15.3. Некоторые насекомые-вредители, для контроля численности которых применяют бакуловирусы

| Насекомое-вредитель         | Тривиальное название     | Растение                 |
|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <i>Neodiprion sertifer</i>  | Пилильщик сосновый рыжий | Сосна                    |
| <i>Lymantria dispar</i>     | Непарный шелкопряд       | Широколиственные деревья |
| <i>Heliothis</i> sp.        | Совка хлопковая          | Хлопок, сорго            |
| <i>Orgyia pseudotsugata</i> | Медведица                | Лжетсуга тиссолистная    |
| <i>Cydia pomonella</i>      | Плодожорка яблонная      | Грецкий орех, яблоня     |
| <i>Trichoplucia ni</i>      | Совка ни                 | Капуста                  |
| <i>Oryctes rhinoceros</i>   | Жук- носорог             | Кокосовый орех           |

вирусные частицы объединяются, образуя компактную структуру, заключенную в кристаллический белковый матрикс. Он состоит в основном из белка полиэдрина. После гибели инфицированных насекомых в среду выходят миллионы полиэдриновых частиц. Попадая в кишечник других насекомых, они подвергаются действию щелочной среды, матрикс растворяется и высвобождаются инфекционные вирусные частицы. Они проникают в клетки кишечника насекомых, через цитоплазму попадают в ядро, где после удаления нуклеокапсида происходит репликация вируса и образование новых вирусных частиц. Некоторые из них попадают в кровоток насекомого, отшнуровываясь от плазматической мембраны инфицированных клеток, а затем и в другие органы. Обычно насекомое погибает по прошествии 10 раундов репликации вируса, т. е. примерно через 5-6 сут после инфекции, при этом до 25% сухой массы насекомого приходится на долю полиэдрина.

Одно из преимуществ бакуловирусов как инструмента биоконтроля численности насекомых состоит в избирательности их действия. С одной стороны, это означает, что данный бакуловирус может использоваться для контроля численности только определенных насекомых-вредителей. Но с другой, благодаря тому что бакуловирусы эволюционировали в течение многих тысяч лет совместно со своими насекомыми-хозяевами, они научились преодолевать их защитные механизмы, а потому устойчивость к этим вирусам развивается крайне редко - гораздо реже, чем к *B. thuringiensis*. Более того, устойчивые к бакуловирусам насекомые быстро утрачивают эту способность после того, как прекращают взаимодействовать с вирусами.

Фермеры и садоводы предпочитают использовать один инсектицидный агент, действующий на различных насекомых-вредителей, а не множество инсектицидов. Это означает, что для более широкого применения бакулирусов необходимо расширить круг их хозяев.

Было показано, что при одновременном инфицировании клетки насекомого двумя штаммами бакуловирусов после их репликации иногда появляются новые штаммы, немного отличающиеся по своим действиям от исходных вирусов. Причиной этому является гомологич-



ная рекомбинация между ДНК разных вирусов. Детальное изучение этого явления показало, что рекомбинация осуществляется в пределах участка ДНК длиной всего 79 нуклеотидов, расположенного в гене геликазы p143. Возможно, этот участок и определяет круг хозяев различных бакуловирусов. Учитывая все это, можно предположить, что замена в нем некоторых нуклеотидов позволит создавать бакуловирусы с более широкой специфичностью.

Усиление биоконтроля с помощью генной инженерии

Бакуловирусы не оказывают свое действие мгновенно. В зависимости от условий инфицированное насекомое может погибнуть за период от нескольких дней до нескольких недель. Чтобы ускорить этот процесс, попытались увеличить вирулентность бакуловирусов введением в них чужеродных генов, в результате экспрессии которых произойдет ослабление инфицированного насекомого или его гибель (табл. 15.4). В одном из экспериментов предполагалось использовать ген, экспрессия которого в клетках насекомого-хозяина нарушает его нормальный жизненный цикл.

Известно, что понижение уровня ювенильного гормона у личинок инициирует окукливание и приводит к прекращению их активного питания. Это снижение происходит в результате повышения содержания специфической эстеразы, катализирующей превращение биологически активной формы сложного метилового эфира ювенильного гормона в неактивную кислоту

Таблица 15.4. Эффект некоторых генов, введенных в бакуловирусы для повышения их инсектицидного действия<sup>1)</sup>

| Продукт гена                   | Влияние, оказываемое на насекомое-хозяина                 |
|--------------------------------|---|
| Диуретический гормон           | Уменьшение объема гемолимфы                               |
| Эстераза ювенильного гормона   | Прекращение питания                                       |
| Токсин <i>B. thuringiensis</i> | Прекращение питания                                       |
| Токсин скорпиона               | Паралич   |
| Клещевой токсин                | Паралич   |
| Токсин осы                     | Преждевременная меланизация, медленное прибавление в весе |

<sup>1)</sup> Из работы Maeda, *Curr. Opin. Biotechnol.* 6: 313-319, 1995.

форму. Ингибирование активности эстеразы приводит к накоплению *in vivo* активного ювенильного гормона, личинки дольше остаются на стадии активного питания и в результате достигают гигантских размеров. Разумно было предположить, что при искусственном повышении уровня экстеразы ювенильного гормона произойдет понижение уровня эндогенного активного ювенильного гормона и преждевременное прекращение питания. К тому же было известно, что при уменьшении времени активного питания личинок урожаю наносится меньший ущерб.

Чтобы проверить это предположение, пришлось сначала провести эксперименты по клонированию и экспрессии гена эстеразы ювенильного гормона. Фермент выделили из насекомого *Heliothis virescens* (совки) и очистили. Определили его аминокислотную последовательность, синтезировали олигонуклеотид, соответствующий одному из сегментов белковой молекулы, и использовали его в качестве зонда для гибридизации. Из библиотеки кДНК *H. virescens* выщедили кодирующую последовательность для эстеразы ювенильного гормона и встроили ее в геном бакуловируса так, чтобы она находилась под транскрипционным контролем вируса. После обработки таким рекомбинантным бакуловирусом *Trichoplusia ni* (совки ни), находящейся на первой личиночной стадии развития, содержание ювенильного гормона у насекомого снизилось, а рост личинок резко замедлился по сравнению с таковыми контрольных личинок, обработанных бакуловирусом дикого типа.

К сожалению, применимость этого подхода для повышения эффективности инсектицидного действия бакуловирусов ограничивается тем, что ухудшение питания личинок при повышении уровня эстеразы ювенильного гормона происходит только на первой стадии развития личинок. Личинки, находящиеся на других стадиях развития, гораздо менее чувствительны к обработке бакуловирусами. Таким образом, бакуловирусы, специально сконструированные для экспрессии гена эстеразы ювенильного гормона, эффективны лишь тогда, когда личинки большей части популяции насекомого-вредителя находятся на первой стадии развития, что в естественных условиях почти недостижимо.



Другой подход к повышению эффективности инсектицидного действия бакуловирусов основан на включении в вирусный геном гена мощного насекомое пецифичного токсина, который экспрессировался бы во время цикла вирусной инфекции. В один из штаммов бакуловируса был введен ген насекомое пецифичного нейротоксина, синтезируемого североафриканским скорпионом, *Androctonus australis* Nestor. Этот нейротоксин, не оказывающий никакого действия на мышей, блокирует транспорт ионов натрия в нейронах насекомых-мишеней, что приводит к параличу и смерти. Насекомые, которые были инфицированы бакуловирусом, несущим ген нейротоксина скорпиона, повреждали листья контрольных растений на 50% меньше, чем насекомые, инфицированные бакуловирусом дикого типа.

Клонирование и экспрессия кДНК токсина израильского желтого скорпиона, *Leiurus quinquestriatus hebraeus*, в бакуловирусе *Autographa californica* привело к уменьшению времени, которое необходимо для уничтожения 50% личинок контрольного насекомого, со 120 до 78 ч. Кроме того, через 120 ч после инфекции личинки насекомого, обработанные рекомбинантным вирусом, набрали вдвое меньший вес по сравнению с личинками, обработанными вирусом дикого типа. Таким образом, рекомбинантный бакуловирус не только ускорял гибель инфицированных личинок, но и существенно уменьшал способность насекомых повреждать растения.

Не так давно рекомбинантный бакуловирус *A. californica*, продуцирующий насекомоспецифичный нейротоксин *Androctonus australis*, был протестирован в полевых условиях. В проведенных ранее лабораторных экспериментах наблюдалось уменьшение времени, необходимого для уничтожения насекомого *T. ni*, на 25—50%, но еще больший эффект оказывал рекомбинантный бакуловирус в контрольных полевых испытаниях (рис. 15.7): он быстрее приводил к гибели насекомых, снижал ущерб, причиняемый растениям капусты, сокращал число вредителей в следующем цикле репродукции.

Какую бы эффективность ни обнаруживал конкретный рекомбинантный бакуловирус в

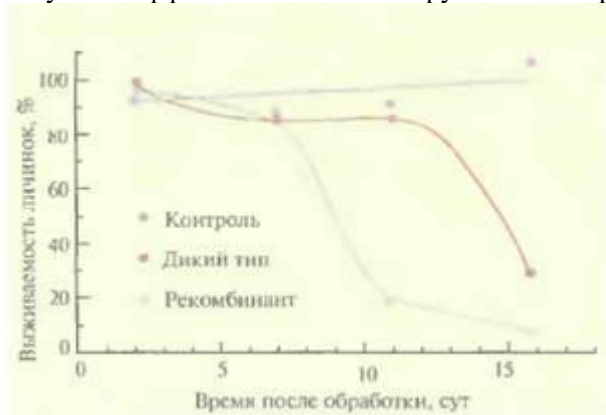


Рис. 15.7. Выживаемость личинок *T. ni* после обработки листьев капусты бакуловирусом дикого типа или рекомбинантным бакуловирусом, экспрессирующим ген нейротоксина скорпиона. На контрольные растения наносили только личинок насекомых. Чем ниже выживаемость, тем больше личинок погибло и тем больше эффективность обработки. Растения обрабатывали бакуловирусами только один раз в начале эксперимента.

лабораторных экспериментах, основным препятствием на пути его широкомасштабного применения является высокая стоимость его препаратов и трудность распространения. Бакуловирусы — это облигатные паразиты, они могут размножаться только в живом организме или в культуре клеток насекомого. Стоимость препаратов бакуловирусов, независимо от того, является вирус рекомбинантным или нет, гораздо выше, чем химических инсектицидов. И тем не менее не исключено, что биологические инсектициды найдут более широкое применение, если учесть, какое неблагоприятное воздействие на окружающую среду оказывают химические инсектициды, т. е. если сопоставить их стоимость и выгоду, которую они дают.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время микробиологические инсектициды получают все более широкое распространение благодаря тому, что они не оказывают вредного воздействия на окружающую среду. Некоторые подвиды бактерии *Bacillus thuringien-*

sis образуют протоксин, который, попадая в кишечник насекомого, в условиях щелочной среды и под действием пищеварительных протеаз превращается в активный токсин и вызывает гибель насекомого. Летальное действие токсина обуславливается образованием в мембранах клеток кишечника ионных каналов, через которые АТФ выходит из клеток. Это приводит к нарушению метаболизма, прекращению питания, дегидратации и т. д. Токсины *B. thuringiensis* высокоспецифичны в отношении ограниченного числа видов насекомых и нетоксичны для всех остальных; они разрушаются в окружающей среде и поэтому редко оказывают ощутимое влияние на нее, что не способствует отбору устойчивых к ним насекомых. Благодаря всем этим свойствам биологические инсектициды являются перспективными кандидатами на роль агентов, с помощью которых можно контролировать численность насекомых, причиняющих ущерб сельскохозяйственным культурам, и насекомых — переносчиков болезней человека.

Клонированы и охарактеризованы гены различных токсинов *B. thuringiensis*. Один из таких генов был введен в неспорулирующий штамм *Bacillus*. При этом ген экспрессировался на всех стадиях развития микроорганизма, а не только на стадии образования спор, когда формируется параспоральный кристалл.

Чтобы расширить специфичность токсина *B. thuringiensis*, гены различных токсинов встраивали в плазмиды и вводили в хозяйский штамм — либо в составе плазмид с широким кругом хозяев, либо путем интеграции в хромосомную ДНК клетки-хозяина. Бактерии, несущие два разных токсиновых гена, иногда оказывались токсичными для какого-то третьего вида насекомого-вредителя, а не только для тех двух видов насекомых, на которых действовали продукты исходных генов. С помощью генетических манипуляций был создан рекомбинантный белок, состоящий из двух доменов, кодируемых разными генами *B. thuringiensis*. Он оказывал двоякое токсическое действие. В ходе другого эксперимента рецепторсвязывающий домен одного токсина был объединен с обладающим токсичностью доменом другого. Есть надежда, что применение таких гибридов уменьшит вероятность появления устойчивых насекомых.

Гены токсинов *B. thuringiensis* вводили также в различные обитающие в поверхностном слое воды микроорганизмы, которые служат пищей для личинок комаров. Этот подход оказался весьма эффективным для прямой доставки токсинов *B. thuringiensis* в организм насекомого-мишени. Генноинженерными методами были созданы также бактерии, обитающие в ризосфере и экспрессирующие гены токсинов *B. thuringiensis*. Это позволяет бороться с насекомыми, повреждающими корни растений.

Бакуловирусы патогенны для многих видов насекомых, но каждый их штамм специфичен в отношении небольшого числа видов. Обычно гибель инфицированного насекомого происходит лишь спустя довольно длительное время, поэтому бакуловирусы не очень эффективны как средство контроля численности насекомых. Однако в различные штаммы бакуловирусов можно ввести специфические гены, и тогда вирус может действовать как система доставки гена, обеспечивающего синтез инсектицида в течение всего жизненного цикла вируса. Проведены предварительные испытания в лабораторных условиях, которые дали положительные результаты. Кроме того, в бакуловирус был введен ген нейротоксина, смертельного для насекомых, и были проведены полевые испытания.

## ЛИТЕРАТУРА

- Ananda Kumar P., R. P. Shamia, V. S. Malik. 1996.  
The insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Adv. Appl. Microbiol.* **42**: 1-43.
- Baum J. A., T. Mahar. 1995. Regulation of insecticidal crystal protein production in *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Microbiol.* **18**: 1—12.
- Bonning B. C., B. D. Hammock. 1992. Development and potential of genetically engineered viral insecticides. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **10**:455—489.
- Bosch D., B. Schipper, H. van der Kleij, R. A. de Maagd, W. J. Mteikema. 1994. Renirnbirmnl *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with new properlies: possibilities for resistance management. *Bio/Technology* **12**: 915-918.

- Calogero S., A. M. Albertini, C. Fogher, R. Marzari, A. Galizâ. 1989. Expression of a cloned *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin gene in *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 446—453.
- Caramon T., A. M. Albertini, A. Galizzi. 1991. In vivo generation of hybrids between two *Bacillus thuringiensis* insect-toxin-encoding genes. *Gene* 98: 37-44.
- Chejanovsky N., N. Zilberberg, H. Rivkin, L. Zlotkin, M. Guervit. 1995. Functional expression of an alpha anti-insect scorpion neurotoxin in insect cells and lepidopterous larvae. *FEBS Lett.* 376: 181-184.
- Chungjatupornchai W. 1990. Expression of the mosquito-cidal-protein genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and the herbicide-resistance gene *bar* in *Synechocystis* PCC6803. *Curr. Microbiol.* 21: 283-288.
- Cory J. S., M. L. Hirst, T. Williams, R. S. Hails, D. Goulson, B. M. Green, T. M. Carty, R. D. Possee, P. J. Cayley, D. H. L. Bishop. 1994. Field trial of a genetically improved baculovirus insecticide. *Nature* 371: 138—140.
- Crickmore N., C. Nicholls, J. Earp, T. C. Hodgman, D. J. Ellar. 1990. The construction of *Bacillus thuringiensis* strains expressing novel  $\delta$ -endotoxin combinations. *Biochem. J.* 270: 133-136.
- Croizier G., L. Croizier, O. Argaud, D. Poudevigne. 1994. Extension of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus host range by interspecific replacement of a short DNA sequence in the p143 helicase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 48-52.
- Ferré J., M. D. Real, J. Van Rie, S. Jansens, M. Peferoen. 1991. Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:5119-5123.
- Fuxa J. R. 1990. Insect control with baculoviruses. *Biotechnol. Adv.* 9: 425-442.
- Ge A. Z., N. I. Shivarova, D. H. Dean. 1989. Location of the *Bombyx mori* specificity domain on a *Bacillus thuringiensis* 6-endotoxin protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 4037-4041.
- Gelernter W., G. E. Schwab. 1993. Transgenic bacteria, viruses, algae and other microorganisms as *Bacillus thuringiensis* toxin delivery systems, p. 89-104. In P. F. Entwistle, J. S. Cory, M. J. Bailey, S. Higgs (ed.), *Bacillus thuringiensis, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice*. John Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom.
- Hammock B. D., B. C. Banning, R. D. Possee, T. N. Hanzlik, S. Maeda. 1990. Expression and effects of the juvenile hormone esterase in a baculovirus vector. *Nature* 344: 458—461.
- Held G. A., L. A. Bulla, E. Ferrari, J. Hoch, A. L. Aronson, S. A. Minnich. 1982. Cloning and localization of the lepidopteran protoxin gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 6065-6069.
- Herrera G., S. J. Snyderman, J. A. Thomson. 1994. Construction of a bioinsecticidal strain of *Pseudomonas fluorescens* active against the sugarcane borer, *Eldana saccharina*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 682-690.
- Kaiman S., K. L. Kiehne, N. Cooper, M. S. Reynoso, T. Yamamoto. 1995. Enhanced production of insecticidal proteins in *Bacillus thuringiensis* strains carrying an additional crystal protein gene in their chromosomes. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3063-3068.
- Lampel J. S., G. L. Canter, M. B. Dimock, J. L. Kelly, J. J. Anderson, B. B. Uratani, J. S. Foulke, Jr., J. T. Turner. 1994. Integrative cloning, expression, and stability of the *cryIA(c)* gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in a recombinant strain of *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 501-508.
- Lereclus D., H. Agaisse, M. Gominet, J. Chauvaud. 1995. Overproduction of encapsulated insecticidal crystal proteins in a *Bacillus thuringiensis* spoOA mutant. *Bio/Technology* 13: 67-71.
- Lereclus D., A. Delécluse, M. M. Lecadet. 1993. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes, p. 37-69. In P. F. Entwistle, J. S. Cory, M. J. Bailey, S. Higgs (ed.), *Bacillus thuringiensis, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice*. John Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom.
- Liu J. T., M. J. Sui, D. D. Ji, I. H. Wu, C. C. Chou, C. C. Chen. 1993. Protection from ultraviolet radiation by melanin of mosquito-cidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 62: 131-136.

**Uu J. W., W. H. Yap, T. Thanabalu, A. G. Porter.**

1996. Efficient synthesis of mosquitocidal toxins in *Asticcacaulis excentricus* demonstrates potential of gramnegative bacteria in mosquito control, *Nat. Biotechnol* **14**: 343-347.

Maeda S. 1995. Further development of recombinant baculovirus insecticides. *Curr. Opin. Biotechnol* **6**:313-319.

**McCutchen B. F., P. V. Choudarj, H. Crenshaw,**

D. Maddox, S. G. Kamita, N. Palekar, S. Velath,

**E. Fowler, B. D. Hammock, S. Maeda.** 1991. Development of a recombinant baculovirus expressing an insect-selective neurotoxin: potential for pest control. *Bio/Technology* **9**: 848-852.

**Mettus A. M., A. Macafuso.** 1990 Expression of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin genes during vegetative growth. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1128-1134.

**Murphy R. C., E. S. Stevens.** 1991. Cloning and expression of the *cryIVD* gene of *Bacillus thuringiensis*, subsp. *Kraenke* in the cyanobacterium *Spirulina*, resulting in larvicidal activity, *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1650-1655.

Otxikowicz/ M. ti., F. J. Perlak, K. Kusano-Kretzmer, E. J. Mayer, S. L. Bolten, L. S. Watrud. 1986. Tn5-mediated integration of the delta-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* into the chromosome of root-colonizing pseudomonads. *J. Bacteriol.* **168**: 982-989.

Obukowicz M. G., F. J. Perlak, K. Kusano-Kretzmer, E. J. Mayer, L. S. Watrud. 1986. Integration of the delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* into the chromosome of root-colonizing strains of pseudomonads using Tn5. *Gene* **45**: 327-333).

Priest F. G. 1992. Biological control of mosquitoes and other biting flies by *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis*. *J. Appl. Bacteriol.* **72**: 357-369.

Schnepf H. E. & H. R. Whiteley. 1981. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 2893-2897.

Stewart L. M. D., M. Hirst, M. L. Ferber, A. T. Merryweather, P. J. Cayley, R. D. Possee. 1991. Construction of an improved baculovirus insecticide containing an insect-specific toxin gene. *Nature* **352**: 85-88.

Thanabalu T., J. Hindley, S. Brenner, C. Oei, C. Berry. 1992. Expression of the mosquitocidal toxins of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* by recombinant *Caulobacter crescentus*, & vehicle for biological control of aquatic insect larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:905-910.

Thiery I., L. Nicholas, R. Kippka, N. Tandeau de Marsac. 1991. Selection of cyanobacteria isolated from mosquito breeding sites as a potential food source for mosquito larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1354-1359.

Tomalski M. D., L. K. Muller. 1991. Insect paralysis by baculovirus-mediated expression of a mite neurotoxin gene. *Nature* **352**: 82-84.

Van Rie J., W. H. McGaughey, D. E. Johnson, B. J. Harriett, H. Van Mellaert. 1990. Mechanism of insect resistance of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* **247**: 72-74.

Wood H. A., R. R. Granados. 1991. Genetically engineered baculoviruses as agents for pest control. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**: 69-87.

Yap W. H., T. Thanabalu, A. G. Porter. 1994. Expression of mosquitocidal toxin genes in a gas vacuolated strain of *Aeromonas aquaticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 4199-4202.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Каковы преимущества биологических инсектицидов перед химическими?
2. Почему токсин *Bacillus thuringiensis* не токсичен для человека?
3. Какой подход вы использовали бы для идентификации гена протоксина *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*? Какое практическое применение может найти этот ген?
4. Как выяснить, где локализован ген определенного протоксина: в плазмиде или в хромосомной ДНК *B. thuringiensis*?
5. Как с помощью генной инженерии можно улучшить полезные свойства того или иного протоксина *B. thuringiensis*?
6. Как, используя методы генной инженерии, повысить эффективность бакуловирусов как инсектицидных агентов?
7. Каким образом можно расширить видоспецифичность токсинов?

8. Какую информацию вы можете получить, зная, к какому классу относится тот или иной белок Сгу?

9. Как бы вы модифицировали белок Сгу, чтобы уменьшить вероятность появления насекомых, устойчивых к токсину?

10. Почему бактерия *Asticcacaulis excentricus* является весьма привлекательным микроорганизмом для осуществления в ней экспрессии генов токсинов *B. thuringiensis*?

11. Как расширить круг насекомых, инфицируемых данным бакуловирусом?

## ГЛАВА 16.

# Промышленный синтез белков при участии рекомбинантных микроорганизмов

Для получения коммерческих продуктов с помощью рекомбинантных микроорганизмов необходимо сотрудничество специалистов в двух областях: молекулярных биологов и биотехнологов. Задача молекулярных биологов заключается в идентификации, изучении свойств, модификации нужных генов и создании эффективных систем их экспрессии в клетках микроорганизмов, которые можно будет использовать для промышленного синтеза соответствующего продукта, а задача биотехнологов — в обеспечении условий оптимального роста нужного рекомбинантного микроорганизма с целью получения продукта с наибольшим выходом. На заре развития молекулярной биотехнологии ученые наивно полагали, что переход от лабораторного синтеза к промышленному — это вопрос простого увеличения масштаба, т. е. условия, оптимальные для малых объемов, будут оптимальными и для больших, так что достаточно просто взять больший реактор и соответственно больший объем культуральной среды.

Такое упрощенное представление не соответствует действительности. Например, аэробные микроорганизмы хорошо растут в обычной колбе на 200 мл при аэрации ее содержимого с помощью мешалки мощностью 300 Вт. Если просто увеличить объем «колбы» до 10 000 литров, то потребуются мешалка мощностью 15 МВт. Ее мотор будет размером с дом, а при перемешивании выделится столько тепла, что микроорганизмы попросту сварятся. Этот простой пример может не во всем убедить биотехнологов, однако они точно знают, что проблема промышленного культивирования микроорганизмов не сводится к пропорциональному увеличению масштаба лабораторного эксперимента. Конечно, увеличить размер реактора (биореактора, ферментера) совершенно необходимо, поскольку для получения 10 000 л клеточной суспензии не имеет смысла использовать 50 000 отдельных колб на 200 мл. Однако помимо этого для получения максимального выхода как в малых (от 1 до 10 л), так и в больших (>1000 л) биореакторах необходимо оптимизировать множество параметров: температуру, рН, интенсивность и способ перемешивания культуры и — в случае аэробных организмов — концентрацию кислорода. При этом надо иметь в виду, что как правило оптимальные условия изменяются при каждом десятикратном увеличении объема биореактора.

Есть и другие очень важные соображения. В реакторе должен поддерживаться достаточный уровень стерильности и, кроме того, необходимо создать условия, предотвращающие утечку генетически измененных микроорганизмов. Чтобы иметь возможность быстро и легко изменять условия в ходе ферментации, реактор должен быть снабжен контрольно-измерительной аппаратурой, позволяющей непрерывно отслеживать значения как можно большего числа параметров. Поскольку при стерилизации может изменяться состав среды (например, могут разрушаться витамины), важно убедиться в том, что он остался оптимальным для роста нужных микроорганизмов.

Как правило, промышленная ферментация и очистка продукта — процессы многоступенчатые (рис. 16,1). Обычно процедура начинается с приготовления и стерилизации культуральной среды и оборудования. Сначала выращивают исходную культуру (5—10 мл), затем инкубируют ее во встряхиваемой колбе (200—1000 мл), после



чего переносят в ферментер для посевного материала (10—100 л) и, наконец, в промышленный ферментер (1000—100 000 л). По завершении ферментации клетки выделяют из культуральной среды центрифугированием или фильтрацией. Если продукт локализован внутри клеток, последние разрушают, удаляют клеточные осколки и выделяют продукт из осветленной среды, Секретируемый продукт выделяют непосредственно из среды.

**Рост микроорганизмов**

Микроорганизмы можно выращивать в ферментере периодического действия, в ферментере периодического действия с добавлением субстрата



Рис. 16.1. Обобщенная схема процесса промышленной ферментации. Выделяемый продукт находится либо в клетках, либо в культуральной среде, но не в обеих фракциях одновременно, так что дальнейшие манипуляции проводят с одной из этих фракций.

или в непрерывной культуре (рис. 16.2). В первом случае микроорганизмы выращивают в стерильных условиях без добавления в ходе ферментации свежей культуральной среды. Во втором случае по ходу ферментации к культуре периодически добавляют увеличивающиеся количества питательных веществ, при этом культуральную среду не удаляют до окончания процесса. При непрерывной ферментации свежая культуральная среда поступает в ферментер непрерывно, и параллельно отводится такой же объем клеточной суспензии. Во всех случаях через среду при необходимости продувают кислород (обычно в виде стерильного воздуха), добавляют пеногаситель и (если это нужно) кислоту или основание.



Рис. 16.2. Изменение во времени концентрации клеток и субстрата в периодической культуре (А), периодической культуре с добавлением субстрата (Б) и в непрерывной культуре (В).

**Периодическая культура**

В ходе периодической ферментации состав культуральной среды, концентрация микроорганизмов (концентрация биомассы), химический состав клеток и количество белкового продукта или метаболита зависят от фазы роста, клеточного метаболизма и наличия питательных веществ. Различают шесть основных фаз роста: лаг-фазу, фазу ускорения, логарифмическую (log), или экспоненциальную фазу, фазу замедления, стационарную фазу и фазу отмирания (рис. 16.3).

Обычно после инокуляции стерильной культуральной среды мгновенного увеличения числа клеток не наблюдается. В течение какого-то периода времени, называемого лаг-фазой, клетки адаптируются к новым условиям: другим рН или концентрации питательных веществ, В ходе такой адаптации может произойти включение каких-то новых, ранее не проявившихся путей метаболизма. Лаг-фаза наблюдается всякий раз, когда посевной материал получен из культуры, рост которой прекратился в результате истощения субстрата или ингибирования продуктом (т. е. культуры в стационарной фазе). Продолжительность лаг-фазы зависит от времени, в течение которого клетки посевного материала находились в стационарной фазе, и от того, как сильно различались среда, в которой росла культура, и новая, свежая культуральная среда. Если же посевным материалом служит культура, находящаяся в экспоненциальной фазе, то выраженная лаг-фаза может отсутствовать и рост начнется немедленно после инокуляции. Между лаг- и экспоненциальной фазами есть короткий период, так называемая фаза ускорения, когда скорость роста клеток увеличивается до достижения постоянной величины.

Во время экспоненциальной фазы клетки претерпевают несколько делений, а удельная скорость роста остается постоянной. При из-

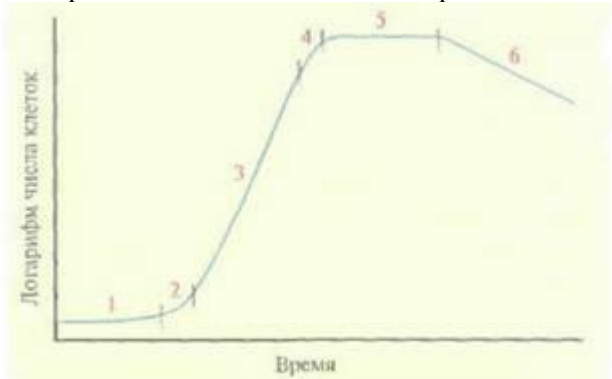


Рис. 16.3. Кривая роста бактериальной культуры при периодической ферментации. 1 - лаг-фаза, 2 - фаза ускорения, 3 - экспоненциальная фаза, 4 - фаза замедления, 5 - стационарная фаза, 6 - фаза отмирания.

бытке субстрата (питательных веществ) и в отсутствие ингибирования роста каким-либо соединением, присутствующим в культуральной среде, удельная скорость роста не зависит от концентрации субстрата. Кривую роста при таких условиях можно описать математически, что позволяет биотехнологам моделировать процесс, а затем провести его масштабирование. Прирост клеточной массы во времени  $dX/dt$  равен произведению удельной скорости роста  $\mu$  на биомассу  $X$ :

$$dX/dt = \mu X.$$

Аналогично, прирост числа клеток  $dN/dt$  равен произведению удельной скорости  $\mu$  на число клеток  $N$ :

$$dN/dt = \mu N.$$

Удельная скорость  $\mu$  зависит от концентрации лимитирующего субстрата (источника углерода или азота)  $S$ , максимальной удельной скорости роста  $\mu_{\max}$  и субстратспецифичной константы  $K_s$ :

$$\mu = \mu_{\max} S / (K_s + S).$$

И  $S$ , и  $K_s$  имеют размерность концентрации (г/л или М).

Иногда вместо удельной скорости роста используют время удвоения, или время генерации  $t_d = \ln 2 / \mu$ . Это время, за которое в определенных условиях число клеток или биомасса удваивается. Для одноклеточных микроорганизмов величина  $\mu_{\max}$  обычно находится в диапазоне от 2,1 до 0,086 ч<sup>-1</sup>, что соответствует времени удвоения примерно от 20 мин до 8 ч.

Когда субстрат присутствует в избытке (т. е. при  $S \gg K_s$ ),  $\mu = \mu_{\max}$  достигается максимальная скорость роста культуры в экспоненциальной фазе. Как правило, величина  $K_s$  настолько мала, что концентрация субстрата редко становится сравнимой с  $K_s$  во время экспоненциальной фазы. Например, в случае *Escherichia coli*  $K_s$  для глюкозы равна примерно 1 мг/л, а начальная концентрация глюкозы в среде обычно составляет около 10 000 мг/л. Однако в конце экспоненциальной фазы субстрата остается мало, и  $S$  может стать ниже  $K_s$ . При  $S < K_s$  быстро наступает фаза замедления. Она может быть очень кратковременной или даже практически незаметной, поскольку из-за большого числа клеток в конце экспоненциальной фазы субстрат может быть израсходован очень быстро.

В результате истощения лимитирующего субстрата (например, источника углерода) или накопления продуктов метаболизма, замедляющих рост, увеличение числа клеток постепенно прекращается и культура переходит в стационарную фазу. В это время биомасса остается постоянной, однако метаболизм часто претерпевает кардинальные изменения. Именно в этот период нередко синтезируются соединения (вторичные метаболиты), представляющие коммерческий интерес, например антибиотики. Продолжительность стационарной фазы зависит от конкретного организма и условий роста.

В фазе отмирания энергетические запасы клеток оказываются исчерпанными, и метаболизм прекращается. В большинстве промышленных процессов ферментацию останавливают и клетки собирают еще до наступления фазы отмирания.

### Периодическая культура с добавлением субстрата

В этом случае в ферментер периодически добавляют субстрат, а конечный продукт собирают только по завершении процесса. Добавление субстрата приводит к удлинению экспоненциальной и стационарной фаз и к увеличению биомассы и количества метаболитов, синтезируемых во время стационарной фазы (например, антибиотиков). Однако в стационарной фазе микроорганизмы часто синтезируют протеолитические ферменты (протеиназы), разрушающие все производимые ими белки. Поэтому, если целью ферментации является получение белковых продуктов, нужно остановить процесс до его перехода в эту фазу. Прямое измерение концентрации субстрата в ходе ферментации часто бывает затруднено, и чтобы определить, в какой момент нужно добавить следующую порцию субстрата, приходится использовать другие показатели, коррелирующие с его расходом, например количество синтезированных органических кислот, значение рН или количество образовавшегося CO<sub>2</sub>. Вообще говоря, ферментеры периодического действия с добавлением субстрата требуют постоянного и более тщатель-

ного контроля, чем простые ферментеры периодического действия, и поэтому используются реже. Но они имеют ряд преимуществ, если говорить о разработке систем получения белков с помощью рекомбинантных микроорганизмов, а потому становятся все более популярными.

Периодическое добавление субстрата к растущей культуре рекомбинантных микроорганизмов продлевает экспоненциальную фазу и отсрочивает наступление стационарной фазы, во время которой инициируются клеточные ответы на стрессовые воздействия, происходит синтез протеиназ и другие изменения метаболизма, уменьшающие выход рекомбинантного белка. Для поддержания метаболизма клетки-хозяина количество добавляемого субстрата необходимо постоянно увеличивать. Чтобы обеспечить непрерывный синтез рекомбинантного белка и его стабильность, нужно тщательно контролировать процесс и добавлять субстрат (источник углерода и азота вместе с микроэлементами) сразу, как только в этом возникнет необходимость. В зависимости от генотипа микроорганизма и природы рекомбинантного белка при периодической ферментации с добавлением субстрата выход продукта может возрасти на 25—1000 % по сравнению с простой периодической ферментацией.

Периодическую ферментацию с добавлением субстрата можно использовать для культивирования не только микроорганизмов, но и клеток млекопитающих и насекомых. Это очень важно, поскольку: 1) такие культуры все шире применяются для получения белковых продуктов, имеющих медицинское значение; 2) без периодического добавления субстрата животные клетки не очень эффективно синтезируют чужеродные белки.

### *Непрерывная культура*

При непрерывной ферментации стационарные условия, т. е. условия, при которых  $dX/dt = 0$ , обеспечиваются тем, что при постоянном объеме биореактора убыль числа клеток (удаление продукта) в точности уравнивается их увеличением в результате деления. Говоря более формальным языком, для непрерывного процесса в стационарном состоянии скорость разведения  $D$ , определяемая как скорость притока

среды  $F$ , деленная на постоянный объем среды  $V$  в биореакторе,

$$D = F/V,$$

равна удельной скорости роста  $\mu$ :  $D = (dX/dt)(1/X) = \mu$ .

Чтобы получить непрерывную культуру с постоянными гидродинамическими характеристиками, нужно создать условия, при которых удельная скорость роста была бы ниже максимальной величины  $\mu_{max}$ . Для этого нужно так отрегулировать насос, который контролирует скорость притока  $F$ , чтобы объем культуры в биореакторе  $V$  поддерживался постоянным.

Важнейшей задачей промышленной ферментации является получение максимального количества продукта при минимуме затрат. Эту задачу можно решить, если для каждого конкретного процесса разрабатывать свою, наиболее эффективную конструкцию ферментера. Вообще говоря, непрерывная ферментация применяется в промышленных целях не так уж часто, прежде всего потому, что ученые накопили наибольший опыт в работе с периодическими культурами. При этом стоимость получения данного количества биомассы в ферментере непрерывного действия гораздо ниже, чем в ферментере, работающем в периодическом режиме. Такое удешевление обусловливается следующими факторами.

- Для получения данного количества продукта с помощью непрерывной ферментации нужны меньшие биореакторы, чем с помощью периодической.
- При периодической ферментации для сбора клеток, их разрушения и последующей очистки белкового продукта или метаболита, синтезированного микроорганизмом, необходимо крупногабаритное оборудование. В то же время в ферментере непрерывного действия синтез идет постепенно, так что и оборудование может быть не столь громоздким.
- Ферментер, работающий в непрерывном режиме, не простаивает, как ферментер, периодического действия, который нужно время от времени разгружать и подготавливать к повторному использованию. Простой биоре-

актора в связи с ремонтом, чисткой или стерилизацией — основная причина снижения эффективности процесса. При непрерывной ферментации этот простой гораздо меньше.

- Физиологический статус большинства клеток при непрерывной ферментации одинаков, поэтому синтез происходит более согласованно. При периодической же ферментации небольшие различия во времени сбора клеток, который проводят начиная с середины экспоненциальной фазы и заканчивая ее поздним этапом, могут приводить к значительной рассогласованности.

Непрерывную ферментацию уже использовали для промышленного получения белков одноклеточных микроорганизмов, антибиотиков и органических растворителей.

Впрочем, этот способ имеет и свои недостатки.

- Время ферментации в непрерывном режиме иногда составляет 500—1000 ч, при этом некоторые клетки могут потерять рекомбинантные плазмиды. Клетки, не несущие плазмид, обычно расходуют меньше энергии и делятся быстрее, чем те, которые содержат плазмиду, поэтому со временем выход продукта может снижаться из-за уменьшения числа клеток, способных его синтезировать. Эту проблему можно было бы решить, интегрировав клонированный ген в геном организма хозяина.

- Очень трудно поддерживать стерильные условия в промышленных установках в течение долгого времени. Кроме того, для непрерывных процессов необходимо стерильное резервное оборудование, что значительно увеличивает основные затраты.

- К качеству компонентов культуральной среды, используемой при крупномасштабной ферментации, не предъявляются столь высокие требования, как к компонентам среды при ферментации в лабораторных условиях; они могут изменяться от одного процесса к другому, что может приводить к изменению физиологии клеток и снижению производительности.

Репутация периодической ферментации как весьма надежной системы сдерживает переход к любому другому типу ферментации, даже при том что непрерывный режим работы более эффективен. И все-таки недавно было создано сразу несколько установок, лабораторных (до 10 л) и пилотных (до 1000 л), для непрерывной и периодической ферментации с добавлением субстрата — с целью получения белков с помощью рекомбинантных микроорганизмов. Это говорит о том, что более широкое применение непрерывных ферментеров и периодических ферментеров с добавлением субстрата в промышленности — это только вопрос времени.

## Повышение эффективности ферментации

Независимо от типа биореактора в ходе ферментации необходимо строго контролировать такие параметры, как концентрация растворенного кислорода, pH, температура и интенсивность перемешивания. Слишком сильное изменение любого из них может существенно снизить скорость роста клеток и стабильность белкового продукта.

Для оптимального роста *E. coli* и многих других микроорганизмов, используемых в качестве инструмента экспрессии рекомбинантных белков, обычно нужна хорошо аэрируемая культуральная среда. Максимальная скорость утилизации кислорода при ферментации  $Q_{\max}$  зависит от массы клеток  $X$ , максимальной удельной скорости роста  $\mu_{\max}$  и скорости роста, зависящей от количества потребленного кислорода  $Y_{O_2}$ . Эта зависимость выражается следующей формулой:

$$Q_{\max} = X\mu_{\max}/Y_{O_2}.$$

Поскольку кислород плохо растворим в воде (0,0084 г/л при 25 °C), он должен подаваться в среду непрерывно. Обычно для аэрации через ферментер продували стерилизованный воздух. Однако при этом в среде образуются пузырьки, и если они слишком велики, то скорость переноса кислорода к клеткам недостаточна для поддержания их роста. Таким образом, в ходе ферментации необходимо с помощью специального датчика контролировать содержание растворенного кислорода в среде, следить за его равно-



## ВАЖНАЯ ВЕХА

**Экспрессия гена гемоглобина стимулирует синтез белка в *E. coli* в условиях недостатка кислорода**C. Khosla, J.E. Curtis, J. DeModena, U.Rinas, J.E. Bailey *Bio/Technology* 8:849-853. 1990

Поскольку кислород плохо растворяется в воде, рост аэробных перфторуглеродов, повышающих растворимость кислорода; 4) тот кислород, который количеством растворенного в модификации конструкции присутствует в культуральной среде кислорода. ферментера таким образом, чтобы среда. Они перенесли ген, Эта проблема особенно актуальна обеспечивались оптимальная кодирующий гемоглобин-при большой плотности культуры аэрация и перемешивание неподходящее соединение, из или при крупномасштабной культуральной среды. Все эти граммотрицательной бактерии ферментации. Чтобы решить ее, подходы решают «кислородную *Vitreoscilla* sp. в несколько биотехнологи попытались проблему" лишь частично. Для рекомбинантных бактерий. увеличить количество каждого из них существует свой Бактериальный гемоглобин кислорода, поступающего в порог, по достижении которого связывал кислород среды и жидкую культуральную среду. выход продукта уже нельзя поддерживал высокую Предложенные подходы состояли повысить дальнейшим концентрацию его в клетках, что в следующем: 1) подача в добавлении кислорода. В стимулировало рост и экспрессию культуральную среду чистого качества альтернативы Бейли и др. чужеродного белка. Этот кислорода вместо воздуха; 2) предложили модифицировать подход проиллюстрировал подача воздуха (или кислорода) микроорганизм, использующийся возможность весьма под давлением; 3) добавление к для культивирования, неожиданного биологического решения трудной технической задачи.

мерным распределением по всему объему и тщательным перемешиванием культуры, обеспечивающим эффективное диспергирование пузырьков.

Большинство микроорганизмов растут лучше всего при pH от 5,5 до 8,5. Следует иметь в виду, однако, что клеточные метаболиты, поступая в культуральную среду, могут изменять ее pH. Таким образом, необходимо тщательно контролировать pH в ходе ферментации и при необходимости добавлять в ферментер кислоту или щелочь. При этом последние должны быть хорошо перемешаны со средой и равномерно распределены по всему объему.

Еще один параметр, от которого зависит успех ферментации, — температура. Если она ниже оптимальной, то рост микроорганизмов замедляется и интенсивность метаболизма снижается. Если же, напротив, температура слишком высока, то может произойти преждевременная индукция синтеза белка, если он находится под контролем температурочувствительного репрессора, или индукция белков теплового шока, что активизирует клеточные протеиназы и снизит выход белкового продукта.

Тщательное перемешивание культуры необходимо, во-первых, для равномерной доставки питательных веществ к клеткам и, во-вторых, для предотвращения накопления токсичных побочных продуктов метаболизма в каком-нибудь небольшом отсеке биореактора. Эффективное перемешивание относительно легко обеспечить при культивировании в небольших объемах, при крупномасштабном же культивировании поддержание гомогенности культуральной среды становится одной из главных проблем.

Перемешивание культуральной среды влияет и на другие параметры: скорость переноса кислорода из пузырьков газа в жидкую среду, а затем из среды в клетки; эффективность теплопередачи; точность измерения концентрации метаболитов в культуральной жидкости; эффективность диспергирования добавляемых реагентов (кислот, оснований, питательных веществ и т. д.). Исходя из всего этого, можно было бы предположить, что чем интенсивнее культура перемешивается, тем лучше она растет. Однако при чрезмерном перемешивании среды в ней могут возникнуть гидромеханические эффекты, губительные для бактериальных клеток и клеток



млекопитающих, или произойти повышение температуры, которое также скажется на их жизнеспособности. Таким образом, как всегда, нужно соблюдать баланс между необходимостью тщательно перемешивать среду и стремлением сохранить целостность клеток.

Есть еще один аспект, касающийся крупномасштабной ферментации, который не имеет отношения к технической стороне процесса, а касается того, используются ли при этом рекомбинантные микроорганизмы. В большинстве стран крупномасштабное культивирование рекомбинантных микроорганизмов сопряжено с необходимостью соблюдения определенных правил и инструкций. Хотя большинство рекомбинантных микроорганизмов не представляют никакой опасности, важно не допустить их случайного попадания в среду. Для этого используются надежные системы, предотвращающие утечку живых рекомбинантных организмов или ограничивающие их распространение, если утечка все же произошла. Кроме того, перед окончательным удалением из установки все рекомбинантные микроорганизмы должны быть инактивированы в соответствии с определенными инструкциями. Использованную культуральную среду тоже необходимо проверять на наличие в ней жизнеспособных микроорганизмов, чтобы исключить их попадание в окружающую среду.

### *Культуры с высокой плотностью*

Вообще говоря, при получении чужеродных белков с помощью рекомбинантных *E. coli* руководствуются тем, что при максимальной конечной плотности культуры получается и максимальное количество продукта. В ферментерах периодического действия с добавлением субстрата концентрация рекомбинантных клеток *E. coli* достигает 50 грамм сухого вещества на 1 л среды (а в некоторых случаях >100 г/л), (Вес сухого вещества клеток *E. coli* составляет примерно 20—25% веса влажного вещества.)

Один из способов повышения плотности культуры состоит в оптимизации культуральной среды. Следует иметь в виду, что некоторые питательные вещества, в том числе источники углерода и азота, при слишком больших концентрациях замедляют рост клеток. Глюкоза подавляет рост при концентрации >50 г/л, аммиак — при концентрации >3 г/л, железо -->1,15 г/л, магний -- >8,7 г/л, фосфор — >10 г/л, цинк — >0,038 г/л. Таким образом, простое увеличение содержания питательных веществ в культуральной среде при периодической ферментации не даст желаемого результата. Кроме того, поскольку состав сложных сред типа пептона или дрожжевого экстракта может немного различаться от раза к разу, ферментация в них не всегда бывает воспроизводимой.

Ацетат, который может подавлять рост клеток, продуцируется *E. coli* при росте в условиях недостатка кислорода, но избытка глюкозы. Проблему его образования можно решить, если использовать в качестве источника углерода глицерин вместо глюкозы, понизить температуру или использовать рекомбинантный штамм *E. coli*, способный превращать ацетат в менее токсичные вещества (см. гл. 6).

В культурах с высокой плотностью может также возникнуть недостаток кислорода. Чтобы избежать этого, увеличивают количество поступающего воздуха (разбрызгивание) либо скорость перемешивания или делают и то, и другое. Кроме того, можно подавать в культуру чистый кислород, а не воздух, в котором содержится только 20% кислорода, или выращивать клетки под давлением, чтобы увеличить растворимость кислорода. В качестве альтернативы предлагалось экспрессировать в хозяйских клетках *E. coli* ген гемоглобина *Vitreoscilla*, что значительно увеличило бы поглощение кислорода растущими клетками.

Высокой плотности чаще всего удается достичь при росте в периодическом режиме с добавлением субстрата. Режим подачи питательных веществ может быть разным: непрерывным, ступенчатым или экспоненциальным. При непрерывном режиме в среду в течение всей ферментации вносят одинаковые количества питательных веществ. Однако в этих условиях удельная скорость роста непрерывно снижается. При ступенчатом режиме питательные вещества добавляют по мере увеличения концентрации клеток во все большем количестве, так что снижение удельной скорости роста в значительной мере компенсируется. При экспоненциальном режиме питательные вещества добавляют в количестве, обеспечивающем постоянную скорость роста клеток. Периодическую подачу питательных веществ можно автоматизировать.

ровать, основываясь на результатах измерения концентрации лимитирующего субстрата (например, глюкозы) в среде в ходе ферментации.

### Биореакторы

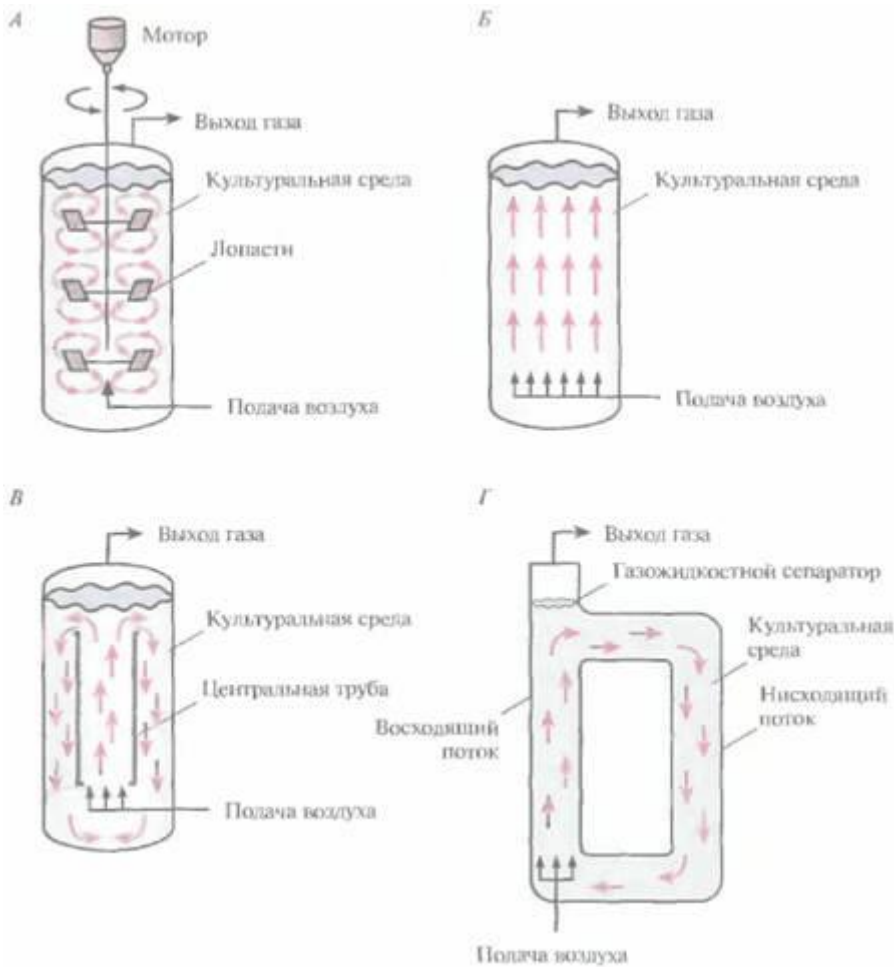
При беглом просмотре литературы по биотехнологии создается впечатление, что число типов биореакторов безгранично. Однако на самом деле все биореакторы можно подразделить на три основных группы:

- реакторы с механическим перемешиванием (рис. 16А, А)
- барботажные колонны, через которые для перемешивания содержимого пропускается воздух или другой газ (рис. 16.4, Б)
- эрлифтные реакторы с внутренней (рис. 16.4, В) или внешней (рис. 16.4, Г) рециркуляцией; перемешивание и циркуляция культуральной среды в них обеспечивается потоком газа (обычно воздуха), за счет которого между верхним и нижним слоями культуральной среды возникает градиент плотности.

Чаще всего используются биореакторы первого типа. Они обладают следующими преимуществами:

- позволяют легко менять технологические условия
- всегда есть в продаже
- обеспечивают эффективную доставку газа к растущим клеткам (если говорить на инже-

Рис. 16.4. Разные типы биореакторов (упрощенная схема), А. Реактор с механическим перемешиванием . Б. Барботажная колонна. В. Эрлифтный реактор с внутренней рециркуляцией. Г. Эрлифтный реактор с внешней системой рециркуляции. Стрелки -- направление потока культуральной среды.



нерном языке, обладают высоким объемным коэффициентом массообмена,  $k_L a$ ) • уже давно используются для выращивания различных микроорганизмов.

В реакторах с механическим перемешиванием газ (как правило, воздух) подают в культуральную среду под давлением через разбрызгиватель - - кольцо с множеством маленьких отверстий либо трубку с одним отверстием. В первом случае образуются мелкие пузырьки воздуха и обеспечивается их более равномерное распределение, однако разбрызгиватели в виде трубок используются чаще, поскольку они реже закупориваются. Для равномерного распределения газа по всему объему биореактора используются мешалки — одна или несколько. Они разбивают крупные пузырьки воздуха, разносят их по всему реактору и увеличивают время пребывания в культуральной среде. При сильном перемешивании средний размер пузырьков в больших биореакторах практически не зависит от размера отверстий в разбрызгивателе. Эффективность распределения газа зависит прежде всего от типа мешалки, числа оборотов и физико-химических свойств среды. Если размер биореактора слишком велик, а газ, поступающий из разбрызгивателя, распределяется по объему неравномерно, то даже при энергичном перемешивании гомогенизировать среду не удастся.

Многие культуральные среды весьма агрессивны, и во избежание коррозионного или механического повреждения стенок биореактора его обычно изготавливают из нержавеющей стали или стекла. Стекланные части чаще используют только в лабораторных биореакторах емкостью меньше 50 л.

Размер биореактора лимитируется его способностью эффективно отдавать тепло, выделяемое микроорганизмами в ходе метаболизма и высвобождаемое в результате перемешивания. Если теплоотдача недостаточна, температура среды может превысить критическую, что уменьшит выход продукта. Для отвода тепла используют охлаждающую рубашку или змеевики, помещаемые внутрь реактора. Внутреннее охлаждение более эффективно, однако змеевики часто покрываются слоем растущих клеток, что затрудняет охлаждение, а иногда мешает интенсивному перемешиванию культуральной среды.

Большую опасность представляет загрязнение ферментера грибами или бактериями. Поэтому биореакторы конструируют таким образом, чтобы их можно было стерилизовать; обычно для этого используют пар под давлением. Внутри реактора не должно быть «мертвых зон», недоступных для пара во время стерилизации. Обработке подлежат все клапаны, датчики, входные и выходные отверстия. При конструировании перед инженерами зачастую возникает проблема: использовать максимальное число датчиков для полного контроля за процессом ферментации или ограничиться их минимальным набором, чтобы легче было поддерживать стерильность.

При интенсивном перемешивании культуральной среды в процессе ферментации часто происходит ее вспенивание. Это может привести к переувлажнению фильтра в отверстии, через которое воздух выходит из биореактора, и уменьшению его потока, а также к попаданию в реактор посторонних микроорганизмов. Для контроля пенообразования используют химические пеногасители или механические сбиватели пены. Однако в присутствии химических реагентов может ухудшаться перенос кислорода, а иногда происходить ингибирование клеточных ферментов, что уменьшает скорость роста микроорганизмов. Кроме того, если пеногасители не удалять, они могут загрязнять конечный продукт. Проблему вспенивания можно решить, если оставить в верхней части биореактора достаточно большое пустое пространство, в котором лопались бы пузырьки воздуха. Правда, в этом случае рабочий объем реактора уменьшится примерно на 25%,

Все эти соображения относятся и к «пневматическим» реакторам типа барботажных колонн и эрлифтных биореакторов. Таким образом, обеспечение стерильности, постоянства pH и температуры — ключевые требования при любом способе культивирования независимо от конструкции биореактора.

Конструкционные особенности барботажных колонн и эрлифтных биореакторов дают им некоторые преимущества перед реакторами с механическим перемешиванием, «Пневматические» реакторы более экономичны, поскольку

перемешивание в них происходит с помощью восходящего потока воздуха (или другого газа в случае анаэробных микроорганизмов), а не механической мешалки, потребляющей много энергии. Кроме того, в отсутствие механической мешалки исключается и один из путей проникновения в биореактор посторонних микроорганизмов. В пневматических биореакторах в культуральной среде не возникает столь сильных гидродинамических возмущений (сдвига слоев жидкости друг относительно друга), при этом в эрлифтных биореакторах перемешивание происходит более равномерно по всему объему. Уменьшение сдвиговых эффектов очень важно по следующим причинам:

- \* клетки рекомбинантных микроорганизмов более хрупки, чем нетрансформированные клетки, поскольку часть их энергетических ресурсов расходуется на синтез чужеродных белков и в результате образуется менее прочная клеточная стенка

- \* самый распространенный ответ клетки на внешнее воздействие — уменьшение количества всех синтезируемых белков, в том числе и рекомбинантных

- \* под действием сдвиговых эффектов могут изменяться физические и химические свойства клеток, что затруднит дальнейшую работу с ними. Например, может увеличиться количество полисахаридов на поверхности клеток, что приведет к ухудшению условий их выделения и лизиса, а также затруднит очистку рекомбинантного белка.

В барботажных колоннах воздух подается под высоким давлением в нижнюю часть биореактора; по мере подъема маленькие пузырьки воздуха объединяются, что приводит к неравномерному его распределению. Кроме того, подача воздуха под высоким давлением может привести к слишком сильному пенообразованию. Все это ограничивает универсальность данных конструкций и сужает диапазон реализуемых технологических условий, а также уменьшает возможный размер барботажных колонн.

Эрлифтные биореакторы могут использоваться как в экспериментальных установках, так и в целях промышленной ферментации. Газ в

них подается в нижнюю часть вертикального канала. Поднимаясь, он увлекает за собой жидкость к верхней части канала — газожидкостному сепаратору, и здесь частично выходит в воздух. Более плотная деаэрированная жидкость опускается по другому вертикальному каналу ко дну реактора, и процесс повторяется. Таким образом, культуральная среда вместе с клетками непрерывно циркулирует в биореакторе.

Эрлифтные биореакторы бывают двух основных типов. В первом случае реактор представляет собой одну емкость с центральной трубкой, которая обеспечивает циркуляцию жидкости (реакторы с внутренней рециркуляцией) (рис. 16.4, *В*). Во втором культуральная среда проходит через отдельные, независимые каналы (реактор с внешней рециркуляцией) (рис. 16.4, *Г*). Конструкция эрлифтных реакторов с внутренней рециркуляцией проще, но если уж реактор построен, его объем и скорость циркуляции остаются неизменными. Напротив, биореактор с внешней рециркуляцией можно модифицировать и создавать разные условия ферментации.

Эрлифтные биореакторы, вообще говоря, более эффективны, чем барботажные колонны, особенно в случае суспензий микроорганизмов с большой плотностью или вязкостью. Перемешивание в них более эффективно и проблема слипания пузырьков не столь велика. В особенно больших эрлифтных ферментерах, таких как ферментер на 500 000 л фирмы IC1 (Англия), сконструированный для получения белков одноклеточных микроорганизмов, для прохождения клетками полного цикла в реакторе требуется весьма значительное время. Чтобы обеспечить их субстратами на все время их перемещения с током жидкости, субстраты вводились по всей длине реактора сразу во многих точках.

## Типичные крупномасштабные системы ферментации

Рекомбинантные микроорганизмы широко используются для получения разнообразных белковых продуктов, применяющихся в медицине (например, инсулина), а также в качестве своего рода «фабрик» по производству имеющих коммерческую ценность метаболитов (например, антибиотиков). Белки синтезируются наиболее

интенсивно в период от середины экспоненциальной фазы до ее завершения, а метаболиты — в период замедления роста и в стационарной фазе. Все это должно учитываться при выборе параметров крупномасштабных процессов ферментации.

Оптимизация синтеза необходимого продукта — серьезная научная проблема. Если речь идет о белках, то для ее решения обычно используют клонированные гены, находящиеся под контролем сильных регулируемых промоторов. Вначале полагали, что для получения нужного количества продукта будет достаточно конститутивной экспрессии клонированного гена. Однако опыт показал, что при непрерывной транскрипции и трансляции клонированного гена истощаются все энергетические ресурсы клетки и ее рост замедляется. Чтобы приурочить экспрессию клонированного гена к определенной фазе роста, можно использовать механизм индукции. Для этого вначале выращивают клетки в оптимальных условиях до относительно высокой плотности, а затем индуцируют транскрипцию, либо изменяя температуру, либо добавляя в среду тот или иной химический индуктор в зависимости от природы промотора (например, изопропил-β-тиогалактопиранозид).

Двухступенчатая ферментация в большом биореакторе (> 100 л) встречается с определенными трудностями, поскольку технически очень сложно быстро повысить температуру (обычно с 30 до 42 °С) в большом объеме или обеспечить быстрое и равномерное распределение химического индуктора. Эту проблему можно решить, если использовать два сообщающихся биореактора (двухступенчатая ферментация): клетки выращивают в одном из них, а индукцию осуществляют в другом. Это позволяет оптимизировать процессы роста и индукции по отдельности и увеличить количество продукта, синтезируемого за единицу времени.

### ***Двухступенчатая ферментация в тандемных эрлифтных биореакторах***

Штамм *E. coli* NM989, несущий ген ДНК-лигазы T4 под транскрипционным контролем промотора  $p^L$  и температурочувствительного репрессора  $cI$ , выращивали и индуцировали в двухступенчатом эрлифтном биореакторе (рис. 16.5). Ген

ДНК-лигазы был встроен в хромосомную ДНК, что снимало все проблемы, связанные с нестабильностью плазмид в ходе длительной ферментации. Клетки выращивали при 30 °С в эрлифтном биореакторе с внешней рециркуляцией и рабочим объемом 10 л. В этих условиях ген ДНК-лигазы не экспрессировался. Для индукции при 42 °С использовали эрлифтный биореактор с внешней рециркуляцией и рабочим объемом около 5 л. Биореакторы были соединены трубкой с насосом, который обеспечивал непрерывность подачи суспензии из первого биореактора во второй. Клеточную суспензию, достигшую определенной плотности, удаляли из биореактора, где проходила индукция, и подвергали дальнейшей обработке.

Максимальная удельная скорость роста культуры ( $\mu_{\max}$ ) составляла примерно  $0,66 \text{ ч}^{-1}$  в первом биореакторе и  $0,54 \text{ ч}^{-1}$  во втором, что соответствовало времени удвоения 63 и 77 мин. Свежую среду непрерывно добавляли в ферментер, где росли клетки, со скоростью 2 л/ч, а из ферментера, где происходила индукция, отбирали такой же объем суспензии. Поскольку рабочие объемы биореакторов различались, клетки находились примерно 5 ч в биореакторе, где происходил рост, и 2 ч в биореакторе, где осуществлялась индукция. Различие во времени пребывания клеток в биореакторах было необходимо для оптимизации числа клеток, выхода продукции и стабильности ДНК-лигазы. Само время пребывания клеток в разных реакторах можно варьировать изменением их относительного рабочего объема и объема поступающих в первый биореактор питательных веществ.

Использованный в этой работе эрлифтный ферментер с двойной наружной рециркуляцией (рис. 16.5) позволил упростить регуляцию относительных рабочих объемов ферментеров, а также повысить гибкость системы (обеспечивать разные условия роста для разных популяций рекомбинантных клеток). При синтезе ДНК-лигазы наилучшие результаты были получены при ежеминутном поступлении примерно 33 мл клеточной суспензии из первого биореактора во второй. Это эквивалентно всего 0,67% объема биореактора, где осуществлялась индукция, что обеспечивало практически мгновенный подъем температуры всей поступающей суспензии с 30

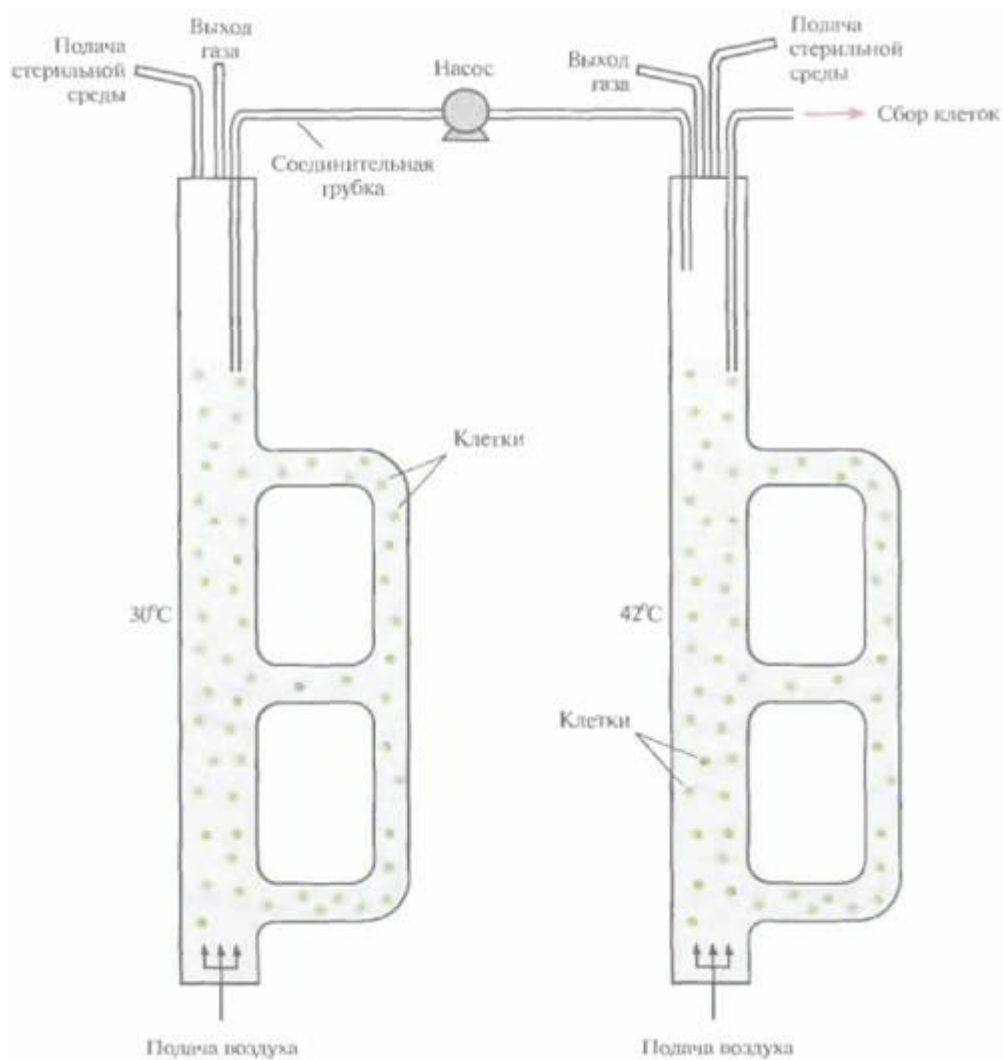


Рис. 16,5. Система из двух эрлифтных биореакторов, использующаяся для температурной индукции синтеза белкового продукта. Из ферментера, в котором осуществляется культивирование при 30 °С (слева), клетки поступают в ферментер с температурой 42 °С (справа), где происходит индукция. У обоих биореакторов имеется двойное внешнее рециркуляционное устройство, оснащенное задвижками. Изменяя положение задвижек, можно создавать рабочий объем, оптимальный для данных условий.

до 42 °С. Для поддержания роста клеток, находящихся во втором биореакторе, в экспоненциальной фазе в него непрерывно добавлялось нужное количество питательных веществ в концентрированной форме. Это предотвращало расщепление ДНК-лигазы протеолитическими ферментами, которые обычно синтезируются клетками в фазе замедления и в стационарной фазе.

При росте в таком двухступенчатом биореакторе непрерывного действия культура штамма *E. coli* NM989 может достигать плотности 4 г (сухого вещества) на 1 л, а на долю ДНК-лигазы T4 может приходиться до 4% суммарного белка в клетке, что соответствует примерно 25 000 ЕД ферментативной активности на 1 г (сухого вещества). Вообще же с помощью описанного подхода можно синтезировать примерно 100 000 ЕД



ферментативной активности на 1 л культуры, т. е. до 4 800 000 ЕД в сутки. С учетом того что после очистки фермента уровень активности уменьшается до 20% и что стоимость единицы активности равна примерно 0,25 долларов, получаем, что ежедневно можно синтезировать количество фермента на сумму 240 000 долларов. Мы не учли всех затрат на само производство белка, однако ясно и так, что прибыль от реализации ценных продуктов, полученных при непрерывной ферментации в биореакторах малого или среднего размера, значительно превышает затраты.

*Двухступенчатая ферментация в одном реакторе с механическим перемешиванием*

Трехкомпонентный рекомбинантный белок AGβgal, использующийся при проведении иммунологических тестов, синтезировали в промышленных масштабах в одном биореакторе с механическим перемешиванием. Ген этого белка был сконструирован методами генной инженерии и содержал сегменты, кодирующие пять сайтов связывания иммуноглобулина G (IgG) А-белка *Staphylacoccus aureus*, два сайта связывания IgG G-белка штамма G148 *Streptococcus* и β-галактозидазу *E. coli*. Он находился под контролем промотора p<sup>R</sup> бактериофага λ, регуляция которого осуществляется так же, как регуляция p<sup>L</sup>-промотора, и был встроен в плазмиду, несущую ген устойчивости к ампициллину; этой конструкцией трансформировали клетки *E. coli*. Штамм с плазмидой, несущей ДНК AGβgai, содержал вторую плазмиду, несущую ген температурочувствительного белка-репрессора cI и ген устойчивости к канамицину.

Культуру в объеме 5 л выращивали при 30 °С в присутствии ампициллина и канамицина, с тем чтобы обеспечить условия для сохранения обеих плазмид, а затем использовали в качестве посевного материала для инициации роста культуры без антибиотиков при 30 °С в реакторе с рабочим объемом 45 л. Суспензия клеток из 45-литрового ферментера в свою очередь служила посевным материалом для культивирования в биореакторе на 600 л, в котором клетки продолжали выращивать при 30 °С без антибиотиков (рис. 16.6). (Вообще говоря, для уменьшения стоимости процесса антибиотики при крупно-

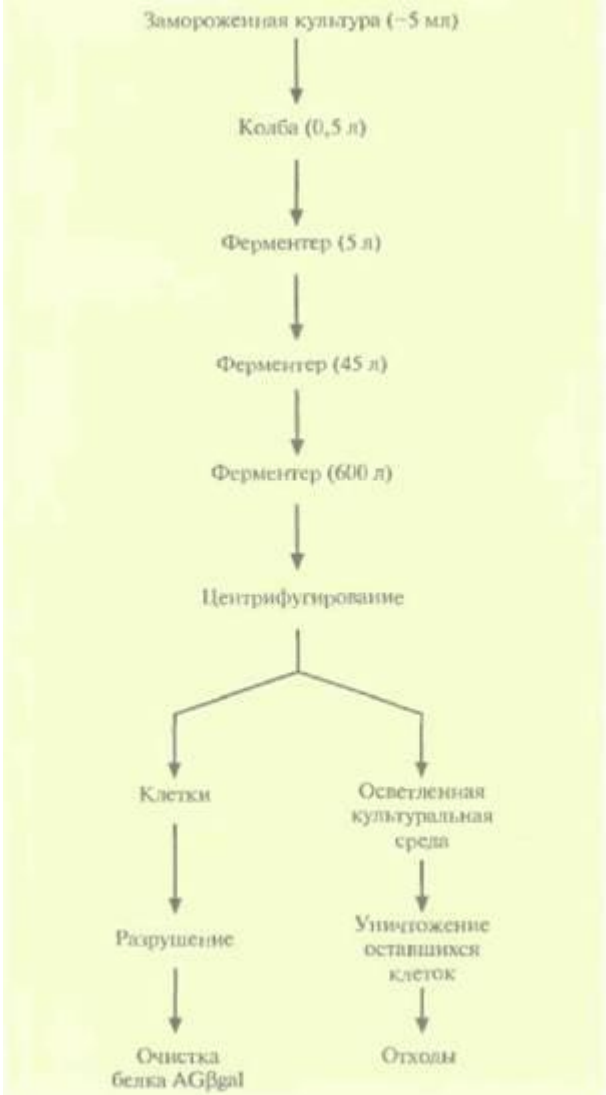


Рис. 16.6. Схематическое представление промышленного синтеза белка AGβgai. В скобках указан объем культуральной среды на каждом этапе. На ее долю приходится от 60 до 75% объема соответствующих биореакторов (ферментеров).

масштабном культивировании в среду не добавляют.) Как только плотность культуры в биореакторе на 600 л достигала примерно 4 г/л, температуру повышали с 30 до 40 °С, чтобы индуцировать экспрессию гена белка AGβgal. На повышение температуры в этих условиях уходило около часа. Индукцию проводили при 40, а не при 42 °С, по-

сколько при более низкой температуре синтезировалось такое же количество белка AGβgal, но клетки могли расти в течение более длительного периода. Иными словами, при более низкой температуре индукции {40 °C) выход белкового продукта был больше.

Удельная активность белка AGβgal в течение 2 ч после начала индукции повышалась, а затем снижалась. Возможно, это было связано с синтезом протеаз клетками, перешедшими в фазу замедленного роста или в стационарную фазу. Кроме того, примерно 50% клеток, росших в течение 4 ч при 40 °C, утратили плазмиду. Но даже при этом после 4-часового культивирования при 40 °C на долю AGβgal-белка приходилось примерно 20% всей массы сухого вещества. Учитывая все это, можно не интегрировать гены белка AGβgal и репрессора cI в хромосомную ДНК хозяйской клетки *E. coli* с целью увеличения выхода продуктов.

Периодическая ферментация и периодическая ферментация с добавлением субстрата

В некоторых случаях для достижения высокой плотности культуры и получения больших количеств продукта достаточно проводить ферментацию в обычном периодическом режиме. В одном из экспериментов плазмиду, несущую ген гибридного белка, одним из компонентов которого был пептид инсулина В, помещали под контроль *trp*-промотора *E. coli* и вводили в *trp*<sup>-</sup>штамм *E. coli*; трансформированные клетки

культивировали в среде с разным содержанием триптофана. При высоких концентрациях последнего гибридный белок не синтезировался; последующее поглощение триптофана из среды растущими клетками приводило к индукции синтеза необходимого белка. Добавление триптофана в среду приводило к увеличению количества как биомассы, так и синтезируемого белка, а использование периодических ферментеров с добавлением постоянного количества субстрата еще более усиливало этот эффект (табл. 16.1).

Сбор клеток

Чтобы очистить продукт ферментации, нужно прежде всего отделить клетки от культуральной среды. Сбор генетически модифицированных и исходных, нетрансформированных клеток можно проводить одними и теми же методами. Однако трансформированные клетки часто обладают другими физиологическими свойствами (они имеют другой размер или синтезируют внеклеточные полисахариды), и в результате условия, оптимальные для сбора нетрансформированных клеток, могут не подходить для клеток, синтезирующих чужеродный белок.

Для выделения клеток из больших объемов культуральной среды часто используют высокоскоростное центрифугирование. Для этого сконструированы специальные высокоскоростные центрифуги полунепрерывного действия. Суспензию клеток непрерывно подают в барабан работающей центрифуги, клетки концент-

Таблица 16. 1. Синтез рекомбинантного белка, одним из компонентов которого является пептид инсулина В, при периодической ферментации и при периодической ферментации с добавлением субстрата<sup>1)2)</sup>

| Конечный показатель                         | Выход                     |                                 |   |
|---|---------------------------|---------------------------------|---|
|   | периодическая ферментация | периодическая ферментация + Trp | периодическая ферментация с добавлением субстрата |
| Биомасса, г/л                               | 6,7                       | 12                              | 20  |
| Содержание рекомбинантного белка, %         | 4,6                       | 7,9                             | 11  |
| Общее количество рекомбинантного белка, г/л | 0,17                      | 0,53                            | 1,21  |
| Доля клеток, несущих плазмиду, %            | 86                        | 62                              | 90  |

<sup>1)</sup> Поданным работы Cosset et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39: 541-546, 1993. <sup>2)</sup> Количество биомассы измеряется в граммах сухого вещества на литр культуры. Процедура «Периодическая ферментация + Trp» означает, что к культуре добавлено 0,1 г триптофана. При периодической ферментации с добавлением субстрата в среду добавляли 0,1 г триптофана каждые 2 ч — в общей сложности пять раз в течение 10 ч. При добавлении большего количества триптофана не увеличивались ни биомасса, ни количество синтезированного белка.

рируются в нем, а осветленная среда удаляется. Когда барабан заполняется осажденными клетками, центрифугу останавливают и клетки собирают. Основное неудобство данного способа -необходимость останавливать процесс, а затем снова начинать его. Кроме того, недостатками являются высокая стоимость оборудования и потребляемой им энергии, вероятность утечки микроорганизмов в окружающую среду, невозможность полного удаления клеток из среды.

Альтернативный метод выделения клеток из культуральной среды — фильтрация через мембрану. К сожалению, при обычной фильтрации клетки со временем забивают поры мембранного фильтра, накапливаются на его поверхности, и в результате скорость процесса быстро снижается (рис. 16.7, А). Фильтрацию можно ускорить, проводя ее под давлением, но это лишь временный эффект; клетки все равно будут накапливаться на поверхности мембраны, а кроме

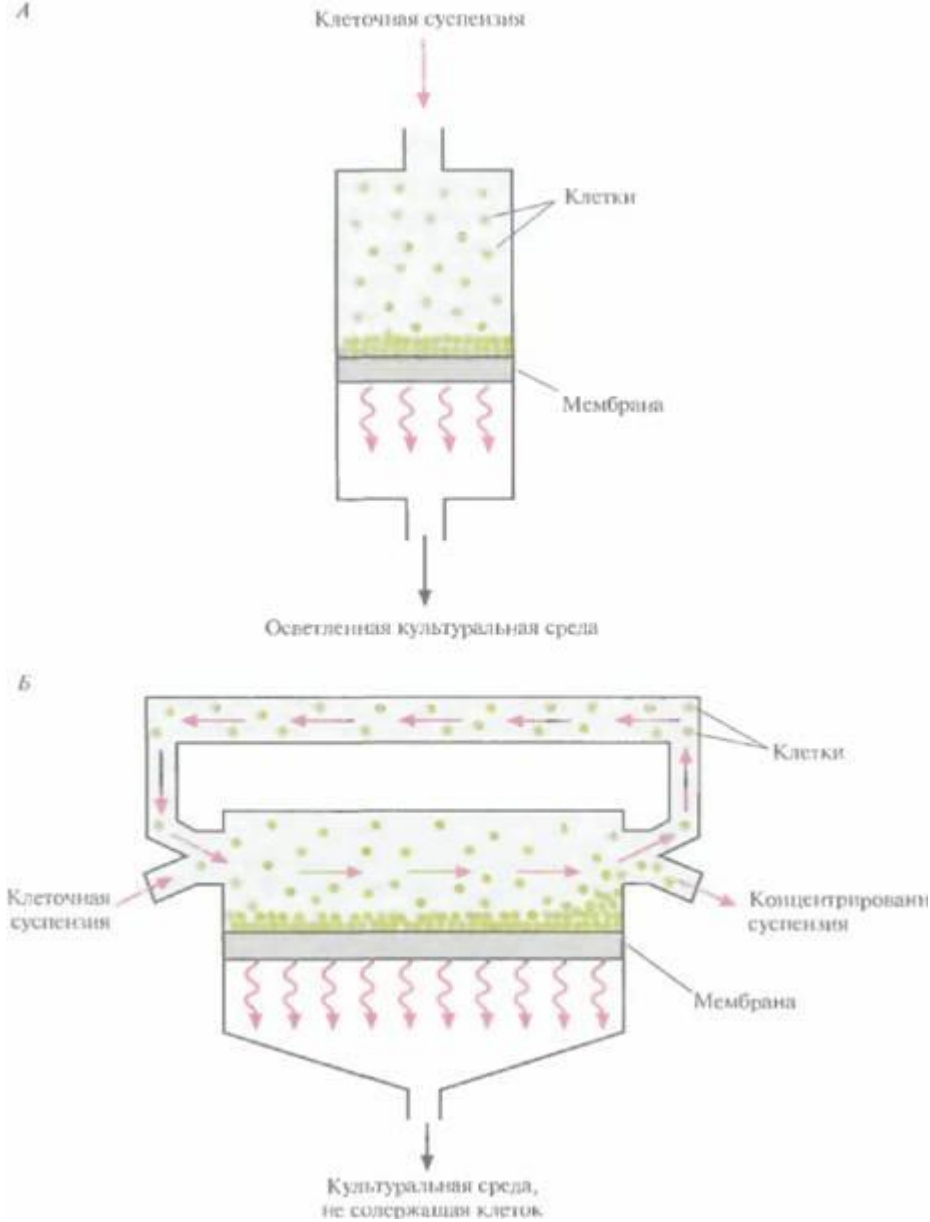


Рис. 16.7. Способы фильтрации, применяющиеся для сбора клеток. А. Фильтрация с необратимым забиванием фильтра. Б. Фильтрация с параллельным потоком клеточной суспензии. Стрелки — направление потока.

того, под давлением они образуют более плотный и менее проницаемый слой.

Чтобы решить эту проблему, клеточную суспензию пропускают с высокой скоростью параллельно поверхности мембраны (рис. 16.7, Б), так что через мембрану за один раунд проходит только небольшая часть циркулирующей жидкости. Остальная ее часть очищает мембрану от накопившихся клеток (см. рисунок), и в результате скорость фильтрации падает не так быстро, как при необратимом забивании фильтра. После многочисленных раундов фильтрации через мембрану проходит почти вся культуральная среда. Этот метод используется пока только в лаборатории; в промышленных процессах для сбора клеток применяют центрифугирование.

Дальнейшие действия зависят от природы и локализации продукта. Если продукт представляет собой белок, находящийся в культуральной среде, то среду концентрируют, а белок очищают хроматографическими или другими методами. Если продукт — это низкомолекулярное соединение, находящееся в культуральной среде, то используют соответствующие методы экстракции. Наконец, если продукт имеет внутриклеточную локализацию, то прежде чем очищать его, клетки разрушают.

## Разрушение клеток

Для разрушения клеток используют разнообразные химические, биологические и физические методы. Все процедуры должны быть достаточно жесткими, чтобы разрушить клеточную стенку, и в тоже время достаточно мягкими, чтобы исключить денатурацию белка. А поскольку клеточные стенки у разных микроорганизмов состоят из разных полимеров, никакого универсального метода их разрушения не существует.

- У грамположительных бактерий клеточная стенка состоит из толстого пептидогликанового слоя N-ацетил глюкозам и на и остатков N-ацетилмуравовой кислоты, соединенных пептидными мостиками.

- У грамотрицательных бактерий клеточная стенка тоньше и покрыта снаружи слоем липидов.

- Стенка дрожжевых клеток состоит из плотного слоя частично фосфорилированных маннанов и β-глюканов.

- \* Низшие грибы имеют многослойные клеточные стенки, состоящие из α- и β-глюканов, гликопротеидов и хитина.

Состав и прочность клеточной стенки зависят от условий культивирования, скорости роста клеток, фазы, на которой они собираются, условий хранения сконцентрированных клеток и от того, экспрессировал ли выделенный микроорганизм клонированный ген.

Химические методы разрушения клеточных стенок включают обработку щелочью, органическими растворителями или детергентами. Если белковый продукт не разрушается при pH от 10,5 до 12,5, то можно без труда и дешево лизировать большие количества бактериальных клеток. Например, рекомбинантный гормон роста человека очень просто выделить из клеток *E. coli* обработкой гидроксидом натрия при pH 11. После обработки щелочью не остается практически ни одной жизнеспособной клетки, что автоматически решает проблему утечки рекомбинантных микроорганизмов. Обработка органическими растворителями — это простой и недорогой способ разрушения клеток, который используется для выделения ферментов из дрожжей. Однако, чтобы убедиться в том, что в подобранных условиях, белковый продукт не денатурирует, необходимо провести предварительное тестирование. Под действием детергентов в мембранах бактериальных клеток образуются поры, через которые белки и другие молекулы выходят из клетки. К сожалению, детергенты дороги, в большинстве случаев в их присутствии белки денатурируют, а кроме того, они могут загрязнять конечный продукт.

Основным биологическим методом разрушения клеток микроорганизмов является лизис с помощью ферментов. Так, лизоцим яичного белка легко гидролизует клеточные стенки грамположительных бактерий. Для разрушения клеточных стенок грамотрицательных бактерий используют лизоцим и этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА), а клеточные стенки дрожжей гидролизуют с помощью одного или

нескольких ферментов:  $\beta$ -1,3-глюканазы,  $\beta$ -1,6-глюканазы, манназы и хитиназы. Ферментативная обработка высокоспецифична, а лизис проходит в мягких условиях. Пока использование ферментов для лизиса клеток сдерживается их высокой стоимостью, но с применением рекомбинантных микроорганизмов для промышленного синтеза ферментов, разрушающих клеточные стенки, эта проблема будет решена.

Клетки можно разрушить и физическими методами: немеханическими (например, с помощью осмотического шока или быстрого многократного замораживания и оттаивания) или механическими (обработкой ультразвуком, с помощью шаровой мельницы, гомогенизации под давлением, соударения). Обычно после обработки немеханическими методами многие клетки остаются неповрежденными. Напротив, механическое разрушение высокоэффективно, что делает его более привлекательным. Особенно часто ультразвуковые излучатели, генерирующие высокочастотные звуковые волны, используют для обработки малых объемов. Клетки разрушаются при этом под действием гидродинамических сил (сдвига слоев жидкости друг относительно друга, кавитации и т. д.).

Для разрушения большого количества клеток обычно используют шаровые мельницы. Концентрированную клеточную суспензию заливают в камеру высокоскоростной шаровой мельницы, заполненную инертным абразивным материалом (например, стеклянными шариками диаметром  $<1$  мм). Содержимое быстро перемешивают с помощью лопастей, насаженных на ось. Большинство клеток разрушается под действием сдвиговых напряжений, возникающих в результате быстрого движения шариков. Условия оптимального разрушения клеток можно подобрать, варьируя число и форму лопастей, скорость перемешивания, размер шариков, их число, концентрацию клеток, геометрию камеры и температуру. Приборы такого типа успешно использовались для разрушения клеток самых разных микроорганизмов. С их помощью можно легко разрушать клетки как нерекомбинантных, так и рекомбинантных микроорганизмов.

При гомогенизации под высоким давлением концентрированную клеточную суспензию продавливают через небольшое отверстие под высоким давлением, а затем давление резко сбрасывают, что и вызывает лизис. Условия обработки можно оптимизировать применительно к разным микроорганизмам. Для этого изменяют рабочее давление, размер и форму отверстия, температуру клеточной суспензии, число продавливаний.

Еще один механический метод разрушения клеток -- соударение. Клеточную суспензию большой вязкости направляют под давлением на неподвижную поверхность или навстречу потоку другой суспензии. В месте соприкосновения выделяется большое количество энергии, разрушающей клетки. Таким способом с помощью устройства под названием Microfluidizer за один прием была разрушена большая часть клеток *E. coli* в двух встречных потоках суспензии. Однако для разрушения клеток других микроорганизмов может понадобиться большее число раундов. В отличие от гомогенизаторов под высоким давлением и высокоскоростных шаровых мельниц, в которых, как правило, используются концентрированные клеточные суспензии, данное устройство пригодно для обработки любых суспензий. Как показали предварительные исследования, активность клеточных белков уменьшается при разрушении клеток по этой методике лишь незначительно. А если обработать суспензию клеток небольшим количеством лизоцима, а затем использовать устройство Microfluidizer в режиме пониженного по сравнению с обычным давления и при небольшой вязкости, то сохранится активность некоторых лабильных белков, инактивирующихся при высоком давлении.

### Дальнейшая обработка

После разрушения клеток их осколки удаляют либо низкоскоростным центрифугированием больших объемов, либо микрофльтрацией через мембрану. Белковый продукт осаждают из грубого или осветленного лизата органическими растворителями (спиртом или ацетоном) или сульфатом аммония. Достижимое при этом обогащение — 2—5 раз. К сожалению, дороговизна



агентов, используемых для осаждения, может значительно увеличить стоимость процесса. В качестве альтернативы для концентрирования и выделения суммарных белков можно использовать ультрафильтрацию с параллельным потоком через мембраны с меньшим средним размером пор, чем у мембран, применяющихся для концентрации клеток или удаления их осколков (рис. 16.7, Б). Этот подход пока находится в стадии разработки, однако уже ясно, что он пригоден для работы с объемами от одного до нескольких тысяч литров, процесс может идти непрерывно (что позволяет уменьшить размеры установки) и обеспечивать 10—100-кратное обогащение (в зависимости от размеров и свойств выделяемого белка).

Необходимая степень очистки белкового продукта зависит от того, где его намереваются использовать. В одних случаях это может быть довольно грубый препарат, в других (например, если речь идет о белках, используемых в медицине) — препарат высокой степени чистоты.

Некоторые белки, синтезирующиеся в клетках в избыточном количестве, образуют нерастворимые частицы (тельца включения). После разрушения клеток их легко можно отделить от большинства других клеточных компонентов. Вначале исследователям не удавалось дезагрегировать выделенные тельца включения так, чтобы при этом не произошла необратимая денатурация белков, но позже были разработаны методы, позволяющие ренатурировать рекомбинантный белок и восстановить его активность. Ясно, что все эти дополнительные процедуры увеличивают стоимость процесса очистки.

### Солюбилизация белков

В некоторых случаях при гиперпродукции рекомбинантных белков образуются как растворимые, так и нерастворимые продукты, что усложняет процедуру очистки. Например, при экспрессии в клетках *E. coli* гена инсулиноподобного фактора роста I (IGF-I) человека мол. массой 7,6 кДа примерно 90% рекомбинантных молекул локализуется в периплазме, а 10% секретируется. Чтобы выделить растворимую и нерастворимую формы IGF-I из периплазмы, для солюбилизации нерастворимой формы *in situ* добавляли мочевины и дитиотрейтол до высоких концентраций при щелочном pH. При этом клетки погибали, но не разрушались, так что цитоплазматические белки оставались внутри клеток. В результате образовывался очень вязкий раствор, что затрудняло осаждение клеток и их осколков центрифугированием. Чтобы решить эту проблему, разработали процедуру двухфазной жидкостной экстракции, позволяющую разделять растворимые и нерастворимые продукты. И солюбилизация *in situ*, и двухфазная жидкостная экстракция высокоэффективны; с их помощью можно выделить от 80 до 95% IGF-I из культуры объемом от 10 до 1000 л.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для крупномасштабного культивирования рекомбинантных микроорганизмов в промышленных биореакторах (>1000 л) недостаточно просто экстраполировать условия роста в лабораторных ферментерах (0,1 — 1,0 л). При конструировании промышленных биореакторов необходимо учитывать такие параметры, как температура, pH, скорость и характер перемешивания, потребность аэробных организмов в кислороде, количество питательных веществ.

Ферментацию можно проводить по-разному. При периодической ферментации посевной материал вводят в свежую культуральную среду и проводят культивирование, не добавляя субстрат до тех пор, пока количество нужного продукта не достигнет максимума. В этих условиях рост культуры проходит шесть этапов; латентную фазу, фазу ускорения, логарифмическую (log) фазу, фазу замедления, стационарную фазу и фазу отмирания. Больше всего белков синтезируется во время логарифмической фазы, а многие низкомолекулярные продукты — во время стационарной. При таком способе ферментации необходимо тщательно следить за тем, чтобы клетки были собраны в нужное время. При периодической ферментации с добавлением субстрата в биореактор добавляют свежую культуральную среду через разные интервалы времени, как правило для того, чтобы продлить логарифмическую фазу. Непрерывная ферментация предполагает добавление свежей среды в течение всего процесса и одновременное удаление клеток и отработанной среды.



Каждая из этих систем ферментации имеет свои недостатки и достоинства, которые нужно учитывать, применяя ее для промышленного синтеза рекомбинантных продуктов. Несмотря на то что непрерывная ферментация применяется в промышленном масштабе не очень широко, этот способ имеет ряд преимуществ и в будущем, по-видимому, получит большее распространение.

Один из подходов к увеличению количества рекомбинантного белкового продукта состоит в максимальном увеличении плотности культуры трансформированных клеток, синтезирующих данный продукт. Для достижения этой цели лучше всего использовать режим периодической ферментации с добавлением субстрата,

Все биореакторы можно отнести к одному из трех основных типов: реакторы с механическим перемешиванием, барботажные колонны, эрлифтные реакторы. В настоящее время в промышленности чаще всего используются биореакторы первого типа, но появляется интерес и к эрлифтным биореакторам. Механическое перемешивание обеспечивается с помощью механической мешалки, а в эрлифтных биореакторах для аэрации и перемешивания используют газ (обычно воздух), который подается под давлением через разбрызгиватель в дне сосуда. При этом во всем объеме происходит непрерывная циркуляция жидкой среды. Барботажные колонны сходны с эрлифтными реакторами, но их недостатком является отсутствие циркуляции культуральной среды. Для обеспечения стерильности, постоянства pH, температуры и других параметров используют разные способы в зависимости от дизайна биореактора. Для синтеза рекомбинантных белков применяют двухступенчатые процессы ферментации, осуществляемые в тандемных эрлифтных биореакторах или в одном реакторе с механическим перемешиванием.

Если синтезированный продукт накапливается в клетках, то их осаждают из культуральной среды центрифугированием или фильтрацией, затем разрушают ферментативными, химическими или механическими методами и выделяют нужный продукт. Если синтезируемый продукт секретируется в культуральную среду, то процедура его выделения и очистки значительно упрощается.

## ЛИТЕРАТУРА

**Bailey J.E., D.F. Olis.** 1977. *Biochemical Engineering Fundamentals*. McGraw-Hill, New York, N.Y.

**Charles M.** 1985. Fermentation scale-up: problems and possibilities. *Trends Biotechnol* 3:134-139.

**Datar R.** 1986. Economics of primary separation steps in relation to fermentation and genetic engineering. *Process Biochem*, 21: 19—29.

**Engler C.R.** 1985. Disruption of microbial cells, p. 305-324. In C.L. Cooney. A.E. Humphrey, M. Moo-Young (ed.), *Comprehensive Biotechnology*, vol. 2. Pergamon Press, Oxford, United Kingdom.

**Giorgio R.J., J.J. Wu,** 1986. Design of large scale containment facilities for recombinant DNA fermentations. *Trends Biotechnol* 4: 60—65.

**Gösset G., R. de Anda, N. Cruz, A. Marttinez, R. Quintero, F. Bolivar.** 1993. Recombinant protein production in cultures of an *Escherichia coli trp* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39: 541-546.

**Grund G., C.W. Robinson, B.R. Click.** 1991. Cross-flow ultrafiltration of proteins, p. 69—83. In M.D. White, S. Reuveny, A. Shaffetman (ed.), *Biologicals from Recombinant Microorganisms and Animal Cells: Production and Recovery*. Verlag Chemie, Weinheim, Germany.

**Hart R.A., P.M. Lester, D.H. Reifsnyder, J.R. Ogez, S.E. Builder.** 1994. Large scale, in situ isolation of periplasmic IGF-f from *E. coli*. *Bio/Technology* 12: 113-117.

**Kroner K.H.** 1986. Cross-flow filtration in the downstream processing of enzymes: current status. *Biotechnol. Forum* 3:20—31.

**Kroner, K.H., H. Nissinen, H. Zeigler.** 1987. Improved dynamic filtration of microbial suspensions. *Bio/Technology* 5:921-926.

**Lee S.V.** 1996. High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.* 14:98—105.

**McKillip E.R., A.S. Giles, M.H. Levner, P.P. Hung, R.N. Njorth.** 1991. Bioreactors for large-scale t-PA production. *Bio/Technology* 9: 805-812.

**Mendoza-Vega O., C. Hebert, S.W. Brown.** 1994. Production of recombinant hirudin by high cell density fed-batch cultivations of a *Saccharomyces*

*cerevisiae* strain: physiological considerations during the bioprocess design. *J. Biotechnol.* 32:249-259.

**Merchuk J.C.** 1990. Why use airlift bioreactors? *Trends Biotechnol.* 8:66-71.

**Park T.H., J.-H.Seo, H.C. Lim.** 1991. Two-stage fermentation with bacteriophage  $\lambda$  as an expression vector in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 37:297-302.

**Paulson D.J., R.L. Wilson, D.D. Spatz.** 1984. Cross-flow membrane technology and its applications. *Food Technol.* Dec. **1984**: 77-87.

**RamTrez D.M., W.F. Bentley.** 1995. Fed-batch feeding and induction policies that improve foreign protein synthesis and stability by avoiding stress response. *Bioiechnol. Bioeng.* 471 596-608.

Reuss M. 1995. Stirred tank bioreactors, p. 207-255. In J.A. Asenjo, J. Merchuk (ed.), *Bioreactor System Design*. Marcel Dekker. Inc., New York, N.Y.

**Robinson O.K., C.P. Chan, C.Vu Ip, P.K. Tsai, J. Tung, T.C. Seamans, A.B. Lenny, D.K. Lee, J. Irwin, M. Silberklang.** 1994. Characterization of a recombinant antibody produced in the course of a high yield fed-batch process. *Biotechnol. Bioeng.* **44**: 727-735.

Sauer T., C.W. Robinson, B.R. Click. 1989. Disruption of native and recombinant *Escherichia coli* in a high-pressure homogenizer, *Biotechnol. Bioeng.* 33: 1330-1342.

**Sayadi S., M. Nasri, F. Berry, J.N. Barbotin, D. Thomas.** 1987. Effect of temperature on the stability of plasmid pTG201 and productivity of *xylE* gene product in recombinant *Escherichia coli*: development of a two-stage chemostat with free and immobilized cells. *J. Gen. Microbiol.* 133: 1901-1908.

**Schügerl K., A. Lübbert.** 1995. Pneumatically agitated bioreactors, p. 257—303. In i.A. Asenjo, J. Merchuk (ed.), *Bioreactor System Design*. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.

Schütte H., M.-R. Kula. 1990. Pilot- and process-scale techniques for cell disruption. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 12: 599-620.

**Seigel R., D.D.Y. Ryu.** 1985. Kinetic study of instability of recombinant plasmid pPLc23f/pAl in *E. coli* using two-stage continuous culture system. *Biotechnol. Bioeng.* 27: 28-33.

**Siegel M.H., H. Hallaille, J.C. Merchuk.** 1988. Airlift reactors: design, operation, and applications. *Adv. Biotechnol. Processes!*: 79—124.

**Strandberg L., K. Köhler, S.-O. Enfors.** 1991. Large-scale fermentation and purification of a recombinant protein from *Escherichia coli*. *Process Biochem.* 26; 225-234.

**Strandberg L., L. Andersson, S.-O. Enfors.** 1994. The use of fed batch cultivation for achieving high cell densities in the production of a recombinant protein in *Escherichia coli*. *F E M S Microbiol. Rev.* **14**: 53-56.

**Strathman H.** 1985. Membranes and membrane processes in biotechnology. *Trends Biotechnol.* 3: 112-118.

**Tanny G.B., D. Mirelman, T. Pistole.** 1980. Improved filtration techniques for concentrating and harvesting bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**: 269-273.

**Tutunjian R.S.** 1985. Scale-up considerations for membrane processes. *Bio/Technology* 3: 615-626.

Van Brunt J, 1985, Scale-up: the next hurdle. *Bio/Technology* 3: 419-424.

**Van Brunt J.** 1986. Fermentation economics. *Bio/Technology* 4: 395-401.

**White M.D., B.R. Click, C.W. Robinson.** 1995. Bacterial, yeast and fungal cultures: the effect of microorganism type and culture characteristics on bioreactor design and operation, p. 47—87. In J.A. Asenjo, J. Merchuk (ed.), *Bioreactor System Design*. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.

Whitney, G.D., B.R. Click, C.W. Robinson. 1989. Induction of T4DNA ligase in a recombinant strain of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 33: 991-998.

**Yamane T.** 1995. Bioreactor operation modes, p. 479-509. In J.A. Asenjo and J. Merchuk (ed.), *Bioreactor System Design*. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. В чем различия между периодической ферментацией, периодической ферментацией с добавлением субстрата и непрерывной ферментацией?

2. Какие параметры необходимо строго контролировать при оптимизации процесса ферментации?
- 3- Как влияет присутствие в клетке рекомби-нантной плазмиды на ее рост?
4. Как влияет перемешивание на доставку кислорода из культуральной среды к клеткам?
5. Для чего нужно стремиться максимально повысить плотность культуры при промышленной ферментации?
6. Каковы относительные преимущества и недостатки биореакторов с механическим перемешиванием и эрлифтных биореакторов?
7. Сравните процедуры выращивания и индукции культуры рекомбинантных микроорганизмов в двух тандемных биореакторах и в одном реакторе.
8. Какой обработке подвергают клеточную суспензию по завершении ферментации?
9. Какую стратегию вы бы выбрали для очистки рекомбинантного белка, секретируемого в культуральную среду?
10. Каковы преимущества и недостатки механического разрушения клеток по сравнению с химическим?
11. Как собирают клетки по завершении ферментации? Каковы преимущества и недостатки соответствующих методов?

# ЧАСТЬ III.

## Эукариотические системы

До недавнего времени высокопродуктивные сорта сельскохозяйственных растений и новые породы животных получали методом селекции. Однако этот подход, требующий для своей реализации много времени, уступил место методам, основанным на генной инженерии высших организмов. Теперь гены, обуславливающие специфические признаки, могут вводиться в клетки растений или животных и передаваться следующим поколениям (наследоваться). В ч. III мы рассмотрим, как получают такие трансгенные растения и животные.

Уже создано несколько видов трансгенных растений, обладающих признаками, которые детерминируются генами, введенными в них генноинженерным и методами. К числу таких признаков относятся: способность синтезировать инсектициды; устойчивость к вирусным инфекциям и гербицидам; измененные сроки созревания плодов; измененная окраска цветков; повышенная пищевая ценность семян и самонесовместимость. Исследования трансгеноза у животных только начинаются, так что пока трудно предсказать, какие генетические признаки будут наследоваться видом-реципиентом. К настоящему времени выведены линии трансгенных мышей, которые используются как модельные системы для изучения механизма возникновения рака, муковисцидоза, болезни Альцгеймера и других заболеваний человека.

Технология рекомбинантных ДНК нашла широкое применение в изучении наследственных болезней человека и раз-

работке методов генной терапии. Так, используя специфический хромосомный сайт в качестве маркера, можно локализовать на хромосоме человека ген, ассоциированный с данным заболеванием, ничего не зная о механизме действия этого гена, а затем, используя клонированную последовательность, которая узнает этот маркерный сайт, попытаться идентифицировать дефектный ген. С помощью такого подхода уже были найдены и охарактеризованы гены некоторых болезней человека. Далее можно исследовать механизм действия нормального и дефектного генов и разработать эффективные методы лечения. В ч. III обсуждаются молекулярная генетика человека и генная терапия.

## ГЛАВА 17.

# Генная инженерия растений: методология

Одной из основных задач селекционеров было получение высокоурожайных сортов растений с повышенной пищевой ценностью. Наибольшее внимание уделялось при этом таким зерновым культурам, как кукуруза, пшеница и рис, однако были осуществлены программы и по скрещиванию других сельскохозяйственных и садовых культур. В качестве важного инструмента прямого генетического воздействия на растения применяется технология рекомбинантных ДНК, широко используемая в микробиологических системах. К настоящему времени разработано несколько эффективных систем переноса ДНК и экспрессирующих векторов, которые работают в ряде растительных клеток. Одним из достоинств последних является их тотипотентность: из одной клетки может быть регенерировано целое растение, так что из клеток, сконструированных генноинженерными методами, можно получить фертильные растения, все клетки которых несут чужеродный(е) ген(ы) (трансгенные растения). Если такое растение цветет и дает жизнеспособные семена, то желаемый признак передается последующим поколениям.

Можно привести три основных аргумента в пользу получения трансгенных растений. Во-первых, введение гена (генов) часто приводит к повышению сельскохозяйственной ценности и декоративных качеств культурных растений. Во-вторых, трансгенные растения могут служить живыми биореакторами при малозатратном производстве экономически важных белков или метаболитов. В-третьих, генетическая трансформация растений (трансгеноз) позволяет изучать действие генов в ходе развития растения и других биологических процессов.

Некоторые генетически обусловленные признаки — такие как инсектицидная активность, устойчивость к вирусным заболеваниям и гербицидам, замедление старения, устойчивость к неблагоприятным условиям окружающей среды, измененная окраска цветков, повышенная пищевая ценность семян и самой есовмести-мость — могут быть приобретены растением при введении в него одного или нескольких генов. На сегодняшний день уже получены многочисленные трансгенные растения на основе как культурных, так и диких видов. Биотехнология несомненно внесет коррективы в традиционные программы разведения растений, в рамках которых для выведения нового сорта требуется от 10 до 15 лет. А в будущем с ее помощью можно будет создавать растения с совершенно новыми характеристиками.

## Трансформация растений Ti-плазмидой из *Agrobacterium tumefaciens*

### Грамотрицательная почвенная бактерия

*Agrobacterium tumefaciens* — фитопатоген, который в процессе своего жизненного цикла трансформирует клетки растений. Эта трансформация приводит к образованию корончатого галла - опухоли, нарушающей нормальный рост растения (рис. 17.1). Этой болезни, имеющей серьезные агрономические последствия, подвержены только двудольные растения, в частности виноград, косточковые фруктовые деревья, розы.

Образование корончатого галла начинается с проникновения, интеграции в геном растительных клеток и экспрессии специфического сегмента бактериальной плазмидной ДНК — так



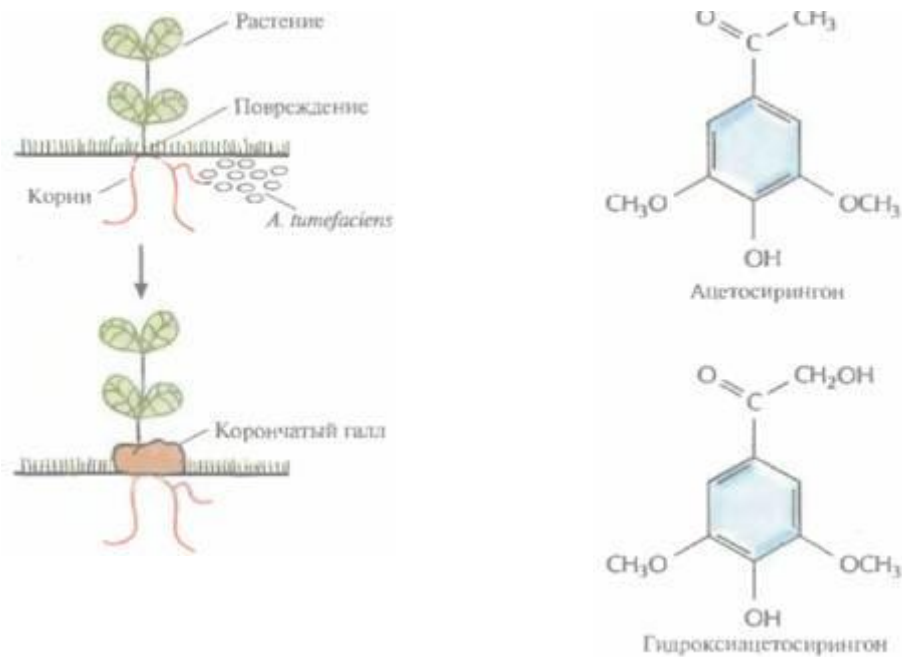


Рис. 17.1. Инфицирование растений *A. tumefaciens* и Рис. 17.2. Структурные формулы ацетосирингона и гидроксиацетосирингона. Эти соединения выделяются растением в ответ на повреждение и активируют *vir*-гены Тi-плазмиды.

называемой Т-ДНК (от англ. *transferred DNA*). Т-ДНК — это часть плазмиды, индуцирующей развитие опухоли (tumor-inducing plasmid, Ti-плазмиды); ее несут большинство штаммов *A. tumefaciens*.

Длина Т-ДНК варьирует от 12 до 24 т. п. н. в зависимости от штамма. Штаммы *A. tumefaciens*, не содержащие Ti-плазмиды, не способны индуцировать развитие корончатого галла.

Инфекционный процесс начинается с прикрепления *A. tumefaciens* к клеткам растения в месте повреждения, часто у основания стебля (у корневой шейки). Ранее предполагалось, что *A. tumefaciens* заражает именно поврежденные растения вследствие разрушения клеточной стенки и устранения физического барьера, затрудняющего проникновение бактерий в клетку. Однако сейчас считается, что все дело в специфических фенольных соединениях, ацетосирингоне и гидроксиацетосирингоне (рис. 17.2), которые выделяет поврежденное растение. Эти соединения сходны с некоторыми продуктами основного пути синтеза у растений вторичных метаболитов, таких как лигнин и флавоноиды. Ацетосирингон и гидроксиацетосирингон активируют гены вирулентности (*vir*), которые локализованы в участке Ti-плазмиды длиной 35 т. п. н., находящемся за пределами Т-ДНК. Продукты *vir*-генов необходимы для транспорта и интеграции Т-ДНК (рис. 17,3) в геном растительной клетки. Существуют по меньшей мере семь разных *vir*-генов.



Рис. 17.3. Генетическая карта Ti-плазмиды (масштаб не соблюден). Т-ДНК содержит гены ауксина, цитокинина и опина, которые транскрибируются и транслируются только в растительных клетках. За пределами Т-ДНК находится кластер *vir*-генов, ген(ы), кодирующий(е) фермент(ы) катаболизма опина, и сайт инициации репликации (*ori*), который обеспечивает стабильное поддержание плазмиды в *A. tumefaciens*, Л и П — левая и правая фланкирующие последовательности соответственно.

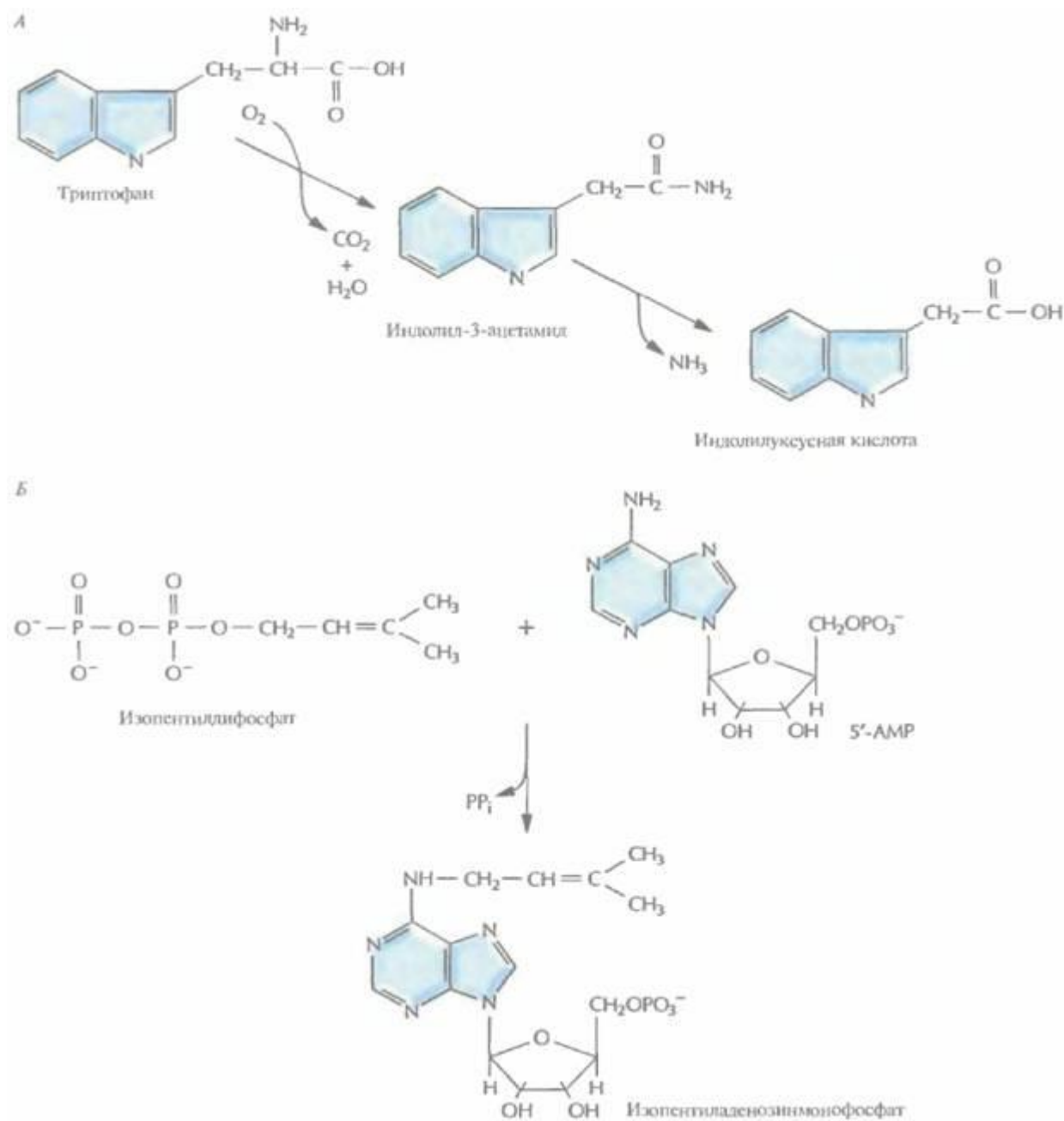


Рис. 17.4. Биосинтез ауксина и цитокинина при участии ферментов, кодируемых генами Т-ДНК *Ti*-плазмиды *A. tumefaciens*. **А.** Синтез ауксина начинается с превращения триптофана в индол-3-ацетамид, катализируемого триптофан монооксигеназой. Затем происходит превращение индол-3-ацетамида в индол-3-пировиноградную кислоту ферментом индол-3-ацетамидгидролазой. **Б.** Синтез цитокинина включает присоединение изопентенильной группы изопентенилдифосфата к 5'-АМР при участии фермента изопентенилтрансферазы с образованием изопентениладенозинмонофосфата.

После присоединения *A. tumefaciens*, несущей Ti-плазмиду, к растительной клетке и активации *vir*-генов Т-ДНК транспортируется в клетку, по-видимому, с помощью механизма, аналогичного механизму переноса плазмидной ДНК из донорной клетки в реципиентную в процессе конъюгации. При этом Т-ДНК находится в одноцепочечной форме, и именно в такой форме она встраивается в хромосомную ДНК растения.

Переход Т-ДНК в одноцепочечную форму начинается с внесения в нее разрывов по обеим фланкирующим ее последовательностям. При этом правая фланкирующая последовательность оказывается на 5'-конце одноцепочечной Т-ДНК, а левая — на 3'-конце. Предполагается, что интеграция Т-ДНК в геном растения зависит от специфических последовательностей, локализованных в правой фланкирующей последовательности, которая содержит повтор длиной 25 п. н. Аналогичный повтор присутствует и в левой последовательности, однако, как показывает делеционный мутагенез, она не принимает участия в интеграции.

Большинство генов Т-ДНК активируются только после ее встраивания в геном растения. Их продукты и вызывают образование корончатого галла. Гены *iaaM* и *iaaH*, известные также как *tms1* и *tms2* соответственно, кодируют ферменты, принимающие участие в синтезе растительного гормона ауксина (индолилуксусной кислоты). Ген *iaaM* кодирует фермент триптофан-2-монооксигеназу, которая катализирует превращение триптофана в индолил-3-ацетамид, а ген *iaaH* — фермент индолил-3-ацетамидгидролазу, катализирующую образование индолилуксусной кислоты из индолил-3-ацетамида (рис. 17.4, А). Кроме того, Т-ДНК несет ген *tmr* (известный также как ген *itr*), кодирующий изопентилтрансферазу — фермент, который катализирует присоединение к 5'-АМР изопреноидной боковой цепи с образованием цитокининов изопентениладенина и изопентениладенозинмонофосфата (рис. 17.4, Б). При гидроксировании этих соединений растительными ферментами образуются цитокинины трансзеатин и трансирибозилзеатин соответственно. И ауксин, и цитокинины регулируют рост и развитие растительной клетки, но, присутствуя в избытке, могут вызывать у растений образование опухолей, таких как корончатый галл.

Кроме генов ауксина и цитокинина, Т-ДНК каждой специфической Ti-плазмиды содержит ген, детерминирующий синтез соединения из класса опинов. Опины — это уникальные продукты конденсации amino- и кетокислот или аминокислот и сахаров. Например, при конденсации аргинина и пировиноградной кислоты образуется октопин, аргинина и α-кетоглутаральдегида — нопалин, а бициклического производного глутаминовой кислоты и сахара — агропин (рис. 17.5). Опины синтезируются в корончатом галле, а затем секретируются. Они могут использоваться как источник углерода (а иногда и как источник азота) любой *A. tumefaciens*, которая несет в Ti-плазмиде ген(ы) катаболизма соответствующего опиона (рис. 17.3), локализованные вне Т-ДНК. Большинство других исследованных почвенных микроорганиз-

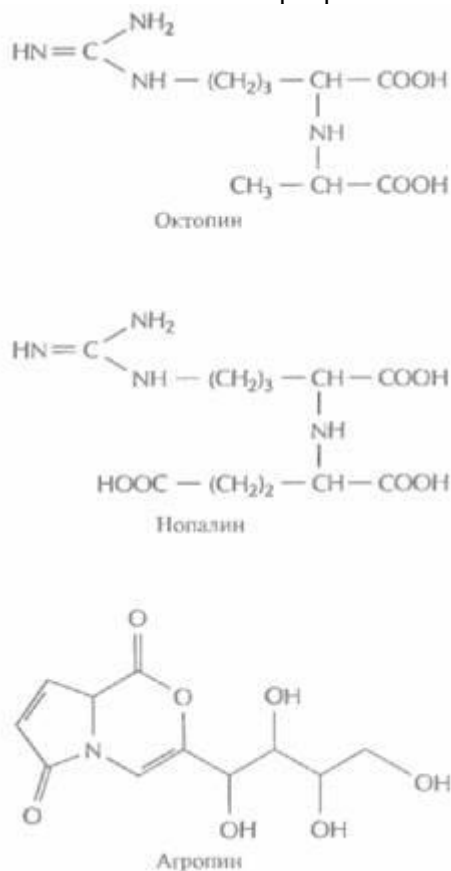


Рис. 17.5. Структурные формулы трех опинов: октопина, нопалина и агропина.

мов не способны использовать опины как источник углерода. Таким образом, в процессе эволюции выработался уникальный набор механизмов, посредством которых каждый штамм *A. tumefaciens* генетически трансформирует растительные клетки в «биологические фабрики» по производству соединений углерода, использовать которые могут только сами эти бактерии.

### Векторные системы на основе Ti-плазмид

Самый простой способ использования природной способности Ti-плазмид к генетической трансформации растений предполагает встраивание интересующей исследователя нуклеотидной последовательности в Т-ДНК, а затем использование Ti-плазмид и *A. tumefaciens* для доставки и встраивания клонированного гена (генов) в геном компетентной растительной клетки. Однако, несмотря на то что Ti-плазмиды являются эффективными природными векторами, имеется ряд серьезных ограничений на их использование в качестве векторов для клонирования.

- Фитогормоны, синтезируемые трансформированными клетками в культуре, подавляют регенерацию из этих клеток зрелого растения, поэтому при конструировании векторов на основе Ti-плазмиды гены ауксина и цито-кинина должны быть удалены.

- Ген опина несуществен для трансгенных растений, но при его наличии может снижаться конечный выход биомассы, поскольку часть ресурсов расходуется на синтез опина. Следовательно, при создании векторов ген опина также должен быть удален.

- Ti-плазмиды имеют очень большой размер (от 200 до 800 т. п. н.), а для экспериментов с рекомбинантными ДНК нужны векторы меньшего размера, поэтому участки ДНК, несущественные для клонирующего вектора, должны быть удалены.

- Ti-плазмиды не реплицируются в *Escherichia coli*, что исключает работу с рекомбинантными Ti-плазмидами в этих бактериях. Следовательно, при конструировании векторов на

основе Ti-плазмид необходимо ввести в них сайт инициации репликации, обеспечивающий их поддержание в *E. coli*.

Несмотря на все эти сложности было сконструировано несколько векторов для растительных клеток. Все векторы на основе Ti-плазмид организованы сходным образом и имеют следующие элементы.

- Селективный маркерный ген, например ген неомицинофосфотрансферазы, который обеспечивает устойчивость трансформированных растительных клеток к канамицину. Поскольку этот ген (как и многие другие маркерные гены, используемые при трансформации растений) по своей природе прокариотический, необходимо поставить его под контроль растительных (эукариотических) сигналов регуляции транскрипции, в том числе промотора и сигнала терминации-полиаденилирования. Это обеспечит эффективную экспрессию гена в трансформированных растительных клетках.

- Сайт инициации репликации, который позволяет плазмиде реплицироваться в *E. coli*. Некоторые векторы содержат также и сайт инициации репликации *A. tumefaciens*.

- Правая фланкирующая последовательность Т-ДНК. Этот элемент абсолютно необходим для интеграции Т-ДНК в клеточную ДНК растений. Большинство же векторов содержат как правую, так и левую фланкирующие последовательности.

- Полилинкер (множественный сайт клонирования) для встраивания гена в участок между границами Т-ДНК.

Поскольку клонирующие векторы не содержат генов *vir*, они сами не способны обеспечивать транспорт и интеграцию Т-ДНК в клетки растения-хозяина. Чтобы решить эту проблему, было разработано два подхода. В первом случае используют бинарную векторную систему (рис. 17.6, А). Бинарный клонирующий вектор содержит сайты инициации репликации и для *E. coli*, и для *A. tumefaciens*, но не несет генов *vir*, т. е. это практически челночный вектор *E. coli* — *A. tumefaciens*. Все стадии клонирования прово-

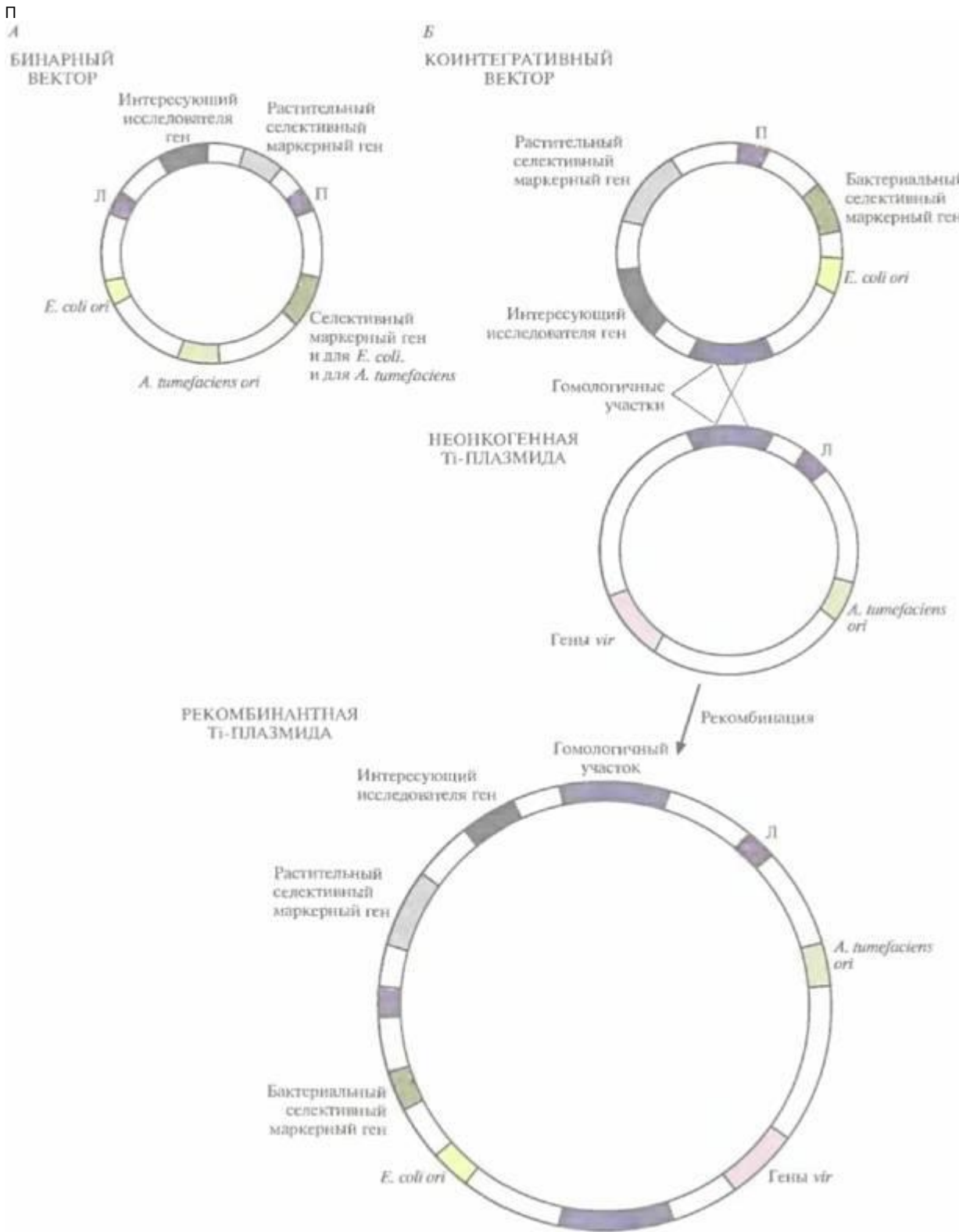


Рис. 17.6. Две векторные системы на основе Тi-плазмид. А. Бинарный клонирующий вектор содержит сайты инициации репликации (*ori*) и для *E. coli*, и для *A. tumefaciens* (либо сайт инициации репликации для широкого круга хозяев), селективный маркерный ген, который может быть использован либо в *E. coli*, либо в *A. tumefaciens*, а также интересующий исследователя ген и растительный селективный маркерный ген, встроенные в Т-ДНК. Б. Коинтегративный клонирующий вектор (вверху) содержит сайт инициации репликации только для *E. coli* и не может автономно существовать в *A. tumefaciens*. Он также несет селективный маркерный ген, который используется либо в *E. coli*, либо в *A. tumefaciens*, правую фланкирующую последовательность Т-ДНК (П), растительный селективный маркерный ген, ген, который нужно ввести в геном, и фрагмент Тi-плазмиды, гомологичный участку ДНК неонкогенной («разоруженной») Тi-плазмиды. Неонкогенная Тi-плазмида (в середине) содержит левую фланкирующую последовательность Т-ДНК (Л), кластер *vir*-генов и сайт инициации репликации *A. tumefaciens* (*ori*). Гомологичная рекомбинация коинтегративного клонирующего вектора с неонкогенной Тi-плазмидой дает рекомбинантную плазмиду (внизу), которая несет клонированный ген и растительный репортерный ген, фланкированные правой и левой концевыми последовательностями Т-ДНК.

дят в *E. coli*, а затем вектор вводят в *A. tumefaciens*. Штамм-реципиент *A. tumefaciens* несет модифицированную неонкогенную («разоруженную») Ti-плазмиду; она содержит полный набор *vir*-генов, но из нее удалена часть (или вся) T-ДНК (так что T-ДНК не может быть транспортирована). В этой системе на неонкогенной Ti-плазмиде синтезируются продукты *vir*-генов, которые мобилизуют участок T-ДНК бинарного клонирующего вектора. Продуцируя белки, кодируемые *vir*-генами, неонкогенная Ti-плазида выступает в роли помощника, способствуя встраиванию T-ДНК из бинарного клонирующего вектора в хромосомную ДНК растения.

Во втором случае используют коинтегративную векторную систему. Векторная ДНК рекомбинирует в *A. tumefaciens* с «разоруженной» Ti-плазмидой, T-ДНК которой не несет опухолеродных генов, таким образом, что весь клонирующий вектор встраивается в неонкогенную Ti-плазмиду (рис. 17.6, Б). Коинтегративный вектор и неонкогенная Ti-плазида-помощник содержат гомологичные последовательности, которые образуют сайт для гомологичной рекомбинации *in vivo*. Обычно эти последовательности расположены в T-ДНК. После рекомбинации клонирующий вектор становится частью неонкогенной Ti-плазмиды, которая содержит *vir*-гены, необходимые для переноса T-ДНК в растительную хозяйскую клетку. Единственный способ поддержания клонирующего вектора в *A. tumefaciens* — это использование такой коинтегративной структуры. В данной конфигурации генетически сконструированный участок T-ДНК может быть перенесен в растительные клетки.

### Физические методы переноса генов в растительные клетки

Системы переноса генов с помощью *A. tumefaciens* эффективно работают только в случае некоторых видов растений. В частности, однодольные растения, включая основные зерновые культуры (рис, пшеницу и кукурузу), практически не трансформируются *A. tumefaciens*. Тем не менее, модифицировав методики и тщательно контролируя условия, удалось трансформировать кукурузу и рис агробактериями *A. tumefaciens*, несущими векторы -- производные Ti-плазмид. Так, например, незрелые зародыши кукурузы помещали на несколько минут в суспензию клеток *A. tumefaciens*, а затем инкубировали несколько дней в отсутствие селективного давления. После этого зародыши переносили в среду с антибиотиками, в которой могли расти только трансформированные растительные клетки. Эти клетки выдерживали в темноте в течение нескольких недель, затем переносили массу трансформированных растительных клеток на другую питательную среду и инкубировали на свету, чтобы произошла регенерация целого трансгенного растения.

В табл. 17.1 перечислен ряд методов трансформации однодольных растений. Некоторые из этих методов требуют удаления клеточной стенки с образованием протопластов. Последние поддерживают в культуре как независимо растущие клетки или в специальной питательной среде, где они образуют клеточные стенки; из таких клеток может быть регенерировано целое растение. Кроме того, разработаны методы трансформации, позволяющие вводить клони-



Таблица 17. 1. Методы введения ДНК в клетки растений

| Метод  | Комментарий   |
|--|---|
| Использование Тi-плазмид                     | Отличная высокоэффективная система, но применима не для всех видов растений   |
| Бомбардировка микрочастицами                 | Используется для широкого круга растений и тканей; простой и дешевый метод  |
| Использование векторов на основе вирусов     | Неэффективный способ доставки ДНК в растительные клетки   |
| Прямое введение генов в протопласты растений | Может использоваться для введения генов только в протопласты растительных клеток, из которых могут быть регенерированы жизнеспособные растения    |
| Микроинъекции                                | Имеют ограниченное применение, поскольку одновременно инъекцию можно сделать только в одну клетку; манипуляции могут проводить только специалисты |
| Электропорация                               | Применяется для введения генов только в протопласты, из которых могут быть регенерированы жизнеспособные растения                                 |
| Слияние липосом                              | Применяется для введения генов только в протопласты, из которых могут быть регенерированы жизнеспособные растения                                 |

Таблица 17.2. Генетически трансформированные растения

|                 |               |                  |                    |
|-----------------|---------------|------------------|--------------------|
| Баклажан        | Земляной орех | Овес             | Сахарная свекла    |
| Банан           | Канола        | Овсяница высокая | Сахарный тростник  |
| Батат           | Капуста       | Овсяница красная | Соевые бобы        |
| Бобы            | Картофель     | Огурец           | Солодка            |
| Виноград        | Киви          | Орхидея          | Сорго              |
| Гвоздика        | Клюква        | Папайя           | Спаржа             |
| Горох           | Кукуруза      | Петуния          | Табак              |
| Груша           | Латук         | Пион             | Томат              |
| Ежа сборная     | Лен           | Подорожник       | Тополь             |
| Ель европейская | Лилия         | Подсолнечник     | Хлопок             |
| Ель канадская   | Лотос         | Пшеница          | Яблоня             |
| Жемчужное просо | Люцерна       | Рис              | Ячмень             |
| Земляника       | Морковь       | Рожь             | <i>Arabidopsis</i> |

рованный ген в небольшое число клеток растительной ткани, из которой можно регенерировать целое растение, обходясь без регенерации из протопластов. В настоящее время для доставки ДНК в клетки растений предпочитают использовать либо векторы на основе Тi-плазмид, либо бомбардировку микрочастицами (табл. 17,1). Таким способом было генетически трансформировано более 50 различных видов растений (табл. 17.2).

**Бомбардировка микрочастицами**

Бомбардировка микрочастицами, или биолис-тика, — наиболее многообещающий метод введения ДНК в растительные клетки. Золотые или вольфрамовые сферические частицы диаметром 0,4—1,2 мкм покрывают ДНК, осажденной СаС1<sub>2</sub>, спермидином или полиэтиленгликолем, и «выстреливают» ими в клетки из специального «ружья», приводимого в действие газами, образующимися при сгорании пороха, сжатым воздухом или гелием. Частицы разгоняются до скорости 300—600 м/с и пробивают клеточную стенку и мембраны растительной клетки. При этом их плотность такова, что клетки практически не повреждаются.

Попав в клетку, ДНК, покрывающая частицы, каким-то неизвестным способом интегрируется в растительную ДНК. Метод бомбардировки микрочастицами позволяет трансформировать растения самых разных видов, в том числе однодольные и хвойные, в которые не удастся ввести ДНК с помощью *Agrobacterium*.

Бамбардировку микрочастицами можно использовать также для введения чужеродной ДНК в суспензию растительных клеток, культуры клеток, меристематические ткани, незрелые зародыши, протокормы, колеоптили и пыльцу широкого круга растений (табл. 17.3). Кроме того,

Таблица 17.3, Трансгенные растения, полученные бомбардировкой различных растительных клеток микрочастицами<sup>1)</sup>

| Растение(я)                 | Источник клеток  |
|-----------------------------|--|
| Кукуруза                    | Суспензия зародышевых клеток, незрелые зиготические зародыши |
| Рис                         | Незрелые зиготические зародыши, зародышевый каллус           |
| Ячмень                      | Суспензии клеток, незрелые зиготические зародыши             |
| Пшеница                     | Незрелые зиготические зародыши                               |
| Дернообразующие злаки       | Зародышевый каллус   |
| Рожь                        | Меристема  |
| Сорго                       | Незрелые зиготические зародыши                               |
| Жемчужное просо             | Незрелые зиготические зародыши                               |
| Орхидные                    | Протокормы   |
| Банан                       | Суспензия зародышевых клеток                                 |
| Тополь                      | Каллус   |
| Ель европейская и канадская | Соматические зародыши  |
| Горох                       | Зиготические зародыши  |
| Огурец                      | Зародышевый каллус   |
| Батат                       | Каллус   |
| Клюква                      | Полученные in vitro части стебля                             |
| Пион                        | Пыльца   |
| Люцерна                     | Зародышевый каллус   |
| Бобы                        | Зиготические зародыши  |
| Хлопок                      | Зиготические зародыши  |
| Виноград                    | Суспензии зародышевых клеток                                 |
| Земляной орех               | Зародышевый каллус   |
| Табак                       | Пыльца   |

<sup>1)</sup> Из работы Southgate et al., *Biotechnol. Adv.*, 13,631-651, 1995.

с помощью этого метода были транспортированы гены в хлоропласты и митохондрии. На поверхность микрочастиц можно осадить плазмидную ДНК, растворенную в буфере. Это позволяет повысить частоту трансформации путем увеличения количества плазмидной ДНК; однако следует иметь в виду, что слишком большие ее количества могут оказаться губительными для клетки,

В трансформированных таким способом клетках, идентифицируемых по экспрессии маркерного гена, введенная ДНК зачастую экспрессируется лишь кратковременно. Пока чужеродная ДНК не встроится в геном растения, она с большой вероятностью утрачивается при делении трансформированных клеток.

Как интеграция, так и экспрессия чужеродных генов может зависеть от конфигурации вектора, используемого для их введения. Например, частота трансформации повышается, если используется линейная, а не кольцевая ДНК. Кроме того, при бомбардировке микрочастицами высокомолекулярные плазмиды (МО т. п. н.) могут фрагментироваться, поэтому уровень экспрессии чужеродных генов окажется ниже, чем в случае плазмид меньшего размера.

Применение репортерных генов при трансформации клеток растений

Для идентификации трансформированных клеток необходимо уметь обнаруживать чужеродную ДНК, интегрировавшуюся в геномную ДНК растения. Более того, при исследовании сигналов регуляции транскрипции и их функций в специфических растительных тканях (листьях, корнях или цветках) зачастую важно уметь количественно оценивать уровень экспрессии гена, кодирующего легко идентифицируемый продукт. Все это требует применения репортер-ных генов, которые позволяют либо проводить отбор трансформированных клеток, либо оценивать активность кодируемого ими фермента. Было протестировано несколько разных генов, которые можно использовать как доминантные селективные маркеры, и генов, чей белковый продукт можно обнаружить с помощью специфических методов (табл. 17.4). Поскольку многие из репортерных генов имеют бактериальное происхождение, они были снабжены регуляторными последовательностями, обеспечивающими их экспрессию в растительных клетках. Проводя отбор по доминантному маркеру, можно получить культуру, содержащую только трансформированные клетки. Так, в присутствии канамицина выживают только клетки растений, синтезирующих активную неомицинфосфотрансферазу.

Выбор того или иного репортерного гена диктуется характером конкретного эксперимента. Если экспрессия гена мешает нормальному росту растения, то его нельзя использовать как репортерный. Кроме того, по мнению экспертов-биотехнологов, присутствие некоторых генов и их продуктов может приводить к

Таблица 17.4. Системы репортерных и селективных маркерных генов растительных клеток<sup>1)</sup>

| Фермент  | Использование в качестве селективного маркерного гена | Использование в качестве репортерного гена |
|--|---|--|
| Неоминифосфотрансфераза                            | Да  | Да   |
| Гитроминифосфотрансфераза                          | Да  | Да   |
| Дигидрофолатредуктаза                              | Да  | Да   |
| Хлорамфеникол-ацетилтрансфераза                    | Да  | Да   |
| Гентамицин-ацетилтрансфераза                       | Да  | Да   |
| Нопалинсинтаза                                     | Нет   | Да   |
| Октопалсинтаза                                     | Нет   | Да   |
| β-Глюкуронидаза                                    | Нет   | Да   |
| Стрептомицинфосфотрансфераза                       | Да  | Да   |
| Фермент, обуславливающий устойчивость к блеомицину | Да  | Нет  |
| Люцифераза светляка                                | Нет   | Да   |
| Бактериальная люцифераза                           | Нет   | Да   |
| Треониндегидратаза                                 | Да  | Да   |
| Металлотионин II                                   | Да  | Да   |
| enol-Пирувилкинаминат-3-фосфатсинтаза              | Да  | Нет  |
| Фосфинотрицин-ацетилтрансфераза                    | Да  | Да   |
| β-Галактозидаза                                    | Нет   | Да   |
| Бластинцидин S-деаминаза                           | Да  | Да   |
| Анетиолактатсинтаза                                | Да  | Нет  |
| Бромоксианилинтриалаза                             | Да  | Нет  |

<sup>1)</sup> Hs robot Walden, Schell, *Eur. J. Biochem.* 192: 563–576; Gruber, Crosby, p. 80–119, in B. R. Glick, J. E. Thompson (ed.), *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, CRC Press, Boca Raton, Fla.

загрязнению коммерческого продукта. В связи с этим лучше не вводить гены устойчивости к антибиотикам в сельскохозяйственные растения.

Некоторые продукты репортерных генов (например, β-D-глюкуронидазу, а также люциферазу, синтезируемую бактериями и светляками) можно обнаружить в интактных растительных тканях. В системах трансформации чаще всего используется ген β-D-глюкуронидазы *E. coli* (GUS-ген). Он кодирует стабильный фермент, обычно отсутствующий в растениях, который катализирует расщепление β-D-глюкуронидов. Его активность в трансформированных растительных тканях можно обнаружить по появлению синей окраски в результате гидролиза неокрашенного субстрата, 5-бром-4-хлор-3-индолил-β-D-глюкуроновой кислоты. Альтернативный, более чувствительный метод количественной оценки активности GUS-генов в растительных экстрактах основан на определении интенсивности флуоресценции продукта гидролиза 4-метилумбеллиферил-β-D-глюкуронида.

**Эксперименты по экспрессии чужеродных генов в растениях**

После того как методика трансформации растений была полностью отработана, исследователи стали пытаться вводить различные растительные и бактериальные гены в клетки самых разных растений. Трансформированные растения проверяли на способность к синтезу чужеродного белка, проводили физиологические исследования, чтобы определить, как присутствие этого белка сказывается на всем растении. Во многих ранних экспериментах использовали промоторы, контролирующие конститутивную экспрессию в ряде растительных клеток. Не так давно были выделены и охарактеризованы растительные промоторы, контролирующие экспрессию чужеродных белков в специфических клетках на определенных стадиях роста и развития растения. Например, вместо сильного конститутивного 35S-промотора вируса мозаики цветной капусты, функционирующего во всех растительных тканях в течение всей жизни растения, ис-

**Регенерация жизнеспособных фертильных растений, синтезирующих октопинсинтазу, из корончатого галла табака после делеции генов, контролирующих образование опухоли**

H, De Grève, J. Leemans, J. P, Hernalsteens, L. Thia -Tonng, M. De Beuckeleer, L Willmitzer, L, Otten, M, Van Montagu, J. Schell *NatureW*: 752-755, 1982

Для получения трансгенных растений. Поэтому Ti-плазмида, включившись в растений необходима прежде чем использовать Ti- хромосомную ДНК обычным эффективная векторная система. плазмиду в качестве вектора для способом, леренесети свою T- Первые попытки создания таких трансформации растений, ДНК, которая теперь не несет систем основывались на необходимо предотвратить генов корончатого галла. использовании Ti-плазмиды образование опухоли. Изучая Следующим логическим шагом в почвенной бактерии A. мРНК, транскрибируемые с развитии этой системы стало *tumefaciens*, поскольку после интактных и модифицированных клонирование чужеродного инфицирования T-ДНК, Шелл и др. показали, что маркерного гена и гена, чувствительных двудольных гены, ответственные за развитие интересующего исследователя, в растений часть Ti-плазмиды (T- корончатого галла, локализованы T-ДНК, чтобы их можно было ДНК) встраивается в T-ДНК. Это означало, что можно транспортировать в хромосомную непосредственно в хромосомную удалить из T-ДНК эти гены и ДНК растения-хозяина. Векторная ДНК клетки растения-реципиента. ввести ее с помощью система на основе Ti-плазмид Однако при инфицировании гомологичной рекомбинации в Ti- нашла широкое применение во растений Ti-плазмидой на плазмиду, а последнюю — в всем мире. Ее используют для трансформированных растениях растительные клетки. создания трансгенных растений в образуется корончатый галл — тысячах лабораторий. опухоль, препятствующая нормальному

пользовали промотор гена малой субъединицы фотосинтетического фермента рибулозобисфосфат-карбоксилазы, работающего только в фотосинтезирующих тканях, например в листьях. Аналогично для контроля экспрессии некоторых чужеродных генов использовали растительные промоторы, функционирующие только в специфических тканях или только при неблагоприятных условиях.

Подавляющее большинство генов растений локализованы в ядерной ДНК, однако хлоропласты и митохондрии тоже содержат гены, кодирующие ряд важных и уникальных функций. При этом не все белки, присутствующие в этих органеллах, закодированы в их ДНК, Некоторые из них кодируются ядерной ДНК, синтезируются в цитоплазме, а затем с помощью специального механизма импортируются в соответствующую органеллу. Есть два способа введения специфического чужеродного белка в митохондрии или хлоропласты. Один способ — это слияние гена, кодирующего чужеродный белок, и последовательности сигнального пептида, направляющего белки в ор-ганеллы. Такая конструкция может быть встроена в хромосомную ДНК, и рекомбинантный белок будет импортироваться в соответствующую органеллу. Второй способ предполагает встраивание гена, кодирующего чужеродный белок, непосредственно в хлоропластную или митохондриальную ДНК.

**Выделение различных промоторов и их использование**

Для выделения растительных промоторов из некоторых видов растений использовали специализированные так называемые «промотор-направленные» векторы и систему трансформации на основе Ti-плазмид *Agrobacterium*. Суть подхода состоит в следующем. Репортерный ген без промотора встраивают сразу за правой фланкирующей последовательностью вектора на основе Ti-плазмиды, и после переноса T-ДНК в хромосому растения он оказывается в окружении растительной ДНК. Если T-ДНК встроится в промоторный участок функционального гена, то произойдет транскрипция репортерного гена. Для идентификации растительных промоторов в качестве репортерного гена можно использовать ген

неомицинофосфотрансферазы (*npt*). При этом экспрессию данного гена можно проконтролировать отбором канамицинустойчивых трансформантов. Однако таким способом трудно идентифицировать промоторы, функционирующие лишь на определенной стадии развития растения или индуцируемые специфическим фактором окружающей среды. Чтобы быть уверенным в отборе именно трансформированных клеток, в Т-ДНК следом за репортерным геном без промотора встраивают ген устойчивости к гигромицину, находящийся под контролем конститутивного промотора. Сначала отбирают гигромицинустойчивые клетки, а затем проверяют ферментативную активность трансформантов в условиях, обеспечивающих экспрессию репортерного гена. В результате обнаруживается, что от 5 до 30% трансформированных растительных клеток несут репортерный ген, находящийся под контролем активного промотора.

35S-промотор вируса мозаики цветной капусты часто используют в растительных системах как сильный промотор, хотя уровень экспрессии контролируемого им гена, кодирующего чужеродный белок, часто оказывается ниже, чем хотелось бы. Чтобы решить эту проблему и найти наиболее эффективный промотор, необходимо протестировать в растениях различные конструкции «промотор—ген». Кроме промотора, экспрессию чужеродных генов могут усиливать некоторые другие элементы, в частности энхансерные последовательности, расположенные на расстоянии от одной до нескольких сотен нуклеотидов до промотора, интроны, стабилизирующие мРНК, и сигналы терминации транскрипции.

Были протестированы ДНК-конструкции, содержащие все или некоторые из следующих элементов: 35S-промотор; сигнал терминации транскрипции гена нопалинсинтазы; от одного до семи tandemных повторов энхансерных элементов; так называемая Ω-последовательность, которая предположительно усиливает экспрессию гена на уровне трансляции. Наиболее эффективная конструкция содержала семь энхансерных элементов, при этом уровень экспрессии чужеродного гена в трансгенных растениях табака и риса был намного выше, чем в случае одного 35S-промотора (табл. 17.5). Протестированные промоторные конструкции контролировали экспрессию в трансгенных растениях широкого круга чужеродных генов. Такое разнообразие, вероятно, объясняется тем, что Т-ДНК встраивалась в разные сайты в геноме растения. Используя этот подход, можно создавать сильные тканеспецифичные промоторы, регулируемые в процессе развития,

**Введение чужеродных генов в хлоропластную ДНК**

У большинства высших растений в каждой клетке листа присутствует примерно 100 хлоропластов и каждый хлоропласт содержит примерно 100 копий хлоропластной ДНК. Для стабильной генетической трансформации хлоропластов с целью изменения их функциональных характеристик необходимо вводить чужеродные гены в хлоропластную, а не в хромосомную ДНК. длина которой примерно в 10<sup>4</sup>—10<sup>5</sup> раз больше. Кроме того, необходимо, чтобы чужеродные гены присутствовали во всех из примерно 10<sup>4</sup> молекул хлоропластной ДНК, содержащихся в одной клетке.

Таблица 17.5. Тестирование промоторных конструкций в трансгенных растениях <sup>1), 2)</sup>

| Растение | Средний уровень экспрессии гена |                  | Максимальный уровень экспрессии гена |                  |
|----------|---------------------------------|------------------|--------------------------------------|------------------|
|          | 35S-промотор                    | сложный промотор | 35S-промотор                         | сложный промотор |
| Табак    | 1,0                             | 2,8              | 2,8                                  | 18,3             |
| Рис      | 1,0                             | 14,4             | 7,2                                  | 47,1             |

<sup>1)</sup> Из работы Mitsuhashi et al, *Plant Cell Physiol.* 37:49-59, 1996.  
<sup>2)</sup> В качестве репортерного гена использовали ген β-глюкуронидазы E. coli. Ферментативную активность нормировали по среднему значению для растения, когда ген находился под контролем 35S-промотора. Фактические величины, полученные при тестировании на табаке, примерно в 30 раз превышают те, которые получены на рисе. Сложный промотор включал 35S-промотор, сигнал терминации транскрипции гена нопалинсинтазы, семь tandemных повторов энхансерных элементов и Ω-последовательность ДНК вируса табачной мозаики. Средний уровень экспрессии генов — это среднее значение, полученное по данным для нескольких трансгенных растений, а максимальный уровень — это наибольшее значение, наблюдавшееся на каком-либо растении с данным промотором.



Рис. 17.7. Плазмидные векторы, используемые для введения тандемных генов в хлоропластную ДНК. *Spc<sup>r</sup>* — ген устойчивости к спектиномицину.



Вначале чужеродные гены вводили в ДНК хлоропластов в составе плазмидного вектора, несущего неселективную чужеродную ДНК и селективный маркер, например ген устойчивости к антибиотику, фланкированные специфическими последовательностями хлоропластной ДНК (рис. 17.7). Такая стратегия была весьма эффективной, однако нередко селективный маркер мешал экспрессии фланкирующих хлоропластных генов. Чтобы решить эту проблему, разработали стратегию, в которой селективный маркер и чужеродный ген не были физически связаны друг с другом. Для этого растения табака трансформировали смесью одинаковых количеств двух разных плазмид: одна содержала селективный маркер (ген устойчивости к спектиномицину), фланкированный ДНК из одного участка хлоропластной ДНК, а вторая — чужеродный ген (ген устойчивости к канамицину), фланкированный последовательностями из другого участка

хлоропластной ДНК (рис. 17.8). Оба гена имели прокариотические сигналы транскрипции, что обеспечивало их транскрипцию в хлоро-пластах, но не в ядре. Последовательности хлоропластной ДНК в плазмиде были организованы таким образом, что рекомбинация или встраивание в геном хлоропластов не приводила к нарушению работы какого-либо хлоропластного гена. Плазмиды вводили методом бомбардировки микрочастицами, а затем отбирали трансформированные растения табака на среде со спектиномицином. Хлоропласты из отобранных трансформантов проверяли на наличие продукта, детерминируемого геном устойчивости к канамицину (неселективным чужеродным геном). Удивительно, что примерно 30% спектиномицинустойчивых трансформантов экспрессировали также ген устойчивости к канамицину. что указывает на применимость котрансформации для введения чужеродных генов в хлоропластную ДНК.

Рис. 17.8. Плазмидные векторы, используемые для встраивания в хлоропластную ДНК двух генов — селективного и неселективного, *Spc<sup>r</sup>* - ген устойчивости к спектиномицину.

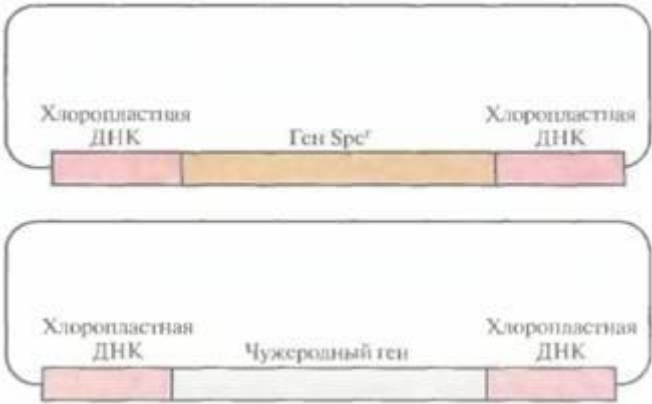






Рис. 17.9. Схематическое представление Т-ДНК, входящей в состав вектора. После интеграции Т-ДНК в хромосомную ДНК растения транспозаза может вырезать селективный маркерный ген и встроить его в другой хромосомный сайт. Обозначения: Л и П — левая и правая фланкирующие последовательности, Ds — мобильный элемент. Промоторы и сигналы терминирования транскрипции гена транспозазы, гена, интересующего исследователя, и селективного маркерного гена не показаны.

## Получение трансгенных растений, не содержащих маркерных генов

Обычно при введении чужеродного гена в растение одновременно вводится и селективный маркерный ген. Хотя до сих пор не было никаких указаний на то, что какой-либо из этих генов оказывает неблагоприятное воздействие на человека, животных или окружающую среду, последствия, к которым в принципе может привести включение в растения селективных маркерных генов, вызвали беспокойство общественности. Например, продукты некоторых маркерных генов могут оказаться аллергенами или токсичными веществами, а гены устойчивости к антибиотикам могут попасть в патогенные почвенные микроорганизмы. Кроме того, присутствие селективных маркеров технически затрудняет трансформацию трансгенных растений дополнительными генами, поскольку один селективный маркер не может использоваться дважды. Чтобы успокоить общественность, были разработаны методы получения трансгенных растений без каких-либо маркерных генов.

Один из экспериментальных подходов к получению безмаркерных трансгенных растений включает котрансформацию растений двумя разными ДНК, одна из которых несет маркерный ген, а другая — интересующий исследователя чужеродный ген. В этом случае от 30 до 80% растений содержат оба гена, которые, однако, интегрированы в разные сайты хромосомной ДНК. После отбора трансформантов маркерный ген можно удалить из трансгенного растения с помощью обычного скрещивания.

В рамках другого подхода селективный маркерный ген встраивают между растительными мобильными элементами (Ds-элементами) и такую конструкцию вводят в Т-ДНК вместе с геном транспозазы, которая вырезает участок ДНК между Ds-элементами и перемещает его в другой хромосомный сайт (рис. 17.9). В процессе встраивания Т-ДНК в ДНК растения-хозяина в 90% случаев селективный маркер, находящийся между двумя Ds-элементами, оказывается в другом сайте хромосомной ДНК, при этом с вероятностью 50% этот сайт находится далеко от исходного. Таким образом, селективный маркерный ген может использоваться для идентификации трансформированных растений, а затем удаляться при скрещивании.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С помощью генной инженерии можно вводить чужеродные гены в растительные клетки в культуре с последующей регенерацией целых фертильных растений из отобранных трансформированных клеток. Естественным путем трансформация растений осуществляется с помощью почвенных бактерий *Agrobacterium tumefaciens*. При поражении растения в нем начинает синтезироваться специфическое вещество. В ответ на этот химический сигнал *A. tumefaciens* прикрепляется к мембране растительной клетки, после чего происходит перенос части (Т-ДНК) бактериальной плазмиды (Ti-плазмиды) в ядро растительной клетки. Т-ДНК встраивается в растительный геном и экспрессируется. Т-ДНК содержит гены, кодирующие ферменты синтеза фитогормонов, которые вызывают увеличение размеров растительных клеток и их пролиферацию. Кроме того, растительные клетки начинают синтезировать опин, кодируемый Т-ДНК, который может использоваться только *A. tumefaciens*. Таким образом, в процессе эволюции сформировался механизм превращения растительной клетки в «фабрику» по производству вещества — источника углерода и азота (опина) исключительно для нужд *A. tumefaciens*.

Чтобы использовать природную способность *A. tumefaciens* проникать в растительные клетки для доставки в них клонированных генов, были созданы модифицированные Ti-плазмиды. Из Т-ДНК удаляли гены фитогормонов и гены метаболизма опина и встраивали такую измененную Т-ДНК в плазмиду, способную стабильно существовать в *E. coli*. Встроенный в Т-ДНК ген-мишень попадал вместе с ней в ядро растительной клетки-реципиента. В случае бинарной системы челночный вектор с клонированным в Т-ДНК геном вводят в штамм *A. tumefaciens*, несущий модифицированную плазмиду с генами, необходимыми для переноса Т-ДНК в клетку растения (*vir*-генами). Кроме того, разработана коинтегративная система, которая предполагает введение челночного вектора в *A. tumefaciens*, где он рекомбинирует с неонкогенной Ti-плазмидой, несущей *vir*-гены, с образованием одной плазмиды, в которой есть и функционирующие *vir*-гены, и Т-ДНК с клонированным геном. Участок Т-ДНК *A. tumefaciens* использовали для введения генов в различные растения. К сожалению, эта система применима не для всех видов растений. Эффективным методом доставки ДНК в различные растительные клетки является также бомбардировка микрочастицами (биолистика).

Для обеспечения экспрессии чужеродных генов, введенных в растительные клетки, использовали растительные промоторы. Различные промоторы, функционирующие только в определенных растительных тканях или на определенной стадии развития растения, идентифицировали по экспрессии репортерного гена без промотора после его интеграции в хромосомную ДНК растения. Были разработаны методы встраивания чужеродных генов непосредственно в хлоропластную или митохондриальную ДНК так, чтобы кодируемый белок синтезировался прямо в этих органеллах. И наконец, для того чтобы успокоить общественность, были разработаны методы удаления маркерных генов из трансгенных растений.

## ЛИТЕРАТУРА

- An G., V. Kim. 1993. Techniques for isolating and characterizing plant transcription promoters, enhancers, and terminators, p. 155—166. in B. R. Glick, J. E. Thompson (ed.), *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Carrer H., P. Maliga. 1995. Targeted insertion of foreign genes into the tobacco ptaslid genome without physical linkage to the selectable marker gene. *Bio/Technology* **13**: 791-794.
- Christou P. 1992. Genetic transformation of crop plants using microprojectile bombardment. *Plant* **2**: 275-281.
- Dale E. C., D. Ow. 1991. Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the host genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 10558-10562.
- Goldsbrough A. P., C. N. LastreUa, J. I. Voder. 1993. Transposition mediated re-positioning and subsequent elimination of marker genes from transgenic tomato. *Bio/Technology* **11**: 1286-1292.
- Grtiber M. Y., W. L. Crosby. 1993. Vectors for plant transformation, p. 89-119, In B. R. Glick, J. E. Thompson (ed.). *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Halfter U., P. C. Morris, L. Willmitzer. 1992. Gene targeting in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* **231**: 186-193.
- Istiida Y., EL Saito, S. Otita, Y. Hiei, T. Kimari, T. Kumashiro. 1996. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nat. Biotechnol.* **14**: 745-750.
- Jefferson R. A., T. A. Kavanagh, M. W. Bcvan. 1987. GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBOJ*, **6**: 3901-3907.
- Klein T. M., E. D. Wolf, R. Wu, J. C. Santord. 1987. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* (London) **327**: 70-73.
- Kriiger-Lebus S., I. Potrykus. 1987. A simple and efficient method for direct gene transfer to *Petunia hybridia* without electroporation. *Plant Mol. Biol. Rep.* **5**: 289-294.
- Miki B. L., P. F. Fobcrt, P. J. Charest, V. N. Iyer. 1993. Procedures for introducing foreign DNA into plants, p. 67-88. In B. R. Glick, J. E. Thompson (ed.), *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*. CRC Press, Boca Raton, Fla.

Mitsuhara I., M. Ugaki, H. Hirochika, M. Ohshima, T. Murakami, Y. Gotoh, Y. Katayose, S. Nakamura, R. Honkura, S. Nishimiya, K. Leno, A. Mochizuki, H. Tanimoto, H. Tsugawa, Y. Otsuki, Y. Ohashi. 1996. Efficient promoter cassettes for enhanced expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants. *Plant Cell Physiol.* 37:49-59.

Ow D. W., K. V. Wood, M. DeLuca, J. R. de Wet, D. R. Helinski, S. H. Howell. 1986. Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. *Science* 234: 856-859.

Paszkowski J., M. Baur, A. Bogucki, I. Potrykus, 1988. Gene targeting in plants. *EMBO J.* 7: 4021-4026.

Pauls K. P. 1995. Plant biotechnology for crop improvement. *B'otechnol. Adv.* 13: 673—693.

Potrykus I. 1990. Gene transfer to cereals: an assessment. *Bio/Technology* 8: 535-542.

Potrykus I. 1991. Gene transfer to plants: assessment of published approaches and results. *Anna. Rev. plant Physiol.* 41: 205-225.

Southgate E. M., M. R. Davey, J. B. Power, R. Marchant 1995. Factors affecting the genetic engineering of plants by microprojectile bombardment. *Riotectinoi. Adv.* 13: 631—651.

Vain P., J. de Buyser, V. Bui Trang, R. Haicour, Y. Henry. 1995. Foreign delivery into monocotyledonous species, *fiotechnol. Adv.* 13:653—671.

Waiden R., J. Shell. 1990. Techniques in plant molecular biology—progress and problems. *Eur. J. Biochem.* 192: 563-576.

Waiden R., R. Wingender. 1995. Gene-transfer and plant-regeneration techniques. *Trends Kotechnol.* 13:324-331.

Voder J. I., A. P. Goldsbrough. 1994. Transformation

system for generating marker-free transgenic

plants. *Bio/Technology* 12: 263-267. Zambryski P. 1988. Basic processes underlying

*Agrobacterium-mediated* DNA transfer to plant

cells. *Antw. Rev. Genet.* 22: 1-30. Zambryski P., J. Tempe, J. Schell. 1989. Transfer

and function of T-DNA genes from

*Agrobacterium* Ti and Ri plasmids in plants. *Cell*

56: 193-201.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Почему Ti-плазмида из *Agrobacterium tumefaciens* подходит для создания вектора — переносчика чужеродного гена в хромосомную ДНК растения?
2. Чем различаются бинарная и коинтегративная векторные системы?
3. Что такое репортерные гены и как они используются при трансформации растительных клеток?
4. В чем заключается метод бомбардировки клеток микрочастицами, использующийся для трансформации растений?
5. Подробно опишите, как вы будете выделять растительный промотор, специфичный для тканей корней.
6. Как интегрировать чужеродный ген в ДНК хлоропластов?
7. Как получить трансгенное растение, не содержащее маркерного гена?
8. Как повысить активность растительного промотора?

## ГЛАВА 18.

# Генная инженерия растений: применение

Основной целью биотехнологических экспериментов на растениях является создание новых сортов культурных растений. Большинство ранних исследований было направлено на получение высокоурожайных сортов растений без изменения их пищевой ценности. В растения вводили гены, обеспечивающие их устойчивость к насекомым-вредителям, вирусам, гербицидам, неблагоприятным условиям окружающей среды, и гены, замедляющие старение. Часть этих работ мы рассмотрим ниже. Кроме того, проводились эксперименты по изменению окраски цветов и качества растительных продуктов, а также по использованию растений в качестве «биореакторов».

### Выведение растений, устойчивых к насекомым-вредителям, вирусам и гербицидам

#### *Растения, устойчивые к насекомым-вредителям*

Если бы хлебные злаки можно было изменять методами генной инженерии так, чтобы они продуцировали функциональные инсектициды, то мы получили бы культуры, устойчивые к насекомым-вредителям и не требующие опрыскивания дорогостоящими и опасными химическими пестицидами (зачастую такое опрыскивание приходится проводить от шести до восьми раз в течение вегетационного периода). По оценкам, в 1995 г. на химические инсектициды во всем мире было израсходовано примерно 4 млрд. долларов. Отсюда следует, что себестоимость зерна при возделывании культур, устойчивых к насекомым-вредителям, была бы ниже, чем для неустойчивых. Кроме того, биологические инсектициды обычно действуют лишь на строго ограниченное число видов насекомых и безопасны для человека и других высших животных.

Для создания растений, устойчивых к насекомым-вредителям, с помощью генноинженерных методов были разработаны различные стратегии. В одном случае использовали ген инсектицидного протеина, продуцируемого одним из подвидов *Bacillus thuringiensis* (гл. 15). В другом — гены растительных белков типа ингибиторов амилазы или протеиназ, эффективных в отношении широкого круга насекомых. Насекомое, в организм которого попадал один из этих ингибиторов, было не способно переваривать растительную пищу, потому что ингибиторы препятствовали гидролизу крахмала или растительных белков.

Протоксин *B. thuringiensis* — это безопасное средство защиты растений: попадая в окружающую среду, он теряет активность. К сожалению, множество вредителей хлебных злаков питаются внутренними тканями растения, так что препараты *B. thuringiensis*, распыляемые на поверхность растений, оказываются малоэффективными. Эту проблему можно решить, если обеспечить экспрессию генов токсинов в самих растениях. Распылять инсектициды в этом случае не потребуется и токсины не попадут в окружающую среду, а кроме того, не возникнет проблем, связанных с ограничением времени их действия в результате разложения. Задача биотехнологов состоит в создании трансгенного растения, которое синтезировало бы активную форму бактериального инсектицида в количестве, достаточном для защиты растения от вреди-

Таблица 18. L Экспрессия некоторых генов, кодирующих инсектициды *Bacillus thuringiensis* в трансгенных растениях <sup>1) 2)</sup>

| Растение     | Ген                           | Экспрессия %    | Устойчивость к насекомым |
|--------------|-------------------------------|-----------------|--------------------------|
| Табак        | <i>cryIA(b)</i> , полн.       | 0,0001—0,0005   | Нет                      |
| Табак        | <i>cryIA(b)</i> , укороч.     | 0,003—0,012     | Да                       |
| Табак        | <i>cryIA(a)</i> , полн.       | Не определяется | Нет                      |
| Табак        | <i>cryIA(a)</i> , укороч.     | 0,00125         | Да                       |
| Табак        | <i>cryIA(c)</i> , укороч.     | <0,014          | Да                       |
| Томат        | <i>cryIA(b)</i> , укороч.     | 0,0001          | Да                       |
| Хлопок       | <i>cryIA(b)</i> , укороч., WT | <0,002          | Нет                      |
| Хлопок       | <i>cryIA(b)</i> , укороч., PM | 0,05—0,1        | Да                       |
| Томат, табак | <i>cryIA(b)</i> , укороч., WT | 0,002           | Да                       |
| Томат, табак | <i>cryIA(b)</i> , укороч., PM | 0,002—0,2       | Да                       |
| Томат, табак | <i>cryIA(b)</i> , укороч., FM | 0,3             | Да                       |

<sup>1)</sup> По данным работы Ely, p. 105- 124, in Entwistle et al. (ed)., *Bacillus thuringiensis*, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice, 1493.  
<sup>2)</sup> Обозначения: полн. — полноразмерный ген протоксина; укороч. — укороченная версия гена протоксина; WT — кодоны дикого типа; PM — частично измененные кодоны; FM — полностью измененные кодоны.

теля. Гены *cryIA(a)*, *cryIA(b)* и *cryIA(c)*, ответственные за синтез инсектицидных белков *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki*, практически не экспрессируются в растениях (табл. 18.1), а для выведения представляющих коммерческий интерес жизнеспособных растений, устойчивых к насекомым-вредителям, необходимо, чтобы эти белки синтезировались в большом количестве. Пытаясь решить эту проблему, уменьшили размер встроенного гена так, чтобы синтезировалась только N-концевая часть молекулы токсина, и снабдили его сильным растительным промотором, чтобы повысить уровень экспрессии. Количество синтезируемого токсина при этом значительно увеличилось, и трансгенные растения получили некоторую защиту от насекомых-вредителей.

Далее была поставлена задача найти минимальную длину нуклеотидной последовательности, обеспечивающей активность токсина. Чтобы определить, есть ли у разных токсинов одинаковый домен, сравнили аминокислотные последовательности протоксинов, продуцируемых различными штаммами *B. thuringiensis*. Оказалось, что N-концевой участок молекул протоксинов разных штаммов *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* высококонсервативен (гомология 98%), а С-концевой более вариабелен (гомология 45%). Дальнейшие исследования показали, что вся инсектицидная активность токсина обеспечивается первыми 646 N-концевыми аминокис-

лотными остатками молекулы протоксина, общая длина которой составляет 1156 аминокислот. Участок гена протоксина, кодирующий высококонсервативную аминокислотную последовательность, клонировали, экспрессировали в бактериях и обнаружили, что в отношении защиты растений от насекомых отряда чешуекрылых в лабораторных условиях укороченный белок столь же эффективен, как и его нативная форма.

Для всестороннего изучения способности укороченного гена протоксина обеспечивать защиту растений от различных насекомых-вредителей были выведены трансгенные растения томата. Укороченный ген, снабженный сильным конститутивным 35S-промотором вируса мозаики цветной капусты и сайтом терминации транскрипции/полиаденилирования гена нопалинсинтазы, клонировали в Т-ДНК коинтегративного Ti-плазмидного вектора (рис. 18.1). Вектор содержал также: 1) ген устойчивости к спектиномицину (*Spc<sup>r</sup>*), позволяющий проводить отбор либо в *E. coli*, либо в *A. tumefaciens*; 2) сайт инициации репликации *E. coli*; 3) ген неомицинфосфотрансферазы под контролем промотора и сайта терминации транскрипции/полиаденилирования гена нопалинсинтазы, позволяющий проводить отбор трансформированных растительных клеток в присутствии канамицина. Кроме того, коинтегративный вектор содержал правую фланкирующую последовательность Т-ДНК нопалиновой Ti-плазмиды и



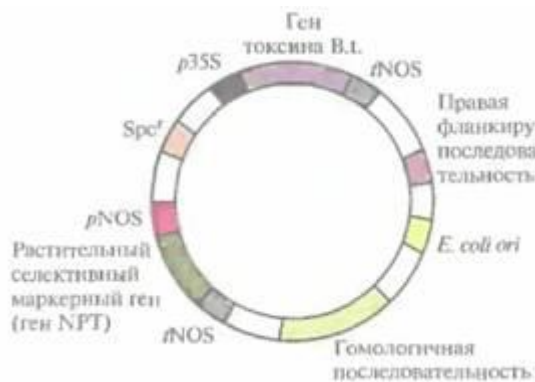


Рис. 18.1. Кointегративный клонирующий вектор, несущий ген инсектицидного токсина *B. thuringiensis* (B.t.). Ген находится под контролем сильного конститутивного 35S-промотора (*p35S*) вируса мозаики цветной капусты и сайта терминации транскрипции/полиаденилирования гена нопалинсинтазы (*tNOS*). Вектор содержит также: сайт инициации репликации *E. coli* (*ori*) и ген устойчивости к спектиномицину (*Spc<sup>r</sup>*), что обеспечивает его амплификацию в *E. coli* и позволяет проводить отбор соответствующих клеток; правую фланкирующую последовательность Т-ДНК; растительный селективный маркерный ген; последовательность, гомологичную неонкогенной Тi-плазмиде и обеспечивающую интеграцию двух плазмид. Ген неомицинофосфотрансферазы (*NPT*) находится под контролем элементов регуляции транскрипции гена нопалинсинтазы (*pNOS* и *tNOS*) и используется для отбора канамициноустойчивых трансформированных растительных клеток.

сегмент октопиновой Тi-плазмиды, обеспечивающий образование коинтеграта с «разоруженной» Тi-плазмидой с помощью гомологичной рекомбинации. Сконструированной плазмидой трансформировали *E. coli*, а затем с помощью конъюгации перенесли ее в штамм *A. tumefaciens*, содержащий «разоруженную» Тi-плазмиду. После рекомбинации в *A. tumefaciens* укороченный ген протоксина включался в хромосомную ДНК томата.

И в оранжерее, и при полевых испытаниях трансгенные растения томата, которые синтезировали укороченную форму протоксина, проявляли некоторую защищенность от таких насекомых, как бражник (*Manduca sexta*), совка, повреждающая плоды томата (*Heliothis zea*), выемчатокрылая моль (*Keiferia lycopersicella*) (табл. 18,2), Эффект был неодинаков для разных насекомых и не абсолютен: наиболее выражен он был в первых двух случаях. Иногда хороший результат давала обработка растений, синтезирующих про-токсин, химическим инсектицидом в низких дозах. Однако для того чтобы определить, как еще больше уменьшить ущерб, причиняемый указанными выше и другими насекомыми-вредителями, необходимы дальнейшие исследования,

Для кардинального повышения уровня экспрессии использовались два других подхода (табл. 18.1). В первом случае методом сайт-специфического мутагенеза изменяли те участки выделенного гена токсина, которые могли бы быть ответственны за снижение эффективности транскрипции или трансляции в растении-хозяине (в этих экспериментах использовали и табак, и томаты). При этом нуклеотидная последовательность измененного гена на 96,5% совпадала с таковой у гена дикого типа. Трансгенные растения, в которых экспрессировался такой "слабо" модифицированный ген, синтезировали в 10 раз больше токсина, чем растения, трансформированные геном дикого типа.

Во втором случае была разработана и синтезирована химическими методами «полностью»

Таблица 18.2. Чувствительность трансгенных растений томата и растений дикого типа к насекомым-вредителям "

| Насекомое           | Доля поврежденных растений или плодов, % |                 |                      |                 |
|---------------------|--|-----------------|----------------------|-----------------|
|                     | растения дикого типа                     |                 | трансгенные растения |                 |
|                     | без инсектицида                          | с инсектицидом  | без инсектицида      | с инсектицидом  |
| Бражник             | 47,5                                     | 3,75            | 1,25                 | 0,00            |
| Совка               | 20,1                                     | Не определяется | 6,4                  | Не определяется |
| Выемчатокрылая моль | 99,7                                     | 95,1            | 94,2                 | 80,4            |

<sup>1)</sup> По данным работы Delannay et al., *Bio/Technology* 7: 1265-1269, 1989.



измененная форма гена токсина. Такой ген содержал кодоны, чаще используемые растениями по сравнению с теми, которые «предпочитают» грамположительные бактерии. Были внесены также изменения, предотвращающие образование вторичной структуры у мРНК или исключающие появление сайтов полиаденилирования, характерных для растений, что могло бы снизить уровень экспрессии. GC-содержание «полностью» измененного гена было равно 49% (для гена дикого типа эта величина составляла 37%), а нуклеотидная последовательность была только на 78,9% гомологична таковой гена дикого типа.

Трансгенные растения, трансформированные сильно измененным геном протоксина, синтезировали в 100 раз больше токсина, чем растения, трансформированные геном дикого типа, при этом наблюдалась прямая корреляция с увеличением инсектицидной активности. Полученные данные позволяют надеяться, что аналогичным образом удастся повысить уровень экспрессии в растениях множества других чужеродных генов.

Количество синтезируемого в растениях протоксина попытались увеличить, осуществив экспрессию «полностью» измененного гена протоксина под контролем промотора гена малой субъединицы рибулозобисфосфат-карбоксилазы, помещенного после хлоропластной сигнальной последовательности этого фермента, таким образом, чтобы сверхпродуцируемый протоксин был локализован в хлоропластах. Эта стратегия привела к радикальному повышению уровня экспрессии гена протоксина, так что на долю протоксина стало приходиться до 1 % всех белков листа. В другом эксперименте ген протоксина вводили непосредственно в хлоропластную ДНК растения-хозяина. Это дает следующие преимущества. Во-первых, вводимый ген не нужно модифицировать, поскольку транскрипционный и трансляционный аппараты хлоропластов относятся к прокариотическому типу. Во-вторых, на одну клетку приходится много хлоропластов, а на один хлоропласт — много копий хлоропластной ДНК, поэтому ген протоксина присутствует в большом числе копий, и эффективность его экспрессии повышается. В-третьих, хлоропласты передаются только через яйцеклетку, а не через пыльцу, так что растения наследуют хлоропластную ДНК по материнской линии и нет никакого риска нежелательного переноса гена протоксина с пыльцой на другие растения.

Одна из форм гена протоксина уже введена и экспрессируется в таких растениях, как томаты, табак, картофель, рис, кукуруза, яблоня, баклажан, канола, люцерна, орех, тополь, ель, клюква и хлопок. Перспективы применения этого метода защиты растений кажутся весьма обнадеживающими. Так, в трансгенных растениях картофеля осуществлена эффективная экспрессия синтетического гена на основе гена инсектицидного токсина *B. thuringiensis* ssp. *tenebrionis* с кодовым словарем, используемым растениями. Полученные растения оказались высокоустойчивыми к колорадскому жуку, основному вредителю картофеля. Уже проведены успешные полевые испытания культуры в течение нескольких лет и получено разрешение на коммерческое ее использование в США. Следует помнить, однако, о необходимости постоянного контроля популяции насекомых-вредителей, с тем чтобы вовремя обнаружить устойчивые организмы. Возможно, в будущем для защиты трансгенного картофеля придется использовать более мощный протоксин *B. thuringiensis* или, что более вероятно, идентифицировать и клонировать в растениях другие инсектицидные гены в дополнение к генам протоксинов *B. thuringiensis*.

В настоящее время разрабатываются способы снижения селективного давления со стороны трансгенных растений, экспрессирующих ген протоксина *B. thuringiensis*, на устойчивых насекомых-вредителей. В одном случае экспрессию гена *B. thuringiensis* в трансгенном растении ограничивали по времени. Для этого его помешали под контроль промотора гена табака PR-1a (от англ. *pathogenesis-related*), экспрессия которого представляет собой часть естественного механизма защиты табака от болезнетворных организмов. Ген PR-1a индуцируется любым патогенным организмом или химическим агентом типа салициловой или полиакриловой кислоты. Обработав трансгенные растения, несущие ген протоксина *B. thuringiensis* под контролем PR-1a-промотора, химическим индуктором, обнаружили, что они синтезируют инсектицид в

заметном количестве в течение 1 сут после обработки, и этого достаточно для последующей защиты растений от насекомых-вредителей. Таким образом, можно индуцировать синтез протоксина, обработав трансгенное растение недорогим и безопасным химическим веществом в определенный момент вегетационного периода. Такая периодичность синтеза протоксина приводит к снижению селективного давления на устойчивых насекомых. Аналогичные системы могут оказаться полезными для регуляции синтеза самых разных чужеродных белков в трансгенных растениях.

Ни один из конкретных типов протоксина *B. thuringiensis* не может быть эффективным в отношении всех видов насекомых. В ходе эволюции растения выработали общие механизмы защиты от насекомых, обеспечивающие их выживание, однако степень этой защиты не всегда достаточна. Некоторые растения синтезируют ингибиторы протеиназ, которые, попадая в кишечник насекомого, блокируют гидролиз растительных белков. Разумно было предположить, что если выделить растительный ген ингибитора протеиназ и снабдить его сильным промотором, то можно будет создать трансгенные сельскохозяйственные культуры, способные синтезировать ингибитор протеиназ в количестве, достаточном для защиты от насекомых-вредителей. В одном из таких экспериментов с помощью химически синтезированного ДНК-зонда из банка клонов комплементарной ДНК (кДНК) был выделен клон, кодирующий ингибитор трипсина вигны китайской. (При синтезе ДНК-зонда руководствовались аминокислотной последовательностью этого белка.) Полноразмерную кДНК субклонировали в бинарный вектор на основе Ti-плазмиды (рис. 18.2) и ввели в штамм *A. tumefaciens*, содержащий неонкогенную Ti-плазмиду с активными *vir*-генами. После инфицирования листовых дисков табака *A. tumefaciens* этим вектором клетки, содержащие комплементарную ДНК, отбирали по способности к росту в присутствии канамицина и регенерировали из них трансгенные растения. Ущерб, наносимый личинками *Heliothis virescens* (совки) трансгенным растениям, синтезирующим более 2 мкг ингибитора трипсина на 1 мг растительного белка, был значительно меньше, чем в случае обычных растений.

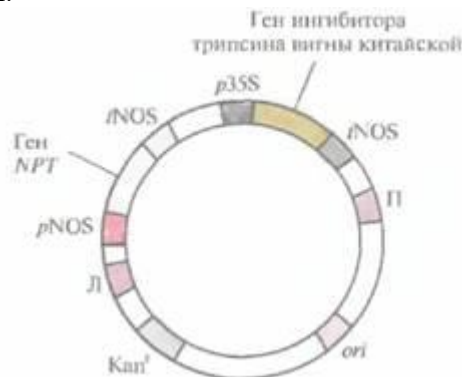


Рис. 18.2. Бинарный клонирующий вектор, несущий ген ингибитора трипсина вигны китайской. Вектор содержит сайт инициации репликации ДНК для широкого круга хозяев (*ori*) и ген устойчивости к канамицину (*Kan<sup>r</sup>*), который функционирует как в *E. coli*, так и в *A. tumefaciens*. Между правой (П) и левой (Л) фланкирующими последовательностями Т-ДНК находятся: 1) ген неомифосфотрансферазы (*NPT*) под контролем элементов регуляции транскрипции гена неомифосфотрансферазы (*pNOS* и *iNOS*), что позволяет проводить отбор канамицинустойчивых трансформированных растительных клеток; 2) ген ингибитора трипсина вигны китайской, находящийся под контролем 35S-промотора (*p35S*) вируса мозаики цветной капусты и сигнала терминации транскрипции/полиаденилирования гена неомифосфотрансферазы (*iNOS*).

Семена вигны китайской, содержащие указанное выше количество ингибитора, нетоксичны для животных и человека. Впрочем, если бы такая опасность и существовала, можно было бы ограничить экспрессию гена ингибитора теми тканями растения, которыми предпочитают питаться основные насекомые-вредители, но которые не используют в пищу человек и животные. Так, клонированный ген ингибитора протеиназ мог бы «работать» в листьях и корнях растения, но не в его плодах.

Введение гена ингибитора 11 протеиназы картофеля в растения риса защищает их от розового стеблевого точильщика (*Sesamia inferens*), основного насекомого-вредителя для этой культуры; заражение приводит к образованию полых стеблей и мертвых метелок без семян. Была сконструирована плазида, содержащая ген ингибитора 11 протеиназы картофеля под контролем его собственного промотора и сигнала терминации транскрипции. Между промотором и кодирующей областью гена ингибитора был

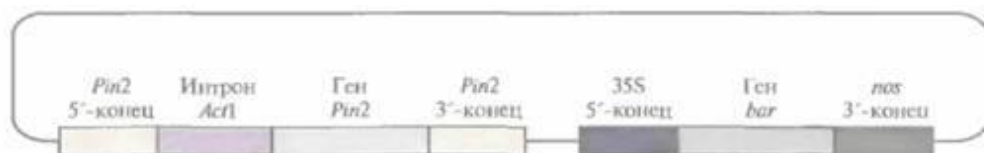


Рис. 18.3. Плазмидный вектор, несущий ген ингибитора II протеиназы картофеля. Обозначения: *Pin2* — ген ингибитора II протеиназы картофеля; 5'-конец — сегмент ДНК, предшествующий данному гену; 3'-конец — сегмент ДНК, следующий за геном; интрон *Act1* — первый интрон гена актина 1 риса; 35S 5'-конец — 35S-промотор вируса мозаики цветной капусты; *bar* — бактериальный ген фосфинотрицин-ацетилтрансферазы; *nos* 3'-конец — сегмент ДНК, следующий за геном нопалинсинтазы. Ген *bar* служит селективным маркером для трансгенных растений, обуславливая устойчивость к гербициду Basta (глюфофизату аммония).

встроен первый интрон гена актина риса. Эту конструкцию ввели в суспендированные клетки риса методом бомбардировки микрочастицами (рис. 18,3) и регенерировали из них трансгенные растения. Когда личинок розового стеблевого точильщика наносили на полученные таким образом растения, только от 15 до 20% последних оказывались поврежденными, в то время как для растений дикого типа эта величина составляла 70—100%. Поскольку растительные ингибиторы протеиназ являются обычными компонентами рациона человека и животных и в процессе приготовления пищи быстро инактивируются, их введение в новые зерновые культуры можно считать безопасным.

Другой подход к увеличению эффективности защиты растений с помощью токсина *B. thuringiensis* основан на параллельном использовании этого токсина и ингибитора сериновой протеиназы. Показано, что смесь очищенного токсина *B. thuringiensis* в количестве, обеспечивающем минимальную смертность насекомых, и ингибитора протеиназ в низких концентрациях обладает в 20 раз большей инсектицидной активностью, чем один протоксин *B. thuringiensis*. Чтобы проверить, будет ли эта система функционировать в трансгенных растениях, был сконструирован фрагмент ДНК, кодирующий гибридный белок «ингибитор протеиназ/укороченный токсин». Трансгенные растения табака, которые синтезировали небольшие количества такого рекомбинантного белка, были в значительной мере защищены от насекомых-вредителей.

Еще один способ защиты растений предполагает введение в них гена, кодирующего ингибитор  $\alpha$ -амилазы. Большой ущерб зерновым приносят такие насекомые, как зерновка (*Callosobruchus maculatus*) и долгоносик лучистой фасоли (*C. chinensis*), питающиеся семенами. Если в рацион личинок этих насекомых включить обычную фасоль (*Phaseolus vulgaris*), то рост насекомых замедляется. Это связано с присутствием в семенах обычной фасоли ингибитора  $\alpha$ -амилазы. Ген ингибитора  $\alpha$ -амилазы, выделенный из обычной фасоли, был помещен под транскрипционный контроль сильного семяспецифичного промотора гена фитогемагглютинаина бобов и использован для трансформации гороха (*Pisum sativum*), обычно весьма чувствительного к упомянутым выше насекомым. Трансгенные растения гороха, которые синтезировали ингибитор  $\alpha$ -амилазы, были устойчивы к обоим насекомым, при этом в случае зерновки эффект оказался пропорциональным количеству ингибитора, синтезированному растением (рис. 18.4).

Альтернативный подход к выведению трансгенных растений, устойчивых к насекомым, основан на использовании бактериального гена холестеролоксидазы. Этот фермент, синтезируемый различными бактериями, катализирует окисление 3-гидроксистероидов с образованием кетостероидов и пероксида водорода. Его часто используют при определении уровня холестерина в сыворотке крови у человека, а в небольших количествах он проявляет высокую инсектицидную активность против личинок хлопкового долгоносика (*Anthonomus grandis grandis*) (рис. 18.5). Это широко распространенное насекомое отряда жесткокрылых наносит ощутимый ущерб хлопковым плантациям. В отношении насекомых-вредителей отряда чешуекрылых холестеролоксидаза менее эффективна. Действие фермента, по-видимому, заключается в разрушении мембраны эпителиальных клеток средней кишки насекомого, что приводит к его гибели. Ген

Рис. 18.4. Зависимость смертности личинок зерновки, развивающихся на трансгенных растениях гороха, от количества ингибитора  $\alpha$ -амилазы, синтезируемого растениями.

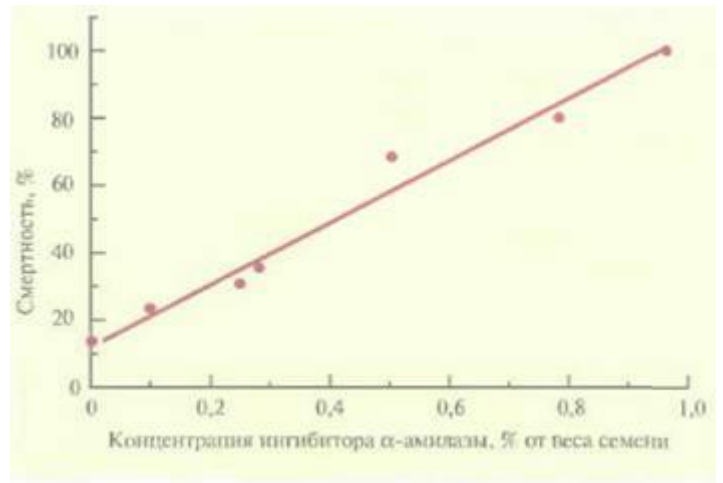
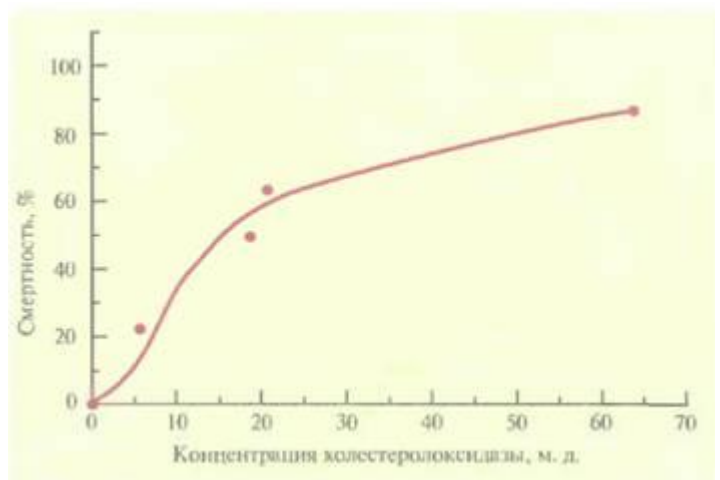


Рис. 18.5. Зависимость смертности личинок хлопкового долгоносика от концентрации холестеролоксидазы. (Corbin et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4239-4244, 1994.)



холестеролоксидазы, кодирующий белок мол. массой 55 000 Да (504 аминокислотных остатка) и лидерный пептид мол. массой 5000 Да (43 аминокислотных остатка), был выделен из штамма *Streptomyces* и встроен в вектор вместе с промотором вируса мозаики норичника шишковатого и сигналом терминации из 3'-области гена нопалинсинтазы *A. tumefaciens*. Когда такую конструкцию ввели в протопласты клеток табака, трансформированные клетки стали активно экспрессировать холестеролоксидазу. В будущем, вероятно, этот ген будет введен в растения хлопка, и тогда — либо самостоятельно, либо в комбинации с генами других биологических инсектицидов — он станет эффективным инструментом защиты растений от насекомых-вредителей.

### **Растения, устойчивые к вирусам**

Вирусы растений часто причиняют значительный ущерб растениям и существенно снижают урожай. Чтобы не прибегать к обработке культур химическими препаратами, селекционеры попытались перенести природные гены устойчивости к вирусам от одной линии растений к другой. Однако устойчивые растения часто вновь становятся чувствительными, а устойчивость к одному вирусу не гарантирует устойчивости к другим. Природный иммунитет к вирусным инфекциям обуславливается разными причинами: блокированием проникновения вируса в растение, предотвращением его распространения, подавлением симптомов вирусной инфекции.

Чтобы получить растения, устойчивые к вирусам, проводили их «иммунизацию» вирусными генами, кодирующими белки оболочки, другими вирусными генами или бессмысленными последовательностями вирусного генома.

Если в трансгенном растении экспрессируется ген, кодирующий белок оболочки вируса, который обычно инфицирует это растение (а данный белок зачастую является основным белковым компонентом вируса), то способность вируса проникать в растение и распространяться в нем часто значительно уменьшается. Механизм ингибирования пролиферации вируса в присутствии генов белка оболочки точно не установлен, однако ясно, что противовирусное действие начинает проявляться на ранних стадиях репликации вируса, так что вирусные частицы не образуются. Это снижает вероятность возникновения спонтанных вирусных мутантов, способных к репликации в присутствии вирусного белка оболочки. С помощью этого подхода были получены устойчивые к различным вирусам трансгенные растения множества различных зерновых культур (табл. 18.3). И хотя абсолютной устойчивости при этом достичь не удалось, ее уровень был весьма высок. Более того, обнаружилось, что ген белка оболочки одного вируса иногда обеспечивает устойчивость к широкому кругу неродственных вирусов. Ценность подхода повышается и благодаря тому, что трансгенные растения развиваются одинаково как в полевых условиях, так и в лаборатории.

Молекула РНК, комплементарная транскрипту нормального гена (мРНК), называется антисмысловой, а сама мРНК, участвующая в трансляции, — смысловой. Антисмысловая РНК образует дуплекс с мРНК, блокируя тем самым трансляцию, так что в ее присутствии синтез белкового продукта соответствующего гена уменьшается. Кроме того, дуплекс антисмысловая РНК—мРНК быстро деградирует, что уменьшает содержание конкретной мРНК в клетке. Учитывая все сказанное выше, можно попытаться предотвратить репликацию растительных вирусов и защитить от них растения, введя в них ген, обеспечивающий синтез антисмысловых РНК, комплементарных мРНК вирусного белка оболочки.

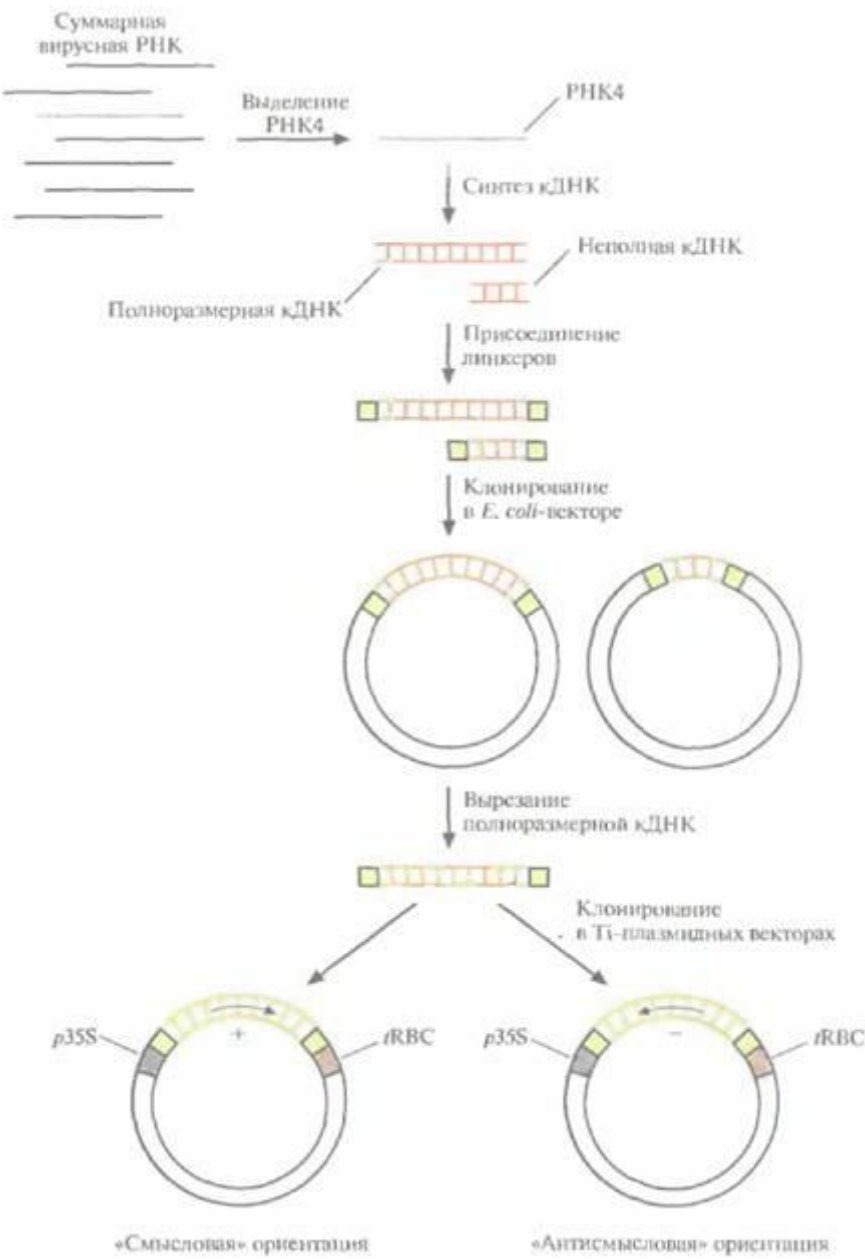
Таблица 18.3. Некоторые устойчивые к вирусам трансгенные растения, синтезирующие белки оболочки вирусов<sup>1)</sup>

| Растение   | Вирусы — источники генов            |
|--|-------------------------------------|
| <i>Nicotiana benthamiana</i> , <i>N. clevelandii</i> | Вирус скрытой мозаики сливы         |
| <i>N. benthamiana</i> , тыква                        | Вирус 2 мозаики арбуза              |
| <i>N. benthamiana</i> , тыква                        | Вирус желтой мозаики кабачков       |
| Папайя, табак  | Вирус кольцевой пятнистости папайи  |
| Картофель  | Вирус скручивания листьев картофеля |
| Картофель  | Вирус V картофеля                   |
| Картофель, <i>Nicotiana debneyi</i>                  | Вирус S картофеля                   |
| Картофель, табак                                     | Вирус X картофеля                   |
| Рис  | Вирус полосатости риса              |
| Табак  | Вирус мозаики резухи                |
| Табак  | Вирус мозаики сои                   |
| Табак  | Вирус гравировки табака             |
| Табак  | Вирус полосатости табака            |
| Табак  | Вирус бронзовости томата            |
| Табак, люцерна, томат                                | Вирус мозаики люцерны               |
| Табак, огурец  | Вирус мозаики огурца                |
| Табак, <i>N. benthamiana</i>                         | Вирус погречковости табака          |
| Табак, томат   | Вирус табачной мозаики              |
| Томат  | Вирус мозаики томатов               |

<sup>1)</sup> По данным работы Fitch, Beachy, *Annu. Rev. Microbiol.* 47: 739-763. 1993.

Для сравнения эффективности подходов, основанных на использовании вирусного гена белка оболочки, с одной стороны, и антисмысловой РНК - с другой, клонировали кДНК белка оболочки вируса мозаики огурца (CuMV) в растениях табака в двух ориентациях, «смысловой» и «антисмысловой» (в каждом конкретном растении — одна из этих ориентаций), а затем определили чувствительность трансгенных растений к вирусной инфекции (рис. 18.6). Геном CuMV представлен тремя отдельными одноцепочечными молекулами РНК, каждая из которых кодирует определенный вирусный белок. In vivo одна из этих молекул — РНК3 — подвергается процессингу; часть ее последовательности удаляется и образуется РНК4, кодирующая вирусный белок оболочки. Создание трансгенных растений, которые синтезируют либо нормальную мРНК и вирусный белок оболочки, либо соответствующую антисмысловую РНК, включает следующие

Рис. 18.6. Процедура введения кДНК белка оболочки вируса мозаики огурца в растительные клетки. РНК4, кодирующую белок оболочки, выделяют из суммарного препарата вирусной РНК и используют в качестве матрицы для синтеза двухцепочечной кДНК. К кДНК присоединяют линкерные последовательности и встраивают ее в вектор на основе *E. coli*-плазмиды. Отбирают клоны, содержащие полноразмерную кДНК, вырезают ее из *E. coli*-вектора и встраивают в Ti-плазмидный вектор между 35S- промотором вируса мозаики цветной капусты (p35S) и сигналом терминации транскрипции гена малой субъединицы рибулозобисфосфат-карбоксилазы (*tRBC*). При этом кДНК РНК4 встраивается в двух ориентациях, так что в одном случае транскриптом является смысловая РНК и синтезируется белок оболочки, в другом образуется РНК, комплементарная мРНК белка оболочки, — антисмысловая РНК.



1. Выделение РНК4.
2. Ферментативный синтез in vitro кДНК на РНК4.
3. Присоединение к кДНК линкерных последовательностей.
4. Встраивание полноразмерной кДНК в векторы для клонирования в обеих ориентациях, в каждой из которых она находится под контролем 35S-промотора вируса мозаики цветной капусты и регуляторных сигналов терминации транскрипции растительного гена малой субъединицы рибулозобисфосфаткарбоксилазы.
5. Регенерация отдельных трансгенных растений, в геном которых встроена кДНК в одной из двух возможных ориентации.

Для введения кДНК, кодирующих смысловую (белок-кодирующую) и антисмысловую



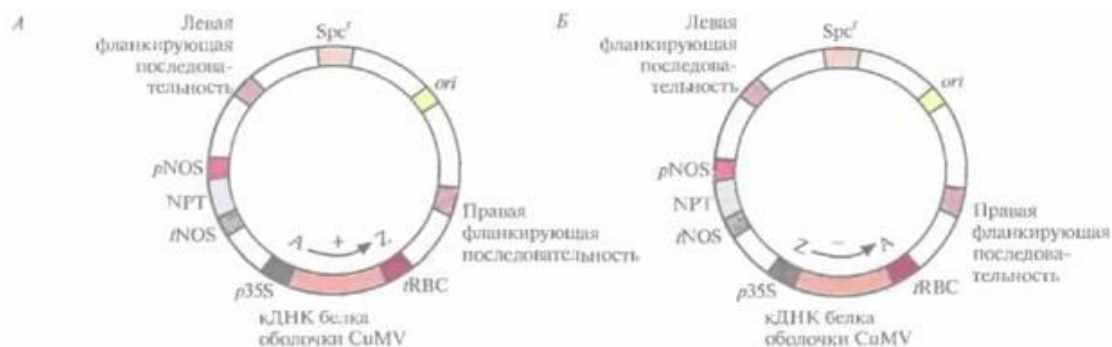


Рис. 18.7. Бинарные клонирующие векторы на основе Ti-плазмид, содержащие кДНК белка оболочки вируса мозаики огурца (CuMV) в «смысловой» (А) или «антисмысловот» (Б) ориентации. кДНК находятся под контролем 35S-промотора (p35S) вируса мозаики цветной капусты и сигнала терминации транскрипции/полиаденилирования гена малой субъединицы рибулозобисфосфат-карбоксилазы (rRBC). Векторы содержат также ген неоминифосфотрансферазы (ген NPT), находящийся под контролем элементов регуляции транскрипции гена нопалинсинтазы (pNOS и rNOS), ген устойчивости к спектиномицину (Spc<sup>r</sup>), правую и левую фланкирующие последовательности Т- ДНК и сайт инициации репликации ДНК для широкого круга хозяев (ori). А —> Z — «смысловая» ориентация кДНК, Z —> А — «антисмысловая».

РНК, в отдельные клетки табака использовали бинарную векторную систему на основе Ti-плазмид (рис. 18.7). В трансгенных растениях, синтезирующих белок оболочки вируса CuMV, вирусные частицы не накапливались и симптомы инфекции не проявлялись независимо от титра инокулята. В отличие от этого трансгенные растения, синтезирующие антисмысловую РНК белка оболочки CuMV, проявляли устойчивость только при малых концентрациях вирусных частиц в инокуляте.

Сходные результаты были получены в других лабораториях, где были созданы трансгенные растения, синтезирующие антисмысловые РНК-копии генов вирусных белков оболочки, и проверено, смогут ли эти растения противостоять вирусной инфекции. Во всех случаях растения проявляли устойчивость к инфекции, только если титр используемого инокулята был мал. Общий вывод, который можно сделать из подобных экспериментов, состоит в следующем: антисмысловые РНК-копии генов вирусных белков оболочки обеспечивают гораздо худшую защиту трансгенных растений от вирусных инфекций, чем смысловые копии генов белков оболочки вируса. Возможно, не стоит совсем отказываться от стратегии защиты, основанной на использовании антисмысловой РНК, однако прежде чем внедрять эту методику, ее необходимо значительно усовершенствовать.

Часто сельскохозяйственные культуры бывают подвержены нескольким вирусным инфекциям; любая из них может нанести ущерб растениям и снизить урожай. В идеале трансгенные растения должны быть устойчивы более чем к одному вирусу. Чтобы достичь этой цели, для трансформации растений желтой яйцевидной тыквы (*Cucurbita pepo*) использовали бинарные векторы на основе Ti-плазмид, несущие один или несколько генов белков оболочки CuMV, вируса желтой мозаики кабачков и вируса 2 мозаики арбуза (рис. 18.8). Трансгенные растения, в которых экспрессировались все три гена, в лабораторных условиях были устойчивы ко всем указанным вирусам. Растения, экспрессирующие гены белков оболочки вируса желтой мозаики кабачков и вируса 2 мозаики арбуза, были проверены в полевых условиях на устойчивость к тлям — насекомым, являющимся природным переносчиком этих вирусов в растущие растения. Если в растении экспрессировались оба гена белков оболочки, то они проявляли полную устойчивость к одновременной инфекции этими вирусами (рис. 18.9), а если наблюдалась экспрессия только одного из вирусных белков оболочки, то заражение происходило не сразу,

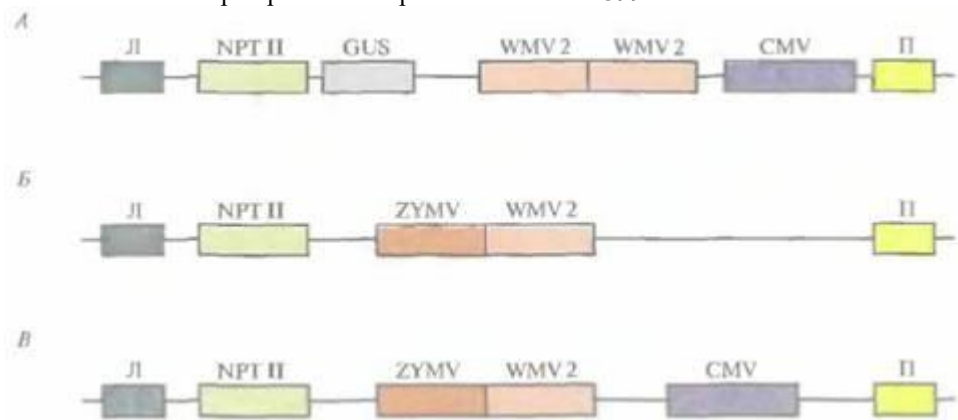
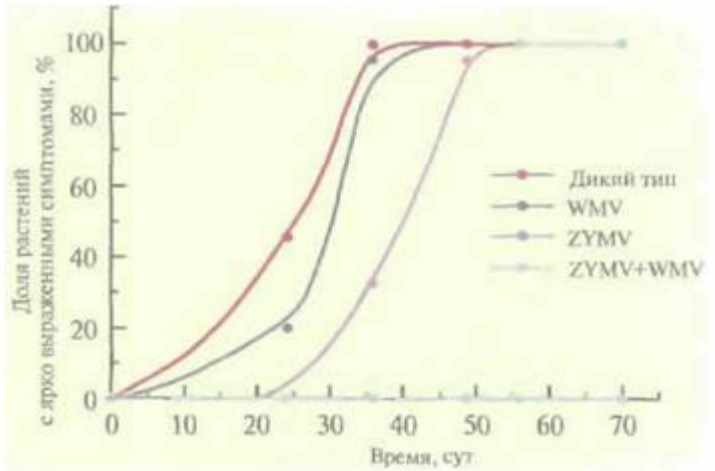


Рис. 18.8. А. Т-ДНК, несущая ген неомицинофосфотрансферазы (NPTII) в качестве селективного маркера, ген β-глюкуронидазы (GUS) в качестве репортерного гена, две копии гена белка оболочки вируса 2 мозаики арбуза (WMV2) и ген белка оболочки вируса мозаики огурца (CMV). Левая и правая фланкирующие последовательности Т-ДНК обозначены Л и П соответственно. Б. Конструкция, аналогичная конструкции А, но без CMV и NPTII, содержащая одну копию WMV2 и ген белка оболочки вируса желтой мозаики кабачков (ZYMV). В. Конструкция, аналогичная конструкции Б, но содержащая CMV. Во всех трех конструкциях присутствуют соответствующие промоторы и сигналы терминирования транскрипции.

Рис. 18.9. Частота заболеваний трансгенных растений желтой яйцевидной тыквы и растений дикого типа в полевых условиях. Для передачи растениям тыквы смеси вируса желтой мозаики кабачков (ZYMV) и вируса 2 мозаики арбуза (WMV) использовали тлю. (По данным работы Fuchs, Gonsalves, *Bio/Technology* 13: 1466-1473, 1995.)



но в конце концов все симптомы вирусной инфекции проявлялись, и растение утрачивало коммерческую ценность. Итак, ясно, что наиболее эффективной стратегией при выведении трансгенных растений, устойчивых ко всем основным вирусам, замедляющим их рост и развитие, является введение в них нескольких генов, детерминирующих синтез белков оболочки вирусов.

Имеются предварительные данные о том, что трансгенные растения, в которых экспрессируются вирусные гены, отличные от генов белков оболочки (например, ген вирусных сателлитных РНК или ген репликации вируса), также оказываются в какой-то мере защищенными от вирусных инфекций, но насколько эффективными и применимыми будут соответствующие подходы, пока неясно.

Защита растений от патогенных вирусов может осуществляться не только их «иммунизацией» генами вирусных белков, но и при участии противовирусных белков, синтезируемых сами-

ми растениями. Например, в клеточной стенке фитолакки американской (*Phytolacca americana*) присутствуют три разных противовирусных белка: РАР, синтезируемый в листьях весной, РАРП, обнаруживаемый в листьях летом, и РАР-S, содержащийся в семенах. Эти белки легко выделить из водных экстрактов измельченных тканей растения. Если небольшое количество РАР нанести на листья других растений, то последние также окажутся устойчивыми к нескольким вирусам. Таким образом, ген белка РАР вполне можно использовать для получения трансгенных растений, устойчивых к широкому спектру вирусов растений.

Выделенную кДНК РАР вводили в геном табака и картофеля с помощью бинарных векторов на основе Ti-плазмид. Трансформанты, синтезирующие РАР в большом количестве ( $> 10$  нг на 1 мг суммарного белка), были чахлыми, пятнистыми и бесплодными, растения же с более низким содержанием РАР (1—5 нг на 1 мг белка) имели нормальный внешний вид и были фертильны. Эти данные говорят о том, что если концентрация РАР превышает некоторый пороговый уровень, то нормальное функционирование клетки нарушается. Противовирусный эффект белка РАР в трансгенных растениях проявляется в основном в уменьшении числа повреждений; однако, если уж повреждение возникало, то растение систематически инфицировалось. Отсюда следует, что РАР подавляет вирусную инфекцию на ранней стадии. Тем не менее, когда трансгенные растения табака и картофеля, экспрессирующие РАР в небольших количествах, инфицировали вирусами картофеля Х или Y, на листьях обнаруживалось значительно меньше повреждений, чем в случае нетрансформированных контрольных растений. Поскольку противовирусное действие РАР проявляется при относительно небольших его концентрациях, можно попытаться создать транс-генные растения, синтезирующие этот белок в малом количестве, и параллельно использовать другие способы защиты растений от вирусов.

### *Растения, устойчивые к гербицидам*

Несмотря на то что на производство более 100 различных химических гербицидов во всем мире ежегодно расходуется 10 млрд. долларов, примерно 10% урожая теряется из-за большого количества сорняков. Кроме того, многие гербициды оказывают одинаковое действие на сорняки и сельскохозяйственные культуры; нередко обработку полей необходимо проводить еще до появления сорняков, а некоторые гербициды накапливаются в окружающей среде. Чтобы решить хотя бы некоторые из этих задач, можно попытаться создать сельскохозяйственные культуры, устойчивые к гербицидам. Для этого можно

- уменьшить поглощение гербицида растением
- обеспечить синтез белка, чувствительного к гербициду, в таком количестве, чтобы его хватало на выполнение присущих ему функций в присутствии гербицида
- уменьшить способность белка, чувствительного к гербициду, к связыванию с ним
- обеспечить инактивацию гербицида в растении в ходе метаболизма.

Из этих подходов были реализованы три последних. Выведенные с их помощью гербицидустойчивые трансгенные растения перечислены в табл. 18.4.

Были получены растения, устойчивые к гли-фосфату - гербициду, быстро разлагающемуся в почве на нетоксичные составляющие и потому безопасному для окружающей среды. Глифос-фат является ингибитором 5-енолпирувилши-кислот-3-фосфатсинтазы (EPSPS) - фермента, играющего важную роль в синтезе ароматических аминокислот и у бактерий, и у растений. Из глифосфатустойчивого штамма *E. coli* был выделен ген, кодирующий EPSPS, помещен под контроль растительного промотора и сигналов терминирования транскрипции/полиаденилирования и введен в растительные клетки. Трансгенные растения табака, петунии, томата, картофеля и хлопка, синтезировавшие EPSPS в количестве, достаточном для замены ингибированного гербицидом растительного фермента, были устойчивы к глифосфату и при обработке, в отличие от сорняков, не погибали.

Другой способ приобретения устойчивости — с помощью инактивации гербицида — был реализован для бромоксилина (3,5-дибром-4-гид-

Таблица 18.4. Некоторые примеры генетически обусловленной устойчивости к гербицидам

| Гербицид  | Способ приобретения устойчивости   |
|---|--|
| Триазины  | Изменение гена <i>psbA</i> , кодирующего хлоропластный белок D-1, на который этот гербицид действует   |
| Сульфонилуреазы   | Введение в растительный геном генов, кодирующих устойчивые формы ацетолактатсинтетазы (гены вводились в растения тополя, канолы, льна и риса)  |
| Имидазолиноны   | Отбор в культуре клеток линий, синтезирующих устойчивые формы ацетолактатсинтетазы   |
| Арилоксифеноксипропионаты<br>циклогександионы               | Эти гербициды ингибируют ацетил-CoA— карбоксилазу. Отбор проводился в культуре тканей. Устойчивость обеспечивалась либо изменением фермента, так что он становился нечувствительным к гербициду, либо разрушением гербицида                              |
| Глифосфат   | Устойчивость обеспечивается сверхпродукцией фермента EPSPS, на который действует этот гербицид. Устойчивость приобретается трансформацией сои геном EPSPS, устойчивой к глифосфату, и табака геном глифосфатоксидоредуктазы, которая разрушает глифосфат |
| Бромоксинил   | Устойчивость к этому ингибитору фотосистемы II обеспечивается трансформацией табака или хлопка бактериальным геном нитрилазы, кодирующим фермент, разрушающий гербицид   |
| Феноксикарбоксильные<br>кислоты (например, 2,4-D и 2,4,5-T) | Устойчивые растения табака и хлопка были созданы трансформацией геном <i>tfdA</i> из <i>Alcaligenes</i> , кодирующим диоксигеназу, которая разрушает гербицид  |
| Глюфолинат<br>(фосфинотрицин)                               | Более 20 различных растений были трансформированы либо геном <i>bar</i> из <i>Streptomyces hygroscopicus</i> , либо геном <i>pat</i> из <i>S. viridochromogenes</i> . Фосфинотрицинацетилтрансфераза, кодируемая этими генами, обеспечивала детоксикацию |
| Цианамид  | Устойчивые растения табака получали при введении гена цианамидгидратазы из гриба <i>Myrothecium verrucaria</i> . Фермент, кодируемый этим геном, катализирует превращение цианамида в мочевины   |
| Далапон   | Растения табака трансформировали геном дегалогеназы <i>Pseudomonas putida</i> , которая обеспечивала детоксикацию  |

роксибензонитрила) — гербицида, который ингибирует фотосинтез. Устойчивые растения создавали путем введения в их геном бактериального гена, кодирующего нитрилазу, которая инактивирует бромоксинил еще до того, как он начинает действовать (рис. 18.10). Из почвенной бактерии *Klebsiella ozaenae* был выделен ген нитрилазы, помещен под контроль светочувствительного промотора гена малой субъединицы

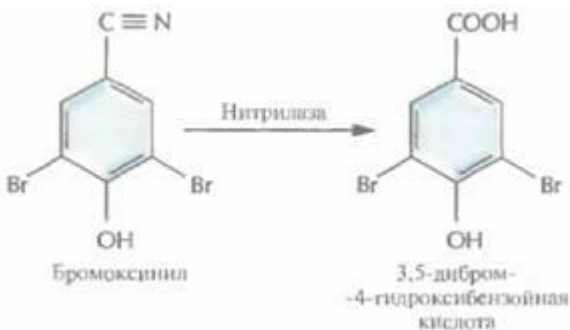


Рис. 18.10. Инактивация гербицида бромоксинила при помощи нитрилазы *K. ozaenae*.

рибулозобисфосфат-карбоксилазы и встроен в геном табака. Трансгенные растения синтезировали активную нитрилазу и были устойчивы к бромоксинилу.

Растения, устойчивые к грибам и бактериям

Фитопатогенные грибы наносят весьма ощутимый вред сельскохозяйственным культурам. По оценкам, убытки, которые терпят фермеры Юго-Восточной Азии, Японии и Филиппин в результате поражения грибом, вызывающим пирикулярриоз, одного из основных зерновых этого региона, риса, исчисляются примерно 5 млрд. долл. в год. Сейчас основной способ борьбы с фитопатогенными грибами состоит в обработке растений химическими веществами, которые накапливаются в окружающей среде и представляют опасность для животных, в том числе и для человека. Поэтому очень важно выработать другие, простые, недорогие, эффективные и безопасные для окружающей среды нехимические методы защиты сельскохозяйственных культур от грибов.

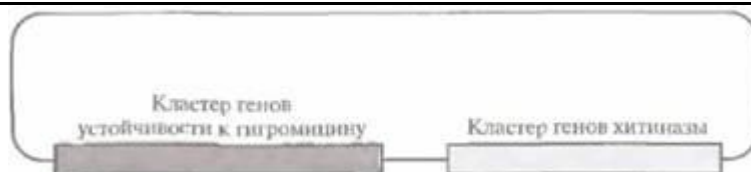


Рис. 18.11. Плазмидный вектор, содержащий кластер генов хитиназы риса и кластер генов устойчивости к гиромизину, использовавшийся для трансформации протопластов риса. Трансформацию осуществляли обработкой протопластов полиэтиленгликолем в присутствии плазмидного вектора. Затем отбирали клетки, устойчивые к гиромизину, и проводили тестирование клеток на наличие генов хитиназы с помощью гибридизации по Саузерну и на наличии самой хитиназы методом Вестерн-блоттинга. Далее из клеток регенерировали целые растения.

Часто в ответ на проникновение патогенов растения начинают синтезировать группу специфических PR-белков (от англ. pathogenesis-related proteins). В эту группу входят р-1,3-глюканаза, хитиназа, тауматинподобные белки (тауматин — небольшой, очень сладкий белок) и ингибиторы протеиназ; все они так или иначе воздействуют на патогены. Имея это в виду, ученые попытались вывести растения, устойчивые к болезнетворным грибам, способные конститутивно экспрессировать гены одного или нескольких PR-белков. Так, были получены трансгенные растения, синтезирующие в большом количестве хитиназу, фермент, гидролизующий  $\beta$ -1,4-связи в молекуле N-ацетил-D-глюкозамина, основного компонента клеточной стенки грибов (рис. 18.11).

Среди таких растений были рис, табак и канولا. Соответствующие гены, введенные в растительный геном, были поставлены под контроль 358-промотора вируса мозаики цветной капусты. Кроме того, были созданы трансгенные растения табака, которые конститутивно синтезировали не только хитиназу, но и  $\beta$ -глюканазу. Такие растения были получены скрещиванием одного трансгенного растения, экспрессирующего ген хитиназы, с другим, экспрессирующим ген  $\beta$ -глюканазы. Трансгенные растения, синтезирующие хитиназу, были более устойчивы к болезнетворным грибам, чем контрольные, даже при том, что последние синтезировали собственные PR-белки в ответ на инфицирование грибами. Кроме того, при этом способность полезного гриба *Glomus mosseae* закрепляться на корнях растений никак не нарушалась. Возможно, это связано с различиями в составе клеточных стенок данных грибов. Существенно, что трансгенные растения, конститутивно синтезирующие хитиназу, не были подвержены грибковым заболеваниям в полевых условиях. По-видимому, описанный подход окажется весьма эффективным способом защиты растений от патогенных грибов.

По оценкам, ущерб, наносимый урожаю картофеля в результате поражения этой культуры патогенной почвенной бактерией *Erwinia carotovora*, составляет примерно 100 млн. долл. в год. Положение усугубляется тем, что у растений не выявлено никаких способов защиты от данной инфекции, которые можно было бы использовать для выведения устойчивых коммерческих сортов. Чтобы решить эту проблему, группа исследователей вывела трансгенные растения картофеля, активно экспрессирующие ген лизоцима бактериофага T4. При этом лизоцим секретировался в апопласт (межклеточное пространство), компартмент, в который проникает и где распространяется *E. carotovora*. Чтобы обеспечить специфичность секреции, к гену лизоцима фага T4 была «пришита» последовательность, кодирующая сигнальный пептид  $\alpha$ -амилазы ячменя, и ген помещен под транскрипционный контроль 35S-промотора вируса мозаики цветной капусты, сигнала терминации транскрипции и сайта полиаденилирования. Хотя ген лизоцима находился под контролем столь сильного промотора, синтезировалось лишь очень небольшое количество лизоцима. Однако трансгенные растения, геном которых содержал такую конструкцию, оказались устойчивыми к большим количествам *E. carotovora* и в лабораторных условиях, и в оранжерее. В естественных условиях эти болезнетворные бактерии присутствуют в гораздо меньших количествах, чем те, которые ис-



Светоиндуцируемая экспрессия химерного гена, введенного в *Nicotiana tabacum* с помощью Ti-плазмидного вектора

L. Herrera-Estrelia, G. Van den Broeck, R. Maenhaut, M. Van Montagu, J. Schell, M. Timko, A. Cashmore  
Na/ure3W: 115-120, 1984

С разработкой Ti-плазмидной системы трансформации растений ни, например в листьях или вани мРНК. Обычно ген у исследователей появилась определенной стадии развития рибулзобисфосфат-возможность введения в них растения, например во время карбоксилазы экспрессируется чужеродных генов с целью развития проростка, образования только в зеленых или синтеза различных ценных плода или в условиях фотосинтезирующих тканях; как и белковых продуктов. Вначале высокотемпературного стресса. ожидалось, там же большинство генов, вводимых в Первый шаг к выведению таких экспрессировался ген растительные клетки, находились растений был сделан Херрера-хлорамфеникол-под транскрипционным контролем Истреллой с сотрудниками, ацетилтрансферазы. Это была сильного конститутивного 35S- которые сконструировали одна из первых работ, промотора вируса мозаики химерный ген, содержащий показавших, что, несмотря на всю цветной капусты или немного следующие элементы: 5 '- свою сложность, растительные менее сильного конститутивного фланкирующий участок гена промоторы способны промотора гена нопалинсинтазы, малой субъединицы рибулзобисфосфат-карбоксилазы гороха; гетерологичных белков в строго ДНК. Однако для получения колирующий участок определенных тканях. растений с новыми полезными бактериального гена Впоследствии разнообразные признаками часто бывает хлорамфеникол-ацетил- растительные промоторы широко необходимо, чтобы трансферазы; 3'-фланкирующий использовались для регуляции специфические белки участок гена нопалинсинтазы, экспрессии гетерологичных генов синтезировались только в содержащий сигналы терминации в трансгенных растениях в определенной тка- транскрипции и полиаденилиро- нужных тканях и на определенных стадиях развития.

пользовались в лабораторных испытаниях, так что есть надежда, что упомянутая генетическая конструкция сможет обеспечить надежную защиту растений. Кроме того, поскольку лизоцим лизирует различные грамположительные и грамотрицательные бактерии, этот подход можно будет использовать для защиты растений от самых разных болезнетворных бактерий.

Получение растений, противостоящих неблагоприятным воздействиям и старению

В отличие от большинства животных, растения физически не могут защитить себя от неблагоприятных воздействий со стороны окружающей среды; высокой освещенности, ультрафиолетового облучения, высоких температур и концентрации солей и т. д., поэтому в процессе эволюции у них выработались физиологические механизмы противодействия экстремальным условиям. Одним из нежелательных последствий физиологического стресса является образование радикалов кислорода. Разумно было предположить, что если удастся создать растения, толерантные к большим концентрациям радикалов кислорода, то такие растения смогут противостоять различным неблагоприятным воздействиям.

Окислительный стресс

Наиболее распространенным радикалом кислорода, представляющим опасность для растений, является супероксид-анион. Фермент супероксиддисмутаза нейтрализует это соединение, превращая его в пероксид водорода, который в свою очередь превращается в воду любой из множества клеточных пероксидаз или каталаз (рис. 18.12). В одном из экспериментов были получены трансформированные растения табака, несущие ген супероксиддисмутазы под контролем 35S-промотора вируса мозаики цветной капусты. Они синтезировали супероксиддисмутазу и были устойчивы к повреждающему действию радикалов кислорода.

У растений имеются несколько изоформ супероксиддисмутазы. Cu/Zn-супероксиддис-



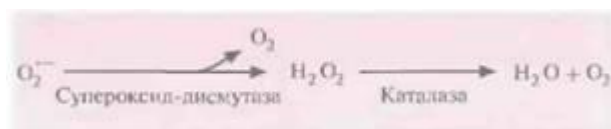


Рис. 18.12. Превращение супероксид-аниона в пероксид водорода, а затем в воду и кислород.

мутазы содержатся главным образом в хлоропластах и в небольшом количестве в цитозоле. Мп-супероксид-дисмутазы локализируются в митохондриях, а некоторые растения синтезируют Fe-супероксид-дисмутаза. Трансгенные растения табака, несущие «ДНК хлоропластом Cu/Zn-супероксид-дисмутаза под контролем 35S-промотора вируса мозаики цветной капусты, были гораздо более устойчивы к яркому свету, чем нетрансформированные растения. Обнаружилось, что фотосинтетическая активность у трансгенных растений сохранялась на 94% в условиях, при которых нетрансформированные растения полностью ее утрачивали. Трансгенные растения, синтезирующие Мп-супероксиддисмутаза, аккумулирующуюся в хлоропластах, были в три-четыре раза менее чувствительны к повреждающему действию озона, чем контрольные нетрансформированные.

Повышение уровня супероксиддисмутаза дает еще одно преимущество: растения становятся более устойчивыми к гербициду метилвиологену и к световому воздействию. Супероксид-дисмутаза способствует также сохранению срезанных цветов при транспортировке. Их увядание тоже происходит в результате образования радикалов кислорода. Если бы удалось создать трансгенные растения, содержащие ген супероксид-дисмутаза, который находится под контролем промотора, специфичного для цветков, это могло бы отсрочить их увядание.

### Солевой стресс

Многие растения произрастают в регионах, где часто бывают засухи или где сильно засолена почва. Чтобы приспособиться к этим условиям, они синтезируют низкомолекулярные нетоксичные вещества — осмопротекторы. Эти вещества способствуют поглощению и удержанию воды, а также предотвращают разрушение мак-

ромолекул, присутствующих в клетках растений, под действием высоких концентраций солей. Осмопротекторами являются такие хорошо известные соединения, как сахара, спирты, пролин и четвертичные соединения аммиака. Одним из высокоактивных осмолитиков является бетаин, который накапливается в некоторых растениях во время засухи или при высокой засоленности.

Некоторые важные сельскохозяйственные культуры, в том числе картофель, рис, томаты, не способны накапливать бетаин. Защитить такие растения можно было бы введением в них генов, кодирующих ферменты биосинтеза бетаина. Как у растений, так и у бактерий бетаин синтезируется из холина в две стадии (рис. 18.13). У таких растений, как шпинат, превращение холина в бетаинальдегид катализируется холинмонооксигеназой, а последующее превращение в бетаин — бетаинальдегид-дегидрогеназой. У бактерий типа *E. coli* обе стадии катализируются одним ферментом — холиндегидрогеназой. Поэтому при создании солеустойчивых сортов табака была использована *A. tumefaciens* для трансформации растительных клеток вектором на основе Ti-плазмид, несущим ген *betA* *E. coli*, который кодирует холиндегидрогеназу; ген находился под контролем 35S-промотора вируса мозаики

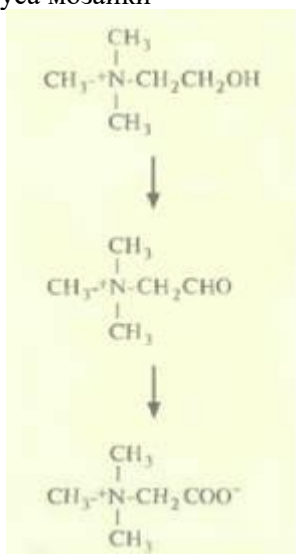


Рис. 18.13. Превращение холина в бетаин.

цветной капусты. Растения, в которых экспрессировался ген *betA E. coli*, были на 80% более устойчивы к высоким концентрациям солей (примерно 300 мМ), чем нетрансформированные контрольные. По-видимому, осмозащиту можно еще более повысить, если использовать для контроля экспрессии гена *betA* тканеспецифический промотор.

Созревание плодов

Серьезной проблемой при транспортировке фруктов и овощей является их преждевременное созревание и размягчение. Установлено, что при созревании плодов в растениях активируются специфические гены, кодирующие ферменты целлюлазу и полигалактуроназу, и если подавить экспрессию одного или нескольких из них, то созревание может начаться позже. Для инактивации указанных генов были созданы трансгенные растения, в которых синтезировались антисмысловые РНК-версии этих генов. При введении гена, кодирующего антисмысловую полигалактуроназную РНК, в растения томата — культуры, ежегодно приносящей в США 1,3 млрд. долл. прибыли, — и количество соответствующей мРНК, и активность фермента уменьшились на 90%. Такие генетически трансформированные томаты известны как FLAVR SAVR. 18 мая 1994 г. Департамент по контролю за качеством пищевых продуктов, медикаментов и косметических средств США пришел к выводу, что томаты FLAVR SAVR столь же безопасны, как и полученные обычным скрещиванием, а потому при их продаже нет необходимости указывать их происхождение.

Регулятор роста растений этилен инициирует экспрессию множества генов, ответственных за созревание и старение плодов. Он синтезируется из S-аденозилметионина с образованием промежуточного продукта, 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты (АСС) (рис. 18.14). Обработка растений химическими препаратами, блокирующими синтез этилена, задерживает и созревание плода, и старение. Таким образом, преждевременное созревание плода можно пре-

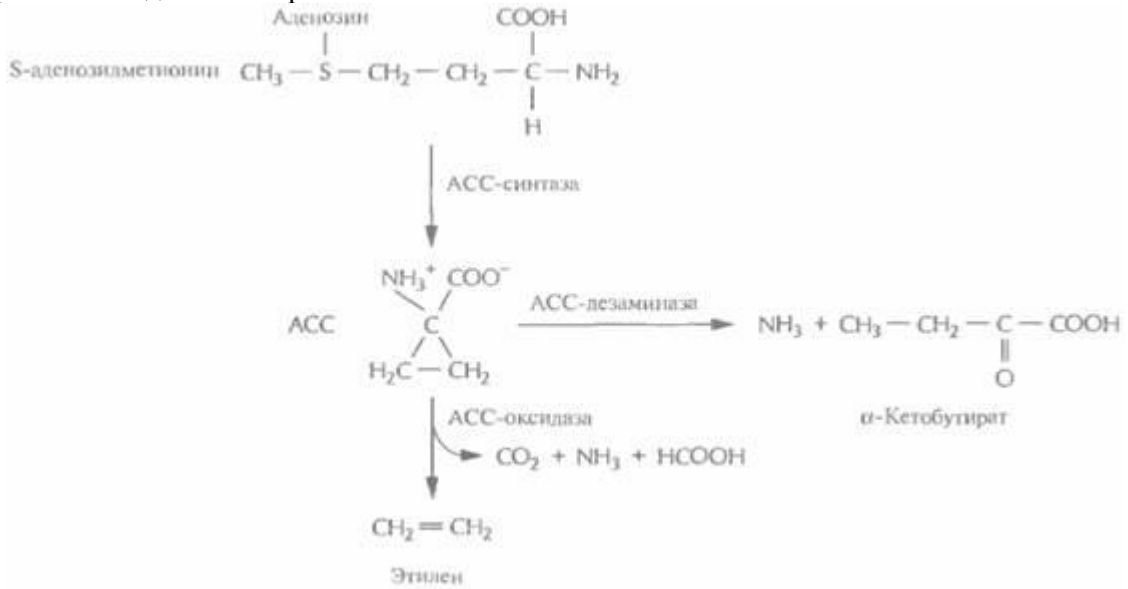


Рис. 18.14. Ингибирование биосинтеза этилена с помощью генетических манипуляций. В норме 1 -аминоциклопропан-1-карбоновая кислота (АСС) синтезируется из S-аденозилметионина с помощью АСС-синтазы, затем АСС-оксидаза катализирует его превращение в этилен. Синтез этилена можно блокировать, создав трансгенные растения, синтезирующие антисмысловые версии мРНК либо АСС-синтазы, либо АСС-оксидазы. Можно также ввести в растение ген АСС-деаминазы, которая конкурирует с АСС-оксидазой за свободный АСС, катализируя образование аммиака и  $\alpha$ -кетобутирата вместо этилена.

дотратить подавлением способности растения синтезировать этилен. Для этого можно использовать разные подходы (рис. 18.14). Так, были созданы трансгенные растения, синтезирующие антисмысловые версии мРНК либо АСС-синтазы, либо АСС-оксидазы, ферментов, необходимых для синтеза растением этилена. У таких растений уровень этилена был гораздо ниже нормы, а потому плоды имели длительный срок хранения.

Кроме того, при помощи скрининга было идентифицировано большое количество штаммов почвенных бактерий, разрушающих АСС. Ген фермента АСС-деаминазы, выделенный из одного такого штамма, был помещен под контроль 35S-промотора вируса мозаики цветной капусты и встроен в геном томата. Полученные растения синтезировали меньше этилена, чем нормальные, а их плоды тоже имели гораздо более длительный срок хранения. Большинство работ по выведению трансгенных растений с пониженным содержанием этилена касаются томатов, но имеется одно сообщение о создании трансгенной мускусной дыни с такими же свойствами. Все эти данные говорят о том, что данный подход может быть весьма результативным применительно к различным плодовым культурам.

## Изменение окраски цветков

Цветоводы все время стараются создавать растения, цветки которых имеют более привлекательный внешний вид и лучше сохраняются после того, как их срежут. С помощью традиционных методов скрещивания за многие годы были выведены тысячи новых сортов, отличающихся друг от друга цветом и формой цветков. Однако скрещивание растений — это кропотливая процедура, требующая много времени и имеющая свои ограничения, связанные с генным пулом конкретного вида; поэтому, например, никому не удалось вывести синюю розу. В качестве альтернативы для выведения цветов с необычной окраской можно использовать методы, основанные на манипуляциях с генами ферментов биосинтеза антоцианинов. Антоцианины, соединения класса флавоноидов, являются наиболее распространенными пигментами цветков. Они синтезируются из аминокислоты фенилаланина в ходе нескольких ферментативных реакций. Окраска цветка определяется химическими свойствами их боковой цепи, при этом производные цианидина ответственны за красный цвет, а производные дельфинидина за синий (рис. 18.15).

Дигидрофлавонол-4-редуктаза петунии катализирует превращение бесцветного дигидрокверцетина в цианидин-3-глюкозид, соединение красного цвета, а бесцветного дигидромирицетина — в синий дельфинидин-3-глюкозид, но не может использовать в качестве субстрата бесцветный дигидрокемпферол (рис. 18.15). Однако после трансформации петунии геном дигидрофлавонол-4-редуктазы кукурузы ее цветки приобретают кирпично-красную окраску. Этот необычный цвет, никогда ранее у петуний не наблюдавшийся, обусловлен синтезом в трансгенном растении пеларгонидин-3-глюкозида из дигидрокемпферола.

Примерно 70% объема индустрии цветоводства приходится на долю четырех растений: роз, гвоздик, тюльпанов и хризантем, поэтому все усилия по получению генетически трансформированных растений с цветками измененной окраски были направлены на работы именно с этими растениями. Например, были выведены трансгенные хризантемы, несущие смысловые и антисмысловые конструкции кДНК халконсинтазы. Этот фермент катализирует первую стадию биосинтеза антоцианина (рис. 18.15). Ученые исходили из того, что и смысловые, и антисмысловые кДНК будут подавлять экспрессию гена халконсинтазы в трансгенных растениях. «Смысловая супрессия», называемая также «косупрессией», состоит в том, что в присутствии дополнительной копии эндогенного гена подавляется накопление соответствующей мРНК. Молекулярные основы этого явления до настоящего времени не установлены. Антисмысловая же РНК халконсинтазы блокирует трансляцию эндогенной халконсинтазной мРНК.

Смысловые и антисмысловые конструкции, находящиеся под контролем 35S-промотора вируса мозаики цветной капусты, были встроены в бинарный вектор на основе Ti-плазмид и введены в клетки растений. У трех из 133 «смысловых» трансформантов и трех из 83 «антисмысловых» цветки были белыми, что указывало на подавление экспрессии эндогенного гена халконсинтазы,

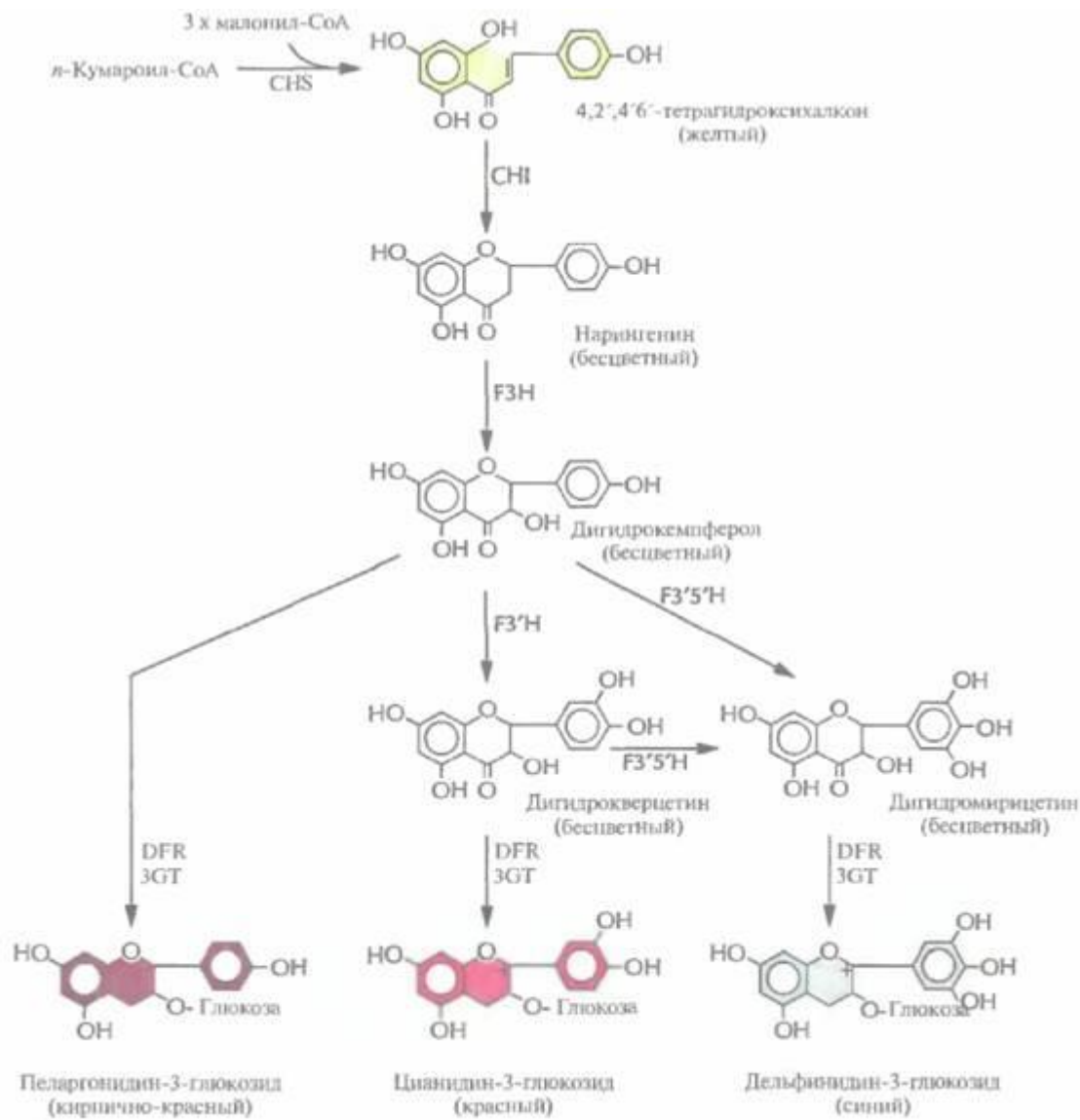


Рис. 18.15. Биосинтез антоцианинов. Сокращения: CHS — халконсинтаза, CHI — халконизомераза, F3H - флавонон-3-гидроксилаза, F3'H — флавоноид-3'-гидроксилаза, F3'5'H - флавоноид-3'5'-гидроксилаза, DFR -дигидрофлавонол-4-редуктаза, 3GT— UDP-глюкоза: флавоноид-3-О-глюкозилтрансфераза. DFR петунии способна катализировать превращение дигидрокверцетина в цианидин-3-глюкозид, а дигидромирицетина — в дельфинидин-3-глюкозил, соединения синего цвета. DFR кукурузы катазирует синтез из дигидрокемпферола пелартнидин-3-глюкозида, соединения кирпично-красного цвета.

т. е. подавление синтеза антоцианина. Растения с белыми цветками вегетативно размножались черенками в полевых условиях и примерно у 90—98% из них продолжали образовываться белые, а не розовые цветки. Эта работа является важной вехой в выведении новых сортов цветов с необычной окраской, представляющих коммерческий интерес.

### Изменение пищевой ценности растений

За многие годы агрономы и селекционеры достигли больших успехов в улучшении качества и повышении урожайности самых разных сельскохозяйственных культур. Однако традиционные методы выведения новых сортов растений,

основанные на их скрещивании, весьма трудоемки и требуют много времени, а их возможности ограничены вследствие ограниченности набора генов у скрещиваемых линий. Генноинженерные методы не только позволяют ускорить процесс получения растений с улучшенными свойствами, но и создавать сорта с новыми признаками, которые невозможно было бы передать растениям с помощью традиционных методов скрещивания. Например, в лабораторных условиях уже получены такие культуры с улучшенными пищевыми качествами, как кукуруза и горох. При этом был изменен аминокислотный состав некоторых запасных белков их семян. Кроме того, созданы сорта масличных культур (как пищевых, так и непищевых) с измененным жирнокислотным составом плодов, а также предпринята попытка улучшить вкус фруктов путем введения в растения гена мо-неллина, белка, имеющего сладкий вкус.

### Аминокислоты

Запасные белки, которые служат источниками углерода и азота прорастающих семян, состоят из ограниченного повторяющегося набора аминокислот. Пищевая ценность этих белков невелика, поскольку в них отсутствуют одна или несколько незаменимых аминокислот (обычно лизин или метионин). Аминокислотный состав запасных белков семян можно немного изменить обычным скрещиванием, а недавно для этих целей были использованы генноинженерные методы.

В одном из предварительных экспериментов в растения табака был введен ген фазеолина из фасоли, кодирующий запасной белок, который состоит из самых разных аминокислот. Ген эффективно экспрессировался, а белковый продукт доставлялся в нужный компартмент. Кроме того, специфически изменив *in vitro* нуклеотидную последовательность генов запасных белков семян, можно было синтезировать белок с нужным аминокислотным составом. Если аминокислотные замены происходят вблизи гипервариабельной области С-концевого участка молекулы, то ее структура не нарушается. Правильная укладка цепи остается и при прорастании семян.

Чтобы увеличить содержание лизина в семенах, была предпринята попытка нарушить регуляцию его биосинтеза. Аминокислоты лизин, треонин, метионин и изолейцин синтезируются из аспартата (рис. 18.16) в несколько этапов. Первый этап состоит в фосфорилировании аспартата аспартаткиназой (АК) с образованием β-аспартилфосфата. Далее, при биосинтезе лизина, происходит конденсация аспарагинового β-полуальдегида с пировиноградной кислотой, катализируемая синтазой дигидродипикколиновой кислоты (DNDPS). Регуляция обеих ферментативных активностей (АК и DNDPS) осуществляется с помощью лизина по принципу обратной связи, которую нужно разорвать, чтобы синтез лизина ничем не ограничивался. Для этого использовали гены DNDPS и АК, не чувствительные к ингибированию лизином, из *Corynebacterium* и *E. coli* соответственно. К каждому из этих генов «пришивали» нуклеотидную последовательность, кодирующую лидерный пептид, транспортирующий белки в хлоропласты, снабжали каждый из генов семяспецифичным промотором и вводили их в растения канолы и сои в составе бинарного вектора на основе Ti-плазмид (рис. 18.17). В семенах трансгенных растений содержалось в 100 раз больше свободного лизина, чем в семенах обычных растений; при этом содержание лизина во всех белках семян канолы было в два раза больше, а в белках сои — в пять раз.

Когда кукуруза используется в качестве корма для скота, к ней добавляют соевую муку и очищенный лизин. Однако вместо того чтобы использовать дорогостоящий лизин, можно добавлять к кукурузе дешевую соевую муку, полученную из трансгенных растений сои, которые синтезируют в больших количествах лизин. Возможно, используя этот подход, успешно примененный на сое, удастся вывести сорт кукурузы, в семенах которой повышено содержание лизина. Такая кукуруза имела бы большую пищевую ценность.

### Липиды

По оценкам, в 1995 г. во всем мире было выработано растительного масла на сумму примерно 45 млрд. долл., а к 2010 г. эта величина составит



Рис. 18.16. Схема биосинтеза аминокислот — производных аспартата (здесь представлены не все реакции и промежуточные продукты). Штриховыми стрелками показано ингибирование по принципу обратной связи. DHDPS - синтаза дигидродипиколиновой кислоты, АК — аспараткиназа.

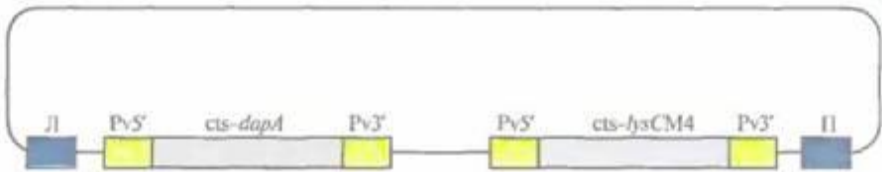
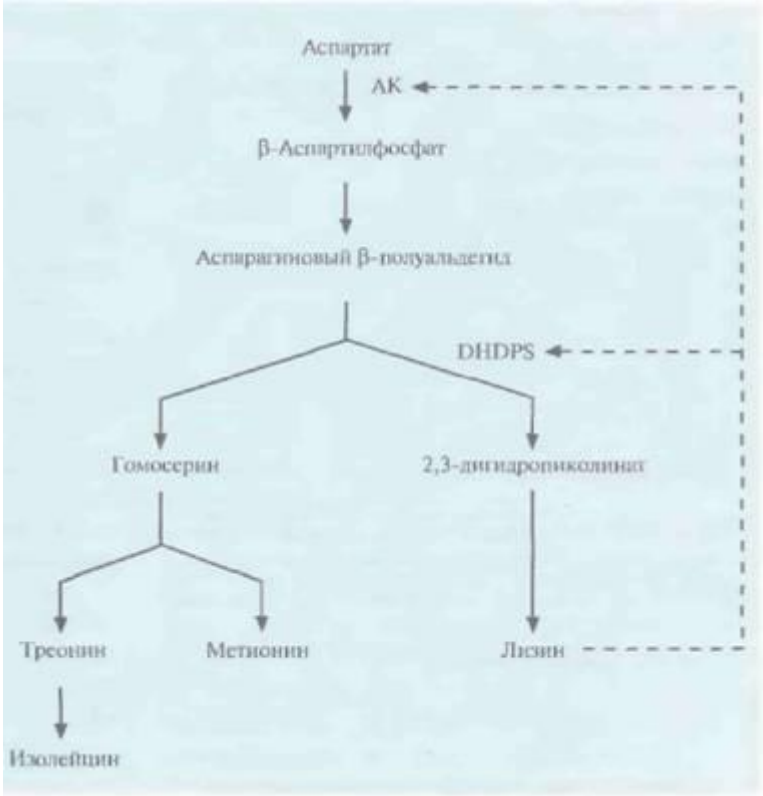


Рис. 18.17. Тi-плазмидный вектор, использующийся для трансформации сои и канолы с целью повышения содержания лизина в этих растениях. Pv5' — промотор гена  $\beta$ -фазеолина бобов, Pv3' — сигнал терминации транскрипции гена  $\beta$ -фазеолина бобов, cts - последовательность, кодирующая сигнальный хлоропластный пептид малой субъединицы рибулозобисфосфат-карбоксилазы, *dapA* — ген *Corynebacterium*, кодирующий синтезу дигидродипиколиновой кислоты, не чувствительной к лизину, *lysCM4* — мутантный ген *lys C E. coli*, кодирующий не чувствительную к лизину аспараткиназу, Л и П — левая и правая фланкирующие последовательности Т-ДНК соответственно.

С помощью генной инженерии можно изменять степень ненасыщенности (т. е. число двойных связей  $C=C$ ) и длину цепи этих кислот. Было создано и проверено в полевых условиях множество трансгенных сортов канолы, которые синтезировали масла с измененным жирно-кислотным составом (табл. 18,6). Каждый трансгенный сорт содержал один Дополнительный ген. Например, растения, синтезирующие в 70 млрд. долл. Более 90% масла расходуется на производство маргарина, жиров, масла для са-лата и для жарки. Примерно 75% всех масличных культур приходится на долю сои, пальмы, рапса (канолы) и подсолнечника, а получаемые из них масла состоят главным образом из следующих жирных кислот: пальмитиновой, стеариновой, олеиновой, линолевой и линоленовой (табл. 18.5).



Таблица 18.5. Некоторые важные растительные жирные кислоты

| Тривиальное название   | Сокращенное обозначение <sup>1)</sup> |
|------------------------|---------------------------------------|
| Каприловая кислота     | C <sub>8:0</sub>                      |
| Каприновая кислота     | C <sub>10:0</sub>                     |
| Лауриновая кислота     | C <sub>12:0</sub>                     |
| Миристиновая кислота   | C <sub>14:0</sub>                     |
| Пальмитиновая кислота  | C <sub>16:0</sub>                     |
| Стеариновая кислота    | C <sub>18:0</sub>                     |
| Петрозелиновая кислота | Δ6C <sub>18:1</sub>                   |
| Олеиновая кислота      | Δ9C <sub>18:1</sub>                   |
| Линолевая кислота      | Δ9,12C <sub>18:2</sub>                |
| Линоленовая кислота    | Δ9,12,15C <sub>18:3</sub>             |
| Рициноленовая кислота  | 12ОНΔ9C <sub>18:1</sub>               |
| Эруковая кислота       | Δ13C <sub>22:1</sub>                  |

<sup>1)</sup> Первая цифра в индексе при С означает число атомов углерода, вторая — степень ненасыщенности, т. е. число двойных связей С—С; значок Δ с последующим числом обозначает номер первого атома углерода, который образует связь С=С; число перед ОН указывает положение боковой гидроксильной группы Все связи С=С — *цис*. В системе нумерации атомов, принятой для жирных кислот, номер 1 присваивают карбоксильной группе.

большом количестве стеариновую кислоту, несли антисмысловую копию гена стеаратдесатуразы *Brassica*; при этом подавлялась экспрессия нормального гена канолы, что приводило к накоплению стеариновой кислоты, которая обычно превращалась в олеиновую. Успехи, достигнутые в получении трансгенных сортов канолы, позволяют надеяться, что в будущем этот подход найдет широкое применение и позволит создать новые, представляющие коммерческую ценность сорта.

Изменение вкуса и внешнего вида плодов

Изменение внешнего вида

Изменение цвета собранных овощей и фруктов создает серьезные проблемы при их реализации. Один из способов борьбы с изменением внешнего вида пищевых продуктов состоит в использовании различных пищевых добавок, что, впрочем, создает другие проблемы. Так, недавно возникли сомнения относительно безопасности одного из видов добавок — сульфитов.

Изменение цвета овощей и фруктов начинается с окисления монофенолов и о-дифенолов до о-хинонов. Катализатором процесса служат ферменты полифенолоксидазы. Они кодируются ядерной ДНК, имеют мол. массу примерно 59 000 и локализуются в мембранах хлоропластов и митохондрий.

Предположение о том, что ингибирование полифенолоксидазы поможет решить проблему изменения цвета плодов, было проверено на трансгенном картофеле, несущем различные кДНК-конструкции полифенолоксидазы. Были созданы векторы, содержащие фрагмент или полноразмерную кДНК полифенолоксидазы картофеля в «смысловой» или «антисмысловой» ориентации, которые находились под контролем одного из трех промоторов: 355-промотора вируса мозаики цветной капусты, промотора гена синтазы грануло связанного крахмала или промотора гена пататина (рис. 18.18). Последние два промотора специфичны для клубней картофеля. Два коммерческих сорта картофеля,

Таблица 18.6. Трансгенные сорта канолы с измененным жирнокислотным составом семян<sup>1)</sup>

| Содержание жирных кислот | Изготавливаемые продукты   | Время проведения первых полевых испытаний |
|--------------------------|--|---|
| 40% стеариновой          | Маргарин, шоколадное масло   | 1994                                      |
| 40% лаури новой          | Детергенты   | 1994                                      |
| 60% лаури новой          | Детергенты   | 1996                                      |
| 80% олеиновой            | Пищевые продукты, смазочные материалы, чернила                             | 1995                                      |
| Петрозелиновая           | Полимеры, детергенты   | 1998                                      |
| Воск симмондсии          | Косметика, смазочные материалы   | 1996                                      |
| китайской (хохоба)       |  |   |
| 40% миристиновой         | Детергенты, мыла, предметы личной гигиены                                  | 1996                                      |
| 90% эруковой             | Полимеры, косметика, чернила, фармацевтические препараты                   | 1998                                      |
| Рициноленовая            | Смазочные материалы, пластификаторы, косметика, фармацевтические препараты | 1997                                      |

<sup>1)</sup> По данным работы Murphy, *Trends Biotechnol* 14:206-213, 1996.



Рис. 18.18. Конструкции со «смысловой» и «антисмысловой» ориентациями гена полифенолоксидазы. Транскрипция в обоих случаях осуществлялась под контролем одного из промоторов: 35S-промотора вируса мозаики цветной капусты (p35S), промотора гена синтазы гранулосвязанного крахмала (pGBSS) или промотора гена пататина 1 (pPATATIN), а также терминации транскрипции гена нопалинсинтазы (rNOS). Л и П — левая и правая фланкирующие последовательности Т-ДНК соответственно. (По данным работы Bachern et al., *Bio/Technology* 12: 1101-1105, 1994.)

трансформированные этими конструкциями, были высокоустойчивы к черной пятнистости (ферментативное изменение цвета), причем уровень устойчивости был гораздо выше, чем тот, которого удавалось достичь при обычном скрещивании. Трансгенные растения, несущие кДНК полифенолоксидазы, преднамеренно повреждали, а затем оценивали их устойчивость к черной пятнистости. Большинство трансгенных растений, в геноме которых присутствовал ан-тисмысловой вариант гена полифенолоксидазы, находящегося под контролем либо 35S-промотора вируса мозаики цветной капусты, либо промотора гена синтазы гранулосвязанного крахмала, были значительно более устойчивы, чем нетрансформированные. Активность промотора гена пататина в клубнях картофеля, по-видимому, проявлялась лишь частично, и накопление полифенолоксидазы не блокировалось. Все растения, содержащие смысловые конструкции, синтезировали полифенолоксидазу в большем количестве и были подвержены поражению в большей степени, чем контрольные. Хотя все эти результаты носят сугубо предварительный характер, описанный подход может оказаться полезным для борьбы с ферментативным изменением цвета плодов различных коммерчески ценных растений.

### Изменение вкуса

Невкусные фрукты и овощи вряд ли будут пользоваться покупательским спросом, даже если они имеют высокую пищевую ценность. Конечно, вкус пищевых продуктов можно улучшить в процессе приготовления добавлением соли, сахара, ароматизаторов или других добавок, однако с экономической точки зрения было бы лучше, если бы пищевые продукты исходно обладали необходимыми вкусовыми качествами и выглядели более аппетитно.

В плоде африканского растения *Dioscorephyllum cumminsii* Diels содержится белок монеллин, примерно в 100 000 раз более сладкий, чем сахароза в эквимоллярных количествах. Этот белок вполне может служить заменителем сахара, обладающим еще и тем преимуществом, что, не являясь углеводом, он не должен оказывать вредного воздействия на метаболизм.

Монеллин — это двухцепочечный димер; А-цепь состоит из 45 аминокислотных остатков, В-цепь — из 50. Цепи связаны между собой слабыми нековалентными связями, и это ограничивает его применение в качестве подсластителя, поскольку при нагревании в процессе приготовления пищи или под действием кислот (например, лимонной или уксусной) он легко диссоциирует и теряет свои вкусовые качества. Задача создания трансгенных растений или микроорганизмов, способных синтезировать монеллин, усложняется тем, что необходимо клонировать и координированно экспрессировать два отдельных гена. Чтобы решить эту проблему, был химически синтезирован ген монеллина, кодирующий А- и В-цепи как один полипептид. Были созданы трансгенные растения томата и салата, синтезирующие химерный белок. Для этого использовали два разных промотора. В случае томатов это был Е8-промотор, специфичный для плодов и активизирующийся в самом начале их созревания. В растениях салата ген находился под контролем 35S-промотора вируса мозаики цветной капусты. В обоих случаях использовались сайты терминации

транскрипции/полиаденилирования гена нопалинсинтазы в составе Ti-плазмиды. Синтетический ген монеллина вводили в растительные клетки инфицированием их *A. tumefaciens*, используя коинтегративную векторную систему на основе Ti-плазмид. Монеллин был обнаружен в зрелых и частично зрелых плодах и в листьях салата, но не в зеленых помидорах, при этом его содержание в томатах повышалось при резком повышении концентрации растительного гормона этилена. Сообщения о всесторонних испытаниях вкусовых качеств генетически подслащенных пищевых продуктов пока отсутствуют, но если результаты окажутся положительными, то описанный способ подслащения плодов можно будет использовать для многих культур.

## Растения как биореакторы

Растения дают большое количество биомассы, а выращивание их не составляет труда, поэтому разумно было попытаться создать трансгенные растения, способные синтезировать коммерчески ценные белки и химикаты. В отличие от ре-комбинантных бактерий, которых культивируют в больших биореакторах (при этом необходимы высококвалифицированный персонал и дорогостоящее оборудование), для выращивания сельскохозяйственных культур не нужно больших средств и квалифицированных рабочих. Основная проблема, которая может возникнуть при использовании растений в качестве биореакторов, будет связана с выделением продукта введенного гена из массы растительной ткани и сравнительной стоимостью производства нужного белка с помощью трансгенных растений и микроорганизмов. Уже созданы экспериментальные установки по получению с помощью растений моноклональных антител, функциональных фрагментов антител и полимера поли- $\beta$ -гидроксibuтирата, из которого можно изготавливать материал, подверженный биодegradации,

### Антитела

Производство антител и их фрагментов с помощью трансгенных растений имеет ряд преимуществ перед их синтезом в клетках рекомбинантных микроорганизмов. Трансформация растений носит стабильный характер, чужеродная ДНК практически необратимо встраивается в растительный геном, в то время как большинство микроорганизмов трансформируются плазмидами, которые могут утрачиваться в ходе длительной или крупномасштабной ферментации. Кроме того, процессинг и укладка чужеродных белков в растениях аналогичны таковым в животных клетках, в то время как в бактериях процессинг, укладка и посттрансляционные модификации эукариотических белков затруднены. Кроме того, крупномасштабное выращивание растений не требует больших затрат и не лимитируется возможностями процессов ферментации. И наконец, можно создать условия, при которых чужеродные белки будут синтезироваться в семенах, где их целостность не нарушится длительное время.

### Полимеры

Крупномасштабный бактериальный синтез поли- $\beta$ -гидроксibuтирата, полимера, из которого получают пластик, подверженный биодegradации, обходится довольно дорого. Поэтому интересно было выяснить, можно ли получать этот полимер с помощью трансгенных растений. В бактериях типа *Alcaligenes eutrophus* поли- $\beta$ -гидроксibuтират синтезируется из ацетил-CoA в три стадии, катализируемые тремя ферментами (см. рис. 12.22), гены которых входят в один оперон. Растения неспособны процессировать транскрипт оперона с более чем одним геном, поэтому каждый из генов был клонирован по отдельности и встроен в хлоропластную ДНК растения *Arabidopsis thaliana*. Хлоропласты были выбраны потому, что, как показали выполненные ранее эксперименты, в цитоплазме полимер синтезировался в небольшом количестве, при этом большинство растений были чахлыми. Кроме того, в хлоропластах может накапливаться другой биополимер — крахмал.

К каждому из трех генов поли- $\beta$ -гидроксibuтирата были присоединены фрагменты ДНК, кодирующие хлоропластную сигнальную последовательность малой субъединицы рибулозобисфосфат-карбоксилазы гороха, и каждый ген был помещен под транскрипционный контроль 35S-промотора вируса мозаики цветной капусты.

ты. Гены были введены в растения *A. thaliana* в составе бинарных векторов на основе Ti-плазмид. Два трансгенных растения, каждое со своим чужеродным геном, скрещивали, чтобы получить растения с двумя чужеродными генами, включенными в хлоропластную ДНК. Затем трансгенное растение с двумя чужеродными генами скрещивали с растением, несущим третий чужеродный ген, и отбирали растения, несущие все три бактериальных гена поли-β-гидроксibuтирата. В зрелых листьях некоторых трансгенных растений, экспрессирующих все три бактериальных гена, синтезировалось более 1 мг поли-β-гидроксibuтирата на 1 г сырой ткани листа. Эту работу можно считать первым важным шагом в создании сельскохозяйственных культур, которые можно использовать для получения в больших количествах поли-β-гидроксibuтирата

### Чужеродные белки, аккумулирующиеся в семенах

Олеозины, или белки масляных телец, содержатся в семенах различных растений. Они весьма гидрофобны и стабилизируют масляные тельца как дискретные структуры. При этом их N- и C-концевые участки более гидрофильны, чем внутренняя область молекулы, и экспонированы в водное окружение. Используя генную инженерию, можно попытаться создать реком-



Рис. 18.19. Рекомбинантный белок, компонентами которого являются олеозин и водорастворимый белок. Олеозин обладает высоким сродством к масляному тельцу семени растения, а его N- и C-концы, а также второй белок гидрофильны и экспонированы в водное окружение.

бинантные белки из олеозинов и водорастворимых белков (рис. 18.19): рекомбинантные белки будут аккумулироваться в масляных тельцах, что позволит относительно легко их очистить. При этом водорастворимый белок будет экспонирован в водное окружение, и при необходимости его можно будет отщепить. Это позволяет значительно удешевить процедуру очистки белков, синтезируемых растениями.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вводя в геном растений чужеродные гены и обеспечивая их экспрессию, можно относительно быстро создавать новые сорта растений. Уже получены трансгенные растения, устойчивые к неблагоприятным условиям окружающей среды, к насекомым-вредителям, вирусам, гербицидам, окислительному и солевому стрессам. Выведены культуры с необычной окраской цветков, растения, имеющие более высокую пищевую ценность, растения с измененным вкусом плодов и т. д. Некоторые растения удалось модифицировать так, что они стали своеобразными фабриками по крупномасштабному синтезу ценных белков, например антител. Многочисленные трансгенные растения с измененными свойствами и повышенной пищевой ценностью прошли успешную проверку в лабораторных, а некоторые из них — в полевых условиях. К настоящему времени на рынок поступило лишь небольшое число генетически модифицированных растений, однако можно с уверенностью сказать, что в будущем они займут на нем достойное место.

## ЛИТЕРАТУРА

- Ananda Kumar P., R. P. Sharma, V. S. Malik. 19%, The insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Adv. Appl. Microbiol.* **42**: 1—43.
- Anderson E. J., D. M. Stark, R. S. Nelson, N. E. Turner, R. N. Beachy. 1989. Transgenic plants that express the coat protein gene of TMV or A1MV interfere with disease development of non-related viruses. *Phytopathology* **12**: 1284-1290.

- Ayub R., M. Guis, M. Ben Amor, L. Gillot, J.-P. Roustan, A. Latehé, M. Bouzayen, J.-C. Pech.** 1996. Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. *Nat. Biotechnol.* **14**: 862-866.
- Bachern C. W. B., G.-J. Speckmann, P. C. G. van der Linde, F. T. M. Verheggen, M. D. Hunt, J. C. Steffens, M. Zabeau.** 1994. Antisense expression of polyphenol oxidase genes inhibits enzymatic browning in potato tubers. *Bio/Technology* **12**: 1101-1105.
- Beachy R. N., S. Loesch-Fries, N. E. Turner.** 1990. Coat protein-mediated resistance against virus infection. *Annu. Rev. Phytopathol.* **28**: 451-474.
- Bird C. R., D. Grierson, J. A. Ray, W. W. Schuch.** October 1993. Tomato plants and cells containing pTOM36 antisense constructs. U.S. patent 5,254,800.
- Boulter D., A. M. R. Gatehouse, V. Hilder.** 1989. Use of cowpea trypsin inhibitor (CpTI) to protect plants against insect predation, *Biotechnol. Adv.* **7**: 489-498.
- Bowler C., L. Stooten, S. Vandenbranden, R. De Rycke, J. Botterman, C. Sybesma, **M. Van Montagu, D. Inze,** 1991. Manganese Superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. *EMBO J.* **10**: 1723-1732.
- Brünfte K. J., R. L. Meeusen. 1991. Insect control with genetically engineered crops. *Trends Biotechnol.* **9**: 197-200.
- Cheng J., M. G. Boh/ani, R. C. Saxena, M. B. Sticklen.** 1992, Production of insect resistant potato by genetic transformation with a  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Plant Set.* **81**: 83-91.
- Comai L., D. Facciotti, W. R. Hiatt, G. Thompson, R. E. Rose, D. M. Stalker** 1985. Expression in plants of a mutant *aroA* gene from *Salmonella typhimurium* confers tolerance to glyphosate. *Nature* **317**: 741-744.
- Corbin D. R., J. T. Greenplate, E. Y. Wong, J. Purcell.** 1994. Cloning of an insecticidal cholesterol oxidase gene and its expression in bacteria and in plant protoplasts. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 4239-4244.
- Courtney-Guttersen N., C. Napoli, C. Lemieux, A. Morgan, E. Firoozabady, K. E. P. Robinson.** 1994. Modification of flower color in florist's Chrysanthemum: production of a white-flowering variety through molecular genetics. *Bio/Technology* **12**: 268-271.
- Cuozzo M., K. M. O'Connell, W. Kaniewski, R.-X. Fang, N.-H. Chua, N. E. Turner.** 1988. Viral protection in transgenic tobacco plants expressing the cucumber mosaic virus coat protein or its antisense RNA. *Bio/Technology* **6**: 549-557.
- Day A. G., E. R. Bejarano, K. W. Buck, M. Burrell, C. P. Lichtenstein.** 1991. Expression of an anti-sense viral gene in transgenic tobacco confers resistance to the DNA virus tomato golden mosaic virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 6721-6725.
- Dekker J., S. O. Duke.** 1995. Herbicide-resistant field crops. *Adv. Agron.* **54**: 69—116.
- Detennay **X., B. J. LaVaUee, R. K. Proksch, R. L. Fuchs, S. R. Sims, J. T. Greenplate, P. G. Marrone, R. B. Dodson, J. J. Augustin, J. G. Layton,**
- D. A. Fischhoff. 1989. Field performance of transgenic tomato plants expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* insect control protein. *Bio/Technology* **7**: 1265-1269.
- Duan X., X. Li, Q. Xue, M. Abo-FJ-Saad, D. Xu, R. Wu.** 1996. Transgenic rice plants harboring an introduced potato proteinase inhibitor II gene are insect resistant. *Nat. Biotechnol.* **14**:494—498.
- During K., P. Porseh, M. Fladung, H. Lorz.** 1993. Transgenic potato plants resistant to the phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora*. *Plant. J.* **3**: 587-598.
- Ely S. 1993. The engineering of plants to express *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins, p. 105-124. in P. F. Entwistle, J. S. Cory, M. J. Bailey, S. Higgs (ed.), *Bacillus thuringiensis*, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice. John Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom.
- Falco S. C., T. Guida, M. Locke, J. Mauvais, C. Sanders, R. T. Ward, P. Webber.** 1995, Transgenic canola and soybean seeds with increased lysine. *Bio/Technology* **13**: 577-582.
- Fiedler U., U. Conrad.** 1995. High-level production and long-term storage of engineered antibodies in transgenic tobacco seeds. *Bio/Technology* **13**: 1090-1093.
- Fischhoff D. A., K. S. Bowdish, F. J. Perlak, P. G. Marrone, S. M. McConnick, J. G. Nfederalmeyer,**
- D. A. Dean, K. Kunsano-Kretzner, E. J. Mayer,**

- D. E. Rochester, S. G. Rogers, R. T. Fraley.** 1987. Insect tolerant tomato plants. *Bio/Technology* 5: 807-813.
- Fitchen J. H., R. N. Beachj.** 1993. Genetically engineering protection against viruses in transgenic plants. *Annu. Rev. Microb'ol.* 47: 739—763.
- Fuchs M., D. Gonsalves. 1995. Resistance of transgenic hybrid squash Z\V-20 expressing the coat protein genes of zucchini yellow mosaic virus and watermelon mosaic virus 2 to mixed infections by both potyviruses. *Bio/Technology* 13:1466-1473.
- Gray J. E., S. Picton, J. J. Giovannoni, D. Grierson.** 1994. The use of transgenic and naturally occurring mutants to understand and manipulate tomato fruit ripening. *Plant Cell Environ.* 17: 557-571.
- Grison R., B. Grezes-Besset, M. Schneider, N. Lucante, L. Olsen, J.-J. Lcguay, A. Toppan.** 1996. Field tolerance to fxmgal pathogens of *Brassica napus* constitutively expressing a chimeric chitinase gene. *Nat. Biotechnol.* 14: 643-646.
- Hilder V. A., A. M. R. Gatehouse, S. E. Sheerman, R. F. Barker, D. Boulter.** 1987. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature* 330: 160-163.
- Hill K. K., N. Jarvis-Eagan, E. L. Halk, K. J. Krahn, L. W. Liao, R. S. Mathewson, D. J. Merlo, S. E. Nelson, K. E. Rashka, L. S. Loesch-Fries.** 1991. The development of virus-resistant alfalfa, *Medicago saliva* L. *Bio/Technology* 9: 373—377.
- Holton T. A., F. Bniguera, D. R. Lester, Y. Tanaka, C. D. Hyland, J. G. T. Menting, C.-Y. Liu, E. Farcy, T. W. Stevenson, E. C. Cornish.** 1993. Cloning and expression of cytochrome P450 genes controlling flower color. *Nature* 366: 276—279.
- Johnson R., J. Narvaez, G. An, C. Ryan.** 1989. Expression of protease inhibitors I and II in transgenic tobacco plants: effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae. *Proc. Natl. Acad. Sei. USA* 86: 9871-9875.
- Jongedijk E., A. A. J. M. de Schutter, T. Stolte, P. J. M. van den Elzen, B. J. C. Cornelissen,** 1992. Increased resistance to potato virus X and preservation of cultivar properties in transgenic potato under field conditions. *Bio/Technology* 10: 422-429.
- Klee H. J., M. B. Hayford, K. A. Kretzmer, G. F. Barry, G. M. Kishore.** 1991. Control of ethylene synthesis by expression of a bacterial enzyme in transgenic tomato plants. *Plant CW/3:* 1187- 1193.
- Knutzon D. S., G. A. Thompson, S. E. Radke, W. B. Johnson, V. C Knauf, J. C. Kridl. 1992. Modification of *Brassica* seed oil by antisense expression of a stearylacyl carrier protein desaturase gene. *Proc. Natl. Acad. Sei. USA* 89:2624-2628.
- Lee W. S., J. T. C. Tzen, J. C. Kridl, S. E. Radke, A. H. C. Huang.** 1991. Maize oleosin is correctly targeted to seed oil bodies in *Brassica napus* transformed with the maize oleosin gene. *Proc. Natl. Acad. Sei. USA* 88: 6181-6185.
- Lilius G., N. Holmberg, L. Bülow.** 1996. Enhanced NaCl stress tolerance in transgenic tobacco expressing bacterial choline dehydrogenase. *Bio/Technology* 14: 177-180.
- Lin W., C. S. Anuratha, **K. Datta, I. Potrykus, S. Muthukrishnan, S. K. Datta.** 1995. Genetic engineering of rice for resistance to sheath blight. *Bio/Technology* 13: 686-691.
- Ling K., S. Namba, C. Gonsalves, J. L. Slightom, D. Gonsalves.** 1991. Protection against detrimental effects of potyvirus infection in transgenic tobacco plants expressing the papaya ringspot virus coat protein gene. *Bio/Technology* 9:752-758.
- Lodge **J. K., W. K. Kaniewski, N. E. Turner.** 1993. Broad-spectrum virus resistance in transgenic plants expressing pokeweed antiviral protein. *Proc. Natl. Acad. Sei. USA* 90: 7089-7093.
- Ma J. K.-C., M. B. Hein.** 1995. Immunotherapeutic potential of antibodies produced in plants. *Trends Biotechnol.* 13: 522-527.
- Macintosh S. C., G. M. Kishore, F. J. Perlak, P. G. Marrone, T. B. Stone, S. R. Sims, R. L. Fuchs. 1990. Potentiation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity by serine protease inhibitors. *J. Agric. FoodChem.* 38: 1145-1152.
- Meyer P., I. Heidmann, G. Forkmann, H. Saedler.** 1987. A new petunia flower colour generated by transformation of a mutant with a maize gene. *Nature* 330: 677-678.
- Mol J. N. M., T. A. Holton, R. E. Koes.** 1995. Floriculture: genetic engineering of commercial traits. *Trends Biotechnol.* 13: 350-355.
- Mol J. N. M., A. R. van der Krol, A. J. van Tunen, R. van Blokland, P. de Lange, A. R. Stuitje.** 1990. Regulation of plant gene expression by antisense RNA. *FEBSLett.* 268:427-430.



- Murphy D. J. 1996. Engineering oil production in rapeseed and other oil crops. *Trends Biotechnol.* 14:206-213.
- Nawrath C., Y. Poirier, C. Somerville. 1994. Targeting of polyhydroxybutyrate biosynthetic pathway to the plastids of *Arabidopsis thaliana* results in high levels of polymer accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: L2760-12764.
- Panarrubia L., R. IOT, J. Giovannoni, S.-H. Kim, R. L. Fischer. 1992. Production of the sweet protein monellin in transgenic plants. *Bio/Technology* 10: 561-564.
- Perlak F. J., R. W. Deaton, T. A. Armstrong, R. L. Fuchs, S. R. Sims, J. T. Greenplate, D. A. Fischhoff. 1990. Insect resistant cotton plants. *Bio/Technology* 8: 939-943.
- Perlak F. J., R. L. Fuchs, D. A. Dean, S. L. McPherson, D. A. Fischhoff. 1991. Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 3324-3328.
- Powell P. A., D. M. Stark, P. R. Sanders, R. N. Beachy. 1989. Protection against tobacco mosaic virus in transgenic plants that express tobacco mosaic virus antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6949-6952.
- Quinn J. P. 1990. Evolving strategies For the genetic engineering of herbicide resistance in plants. *Biotechnol. Adv.* 8: 321-333.
- Rooijen G. J. H., M. M. Moloney. 1995. Plant seed oil-bodies as carriers for foreign proteins. *Bio/Technology* 13: 72-77.
- Ryan C, A. 1990. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insect and pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol* 28: 425-449.
- Sen Gupta A., R. P. Webb, A. S. Holaday, R. D. Allen. 1993. Overproduction of Superoxide dismutase protects plants from oxidative stress. *Plant Physiol.* 103: 1067-1073.
- Shade R. E., H. E. Schroeder, J. J. Pueyo, L. M. Tabe, L. L. Murdock, T. J. V. Higgins, M. J. Chrispeels. 1994. Transgenic pea seeds expressing the tx-amylase inhibitor of the common bean are resistant to bruchid beetles. *Bio/Technology* 12: 793-796.
- Shah D. M., C. M. T. Rommens, R. N. Beachy. 1995. Resistance to diseases and insects in transgenic plants: progress and applications to agriculture. *Trends Bioiechnol.* 13: 362-368.
- Töpfer R., N. Martini, J. ScheU. 1995. Modification of plant lipid synthesis. *Science* 268:681—686.
- Tricoli D. M., K. J. Carney, P. F. Russell, J. R. McMaster, D. W. Groff, K. C. Hadden, P. T. Himmel, J. P. Hubbard, M. L. Boeshore, H. D. Quemada. 1995. Field evaluation of transgenic squash containing single or multiple virus coat protein gene constructs for resistance to cucumber mosaic virus, watermelon mosaic virus 2, and zucchini yellow mosaic virus. *Bio/Technology* 13: 1458-1465.
- Vaeck M., A. Reynaerts, H. Hofte, S. Jansens, M. de Beuckeleer, C. Dean, M. Zabeau, M. Van Montagu, J. Leemans, 1987. Transgenic plants protected from insect attack. *Nature* 328: 33-37.
- Van Camp W., H. Wdtekens, C. Bmrter, M. Van Montagu, D. Inzé, P. Reupold-Popp, H. Sandermann, Jr., C. Langebartels. 1994. Elevated levels of Superoxide dismutase protect transgenic plants against ozone damage, *Bio/Technology* 12: 165-168.
- Van Rie J. 1991. Insect control with transgenic plants: resistance proof? *Trends Bioiechnol.* 9: 177-179.
- Vierheilig H., M. Alt, J.-M. Neuhaus, T. Boiler, A. Wiemken. 1993. Colonization of transgenic *Nicotiana glauca* plants, expressing different forms of *Nicotiana glauca* chitinase, by the root pathogen *Phytophthora solani* and by the mycorrhizal symbiont *Glomus mosseae*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6: 261-264.
- Williams S., L. Friedrich, S. Dincher, N. Carozzi, H. Kessmann, E. Ward, J. Ryals. 1992. Chemical regulation of *Bacillus thuringiensis* 6-endotoxin expression in transgenic plants. *Bio/Technology* 10: 540-543.
- Zhu Q., E. A. Maher, S. Masoud, R. A. Dixon, C J. Lamb. 1994. Enhanced protection against fungal attack by constitutive co-expression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco. *Bio/Technology* 12: 807-812.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Предположим, что растения инфицированы вирусом без оболочки с одноцепочечным РНК-геномом (8000 нуклеотидов). Вирус и его РНК. можно легко выделить. Кроме того,

у вас есть антитела ко всем четырем вирусным белкам. Какую стратегию вы выбрали бы для защиты растений от вирусной инфекции?

2. Предложите несколько стратегий создания растений, устойчивых к насекомым-вредителям.

3. Как с помощью антисмысловой РНК можно обеспечить устойчивость растений к специфическим вирусам?

4. Каким образом ингибиторы протеиназ, ингибитор амилазы и холестеролоксидаза защищают растения от насекомых-вредителей?

5. Предложите стратегию защиты растений от повреждения несколькими разными вирусами.

6. Опишите основные способы создания растений, устойчивых к гербицидам.

7. Как следует изменить растение, чтобы обеспечить его защиту от патогенных почвенных грибов?

8. Как с помощью генной инженерии получить растения, устойчивые к патогенным бактериям?

9. Какой подход вы применили бы для создания растения, толерантного к высоким концентрациям солей?

10. Предположим, что вам нужно замедлить созревание плодов авокадо при их транспортировке. Какой способ вы выберете?

11. Как с помощью методов генной инженерии получить растения с необычной окраской цветков?

12. Как с помощью генной инженерии повысить содержание лизина в сое?

13. Что такое косупрессия? Антисмысловая супрессия? Сравните их.

14. Как упростить процедуру очистки растворимых белков, например фрагментов антител, синтезируемых растениями?

# ГЛАВА 19.

## Трансгенные животные

Для выведения улучшенных пород домашних животных и птиц (коров с более высокой удойностью, овец с качественной шерстью, кур с более высокой яйценоскостью и т. д.) проводят множество раундов скрещиваний и отбора, каждый раз используя в качестве производителей животных с наилучшими характеристиками. В результате со временем можно получать более или менее чистые линии высокопродуктивных пород животных. Стратегия скрещивания и отбора, требующая больших временных и материальных затрат, оказалась тем не менее исключительно успешной, и сегодня почти все аспекты биологических основ выведения новых пород домашнего скота могут быть к ней сведены. Однако после того как эффективная генетическая линия получена, вводить новые признаки методом скрещивания и отбора становится все труднее. Так, линия с новым «ценным» геном может нести также и «вредные» гены, вследствие чего потомки могут оказаться менее продуктивными. Чтобы быть уверенными в том, что новая, улучшенная линия сохранит исходные полезные признаки и приобретет новые, необходимо разработать абсолютно новую стратегию.

Успешные эксперименты по введению чужеродных генов в клетки млекопитающих и возможность создания генетически идентичных животных путем переноса ядра из эмбриональной клетки в яйцеклетку с удаленным ядром (перенос ядра, клонирование) позволили включать в хромосомную ДНК высших животных отдельные функциональные гены или целые их кластеры. Используемая стратегия состоит в следующем.

- Клонированный ген вводят в ядро оплодотворенной яйцеклетки.
- Инокулированные оплодотворенные яйцеклетки имплантируют в реципиентную женскую особь (поскольку успешное завершение развития эмбриона млекопитающих в иных условиях невозможно).
- Отбирают потомков, развившихся из имплантированных яйцеклеток, которые содержат клонированный ген во всех клетках.
- Скрещивают животных, которые несут клонированный ген в клетках зародышевой линии, и получают новую генетическую линию.

Такой подход имеет много практических приложений. Например, если продукт вводимого гена стимулирует рост, то трансфицированные животные будут расти быстрее при меньшем количестве пищи. Повышение эффективности усвоения пищи всего на несколько процентов может существенно снизить стоимость конечного продукта (говядины, свинины и т. д.).

Идея генетического изменения животных путем введения генов в оплодотворенные яйцеклетки была реализована на практике в 1980-х гг. Как и во многих других новых областях науки, для упрощения обмена информацией между учеными был введен ряд новых терминов. Так, животное, чей генотип был изменен путем введения чужеродной (экзогенной) ДНК, было названо трансгенным, вводимая ДНК - трансгеном, а весь процесс - трансгенной технологией, или трансгенозом.

Эксперименты по генетической модификации многоклеточных организмов путем введения в них трансгенов требуют много времени. Тем не менее трансгеноз стал мощным инстру-

Таблица 19.1. Белковый состав (г/л) молока коров и овец

| Белок                    | Корова              | Овца          |
|--------------------------|---------------------|---------------|
| Казеин                   |                     |               |
| $\alpha_{S1}$ -Казеин    | 10,0                | 12,0          |
| $\alpha_{S2}$ - Казеин   | 3,4                 | 3,8           |
| $\kappa$ - Казеин        | 3,9                 | 4,6           |
| $\beta$ - Казеин         | 10,0                | 16,0          |
| Основные белки сыворотки |                     |               |
| $\alpha$ -Лактальбумин   | 1,0                 | 0,8           |
| $\beta$ -Л актальбумин   | 3,0                 | 2,8           |
| Другие белки             |                     |               |
| Сывороточный альбумин    | 0,4                 | Не обнаружен  |
| Лизоцим                  | Следовые количества | Не обнаружен  |
| Лактоферрин              | 0,1                 | Не обнаружен  |
| И ммуноглобулины         | 0,7                 | Не обнаружены |

ментом для исследования молекулярных основ экспрессии генов млекопитающих и их развития, для создания модельных систем, позволяющих изучать болезни человека, а также для генетической модификации клеток молочных желез животных с целью получения с молоком важных для медицины белков. Был даже предложен новый термин «фарминг», относящийся к процессу получения из молока трансгенных домашних ("pharm") животных аутентичных белков человека или фармацевтических препаратов. Использование молока целесообразно потому, что оно образуется в организме животного в большом количестве и его можно надаивать по мере надобности без вреда для животного. Вырабатываемый молочной железой и секретируемый в молоко новый белок не должен при этом оказывать никаких побочных эффектов на нормальные физиологические процессы, протекающие в организме трансгенного животного, и подвергаться посттрансляционным изменениям, которые по крайней мере близки к таковым в клетках человека. Кроме того, его выделение из молока, которое содержит и другие белки (табл. 19.1), не должно составлять большого труда.

Трансгенные мышцы: методология

Трансгенные технологии разрабатывались и совершенствовались на лабораторных мышах. С начала 1980-х гг. в различные линии мышей были введены сотни генов. Эти исследования в значительной мере способствовали установлению механизмов генной регуляции и развития опухолей, природы иммунологической специфичности, молекулярной генетики роста и развития, других фундаментальных биологических процессов. Трансгенные мыши сыграли свою роль в исследовании возможности крупномасштабного синтеза лекарственных веществ, а также в создании трансгенных линий, позволяющих моделировать различные генетические болезни человека. Введение чужеродной ДНК мышам можно осуществить разными методами: 1) с помощью ретровирусных векторов, инфицирующих клетки эмбриона на ранних стадиях развития перед имплантацией эмбриона в самку-реципиента; 2) микроинъекцией в увеличенное ядро спермия (мужской пронуклеус) оплодотворенной яйцеклетки; 3) введением генетически модифицированных эмбриональных стволовых клеток в предимплантированный эмбрион на ранних стадиях развития.

Использование ретровирусных векторов

Преимущество метода, основанного на использовании ретровирусных векторов (рис. 19.1), перед другими методами трансгеноза состоит в его эффективности. Однако размер вставки в этом случае ограничивается 8 т. п. н., вследствие чего транс ген может оказаться лишенным прилегающих регуляторных последовательностей, необходимых для его экспрессии.

Использование ретровирусных векторов имеет и еще один большой недостаток. Хотя эти векторы создаются так, чтобы они были дефектными по репликации, геном штамма ретровируса (вируса-помощника), который необходим для получения большого количества векторной ДНК, может попасть в то же ядро, что и трансген. Несмотря на все принимаемые меры, ретровирусы-помощники могут реплицироваться в организме трансгенного животного, что совершенно недопустимо, если этих животных предполагается использовать в пищу или как инструмент для получения коммерческого продукта. И поскольку существуют альтернативные методы трансгеноза, ретровирусные векторы редко используются для создания трансгенных животных, имеющих коммерческую ценность.

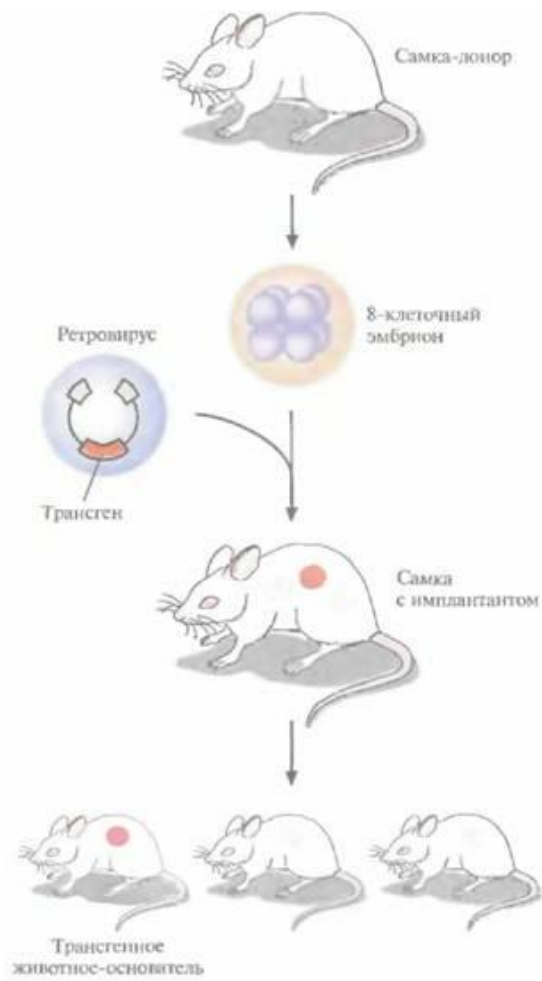


Рис. 19.1. Получение линии трансгенных мышей с использованием ретровирусных векторов. Эмбрион, обычно находящийся на стадии 8 клеток, инфицируют рекомбинантным ретровирусом, несущим трансген. Самки, которым был имплантирован эмбрион («суррогатные» матери), производят на свет трансгенное потомство. Для идентификации мышат, несущих трансген в клетках зародышевой линии, проводят ряд скрещиваний.



Рис. 19.2. Получение линий трансгенных мышей методом микроинъекций. Яйцеклетки выделяют из самок-доноров, у которых была индуцирована гипероуляция и проведено спаривание с самцами. Трансгенную конструкцию инъецируют в мужской про нуклеус оплодотворенной яйцеклетки. Яйцеклетки имплантируют в «суррогатную» мать, которая производит на свет трансгенных мышат — основателей трансгенных линий.

**Метод микроинъекции ДНК**

В настоящее время для создания трансгенных мышей чаще всего используют метод микроинъекций ДНК. Он заключается в следующем (рис. 19.2).

- 1. Увеличение числа яйцеклеток, в которых будет инъецирована чужеродная ДНК, путем стимуляции гиперовуляции у самок-доноров. Сначала самкам вводят сыворотку беременной кобылы, а спустя примерно 48 ч -хорионический гонадотропин человека. В результате гиперовуляции образуется примерно 35 яйцеклеток вместо обычных 5—10.
- 2. Скрещивание с самцами самок с гиперовуляцией и их умерщвление. Вымывание из яйцеводов оплодотворенных яйцеклеток.
- 3. Микроинъекция ДНК в оплодотворенные яйцеклетки — как правило, сразу после выделения. Часто вводимая трансгенная конструкция находится в линейной форме и не содержит прока-риотических векторных последовательностей.

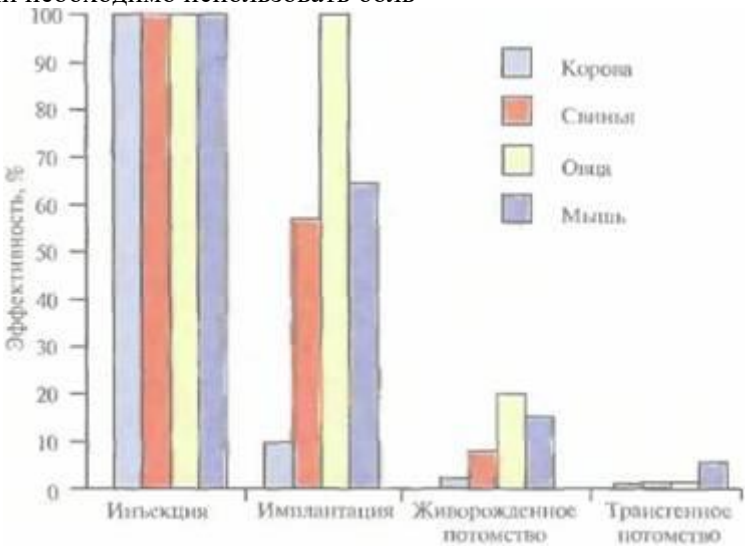
У млекопитающих после проникновения сперматозоида в яйцеклетку ядро спермия (мужской пронуклеус) и ядро яйцеклетки существуют отдельно. После того как последнее заканчивает митотическое деление и становится женским пронуклеусом, может произойти слияние ядер (кариогамия). Мужской пронуклеус обычно гораздо больше женского, его легко локализовать с помощью секционного микроскопа и ввести в него чужеродную ДНК. При этом яйцеклетку на время проведения микроинъекции можно перемещать, ориентировать нужным образом и фиксировать. Опытный экспериментатор за день может инокулировать несколько сотен яйцеклеток.

После введения ДНК от 25 до 40 яйцеклеток имплантируют микрохирургическим путем в «суррогатную» мать, у которой вызывают ложную беременность скрещиванием с вазэктомированным самцом. У мышей спаривание — это единственный известный способ подготовки матки к имплантации. Поскольку вазэктомированный самец сперматозоидов не продуцирует, ни одна из яйцеклеток «суррогатной» матери не оплодотворяется. Эмбрионы развиваются только из введенных яйцеклеток, и мышата рождаются спустя примерно 3 нед после имплантации.

Для идентификации трансгенных животных выделяют ДНК из маленького кусочка хвоста и тестируют ее на наличие трансгена с помощью блот-гибридизации по Саузерну методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Чтобы определить, находится ли трансген в клетках зародышевой линии животного, трансгенную мышь скрещивают с другой мышью. Далее можно проводить скрещивание потомков для получения чистых (гомозиготных) трансгенных линий.

Описанный подход кажется на первый взгляд относительно простым, однако он требует четкой координации разных этапов. Даже высококвалифицированному специалисту удастся получить жизнеспособных трансгенных животных в лучшем случае лишь из 5% инокулированных яйцеклеток (рис. 19.3). Ни один из этапов эксперимента не эффективен на все 100%, поэтому для микроинъекций необходимо использовать боль-

Рис. 19.3. Суммарная эффективность трансгеноза после микроинъекций. Все оплодотворенные яйцеклетки (100%) коровы, свиньи, овцы и мыши инокулировали трансгеном, однако успешная имплантация и появление потомства были редкими событиями: трансгенное потомство давали менее 5% обработанных яйцеклеток.





шое число оплодотворенных яйцеклеток. Например, при получении трансгенных мышей после инъекции ДНК выживают только 66% оплодотворенных яйцеклеток; мышата развиваются примерно из 25% имплантированных яйцеклеток, причем трансгенными из них оказываются лишь 25%. Таким образом, из 1000 имплантированных оплодотворенных яйцеклеток развивается от 30 до 50 трансгенных мышат. Кроме того, введенная ДНК может интегрироваться в любое место в геноме, и зачастую множество ее копий включаются в один сайт. И наконец, не все трансгенные мышата будут обладать нужными свойствами. В организме некоторых особей трансген может не экспрессироваться из-за неподходящего окружения сайта интеграции, а в организме других число копий чужеродного гена может оказаться слишком большим, что может привести к гиперпродукции белка и нарушению нормальных физиологических процессов. И все же, несмотря на все это, метод микроинъекций используют для получения линий мышей, несущих функциональные трансгены, довольно часто.

### ***Использование модифицированных эмбриональных стволовых клеток***

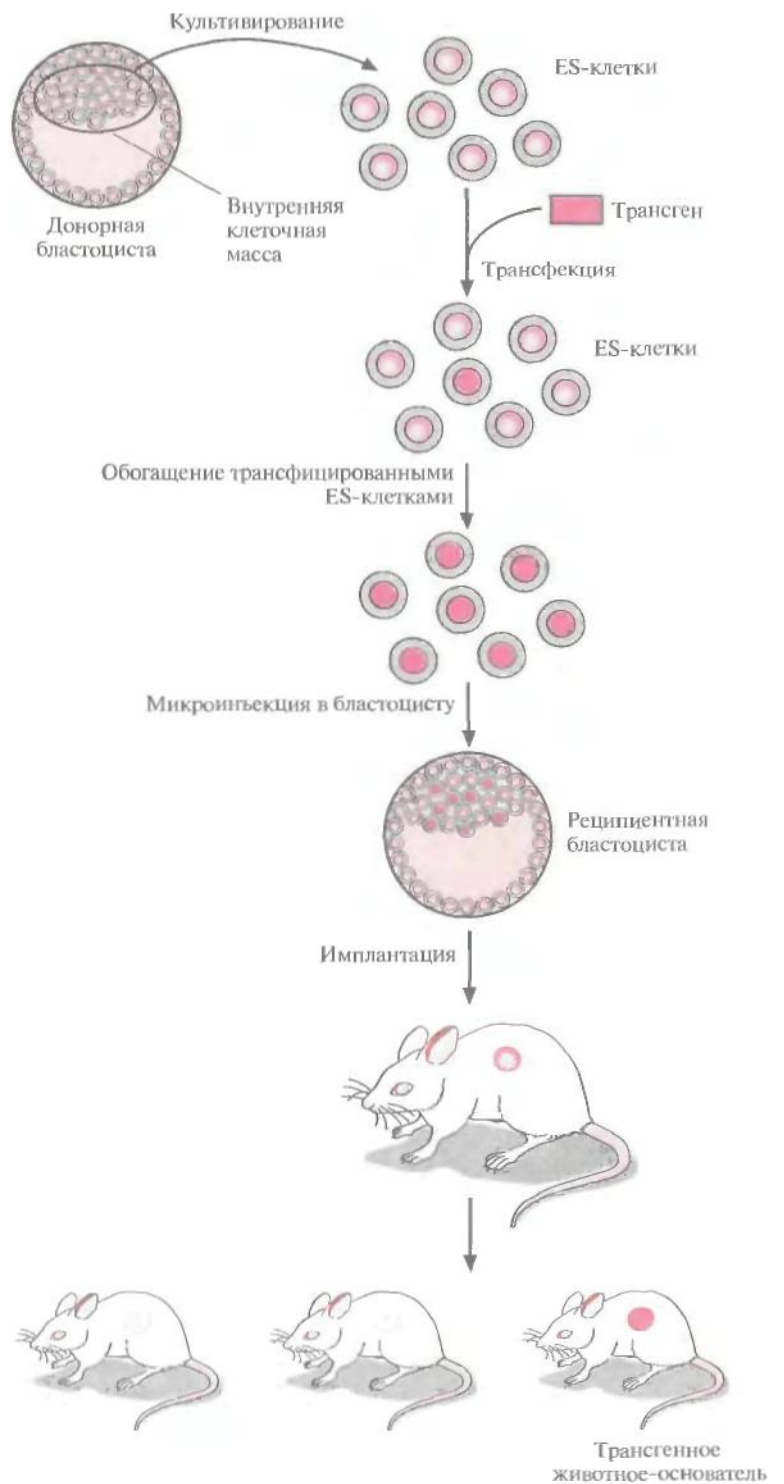
Клетки, выделенные из мышинных эмбрионов на стадии бластоцисты, могут пролиферировать в культуре, сохраняя способность к дифференцировке в любые типы клеток, в том числе и в клетки зародышевой линии, при введении в другой эмбрион на стадии бластоцисты. Такие клетки называются плюрипотентными эмбриональными стволовыми клетками (ES). ES-клетки в культуре легко модифицировать методами генной инженерии без нарушения их плюрипотентности. Например, в определенный сайт незначительного гена в их геноме можно встроить функциональный трансген. Затем можно отобрать измененные клетки, культивировать их и использовать для получения трансгенных животных (рис. 19.4). Это позволяет избежать случайного встраивания, характерного для метода микроинъекций и ретровирусных векторных систем.

При трансфекции ES-клеток в культуре вектором, предназначенным для интеграции в специфический хромосомный сайт, в некоторых клетках ДНК встраивается случайным образом, в других встраивание происходит в нужный сайт, в большинстве же ES-клеток интеграции вообще не происходит. Для увеличения числа клеток первого типа используют так называемую позитивно-негативную селекцию. Эта стратегия состоит в позитивной селекции клеток, несущих векторную ДНК, встроившуюся в нужный сайт, и негативной селекции клеток с векторной ДНК, интегрировавшейся в случайный сайт.

Сайт-мишень должен находиться в такой области геномной ДНК, которая не кодирует важных белков, чтобы интеграция чужеродной ДНК не повлияла на процессы развития или клеточные функции. Кроме того, существенно, чтобы встраивание трансгена не блокировало трансляцию соответствующего участка генома. Поиск подобных сайтов ведется непрерывно.

Вектор для позитивно-негативной селекции обычно содержит следующие элементы: 1) два блока последовательностей (HB1 и HB2), гомологичных отдельным участкам сайта-мишени; 2) трансген (TG), кодирующий новую функцию реципиента; 3) последовательность, кодирующую устойчивость к соединению G-418 (Neo<sup>r</sup>); 4) два разных гена тимидинкиназы (*tk1* и *tk2*) вируса простого герпеса типов 1 и 2 (HSV-rit/ и HSV-Î&2) (рис. 19.5, А). Ключевым для позитивно-негативной селекции является взаимное расположение этих элементов. Трансген и ген устойчивости к G-418 (Neo<sup>r</sup>) должны находиться между двумя участками ДНК, гомологичными сайту-мишени, а гены HSV-*tk1* и HSV-*tk2* — по бокам этой конструкции. Если встраивание происходит в случайный сайт (не в HB1 и HB2), то с высокой вероятностью вместе с другими последовательностями интегрируют один или оба гена HSV-/& (рис. 19.5, А). Напротив, если интеграция происходит в результате гомологичной рекомбинации путем двойного кроссинговера в нужный сайт, то в геном встраиваются только трансген и ген Neo<sup>r</sup>, а гены HSV-/& — нет (рис. 19.5, Б). При выращивании трансфицированных клеток в присутствии G-418 клетки, не несущие ген Neo<sup>r</sup>, расти не будут. Выживут только клетки, в которых произошла интеграция — иными словами, осуществляется позитивная селекция. Если одновременно с G-418 в среду

Рис. 19.4. Получение трансгенных мышей с помощью генетической модификации эмбриональных стволовых (ES) клеток. ES-клетки получают из внутренней клеточной массы бластоцисты мыши. Их трансфицируют вектором, несущим трансген, культивируют и идентифицируют трансфицированные клетки методом позитивно-негативной селекции или ПЦР. Популяцию трансфицированных клеток вновь культивируют и вводят в бластоцисты, которые затем имплантируют в матку «суррогатных» матерей. Скрещивая животных-основателей, несущих трансген в клетках зародышевой линии, можно получить линии трансгенных мышей.



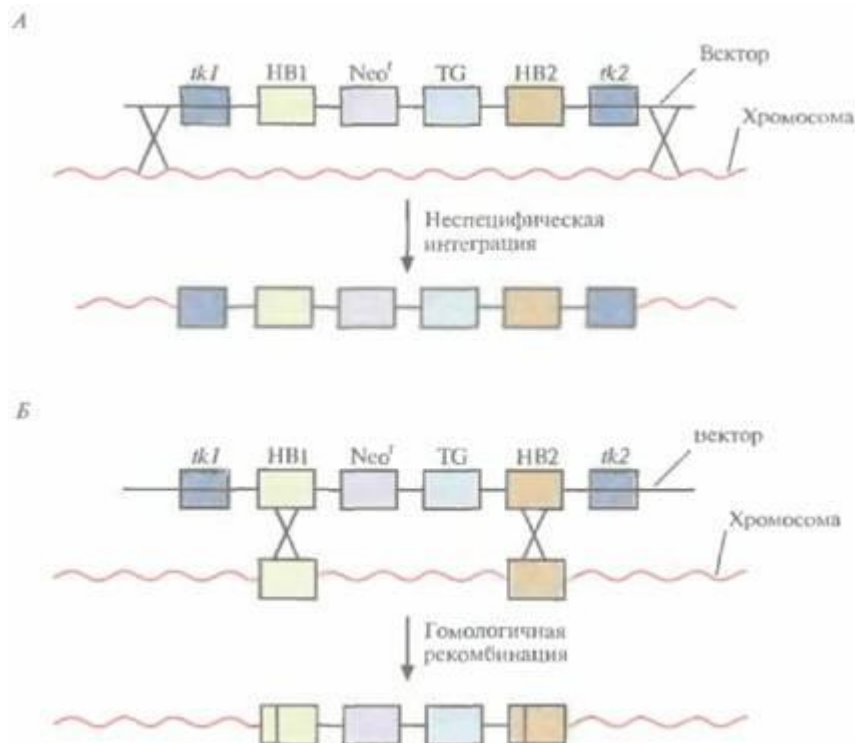


Рис. 19.5. Позитивно-негативная селекция. *А.* Неспецифическая интеграция. В хромосому встроились оба гена тимидинкиназы (*tk1* и *tk2*), два участка ДНК, гомологичные специфичным последовательностям хромосомной ДНК репицентных клеток (HB1 и HB2), ген (*Neo<sup>r</sup>*), обеспечивающий устойчивость к цитотоксическому соединению G-418, и трансген (TG). После трансфекции проводят тестирование клеток на устойчивость к G-418 и ганцикловиру, который становится цитотоксичным для клеток, синтезирующих тимидинкиназу. Интеграция может произойти и по-другому, со встраиванием в хромосому только гена тимидинкиназы. В присутствии G-418 и ганцикловира все такие клетки тоже погибают. *Б.* Специфическая интеграция с помощью гомологичной рекомбинации. В результате двойного кроссинговера между гомологичными участками (HB1 и HB2) векторной и хромосомной ДНК в последнюю встраивается фрагмент, не содержащий генов тимидинкиназы (*tk1* и *tk2*). В присутствии G-418 и ганцикловира выживают только клетки, в которых прошла гомологичная рекомбинация.

добавить ганцикловир, то рост клеток, синтезирующих тимидинкиназу, будет подавлен, поскольку этот фермент катализирует превращение ганцикловира в токсичное соединение, летальное для клетки, т. е. произойдет негативная селекция. Клетки, прошедшие через такое двойное сито, скорее всего будут содержать последовательность, встроившуюся в нужный сайт. Хотя этот метод не застрахован от ошибок, он позволяет обогатить клеточную популяцию клетками, несущими трансген в специфичном хромосомном сайте.

Более простой способ идентификации ES-клеток, несущих трансген в нужном сайте, основан на использовании ПЦР. В этом случае ДНК-вектор содержит два участка, гомологичных сайту-мишени, по одному со стороны трансгена и со стороны клонированной бактериальной или синтетической (уникальной) последовательности, отсутствующей в геноме мыши (рис. 19.6). После трансфекции ES-клеток этим вектором проводят скрининг трансфицированных клеток методом ПЦР. Один из ПЦР-праймеров (P1) комплементарен участку клонированной бактериальной или синтетической (уникальной) нуклеотидной последовательности интегрировавшего вектора, а второй (P2) — участку хромосомной ДНК, прилегающему к одному из гомологичных участков ДНК. При встраивании последовательности-мишени в случайный сайт

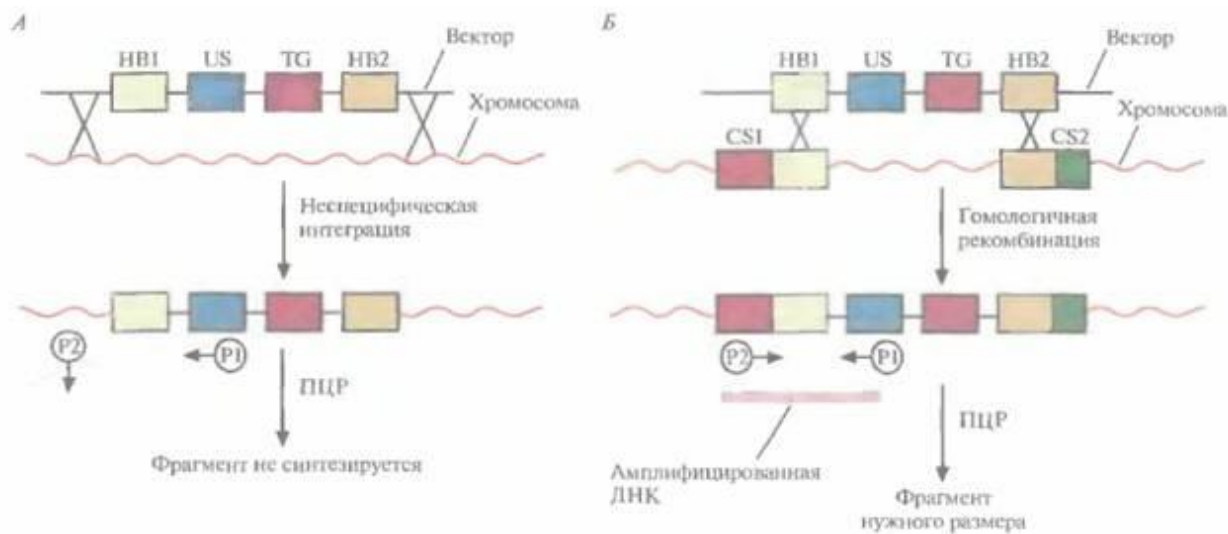


Рис. 19.6. Идентификация клеток, несущих трансген в специфическом сайте, при помощи ПЦР. *А.* В результате неспецифического встраивания векторной ДНК один из праймеров (P2) не сможет гибридизоваться с участком хромосомы, находящимся на определенном расстоянии от места отжига праймера P1, и фрагмента нужного размера при амплификации не образуется. P1 гибридизуется с уникальным участком (US) встроенной ДНК, отсутствующим в хромосомной ДНК клетки-реципиента. *Б.* В результате гомологичной рекомбинации между участками HB1 и HB2 встраиваемой ДНК, с одной стороны, и комплементарными участками хромосомы CS1 и CS2, с другой, образуются участки, с которыми могут гибридизоваться оба праймера, P1 и P2, и которые находятся на определенном расстоянии друг от друга. В ходе ПЦР-амплификации синтезируются фрагменты одного размера, которые можно идентифицировать при помощи гель-электрофореза. Если ПЦР-продукт нужной длины образовался, значит транс ген (TG), находящийся между гомологичными участками (HB1 и HB2), встроился в определенный сайт хромосомы.

ожидаемый продукт амплификации образовываться не будет (рис. 19.6, *А*), а при сайт-специфической интеграции в результате ПЦР-амплификации образуется фрагмент ДНК известного размера (рис. 19.6, *Б*). Таким образом можно идентифицировать пулы ES-клеток, содержащих трансген в нужном сайте, а пересевая клетки из этих пулов — получить клеточные линии с сайт-специфической вставкой.

ES-клетки, в геном которых в нужном сайте встроен трансген, можно культивировать и ввести в эмбрион на стадии бластоцисты, а затем имплантировать такие эмбрионы в матку псевдобеременных «суррогатных» матерей. Мышата, у которых генетически модифицированные ES-клетки участвовали в образовании клеток зародышевой линии, могут дать начало трансгенным линиям. Для этого их нужно скрестить с особями той же линии, а затем скрестить их трансгенных потомков. В результате будут получены трансгенные мыши, гомозиготные по трансгену.

В специфический хромосомный сайт ES-клеток можно не только встроить трансген, кодирующий какую-то новую функцию, но и направленно разрушить этот сайт интеграцией с его кодирующей областью специфической последовательности (обычно селективного маркерного гена) (рис. 19.7). Одна из задач направленного нарушения («нокаута») гена состоит в исследовании влияния этого процесса на развитие организма и протекающие в нем физиологические процессы. Кроме того, есть надежда, что трансгенных животных с нарушением в определенном гене можно использовать как модель для изучения болезней человека на молекулярном уровне.

Например, направленный «нокаут» гена родопсина мыши приводит к инактивации палочек сетчатки, что имитирует такую болезнь человека, как пигментный ретинит. На мышах с «нокаутированным» геном родопсина можно изучать процесс дегенерации сетчатки, а также

терапевтический эффект лекарственных средств, замедляющих или вообще останавливающих генетически обусловленный патологический процесс. Уже создано более 250 линий мышей с «нокаутированными» генами, использующихся в качестве моделей для изучения различных заболеваний человека.

В принципе подходы к созданию трансгенных животных с «улучшенными функциями» и с «потерей функций» сходны. К сожалению, плюрипотентные ES-клетки, аналогичные таковым у мышей, пока не обнаружены у крупного рогатого скота, овей, свиней и цыплят, но их поиск продолжается.

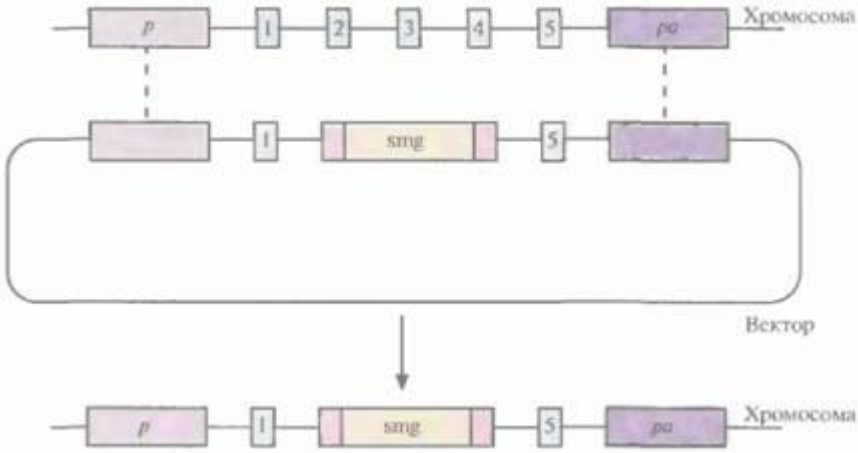


Рис. 19.7. «Нокаут» гена с помощью направленной гомологичной рекомбинации. Вектор несет селективный и маркерный ген (smg) и фланкирующие его последовательности, гомологичные соответствующим участкам гена-мишени. Последний содержит пять экзонов (1—5). В результате гомологичной рекомбинации (штриховые линии) ген-мишень прерывается («нокаутируется»).

*Клонирование с помощью переноса ядра*

Плюрипотентность можно выявить, если перенести ядро тестируемой клетки в яйцеклетку с удаленным ядром и затем исследовать способность последней к развитию и образованию жизнеспособного потомства. В нескольких лабораториях с переменным успехом исследовали плюрипотентность линий эмбриональных клеток, клеток плода и взрослой особи. Было показано, что ядра эмбриональных клеток способны -хотя и с низкой эффективностью — обеспечивать развитие. Например, с помощью переноса ядер эмбриональных клеток крупного рогатого скота, культивированных непродолжительное время, были получены жизнеспособные особи. Всем известная овца по имени Долли была клонирована с помощью переноса ядра клетки молочной железы (вымени) взрослого животного (рис. 19.8). Так впервые была доказана плюрипотентность ядра дифференцированной взрослой клетки. Впрочем, нельзя исключить, что на самом деле донорское ядро было взято из недифференцированной клетки, присутствовавшей в эпителии молочной железы организма-донора.

Клонирование Долли из ядра дифференцированной клетки и трех других овец из ядер эмбриональных клеток удалось осуществить благодаря переносу ядер из клеток, находящихся в стадии покоя (G<sub>0</sub>), и, возможно, особенностям эмбриогенеза этого животного. Дело в том, что в течение первых трех делений зиготы овцы, занимающих несколько суток, происходит только репликация ДНК, ни один из генов не экспрессируется. Предполагается, что за это время введенная ДНК освобождается от специфичных для клетки регуляторных белков, а соответствующие гены эмбрионального развития связываются с инициаторными эмбриональными белковыми факторами из цитоплазмы яйцеклетки.

Основная проблема, которую нужно решить для того, чтобы создание трансгенных животных с помощью метода переноса ядер стало реальным, — это сохранение плюрипотентности клеток в непрерывной культуре. Если это удастся, то генетическое изменение таких клеток и создание трансгенных организмов станет почти рутинной процедурой. Однако вследствие видовых различий во времени процесса деления



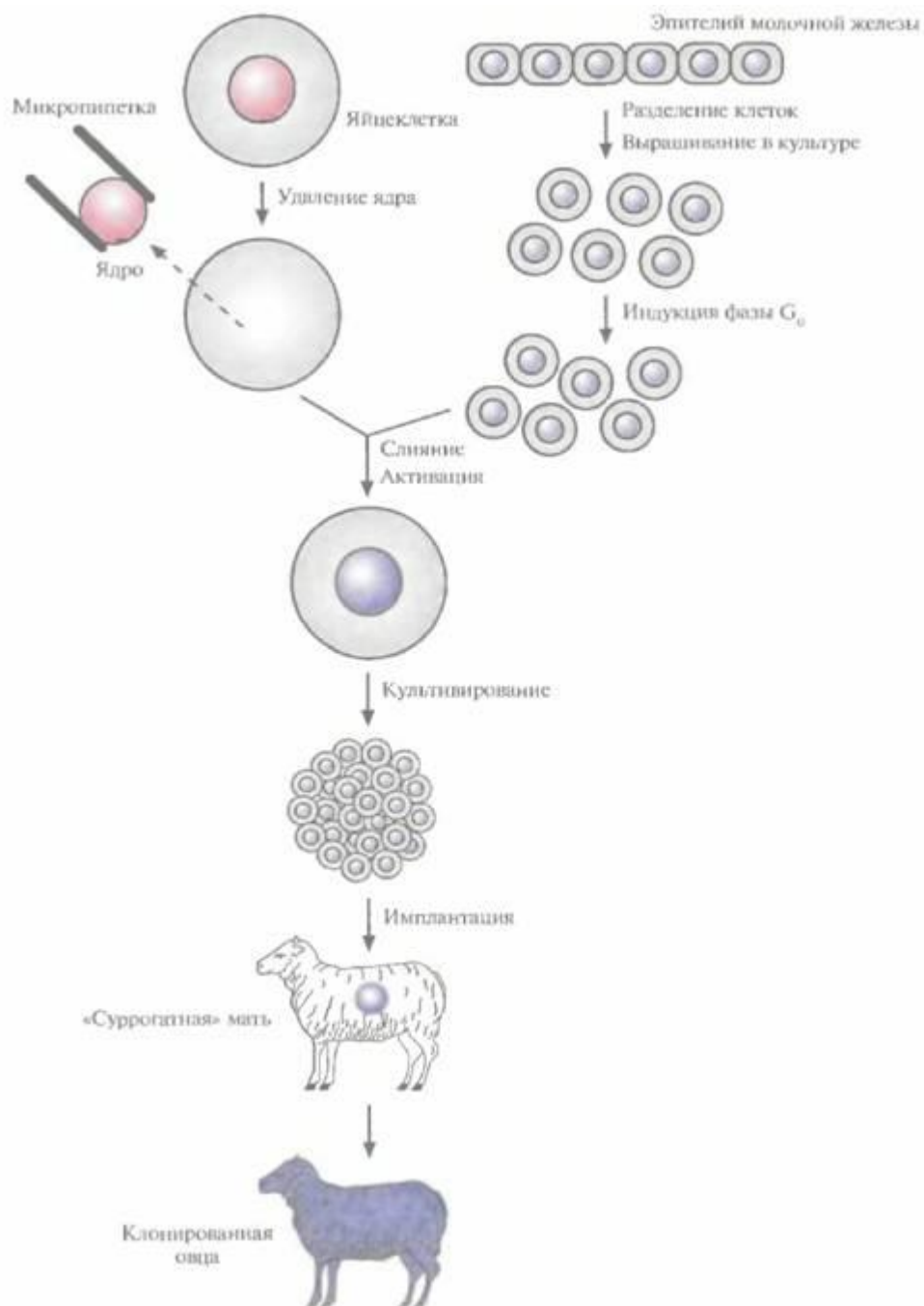


Рис. 19.8. Клонирование овцы методом переноса ядра. Ядро яйцеклетки удаляют с помощью микропипетки. Культивируют эпителиальные клетки молочной железы взрослой особи и индуцируют их переход в фазу  $G_0$ . Осуществляют слияние клеток в  $G_0$ -фазе и яйцеклеток, лишенных ядра, и выращивают восстановленные яйцеклетки в культуре или в яйцевыводке с наложенной лигатурой до ранних стадий эмбриогенеза, а затем имплантируют их в матку «суррогатной» матери, где и происходит дальнейшее развитие. В эксперименте, описанном Уилмутом и др. (Wilmut et al., 1997), было проведено слияние 277 яйцеклеток с удаленными ядрами с клетками молочной железы в фазе  $G_0$ ; из 29 эмбрионов только один развился до жизнеспособного плода.



**Генетическая трансформация эмбрионов мыши  
микроинъекцией очищенной ДНК**

J. W. Gordon, G. A. Scangos, D. J. Plotkin, J. A. Barbosa. F. H. Ruddle *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 7380-7384, 1980

**Экспрессия гена тимидинкиназы вируса простого герпеса в  
соматических клетках мыши после инъекции  
рекомбинантного гена в яйцеклетки**

R. L. Brinster, H. Y. Chen, M. Trumbauer, A. W. Seneff, R. Warren, R. D. Palmiter *Cell* 27: 223-231, 1981

Впервые возможность введения ДНК не была трансгенотипу мышей. переноса ДНК при помощи интактна, и ген тимидинкиназы. Несмотря на техническую микроинъекций в пронуклеус HSV не стал трансгеном. сложность и относительную оплодотворенной яйцеклетки Бринстер и др. инъектировали неэффективность метода с мышью была проиллюстрирована ген тимидинкиназы HSV под использованием микроинъекций, Дж. Гордоном и др. В этом контроле промотора гена эти эксперименты оказались эксперименте в несколько сотен металлотиюнеина-I и вполне успешными. В настоящее оплодотворенных яйцеклеток обнаружили, что у одной из время различные линии мышей, инъектировали плазмидный полученных трансгенных которые несут чужеродные гены вектор pBR322, содержащий ген мышей синтезировалось больше {трансгенные мышью) или тимидинкиназы вируса простого тимидинкиназы HSV в клетках собственные гены, выведенные герпеса (HSV) и часть генома печени и почек, чем у трех из строя интеграцией фрагмента обезьяньего вируса 40 (SV40). других, синтезировавших этот чужеродной ДНК Из 78 потомков, рожденных фермент лишь в небольшом («нокаутированные" гены), приемными матерями, два количестве. Кроме того, восемь используются в самых разных содержали плазмидную ДНК. других трансгенных животных целях: для изучения процессов Авторы сделали вывод, что «эти несли ген тимидинкиназы HSV, регуляции генов и развития данные свидетельствуют о не синтезировали активного млекопитающих, возникновения возможности использования фермента. По данным Саузерн- вирусных заболеваний и рака, рекомбинантных плазмид в блоттинга, у всех трансгенных мутагенных эффектов качестве вектора для введения мышей введенная ДНК различных агентов и многого чужеродных генов присутствовала в большом числе другого. Кроме того, непосредственно в эмбрионы копий. Эти два исследования трансгенные мышью и мышью с мышью, которые сохраняют эти послужили основой «нокаутированным» геном гены в ходе развития». К экспериментов по представляют интерес как сожалению, плазмидные модельные системы для исследования болезней человека.

клетки на ранних стадиях эмбриогенеза и инициации транскрипции в этот период пока не ясно, удастся ли осуществить перенос ядра в случае каких-либо других домашних животных, кроме овец, если донорское ядро будет находится на той же стадии, что и яйцеклетка.

**Перенос генов с помощью искусственных дрожжевых хромосом**

Большинство трансгенов представляют собой кДНК, небольшие гены (<20 т. п. н.) или фрагменты генов. Зачастую кДНК плохо экспрессируются в клетках млекопитающих, а когда трансгеном служит геномная ДНК, важные геноспецифичные регуляторные последовательности, расположенные до и после гена-мишени, обычно не входят в состав вставки. Кроме того, полноразмерные гены и мультигенные комплексы (>100 т. п. н.) слишком велики для встраивания в обычные векторы. Учитывая все это, для трансгенотипа стали использовать искусственные дрожжевые хромосомы (YAC), вмещающие фрагменты геномной ДНК длиной от 100 до > 1000 т. п. н.

Трансгенных мышью получали микроинъекцией в пронуклеус оплодотворенной яйцеклетки или трансфекцией ES-клеток с помощью YAC, несущих несколько родственных генов или один большой ген. Трансгенные мышью, несущие кластер из пяти функциональных генов β-глобина человека суммарной длиной примерно 250 т. п. н., экспрессировали все эти гены тканеспецифично и в нужное время — точно так же, как это происходит у человека. Такое соответст-

вне обеспечивалось фланкирующими их последовательностями, которые содержат промотор и другие важные регуляторные элементы.

Создание мышей, которые синтезировали бы только человеческие антитела, — это примечательный пример трансгеноза с помощью YAC. Как отмечалось в гл. 10, моноклональные антитела можно использовать для лечения некоторых заболеваний человека. Однако получить человеческие моноклональные антитела практически невозможно. К сожалению, и моноклональные антитела грызунов иммуногенны для человека. Чтобы «очеловечить» существующие моноклональные антитела грызунов, были разработаны сложные стратегии с использованием рекомбинантных ДНК. В результате этих трудоемких процедур удалось получить Fv- и Fab-фрагменты, зачастую обладающие каким-то сродством к специфическому антигену. Возможно, технологического прорыва удастся достичь, если использовать для получения полноразмерных человеческих антител более доступный метод с использованием гибридом.

Синтез природных антител — это настоящее чудо. Антитело — очень сложная тетрамерная конструкция, состоящая из двух пар разных цепей. Одна из них называется тяжелой (H), а другая — легкой ( $\lambda$  или k). Эти термины отражают различия в молекулярных массах субъединиц антитела. Генетические особенности каждой тяжелой цепи определяются комбинацией варибельного ( $V_H$ ), дивергентного ( $D_H$ ), шарнирного ( $J_H$ ) и константного ( $C_H$ ) участков (доменов) соматической ДНК в В-клетке. Известны два типа легких цепей,  $\lambda$  и k, которые образуются в результате перестройки их собственных варибельных ( $v\lambda$ , VK), шарнирных ( $J\lambda$ , JK) и константных ( $C\lambda$ , Ck) доменов. Данная В-клетка синтезирует один вид антител, с уникальной комбинацией участков, составляющих H-цепь, и либо перестроенной  $\lambda$ -, либо k-цепью.

Набор генетических элементов, обеспечивающих образование множества разных H-цепей антител человека, включает около 95  $V_H$ -доменов, 30  $D_H$ -доменов, 6  $J_H$ -доменов и 5 основных константных ( $C\alpha$ ,  $C\gamma$ ,  $C\delta$ ,  $C\epsilon$ ,  $C\mu$ ) доменов. Ло-кус к-генов содержит примерно 76  $V_k$ -доменов, 5  $J_k$ -доменов и один константный (Ck) участок (рис. 19.9). Размер H-локусов и к-генов — от 1 до 1,5 т. п. н. Для создания трансгенных мышей, способных синтезировать множество различных человеческих антител, необходимо инактивировать мышинные гены H- и L-цепей, а затем встроить в хромосомную ДНК мыши YAC, содержащую гены H- и L-цепей каждого человеческого гена иммуноглобулина,

Чтобы решить эту задачу, мышинные гены H-и k-цепей были заменены («нокаутированы») небольшим участком кластера генов H-цепи человека (который включал 4  $V_H$ -домена, 16  $D_H$ -доменов, 6  $J_H$ -доменов,  $C\gamma$  и  $C\mu$ ) и кластера генов k-цепи человека (содержащего 4  $V_k$ -домена, 5  $J_k$ -доменов и Ck). Трансгенные мыши с таким набором генов антител человека синтезировали человеческие антитела к некоторым антигенам; кроме того, были созданы гибридомы, продуцирующие человеческие моноклональные антитела. Однако разнообразие человеческих антител, продуцируемых такими трансгенными мышами, было невелико вследствие ограниченности набора варибельных сегментов H- и k-цепей. Чтобы решить эту проблему, создали YAC с большим числом генов варибельных участков H- и k-цепей гемоглобина человека.

Объединив четыре разные YAC с генами H-цепей гемоглобина человека, создали YAC длиной 1000 т. п. н., несущую 66  $V_H$ -доменов, около 30  $D_H$ -сегментов, 6  $J_H$ -доменов,  $C\alpha$ ,  $C\delta$ , и  $C\gamma$ . Аналогично, из трех YAC, несущих различные домены VK, создали YAC длиной 800 т. п. н. с 32 VK-доменами, 5 JK-доменами и Ck. ES-клетки трансфицировали по отдельности YAC с генами H- и k-цепей методом слияния клеток, отобрали клетки, в которых произошла интеграция YAC, с помощью селективного маркера и проверили целостность каждой вставки методом ПЦР. Инъецировали клетки, несущие встроенные гены H- либо k-цепи, в бластоцисты и идентифицировали особь-основателя с помощью ПЦР. Трансгенных мышей со вставками генов H- и k-цепей скрещивали по отдельности с мышами с инактивированными локусами этих цепей. Затем потомство скрещивали между собой, чтобы получить мышей, лишенных функциональных мышинных генов H- и k-цепей, но несущих обе вставки генов H- и k-цепей гемоглобина человека,

Трансгенные мыши с увеличенным числом человеческих  $V_H$ - и  $V_k$ -доменов синтезировали

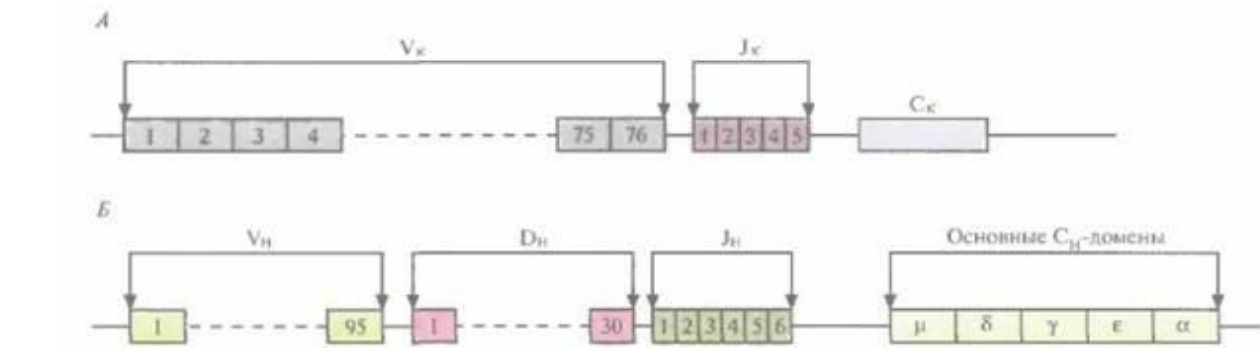


Рис. 19.9. Схематичное изображение генов к- и Н-цепей иммуноглобулинов человека. А. Строение гена к-цепи иммуноглобулина в клетках зародышевой линии. Штриховая линия — промежуточные домены, здесь не показанные. Ген функциональной к-цепи, например Vκ8-Jκ4-Cκ, образуется в В-клетках в результате нескольких перестроек соответствующих ДНК- доменов. Представленная здесь комбинация — лишь одна из 500 возможных. Б. Строение гена Н-цепи иммуноглобулина в клетках зародышевой линии. Штриховая линия — промежуточные домены, здесь не показанные. Ген функциональной Н-цепи, например Vη33-Dη26-Jη4-C□ образуется в В-клетках в результате ряда перестроек соответствующих доменов. Представленная здесь комбинация — лишь одна из 140 000 возможных. На рисунке показан только один Сγ-домен, хотя на самом деле их четыре (Сγ1, Сγ2а, Сγ2b и Сγ3).

человеческие антитела. Их иммунизировали тремя разными антигенами, и в каждом случае гибридомы секретировали человеческие моноклональные антитела, обладающие высоким сродством к антигену, которым животные были иммунизированы. Весьма вероятно, что с помощью такой трансгенной системы удастся получать человеческие моноклональные антитела для использования их в медицине.

**Трансгенные мыши: применение**

Трансгенные мыши могут служить модельными системами для изучения болезней человека и тест-системами для исследования возможности синтеза продуктов, представляющих интерес для медицины. Используя целых животных, можно моделировать и возникновение патологии, и ее развитие. Однако мышь — не человек, хотя она тоже относится к классу млекопитающих, поэтому данные, полученные на трансгенных моделях, не всегда можно экстраполировать на человека в том, что касается медицинских аспектов. Тем не менее в некоторых случаях они позволяют выявить ключевые моменты этиологии сложной болезни. Принимая во внимание все это, ученые разработали «мышинные» модели таких генетических болезней человека, как болезнь Альцгеймера, артрит, мышечная дистрофия, образование опухолей, гипертония, нейродегенеративные нарушения, дисфункция эндокринной системы, сердечно-сосудистые заболевания и многие другие.

Болезнь Альцгеймера — это дегенеративный процесс, приводящий к утрате клеток различных отделов головного мозга. Наиболее ранним проявлением служит ухудшение памяти. Этот процесс прогрессирует, к нему присоединяются утрата способности к абстрактному мышлению, изменение личности, нарушения речи, снижение физического статуса. Патология наблюдается у 1% людей возрастной группы от 60 до 65 лет и у 30% людей старше 80 лет. При патоморфологическом исследовании в теле нейронов обнаруживаются нейрофибриллярные клубочки, а у синаптических окончаний — плотные агрегаты, называемые сенильными бляшками (рис. 19.10). Кроме того, в кровеносных сосудах мозга обнаруживаются конгломераты — амилоидные бляшки,

Основным компонентом сенильных и амилоидных бляшек является белок Аβ (амилоид β, В-белок, В-амилоидный белок, β/A4) мол. массой 4 кДа. Существуют Аβ-белки с разным числом аминокислотных остатков, например Аβ40 и Аβ42. Все они образуются в результате протео-



Рис. 19.10. Схематическое изображение нейрона коры головного мозга человека с указанием некоторых гистологических особенностей, характерных для болезни Альцгеймера. У синапсов образуются сенильные бляшки, содержащие амилоидные скопления и обломки клеток. В теле нейрона накапливаются нейрофибриллы, включающие агрегаты из белков цитоскелета и других белков. Происходят и другие изменения, здесь не показанные.

литического расщепления белка-предшественника (APP). Причины аккумуляции Aβ-белка не установлены. Члены некоторых семей, в которых с высокой частотой встречается болезнь Альцгеймера, несут мутации в гене APP, что наводит на мысль об участии этого гена в возникновении данной патологии. К сожалению, проследить в деталях за возникновением и развитием болезни Альцгеймера на человеке не удастся. Неоценимую помощь в этом могла бы оказать какая-нибудь «животная» модель,

Было получено множество трансгенных мышей, несущих полноразмерный ген APP или его часть под контролем нейроспецифичного промотора. При этом у большинства животных образование амилоидных бляшек, нейрофибрилярных клубочков, гибель нейронов или нарушение поведения не отмечались. Однако у животных, несущих трансген, кодирующий участок из 100 последних аминокислот APP, который включал и Aβ-белок, обнаруживалась дегенерация нервных тканей, аналогичная таковой при болезни Альцгеймера.

Более адекватные «животные» модели, позволяющие изучать болезнь Альцгеймера, были созданы с использованием трансгенов, содержащих мутации в гене APP, характерные для некоторых семей с высокой частотой встречаемости болезни Альцгеймера в раннем возрасте (<50 лет). У одной группы таких семей в положении 717 APP (APP-717) вместо валина присутствовал фенилаланин, в другой группе в положениях 670 и 671 APP (APP-670/671) лизин и метионин были заменены на аспарагин и лейцин соответственно.

Трансген с мутацией APP-717 был создан на основе кДНК APP встраиванием между экзонами 6 и 7, 7 и 8, 8 и 9 модифицированных интронов. Интроны вводились потому, что, согласно данным эксперимента, содержащие их трансгены транскрибируются более эффективно, чем трансгены без интронов. Конструкция «кДНК APP—интроны» находилась под контролем промотора гена β-фактора роста из тромбоцитов, экспрессирующегося в тканях мозга (рис. 19.11). Вся она была названа мини-геном PDAPP. У стареющих трансгенных мышей (старше 6 месяцев), несущих около 40 копий PDAPP, образовывались амилоидные бляшки, отмечались гибель нейронов и дефекты памяти. Конструкция APP-670/671 под контролем нейроспецифичного промотора вызывала у трансгенных мышей симптомы, подобные симптомам болезни Альцгеймера, в том числе образование избыточных количеств Aβ42. Интересно, что ни у стареющих мышей, несущих PDAPP-мини-ген, ни у трансгенных мышей APP-670/671 нейрофибрилярные клубочки не обнаруживались. Возможно, эти структуры возникают у человека как следствие сверхпродукции Aβ42,

В развитии болезни Альцгеймера у человека участвуют еще три гена — ApoE4, гены пресенилина 1 (PS1) и пресенилина 2 (PS2). Наличие аллеля ApoE4 локуса ApoE, который ответствен за

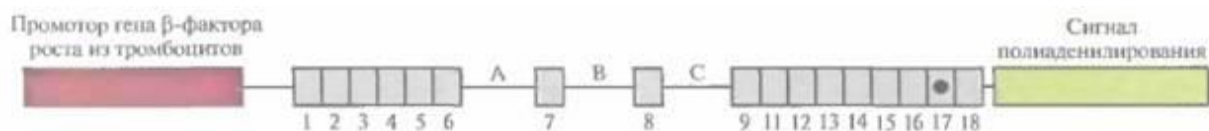


Рис. 19.11. Генетическая конструкция, называемая мини-геном PDAPP, с помощью которой можно моделировать развитие болезни Альцгеймера у трансгенных мышей. 1—10 — экзоны кДНК белка-предшественника амилоида, А—С — введенные интроны. Регуляторными элементами являются промотор гена β-фактора роста из тромбоцитов и сигнал полиаденилирования вируса SV40.

транспорт липидов, коррелирует с увеличением вероятности возникновения болезни Альцгеймера у людей старше 60 лет, В семьях, где отмечается развитие этой болезни в молодом возрасте, обнаруживаются мутации в генах пресенилинов, однако роль каждого из них в развитии данной патологии не выяснена. По данным разных авторов, мутации в генах пресенилинов приводят к увеличению аккумуляции Аβ42. Например, у дважды трансгенных мышей, полученных скрещиванием трансгенных мышей, которые несли полноразмерный человеческий ген APP, с мышами, несущими мутантный ген пресенилина 1, отмечалась сверхпродукция Аβ42. Пока о патогенезе болезни Альцгеймера мало что известно, но есть надежда, что животные модели помогут ответить на некоторые важные вопросы о ее молекулярных основах. В США эта болезнь поражает ежегодно около 4 млн. человек, и наносимый ею ущерб составляет порядка 100 млрд. долларов.

Трансгенных мышей использовали также в качестве модельных систем для изучения экспрессии генов, кодирующих трансгенные продукты, которые секретируются в молоко. Так, для изучения функций белка, нарушения в котором приводят к муковисцидозу (CFTR), и для разработки подходов к лечению муковисцидоза (CF) необходимы большие количества аутентичного CFTR-белка.

**Муковисцидоз** — распространенная генетическая болезнь, поражающая в странах Европы одного из 2500 новорожденных. Первичный эффект дефектного CF-гена — это изменение функции CFTR, который в норме служит каналом для ионов хлора. В результате блокирования потока этих ионов в клетку и из клетки в протоках некоторых органов, особенно в легких и поджелудочной железе, скапливается слизь. Она становится источником бактериальной инфекции, которая с трудом поддается лечению антибиотиками. ДНК, высвобождающаяся из лизи-ровавших бактерий, делает слизь очень густой. Загустевшая слизь забивает протоки, нарушается нормальная работа органа и симптомы муковисцидоза еще более усиливаются. Продолжительность жизни больных муковисцидозом составляет в настоящее время 25-30 лет.

Для того чтобы лучше изучить механизм действия CFTR, необходимо иметь этот белок в достаточном количестве. Все известные клеточные системы экспрессии *in vitro* не обеспечивали его эффективного синтеза. Возможно, это связано с аккумуляцией CFTR в мембранах трансфицированных клеток. Решить эту проблему можно было бы постоянным удалением плазматических мембран из хозяйских клеток. В такой системе гетерологичный трансмембранный белок связывался бы с отдельными фрагментами плазматической мембраны, что значительно облегчало бы его концентрирование и очистку. Аналогичный механизм используется клетками молочной железы для образования глобул жира в период вскармливания. Жировые капельки инкапсулируются в плазматической мембране и в таком виде секретируются в молоко.

Чтобы проверить действенность этой системы, полноразмерную кДНК CFTR встроили в середину дефектного гена β-казеина козы, из которого был удален участок от конца экзона 2 до начала экзона 7 (рис. 19.12). Получившаяся конструкция содержала промотор и сигнал терминации транскрипции гена β-казеина козы. При этом кДНК CFTR была встроена в структурный ген с интронами, благодаря которым повышалась эффективность транскрипции трансгена. Ген β-казеина активно экспрессируется в клетках молочных желез в период вскармливания, и этот белок является основным белком молока.





Рис. 19.12, Генетическая конструкция «кДНК CFTRG-ген β-казеина козы». Полноразмерная кДНК CFTR встроена между экзонами 2 (EX2) и 7 (EX7) гена β-казеина козы. Сохранены промотор, терминатор и экзоны 1,8 и 9 (EX1, EX8 и EX9) гена казеина.

Были получены линии трансгенных мышей, несущих кДНК CFTR под контролем регуляторных последовательностей гена β-казеина. Как и ожидалось, в молоке трансгенных самок содержался CFTR-белок, связанный с мембранами глобул жира. Никаких отрицательных побочных эффектов у кормящих CFTR-трансгенных самок или у мышат, вскормленных их молоком, не наблюдалось. CFTR был гликолизирован и легко экстрагировался из жировой фракции молока. Остается только выяснить, является ли он аутентичным белком. Исследовалась также возможность получения других мембраносвязанных белков с молоком. В клетках молочных желез трансгенных мышей в период лактации синтезируется множество белков, представляющих интерес для медицины. Но чтобы иметь возможность получать CFTR, другие трансмембранные белки и различные белки человека в больших количествах, соответствующие трансгенные конструкции необходимо встраивать в геном более крупных млекопитающих — коровы, овцы или козы.

### Трансгенный крупный рогатый скот

Если предполагается использовать молочную железу в качестве «биореактора», то наиболее предпочтительным животным для трансгеноза является крупный рогатый скот, который ежегодно дает до 10 000 л молока, содержащего примерно 35 г белка на 1 л. Если в молоке будет содержаться такое количество рекомбинантно-го белка и эффективность его очистки составит 50%, то от 20 трансгенных коров можно будет получать примерно 100 кг такого белка в год. По случайному совпадению, именно столько белка С, использующегося для предотвращения тромбообразования, требуется ежегодно. С другой стороны, одной трансгенной коровы будет более чем достаточно для получения требуемого ежегодно количества фактора IX (фактора Кристмаса) каскадного механизма свертывания крови, который вводят больным гемофилией для повышения свертываемости крови.

Для создания трансгенных коров использовали модифицированную схему трансгеноза мышей методом микроинъекций ДНК (рис. 19.13). Процедура включала следующие основные этапы.

1. Сбор ооцитов коров, забитых на скотобойне.
2. Созревание ооцитов *in vitro*.
3. Оплодотворение бычьей спермой *in vitro*.
4. Центрифугирование оплодотворенных яйцеклеток для концентрирования желтка, который в нормальных яйцеклетках мешает визуализации мужского пронуклеуса с помощью секционного микроскопа.
5. Микроинъекция ДНК в мужской пронуклеус.
6. Развитие эмбрионов *in vitro*.
7. Нехирургическая имплантация одного эмбриона реципиентной самке во время течки.
8. Скрининг ДНК потомков на наличие трансгена.

В тестовых экспериментах из пула в 2470 ооцитов были получены два трансгенных теленка. Этот результат указывает на результативность описанного подхода, но также и на его низкую эффективность. Исследования в этой области продолжаются, и есть надежда на усовершенствование методики трансгеноза. Например, скоро появится возможность отбирать небольшое число клеток у развивающегося эмбриона *in vitro* и тестировать их на наличие трансгена; такая потеря клеток эмбрионом не мешает его нормальному развитию. Этот тест позволит имплантировать только эмбрионы, несущие трансген.

Одна из целей трансгеноза крупного рогатого скота — изменение содержания в молоке различных компонентов. Так, количество сыра, получаемого из молока, прямо пропорционально содержанию в нем к-казеина, поэтому весьма





Рис. 19.13. Получение трансгенных коров.

перспективным представляется увеличение количества синтезируемого к-казеина с помощью гиперэкспрессии трансгена этого белка. Далее, если обеспечить экспрессию гена лактазы в клетках молочной железы, то можно будет получать молоко, не содержащее лактозы. Такое молоко незаменимо для многих людей, не переносящих лактозу; после приема молока или молочных продуктов у них возникает серьезное желудочно-расстройство. Трансгеноз крупного рогатого скота — это весьма перспективный подход, но создание большого числа трансгенных животных потребует времени, ведь для того чтобы вырастить половозрелое животное из оплодотворенной яйцеклетки, нужно примерно 2 года.

Весьма актуально создание домашних животных с наследственной устойчивостью к бактериальным и вирусным инфекциям и паразитарным инвазиям. Известно о существовании пород с наследственной устойчивостью к бактериальным инфекционным заболеваниям — маститу (коровы), дизентерии (новорожденные поросята), холере (домашняя птица). Если в основе устойчивости к каждой из этих болезней лежит один ген, можно попытаться создать несущих его трансгенных животных. В настоящее время для борьбы с инфекционными заболеваниями домашних животных используют прививки и лекарственные препараты. Заболевших животных изолируют, за здоровыми ведут тщательное наблюдение. Стоимость всех этих мероприятий может достигать 20% общей стоимости конечной продукции.

Для выведения линий животных, устойчивых к возбудителям инфекций, можно использовать другой подход, заключающийся в создании путем трансгеноза наследуемых иммунологических механизмов. С этой точки зрения рассматривают самые разные гены, ответственные за работу иммунной системы: гены основного комплекса гистосовместимости, Т-клеточных рецепторов, лимфокинов. Наиболее обнадеживающими на настоящее время являются предварительные результаты, полученные при введении мышам, кроликам и свиньям генов, кодирующих Н- и L-цепи какого-либо моно-клонального антитела. Идея этого подхода заключается в том, чтобы снабдить трансгенное животное наследуемым механизмом защиты, позволяющим обойтись без иммунизации с помощью прививок.

Введение в организм реципиента генов антител, которые связываются со специфическими антигенами, было названо иммунизацией *in vivo*. Для этого гены Н- и L-цепей иммуноглобулинов моноклонального мыши-

ного антитела к антителу, связывающемуся с 4-гидрокси-3-нитрофенилацетатом, вводили с помощью микроинъекций в оплодотворенные яйцеклетки мыши, кролика и свиньи. Во всех случаях в сыворотке трансгенных животных обнаруживалась соответствующая активность моноклонального антитела. Однако количество моноклональных антител, содержащих цепи H и L, было невелико. Чтобы установить, можно ли решить эту проблему, необходимо протестировать различные трансгенные конструкции.

Трансгенные овцы, козы и свиньи

Опыты по трансгенозу в случае овец и коз в основном были направлены на превращение молочных желез этих животных в своеобразные биореакторы для получения белковых продуктов, использующихся в медицине. Несмотря на то что надой у овец и коз меньше, чем у коров, за год они дают сотни литров молока. С помощью метода, аналогичного используемому для создания трансгенных мышей и трансгенных конструкций, содержащих гены человека под контролем промоторов, специфичных для молочных желез (табл. 19.2), были созданы трансгенные овца и коза, в молоко которых секретировались белки человека. Они были гликозилированы и обладали активностью, близкой к таковой соответствующих белков, получаемых от человека. Однако, для того чтобы убедиться в полной эквивалентности этих белков, нужны дополнительные исследования. Экспрессия трансгенов в клетках молочных желез овец и коз не оказывала никаких побочных действий ни на самок в период лактации, ни на вскармливаемое потомство. В отличие от этого при введении свиньям трансгена бычьего гормона роста под контролем промотора металлотионеина неблагоприятные эффекты наблюдались. Количество гормона у разных особей в группе трансгенных свиней различалось, однако в целом вся эта группа быстрее прибавляла в весе. К сожалению, этот положительный результат частично обесценивался различными патологиями: у животных отмечались язва желудка, почечная недостаточность, хромота, воспаление перикарда, уменьшение подвижности суставов, предрасположенность к пневмонии. Причины этих симптомов неизвестны. Возможно, они связаны с долговременным присутствием в организме избытка гормона роста. В этих экспериментах трансген синтезировался более или менее непрерывно. Были созданы также трансгенные овцы с повышенной скоростью роста шерсти. Для этого кДНК овечьего инсулиноподобного фактора роста 1 была помещена под контроль мышиногo промотора гена кератина с высоким содержанием серы, что обеспечивало гиперэкспрессию кДНК. При этом у трансгенных овец в отличие от свиней никаких нежелательных побочных эффектов не наблюдалось.

Положительные результаты были получены и в ходе экспериментов с трансгенными свиньями. Например, были созданы здоровые трансгенные свиньи, в геноме которых присутствовала следующая генетическая конструкция: регуляторная область гена β-глобина человека, два гена α<sub>1</sub>-глобина человека и один ген β<sup>A</sup>-глобина человека. В результате ее экспрессии в клетках крови свиней синтезировался человекече-

Таблица 19.2. Трансгенные конструкции, содержащие гены человека под контролем промоторов, специфичных для молочных желез, и реципиентные организмы

| Трансген   | Промотор                      | Реципиент |
|--|-------------------------------|-----------|
| Ген активатора плазм и ногена длительного действия | Ген белка сыворотки           | Коза      |
| Ген α <sub>1</sub> -антитрипсина                   | Ген β-лактоглобулина          | Овца      |
| Ген фактора IX системы свертываемости крови        | Ген β-лактоглобулина          | Овца      |
| Ген растворимого белка CD4                         | Ген белка сыворотки           | Мышь      |
| Ген лактоферрина                                   | Ген α <sub>S1</sub> -казеина  | Корова    |
| Ген урокиназы                                      | Ген α <sub>S1</sub> - казеина | Мышь      |
| Ген CFTR   | Ген β-казеина                 | Мышь      |
| Ген интерлейкина-2                                 | Ген β- казеина                | Кролик    |

скин гемоглобин, при этом в результате замены человеческого промотора гена  $\beta$ -глобина свиным человеческий гемоглобин синтезировался в значительно большем количестве. Человеческий гемоглобин, продуцируемый трансгенными свиньями, обладал такими же химическими свойствами, что и природный человеческий. Его можно было очистить от гемоглобина свиней обычной хроматографией.

Эти результаты указывают на принципиальную возможность замены цельной крови, используемой при трансфузии, человеческим гемоглобином, полученным методом трансгеноза. Однако изолированный гемоглобин переносит кислород не так эффективно, как гемоглобин в составе эритроцитов. Более того, он быстро разрушается в организме животного, которому был введен, а продукты его распада токсичны для почек. Таким образом, получение заменителя человеческой крови с помощью трансгеноза — это дело далекого будущего.

В последнее время большое внимание уделяется вопросу об использовании органов животных для трансплантации человеку. Основная проблема межвидовой трансплантации — это гиперострое отторжение. Гиперострое отторжение влечет за собой связывание антител организма-хозяина с углеводной антигенной детерминантой на поверхности клеток пересаженного органа. Связавшиеся антитела вызывают острую воспалительную реакцию (активацию каскада комплемента), происходит массовая гибель несущих антитела клеток и быстрая потеря пересаженного органа.

В естественных условиях воспалительная реакция блокируется особыми белками на поверхности клеток, выстилающих стенки кровеносных сосудов. Эти белки ингибиторы комплемента видоспецифичны. Было высказано предположение, что если бы животное-донор несло один или несколько генов человеческого белка, ингибирующего комплемент, то пересаженный орган был бы защищен от первичной воспалительной реакции. С этой целью были получены трансгенные свиньи, несущие различные человеческие гены ингибитора комплемента. Клетки одного из этих животных оказались совершенно нечувствительными к компонентам системы каскада комплемента. Предварительные эксперименты по пересадке органов трансгенных свиней приматам показали, что ткани пересаженного органа повреждаются слабее, а сам орган не отторгается немного дольше. Возможно, трансгенные свиньи, несущие человеческий ген ингибитора комплемента и лишенные основного поверхностного белка клеток свиней, который вызывает острейшее отторжение, будут служить источником органов для трансплантации человеку.

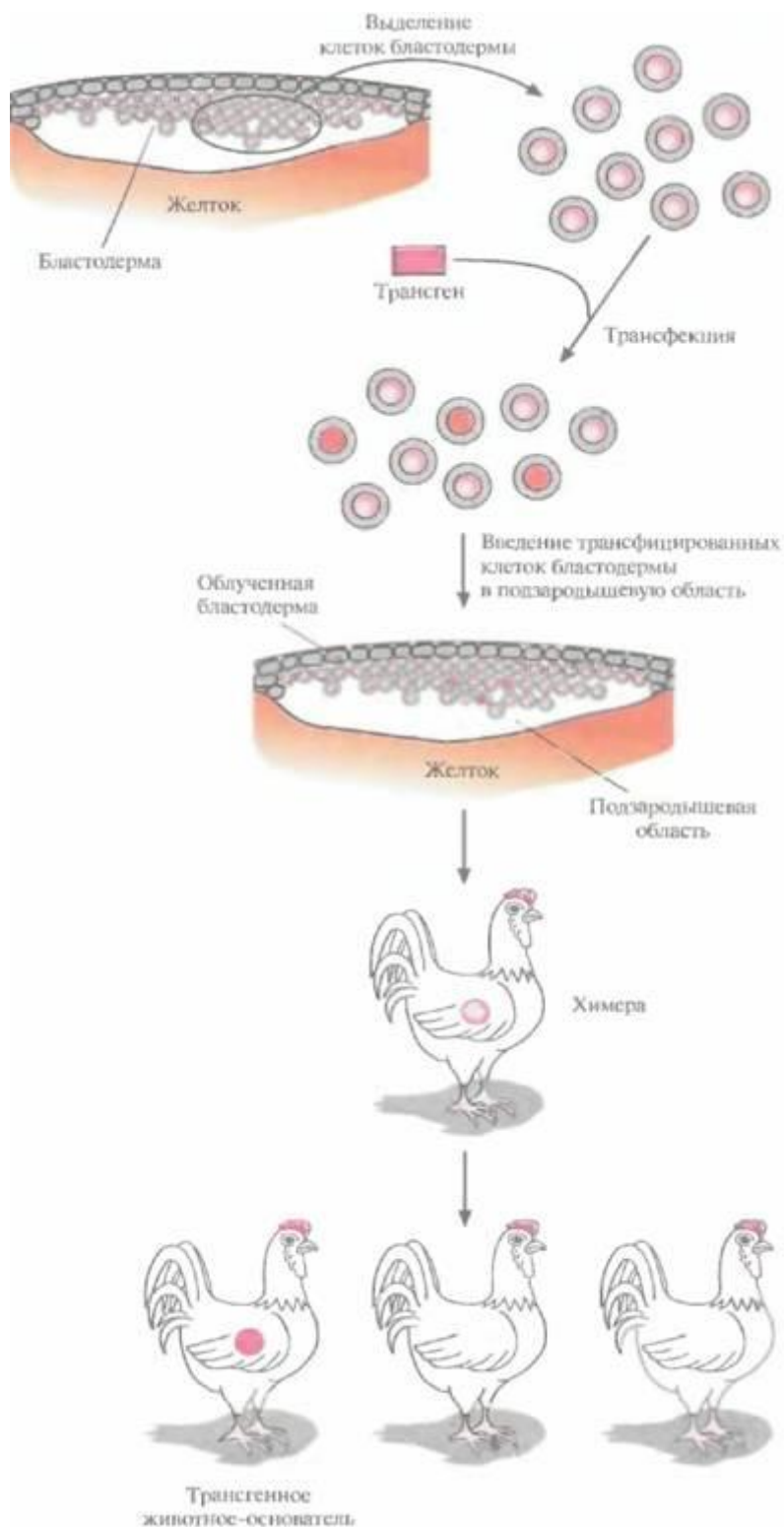
### Трансгенные птицы

Микроинъекция ДНК в оплодотворенные яйцеклетки птиц с целью получения трансгенных линий — непростая процедура. Это связано с некоторыми особенностями воспроизводства и развития птиц. Так, при оплодотворении у птиц в яйцеклетку могут проникнуть сразу несколько сперматозоидов, а не один, как это обычно бывает у млекопитающих, и идентифицировать тот мужской пронуклеус, который соединится с женским, становится невозможно. Метод микроинъекции ДНК в цитоплазму тоже не подходит, поскольку в этом случае ДНК не интегрируется в геном оплодотворенной яйцеклетки. Наконец, даже если удастся осуществить микроинъекцию ДНК в ядро, дальнейшие операции будет трудно осуществить, поскольку у птиц яйцеклетка после оплодотворения достаточно быстро обволакивается прочной мембраной, покрывается слоем альбумина и внутренней и наружной известковыми оболочками.

Однако трансген можно вводить в область желтка (зародышевый диск), который содержит и женский, и мужской пронуклеусы и образуется раньше, чем скорлупа. После введения ДНК каждую яйцеклетку культивируют *in vitro*, и когда образуется зародыш, его помещают в суррогатное яйцо, чтобы имитировать вылупление. При помощи такой стратегии была получена одна линия трансгенных цыплят. Однако в настоящее время этот метод неэффективен и технически трудновыполним в обычных условиях.

К тому времени, когда наружная известковая оболочка яйцеклетки птиц затвердевает, зародыш, находящийся на стадии бластодермы, состоит из двух слоев по 40 000 и 80 000 клеток. Проведены эксперименты по инокуляции тако-

Рис. 19.14. Получение трансгенных цыплят трансфекцией изолированных клеток бластодермы. Выделенные клетки трансфицируют трансгеном с помощью липосом и вводят в подзародышевую область облученной бластодермы реципиента. Часть полученных потомков являются химерами, а некоторые из них, несущие трансген в клетках зародышевой линии, при скрещивании могут дать начало трансгенным линиям.



го зародыша ретровирусными векторами с нарушенной репликацией, несущими бактериальные маркерные гены. В результате были получены трансгенные цыплята и обыкновенные перепела, несущие чужеродные гены в клетках зародышевой линии. Обычно такие птицы не продуцируют свободных вирусных частиц, и тем не менее применение ретровирусных векторов в качестве «поставщиков» чужеродных генов животным, которые затем могут использоваться в пищу, неизбежно вызывает вопросы относительно безопасности такого подхода. Кроме того, размер трансгена, который может быть введен в организм реципиента в составе ретровирусного вектора, не превышает ~8 т. п. н., а в некоторых случаях интеграция в исходный сайт нестабильна. Все это заставило исследователей искать альтернативные способы трансгеноза.

Никаких специфичных для птиц ES-клеток не обнаружено, поэтому подход, основанный на их использовании, для птиц неприменим. Более перспективным представляется метод с использованием рекомбинантных эмбриональных клеток. Он состоит в следующем. Выделяют клетки бластодермы из куриного эмбриона, трансфицируют их с помощью катионных липидов (липосом), связанных с трансгенной ДНК (липосомная трансфекция), и повторно вводят в подзародышевую область свежеснесенных яиц (рис. 19,14). Часть потомков будет нести в каком-то небольшом количестве клетки донора: таких животных называют химерами. У некоторых химер клетки, произошедшие от трансфицированных клеток, могут образовывать линии зародышевых клеток, и после нескольких раундов скрещиваний таких химер можно получить линии трансгенных животных. Чтобы увеличить вероятность создания химер, несущих чужеродные гены в клетках зародышевой линии, число донорских клеток в химерах можно увеличить облучением эмбрионов реципиента перед введением в них трансфицированных клеток (540—660 рад в течение 1 ч). Под действием облучения некоторые (но не все) клетки бластодермы погибнут, и соотношение между трансфицированными клетками и клетками реципиента увеличится в пользу первых. По-видимому, таким образом можно получать трансгенных цыплят, хотя и с малой эффективностью.

Трансгенных цыплят можно использовать для улучшения генотипа уже существующих пород — для придания им (*in vivo*) устойчивости к вирусным инфекциям и заболеваниям, вызываемым кокцидиями, повышения эффективности усвоения пищи, снижения уровня жира и холестерина в яйцах, повышения качества мяса. Было предложено также использовать яйцо с его высоким содержанием белка в качестве источника белковых продуктов, используемых в фармацевтической промышленности. Экспрессия трансгена в клетках репродуктивного пути курицы, где обычно секретируется большое количество овалбумина, может способствовать накоплению соответствующего белкового продукта в яйце, откуда его можно затем выделить.

## Трансгенные рыбы

По мере истощения природных рыбных запасов все большую роль будет приобретать разведение рыбы в искусственных условиях. Основная цель исследований в этой области — создание рекомбинантных рыб путем трансгеноза. До настоящего времени трансгены вводили микроинъекцией ДНК или электропорацией оплодотворенных яйцеклеток различных видов рыб — карпа, зубатки, форели, лосося и т. д. Поскольку у рыб пронуклеус в оплодотворенной яйцеклетке плохо различим в обычный микроскоп, линейаризованную трансгенную ДНК вводят в цитоплазму оплодотворенных яйцеклеток или клеток эмбрионов, достигших стадии четырех бластомеров. Эмбриогенез у рыб протекает в водной среде вне организма, поэтому в имплантации нет необходимости. Все дальнейшие процессы могут протекать в резервуарах с регулируемой температурой. Выживаемость эмбрионов рыб после микроинъекций довольно высока, от 35 до 80%, а доля трансгенных потомков колеблется от 10 до 70%. Трансген можно обнаружить с помощью ПЦР с использованием либо препаратов эритроцитов зародышей, либо суммарной ДНК. Скрещивая трансгенных рыб, можно вывести трансгенные линии.

Большинство первых исследований в этой области было направлено на исследование влияния трансгена гормона роста на скорость роста. В одном из экспериментов в яйцеклетки ат-



лантического лосося был введен трансген, состоящий из следующих элементов: промотора гена антифризного белка американской бельдюги, кДНК гормона роста лосося, сигналов терминации/полиаденилирования 3'-конца гена антифризного белка американской бельдюги. Как правило, трансгенные лососи были крупнее и быстрее прибавляли в весе, чем контрольные нетрансформированные особи. В этом случае была выбрана система экспрессии с ускоренной транскрипцией гена гормона роста в холодной воде и пригодная для «всех рыб», что позволяло избежать биологической несовместимости, которая могла бы возникнуть, если бы ген гормона роста происходил не из рыб. Годовалые трансгенные особи, полученные в результате введения в яйцеклетки нерки генетической конструкции гормона роста, подходящей для «всех лососей», весили примерно в 11 раз больше, чем нетрансгенные. Физиологическая активность линий таких трансгенных лососей в естественных условиях вызывает значительный интерес. Предполагается, что в будущем гены устойчивости к болезням и стрессовым воздействиям, а также гены, обуславливающие другие биологические особенности, будут введены как рыбам умеренных широт, так и тропическим рыбам.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Генетическая модификация животных при помощи технологии рекомбинантных ДНК (трансгеноза) основана на введении клонированного гена(ов) в геном клетки, которая могла бы дать начало клеткам зародышевой линии. Скрещивая трансгенных потомков, появившихся в результате такой операции, можно получить гомозиготные линии трансгенных животных. Большинство исследований в этой области проводилось на мышах. Обычно для этого вводили клонированный ген в оплодотворенную яйцеклетку мыши с помощью микроинъекции, имплантировали ее в реципиентную самку и проверяли потомство на наличие введенного гена. Чужеродный ген можно вводить в оплодотворенную яйцеклетку мыши и с помощью ретровирусного вектора. Альтернативный подход заключается в выделении мышинных эмбриональных

стволовых клеток и трансфекции их клонированным геном. При этом вводимая конструкция должна интегрироваться в геном стволовых клеток. Клетки, несущие ген-мишень в определенном хромосомном сайте, отбирают и культивируют, а затем вводят их в мышинные эмбрионы на ранних стадиях развития. Мышинные эмбриональные стволовые клетки плюрипотентны (тотипотентны), т. е. могут дать начало клеткам любого типа, в том числе и клеткам зародышевой линии. Для трансгеноза используют также искусственные дрожжевые хромосомы (YAC), несущие множество генов. Таким образом были получены мыши, синтезирующие только человеческие антитела. Их использовали в качестве модельных систем для изучения генетических болезней человека (например, болезни Альцгеймера).

С помощью аналогичных экспериментальных подходов были получены трансгенные коровы, овцы, свиньи, птицы и рыбы. Есть надежда, что трансгеноз позволит улучшать генотип существующих пород домашнего скота и выводить породы животных с новыми признаками. Кроме того, возможно, таких домашних животных, как коровы, овцы и козы, удастся использовать в качестве своеобразных «биологических фабрик» для получения продуктов клонированных генов, секретируемых в молоко.

## ЛИТЕРАТУРА

- Brinster R. L., K. M. Allen, R. R. Behringer, R. E. Gelinas, R. D. Palmiter.** 1988. Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 836-840.
- Citron M., D. Westaway, W. Xia, G. Carlson, T. Diehl, G. Levesque, K. Johnson-Wnod, M. Lee, P. Seubert, A. Davis, D. Kholodenko, R. Motter, R. Sherrington, B. Perry, H. Yao, R. Strome, L. Lieberburg, J. Rommens, S- Kim, D. Schenk, P. Fraser, P. St. George Hyslop, D. J. Selkoe.** 1997. Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid  $\beta$ -protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat. Med.* 3: 67—72.
- Clark A. J.** 1996. Genetic modification of milk proteins. *Am. J. Clin. Nutr.* 63: 633S-638S.



- Damak S., H. Su, N. P. Jay, D. W. Bullock.** 1996. Improved wool production in transgenic sheep expressing insulin-like growth factor 1. *Bio/Technology* 14: 185-188.
- Devlin R. H., T. V. Yesaki, C. A. Blagl, E. M. Donaldson, P. Swanson, W.-K. Chan.** 1994. Extraordinary salmon growth. *Nature* 371: 209-210.
- Diamond L. E., K. R. McCurry, M. J. Martin, S. B. McClellan, E. R. Oldham, J. L. Platt, J. S. Logan.** 1996. Characterization of transgenic pigs expressing functionally active human CD59 on cardiac endothelium. *Transplantation* 61: 1241-1249.
- DiTuffio P., S. H. Cheng, J. Marshall, R. J. Gregory, K. Ebert, H. M. Meade, A. E. Smith.** 1992. Production of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the milk of transgenic mice. *Bio/Technology* 10: 74-77.
- Fishwild D. M., S. L. O'Doimcll, T. Bengoechea, D. V. Hudson, F. Harding, S. L. Bernhard, D. Jones, R. M. Kay, K. M. Higgins, S. R. Schramm, N. Lunberg.** 1996. High-avidity human IgGK monoclonal antibodies from a novel strain of minilocus transgenic mice. *Nat. Biotechnol.* 14: 845—851.
- Fodor W. L., B. L. Williams, L. A. Malis, J. A. Madri, S. A. Rollins, J. W. Knight, W. Velander, S. P. Squinto.** 1994. Expression of a functional human complement inhibitor in a transgenic pig as a model for the prevention of xenogeneic hyper-acute organ rejection. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91:11153-11157.
- Games D., D. Adams, R. B. Alessandrini, R. Barbour, P. Berthelette, C. Blackwell, T. Carr, J. Clemens, T. Donaldson, F. Gillespie, T. Guido, S. HaKopian, K. Johnson-Wood, K. Khan, M. Lee, P. Liebowitz, I. Lieberburg, S. Little, E. Masliah, L. McConlogue, M. Montoya-Zavala, L. Mucke, L. Paganini, E. Pannini, M. Power, D. Schenk, P. Seubert, B. Snyder, E. Soriana, H. Tan, J. Vitale, S. Wadsworth, B. Wotarin, J. Zhao.** 1995. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F  $\beta$ -amyloid precursor protein. *Nature* 373: 523—527.
- Gong /., C. T.,... Hew.** 1995. Transgenic fish in aqua-culture and developmental biology. *Curr. Top. Dev. Biol.* 30: 177-214.
- Hsiao K., P. Chapman, S. Nilsen, C. Eckman, Y. Harigaya, S. Younkin, F. Yang, G. Cole.** 1996. Correlative memory deficits, A $\beta$  elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274: 99-102.
- Humphries M. M., D. Rancourt, G. J. Farrar, P. Kenna, M. Hazel, R. A. Bush, P. A. Sieving, D. M. Shells, N. McNally, P. Creighton, A. Erven, A. BOFOS, K. Gulya, M. R. Capocchi, P. Humphries.** 1997. Retinopathy induced in mice by targeted disruption of the rhodopsin gene. *Nat. Genet.* 15: 216-219.
- Janne J., J.-H. Hyttinen, T. Peura, M. Tolvanen, L. Alhonen, R. Sinervirta, M. Halmekyto.** 1994. Transgenic bioreactors. *Int. J. Biochem.* 26: 859-870.
- Johnson-Wood K., M. Lee, R. Motter, K. Hu, G. Gordon, R. Barbour, K. Khan, M. Gordon, H. Tan, D. Games, I. Lieberburg, D. Schenk, P. Seubert, L. McConlogue.** 1997. Amyloid precursor protein processing and A $\beta$ 42 deposition in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1550-1555.
- Krimpenfort P., A. Rademakers, W. Eyestone, A. van der Schans, S. van den Brock, P. Kooiman, E. Kootwijk, G. Platenburg, F. Pieper, R. Stryker, H. de Boer.** 1991. Generation of transgenic dairy cattle using "in vitro" embryo production. *Bio/Technology* 9: 844—847.
- Masliah E., A. Sisk, M. Mallory, L. Mucke, D. Schenk, D. Games.** 1996. Comparison of neurodegenerative pathology in transgenic mice overexpressing V717F  $\beta$ -amyloid precursor protein and Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 16: 5795-5811.
- McCurry K. R., D. L. Kooyman, C. G. Atvarado, A. H. Cotterell, M. J. Martin, J. S. Logan, J. L. Platt.** 1995. Human complement regulatory proteins protect swine-to-primate cardiac xenografts from humoral injury. *Nat. Med.* 1:423-427.
- Mendez M. J., L. L. Green, J. R. F. Corvalan, X.-C. Jia, C. E. Maynard-Currie, X. Yang, M. L. GaUo, D. M. Louie, D. V. Lee, K. L. Erickson, J. Luna, C. M.-N. Roy, H. Abderrabim, F. Kirschenbaum, M. Noguchi, D. M. Smith, A. Fukushima, J. F. Hales, M. H. Finer, C. G. Davis, K. M. Zsebo, A. Jakobovits.** 1997. Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice. *Natl. Genet.* 15: 146-156.

**Oster-Granite M. L., D. L. McPhie, J. Greenan, R. L. Neve.** 1996. Age-dependent neuronal and synaptic degeneration of mice transgenic for the C terminus of the amyloid precursor protein. *J. Neurosci.* **16**: 6732-6741.

**Petite J. N., M. E. Clark, G. Liu, A. M. Verrinder Gibbins, R. J. Etches.** 1990. Production of somatic and germline chimeras in the chicken by transfer of early blastodermal cells. *Development* **108**: 185-189.

**Pursel V. G., C. A. Pinkert, K. F. Milter, D. J. Bolt, R. G. Campbell, R. D. Palmiter, R. L. Brinster, R. E. Hammer.** 1989. Genetic engineering of livestock. *Science* **244**: 1281-1288.

**Sang H.** 1994. Transgenic chickens—methods and potential applications. *Trends Biotechnol.* **12**: 415-420.

**Sharma A., M. J. Martin, J. F. Okabe, R. A. Truglio, N. K. Dhanjal, J. S. Logan, R. Kumar.** 1994. An isologous porcine promoter permits high level expression of human hemoglobin in transgenic swine. *Bio/Technology* **12**: 55—59.

**Sims M., N. L. First.** 1993. Production of calves by transfer of nuclei from cultured inner cell mass cells. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **90**: 6143-6147.

**Swanson M. E., M. J. Martin, K. O'Donn, K. Hoover, W. Lago, V. Huntress, C. T. Parsons, C. A. Pinkert, S. Pilder, J. S. Logan.** 1992. Production of functional human hemoglobin in transgenic swine. *Bio/Technology* **10**: 557—559.

**Wcidle U. H., H. Lenz, G. Brcнк** 1991. Genes encoding a mouse monoclonal antibody are expressed in transgenic mice, rabbits, and pigs. *GeneW*: 185-191.

**Wilmut L, A. E. Schnieke, J. McWhir, A. J. Kind, K. H. S. Campbell.** 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* **385**:810-813.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Как получают трансгенных мышей?
2. В чем состоит принцип позитивно-негативной селекции?
3. Что из себя представляют мыши с «нокаутированным» геном? Как и для чего получают таких мышей?
4. Каковы преимущества и недостатки трансгенных мышей как модельных систем для исследования болезней человека?
5. Что такое клонирование?
6. Расскажите, как с помощью трансгеноза можно получать моноклональные антитела человека,
7. Как молочная железа может быть использована в качестве «биореактора» для синтеза коммерческих продуктов.
8. Каким образом трансгеноз может облегчить трансплантацию органов?
9. Какие подходы используются для выведения транс генных цыплят?
10. Опишите способы улучшения пород рыб с помощью трансгеноза.

# ГЛАВА 20.

## Молекулярная генетика человека

Состояние здоровья человека зависит от многих факторов: его образа жизни, биологии, условий окружающей среды, качества системы здравоохранения и т. д. За последние десятилетия достигнуты значительные успехи в диагностике, лечении и профилактике инфекционных болезней, поэтому более очевидным стало влияние генетических факторов, особенно в развитых странах. Например, в Канаде, согласно статистическим данным, у 5% населения в возрасте до 25 лет обнаруживаются наследственные дефекты, приводящие к инвалидности, а у более чем 50% в течение жизни развивается заболевание, имеющее в той или иной степени наследственную природу. В настоящее время более половины случаев обращения в детские лечебные учреждения связаны с генетическими заболеваниями.

Наследственными являются свыше 1000 болезней человека. Большинство из них очень редки ( $\sim 10^{-5}$ ), но некоторые встречаются относительно часто ( $\sim 10^{-4}$ ). Многие наследственные заболевания человека обуславливаются мутациями в единственном гене, однако ряд сложных патологий, например рак, определяется мутациями в нескольких генах. В том случае, когда имеется полное, точное и последовательное описание симптомов заболевания (фенотипа), определяемого единственным геном, генетическую природу заболевания можно установить исходя из типа его наследования в семьях, представленных несколькими поколениями. Существуют четыре основных типа наследования: аутосомно-доминантный (рис. 20.1), аутосомно-рецессивный (рис. 20.2), X-сцепленный доминантный (рис. 20.3) и X-сцепленный рецессивный (рис. 20.4). Термин «аутосомный» относится к 22 парам неполовых хромосом (аутосом) человека, а термин «X-сцепленный» указывает на локализацию гена на X-хромосоме. Доминантным называют такое состояние, когда для проявления заболевания достаточно присутствия одного мутантного аллеля данного гена, а в случае рецессивного заболевания дефектными должны быть оба аллеля. У мужчин в ядре присутствует одна X-хромосома, поэтому большинство X-сцепленных генов независимо от того, являются они доминантными или рецессивными, приводят к проявлению заболевания.

Анализ родословных чрезвычайно полезен для установления типа наследования специфического состояния, однако не дает никакой информации об ассоциированном с данным заболеванием гене, о биологической основе нарушения или — в случае аутосомного заболевания — о хромосомной локализации гена. Более того, не всегда можно определить, является ли заболевание наследственным. Во-первых, не у всех лиц, несущих дефектный ген, проявляются симптомы заболевания (неполная пенетрантность). Во-вторых, симптомы (фенотип) могут варьировать от слабых до ярко выраженных (варьирующая экспрессивность). В-третьих, один и тот же фенотип может обуславливаться дефектами в совершенно разных генах (генетическая гетерогенность). В-четвертых, в некоторых случаях альтернативные формы (аллели) одного гена могут приводить к разным фенотипам. В-пятых, из-за небольшого размера семей со случаями исследуемого заболевания приходится собирать данные о большом числе родословных, чтобы сделать вывод о природе этого заболевания.

Успех в установлении корреляции между нормальным или патологическим фенотипом, с одной стороны, и соответствующим ему генотипом, с другой, в значительной степени зависит

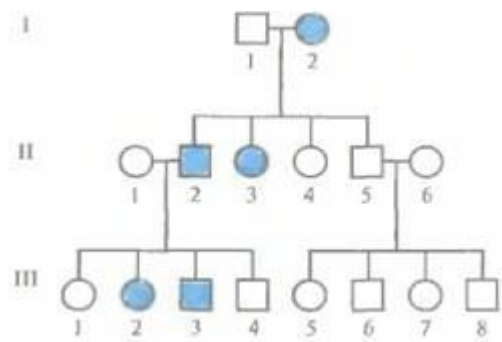


Рис. 20.1. Аутосомно-доминантный тип наследования. Квадратиками изображены мужчины, кружками — женщины; закрашенные символы — больные члены семьи, незакрашенные — здоровые. Горизонтальная линия, соединяющая квадратик и кружок, означает, что данные мужчина и женщина являются супругами. Вертикальные линии ведут к их потомкам, родившимся в том порядке, как они расположены на рисунке, слева направо. Римскими цифрами (I, II и III) обозначены поколения, арабскими (1, 2 и 3) — члены семьи в каждом поколении. Для точного обозначения конкретного члена семьи используется двузначный код (например, II-3). Характерными признаками аутосомно-доминантного типа наследования являются: 1) симптомы заболевания проявляются в последующих поколениях в случае полной пенетрантности (т. е. если каждый генотип проявляется фенотипически); 2) лица мужского и женского пола поражаются с одинаковой частотой.

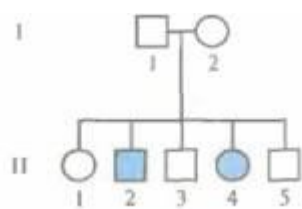


Рис. 20.2. Аутосомно-рецессивный тип наследования. Характерные признаки: 1) у здоровых родителей могут появляться больные дети; 2) лица мужского и женского пола поражаются с одинаковой частотой; 3) если больны оба родителя, то больны и все их дети (эта ситуация на рисунке не отражена).

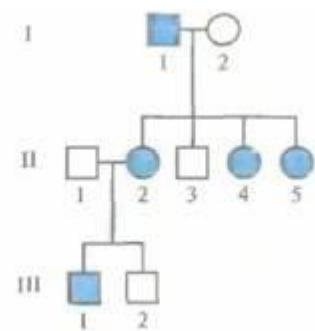


Рис. 20.3. X-сцепленный доминантный тип наследования. Характерные признаки: 1) в случае полной пенетрантности больные присутствуют в каждом поколении; 2) больны все дочери пораженного мужчины, а все его сыновья здоровы; 3) в последующих поколениях часто проявляется тип наследования «от отца — к дочери - к ее сыну»; 4) число больных женского пола может быть больше, чем мужского.

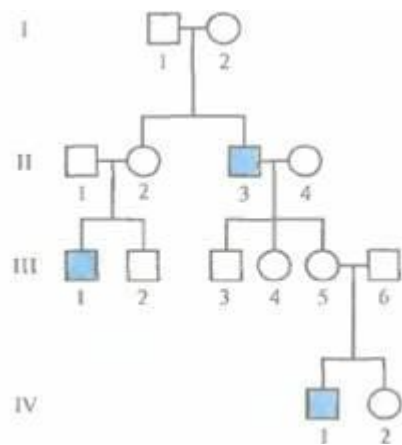


Рис. 20.4. X-сцепленный рецессивный тип наследования. Характерные признаки: 1) у здоровых родителей могут рождаться больные дети; 2) нет прямой передачи заболевания от отца к сыну; 3) больных мужского пола больше, чем женского.

от того, удастся ли идентифицировать и изолировать (клонировать) конкретный ген. Зная нуклеотидную последовательность гена, можно определить, какую функцию выполняет его продукт в норме, как нарушается эта функция в результате мутации, в какой степени различные мутации в разных экзонах ответственны за проявление заболевания. Если ген клонирован, можно поставить такие эксперименты, которые позволяли бы установить функции генного продукта, его взаимодействия с другими веществами и характер нарушения нормальных процессов, вызываемого продуктом мутантного гена. Кроме того, основываясь на различиях в нуклеотидных последовательностях нормального и мутантного генов, можно разработать диагностические тесты для выявления специфических мутаций. Чем полнее

будут наши знания о функциях гена, ответственного за то или иное заболевание, тем более эффективную схему лечения мы сможем предложить.

Клонирование генов человека не всегда состоит из строго определенных последовательных процедур. Скорее существует набор различных инструментов и способов, используемых в зависимости от конкретных условий. Например, начальный этап поиска гена, ответственного за данное заболевание, определяется наличием информации о его продукте. Как правило, при идентификации генов, ассоциированных с различными заболеваниями, нельзя обойтись без генетических и физических карт, а построение таких карт в конечном счете поможет определить нуклеотидную последовательность всего генома человека. Генетическая карта (карта сцепления) показывает расположение определенных сайтов (локусов) вдоль хромосомы. Для построения полных карт сцепления необходимо, чтобы локусы каждой хромосомы были представлены часто встречающимися аллелями и чтобы можно было легко идентифицировать каждый из них. Физическая карта — это набор упорядоченных клонов ДНК, охватывающих всю хромосому или какую-то ее область. На практике эти клоны перекрываются, образуя последовательность фрагментов, называемую контигом. Длина участка, охватываемого контигом, выражается в парах нуклеотидов. Физическая карта, состоящая из контигов, служит основой при построении окончательной физической карты, которая представляет собой полную нуклеотидную последовательность хромосомы.<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Полная нуклеотидная последовательность каждой из хромосом человека уже определена. Более того, идентифицирована значительная часть генов, определена их структура. (T.C. Venter et al., „Science”, 16 Feb. 2001. v. 291, N 5507, p. 1303; E. Lander. Nature, 2001, v. 409, No 6822, p. 860). - Прим. ред.

Генетическое сцепление и картирование генов

В 1865 г. Грегор Мендель, основываясь на результатах своих опытов с садовым горохом, сформулировал основные принципы наследования признаков. Во-первых, он пришел к выводу, что единицы наследственности дискретны, встречаются парами и могут существовать в альтернативных формах. Позже (1905 г.) эти единицы назвали генами, а варианты одного гена -аллелями.

Во-вторых, Мендель обнаружил, что в половую клетку (гамету) попадает только один ген из каждой пары. В-третьих, он заключил, что пары генов образуются независимо друг от друга, поэтому результатом единственного генетически значимого скрещивания будут все возможные генетические комбинации — в том случае, если число потомков достаточно велико (рис. 20.5). Последнее заключение, хотя Мендель и не знал этого, справедливо только для пар генов, находящихся на разных хромосомах или по крайней мере на разных концах одной хромосомы. В экспериментах Менделя ни при одном

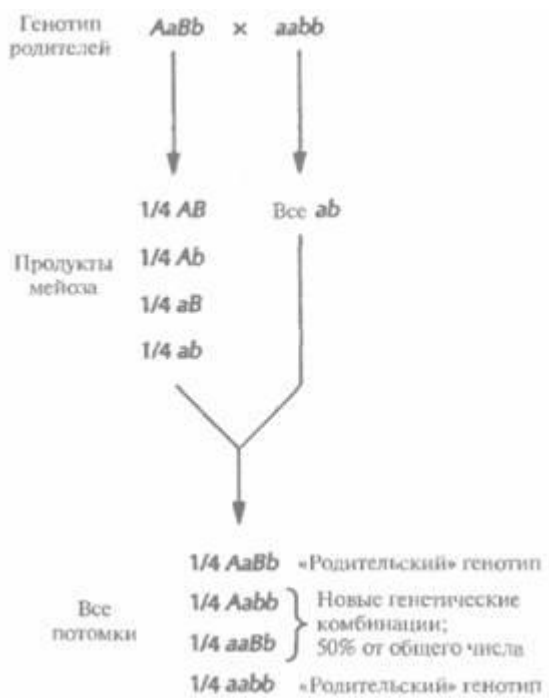


Рис. 20.5. Независимое распределение генов. При скрещивании дигетерозиготного индивида (AaBb) с индивидом, гомозиготным по двум рецессивным признакам (aabb), 50% потомков будут иметь родительские генотипы (AaBb, aabb), а 50% — новые комбинации генотипов (Aabb, aaBb) — в том случае, если число потомков достаточно велико для получения репрезентативной выборки. Этот результат означает, что гены A и B распределяются независимо, у потомков встречаются все возможные комбинации гамет каждого из родителей. Необходимо заметить, что процентное соотношение «родительских» и комбинированных типов зависит от генотипов родителей; например, в результате скрещивания особей с генотипами AABB и aabb потомки в 100% случаев будут иметь генотип, отличный от родительских (AaBb).

из скрещиваний не затрагивались такие пары генов, которые находились на одной хромосоме близко друг от друга. В противном случае он заметил бы, что эти гены наследуются не независимо, как сейчас говорят, они сцеплены.

В принципе при полном генетическом сцеплении все гены любой хромосомы должны передаваться в половые клетки в виде неразделимых блоков, не образуя в процессе мейоза новых генетических комбинаций на хромосомах (рис. 20.6). Однако в большинстве случаев сцепление является неполным. При мейозе происходит обмен (рекомбинация, кроссовер) между генными сайтами (локусами), и создаются новые комбинации генов (рис. 20.7). Поскольку обычно рекомбинация происходит тем чаще, чем больше расстояние между двумя специфическими генными локусами, частоту рекомбинаций можно использовать как меру расстояния (генетического расстояния) между двумя генами. Таким образом, анализируя частоты рекомбинаций у потомков родителей, гетерозиготных по ряду сцепленных генов, можно построить генетическую карту, на которой гены будут расположены в линейном порядке. Расстояние между локусами отражает лишь частоту рекомбинаций и не эквивалентно точному физическому расстоянию. Однако, сравнивая физические и генетические карты хромосом, удалось установить соответствие между частотой рекомбинаций и

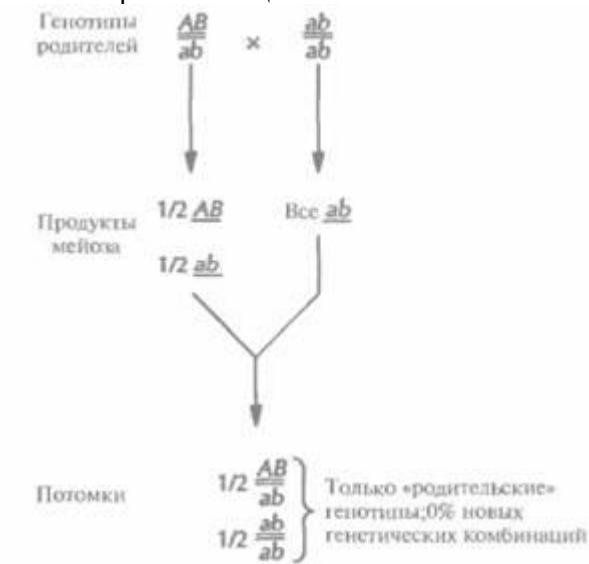


Рис. 20.6. Полное сцепление. Рассматриваемые аллели  $d$  и гетерозиготного родителя,  $AB/ab$ , находятся в фазе сцепления (*цис*), второй родитель гомозиготен по двум рецессивным признакам, его генотип  $ab/ab$ . В отсутствие рекомбинации между локусами  $A$  и  $B$  все потомки будут иметь родительские генотипы, половина — генотип  $AB/ab$  и половина —  $ab/ab$ . Полное сцепление не всегда означает отсутствие новых генетических комбинаций: например, все потомки от скрещивания  $Ab/aB \times AB/ab$  будут иметь новые генетические комбинации, а именно:  $Ab/AB$ ,  $Ab/ab$ ,  $aB/AB$  и  $aB/ab$ . Однако в отсутствие рекомбинации гены одной и той же хромосомы будут всегда сцеплены вместе. Для удобства генетическая номенклатура использует одну горизонтальную или косую черту вместо двух для обозначения сцепления локусов пары одинаковых (гомологичных) хромосом.

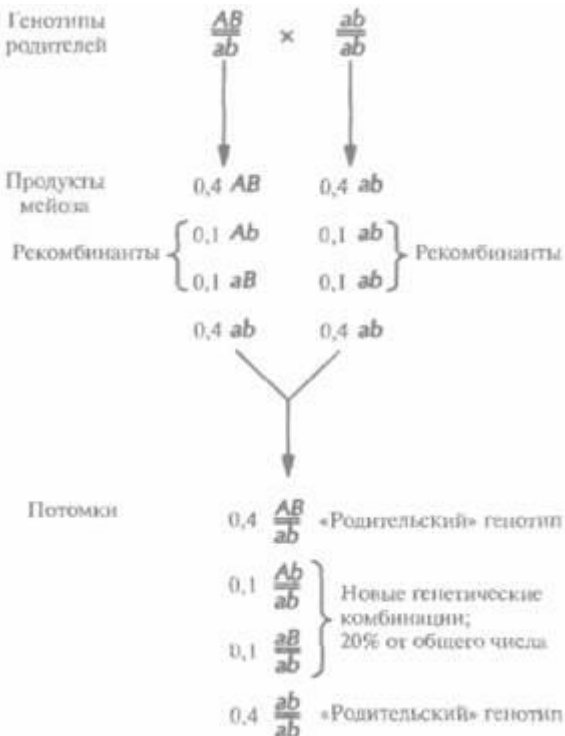


Рис. 20.7. Неполное сцепление. В данном примере 20% (т. е.  $0,1 + 0,1 = 0,2$ ) потомков имеют генотипы, сформировавшиеся в результате рекомбинации(й) между локусами  $A$  и  $B$  в процессе мейоза. Частота рекомбинаций не зависит от генотипов родителей. Родитель, гомозиготный по двум рецессивным признакам, производит только один тип гамет даже в случае рекомбинации. В анализирующем скрещивании ре-комбинантные продукты мейоза проявляются у потомков фенотипически.



числом нуклеотидных пар ДНК. В качестве единицы при картировании используется 1 сантиморганида (сМ), величина, равная частоте рекомбинаций 1%, что для человека соответствует примерно  $10^6$  пар нуклеотидов (п. н.).

Отметим несколько важных моментов, касающихся генетического сцепления и картирования генов. Во-первых, чтобы можно было оценить частоту новых генетических комбинаций (рекомбинантов), один из родителей должен быть гетерозиготен как минимум по двум локусам ( $AB/ab$  или  $Ab/aB$ ). Во-вторых, дигетерозиготные генотипы должны существовать в двух конфигурациях (фазах). Если два сцепленных гена на каждой из хромосом представлены одним типом аллелей (т. е. оба доминантные,  $AB$ , или оба рецессивные,  $ab$ ), то такую конфигурацию называют фазой сцепления (*цис*-фазой). Если же два сцепленных гена на каждой хромосоме представлены разными типами аллелей (т. е. один доминантный, а другой рецессивный,  $aB$  или  $Ab$ ), то конфигурацию называют фазой отталкивания (*транс*-фазой). В-третьих, рекомбинация между двумя генами происходит независимо от их фазы. С точки зрения генетики рекомбинация между генами, находящимися в дигомозиготном состоянии (т. е.  $Ab/Ab$  или  $AB/AB$ ), не приводит к появлению новой генетической комбинации, и поэтому, даже если подобная рекомбинация происходит, ее невозможно обнаружить. В-четвертых, частота рекомбинации 0% означает полное сцепление, а 50% — что гены расположены либо на разных хромосомах, либо на одной хромосоме, но удалены друг от друга слишком далеко для выявления сцепления. Для решения проблемы картирования двух сильно удаленных генов, расположенных на одной хромосоме, необходимо картировать гены, лежащие между ними, что позволит определить, образуют ли все они одну группу сцепления.

Для построения подробных генетических карт некоторых эукариотических организмов, таких как мышь, кукуруза, плодовая мушка, нематоды и дрожжи, необходимо идентифицировать целый ряд генов, каждый из которых представлен по крайней мере двумя аллелями. Затем нужно провести скрещивания и подсчитать частоту рекомбинаций у большого числа потомков. Результаты отражают степень сцепления между генами. В конце концов, используя мультифакторные (более двух пар сцепленных генов) скрещивания, можно получить детальные генетические карты.

## Обнаружение и оценка генетического сцепления у человека

До появления в начале 1980-х гг. технологии рекомбинантных ДНК обнаружение и оценка генетического сцепления у человека представляли собой сложную и очень трудоемкую процедуру, которая к тому же обычно оказывалась безуспешной. При этом исследователи сталкивались с целым рядом проблем. Во-первых, генетический статус родителей обычно бывает неизвестен, что затрудняет разграничение рекомбинантных и нерекомбинантных потомков. Во-вторых, немногочисленность большинства семей снижает статистическую достоверность полученных результатов.

Наличие у мужчин одной X-хромосомы значительно облегчает оценку генетических расстояний между генными локусами. В данном случае все аллели генов, расположенных на X-хромосоме, проявляются фенотипически. Сыновья женщин, дигетерозиготных по X-сцепленным локусам, получают рекомбинантную или нерекомбинантную X-хромосому. Если фаза, в которой аллели двух генных локусов находятся у матерей, известна, то среди сыновей легко установить рекомбинантные и нерекомбинантные типы. Генотипы отцов в данном случае не имеют значения, поскольку сыновья наследуют только материнскую X-хромосому. Иногда фазу аллелей у дигетерозиготной матери можно установить исходя из фенотипа ее отца. Например, если у отца матери (деда) два X-сцепленных признака рецессивны, а у нее самой — доминантны, то мать дигетерозиготна, а рассматриваемые аллели находятся в *цис*-фазе, т. е.  $AB/ab$  (рис. 20.8). Этот метод обнаружения сцепления основан на подсчете двухлокусных фенотипов у сыновей большого числа дигетерозиготных женщин с известной фазой аллелей. В этом случае доля хромосом, рекомбинантных по двум специфическим генным локусам (рекомбинационный индекс), будет равна сумме рекомбинантных хромосом ( $A$ ), деленной на общее чис-

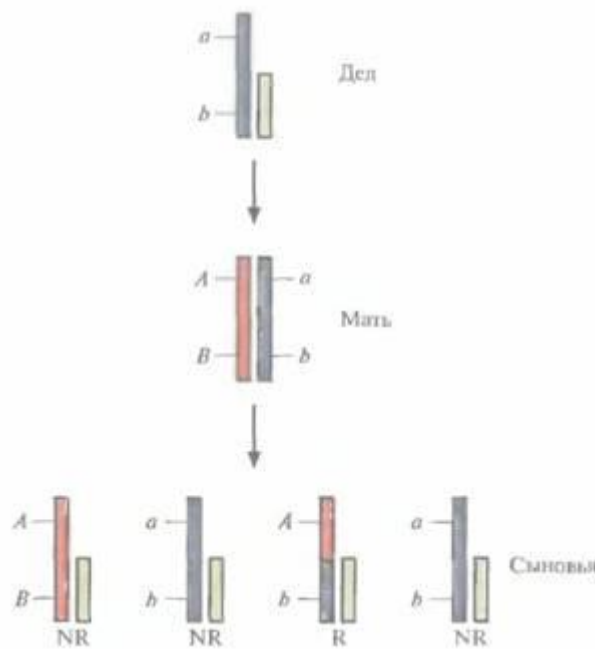


Рис. 20.8. Картирование X-хромосомы. В этом случае генетическая фаза двух или большего числа X-сцепленных локусов у дочери (Мать) устанавливается на основании данных о X-сцепленных аллелях ее отца (Дед). Эту информацию в свою очередь используют для определения, какие из ее сыновей (Сыновья) получили рекомбинантную (R) и нерекомбинантную (NR) хромосому. В данном примере дед несет два рецессивных гена в локусах *A* и *B* X-хромосомы, его дочь дигетерозиготна, а рассматриваемые аллели находятся у нее в *цис*-фазе. На X-хромосоме показаны аллели локусов *A* и *B*, Y-хромосома изображена в виде более короткой полоски.

ло хромосом — рекомбинантных и нерекомбинантных (NR):

$$\Sigma(R)/[\Sigma(R) + \Sigma(NR)].$$

Однако данный подход имеет ряд недостатков. Во-первых, не всегда можно определить генотип деда, а следовательно, фаза, в которой находятся аллели у предположительно дигетерозиготной матери, остается неизвестной. Во-вторых, не все матери в большой выборке семей будут гетерозиготны по одним и тем же двум локусам. Несмотря на все усилия, до 1980-х гг. не удавалось построить достаточно протяженную однозначную карту сцепления X-хромосомы человека, основанную на подсчете рекомбинантных и нерекомбинантных хромосом. В то время было известно всего несколько локусов и слишком мало аллелей было идентифицировано.

### **Анализ сцепления методом максимального правдоподобия: логарифм соотношения шансов (лод-балл)**

Кроме метода, в котором определяется частота рекомбинаций между двумя локусами на основании прямого подсчета рекомбинантных и нерекомбинантных хромосом, необходимо было разработать более общий, непрямой метод, который: 1) мог бы строго различать независимое распределение и сцепление; 2) не обязательно опирался бы на данные о фазе аллелей дигетерозиготных родителей; 3) мог суммировать информацию, полученную от большого количества различных семей; 4) позволял оценить рекомбинационный индекс в том случае, когда сцепление обнаружено. Такой метод, широко использующийся в настоящее время, был создан в 1955 г. Мортоном.

При изучении сцепления рекомбинационный индекс обозначается греческой буквой  $\theta$ . В методе Мортонна сравнивается вероятность  $L(\theta)$  того, что у братьев и сестер (сисбсов) два локуса сцеплены (т. е. локализованы на одной хромосоме и находятся близко друг от друга), с вероятностью  $L(0.50)$  того, что два локуса не сцеплены (т. е. находятся на разных хромосомах или далеко друг от друга в пределах одной хромосомы), для любого рекомбинационного индекса  $\theta$ . В случае сцепления, поскольку рекомбинационный индекс неизвестен, он может принимать любое значение в интервале от 0 до 0,5 ( $0 < \theta < 0,50$ ). Если же два локуса распределяются независимо, то  $\theta = 0,50$  по определению. Другими словами, в том случае, когда половина гамет, полученных от дигетерозиготного родителя, содержит новые генетические комбинации, два локуса находятся либо на негомологичных хромосомах, либо настолько далеко друг от друга на одной хромосоме, что это выглядит так, будто они расположены на разных хромосомах. Следовательно, если  $L(\theta) = L(0,50)$ , то два локуса не сцеплены. Десятичный логарифм отношения этих двух вероятностей, т.е.  $\log[L(\theta)/L(0,50)]$ , представляет собой логарифм соотношения шансов (log-of-odds ratio), называемый лод-баллом (LOD). Лодд-балл обозначают буквой  $Z$ ;  $Z(\theta)$  — это лод-балл для данного значения  $\theta$ , где  $0 < \theta < 0,50$ .

$L(\theta)$  можно определить, если известна вероятность получения конкретного сочетания рекомбинантных и нерекомбинантных хромосом для sibсов каждой изучаемой семьи. Вероятность того, что потомки получают от дигетерозиготного родителя нерекомбинантную хромосому, равна  $\frac{1}{2}(1-\theta) + \frac{1}{2}(1-\theta)$ , или  $1-\theta$ , а вероятность того, что они получают рекомбинантную хромосому,  $\frac{1}{2}\theta + \frac{1}{2}\theta$ , или  $\theta$ . Например, в семье с пятью детьми вероятность для каждого из них получить нерекомбинантную хромосому от дигетерозиготного родителя составляет  $K(1-\theta)^5$ , где  $(1-\theta)$  -вероятность получения нерекомбинантной хромосомы, показатель степени 5 — число sibсов с нерекомбинантной хромосомой, точнее, число нерекомбинантных хромосом у sibсов,  $K$  — коэффициент. Если все хромосомы одинаковы, т. е. все нерекомбинантные или все рекомбинантные, то  $K = 1$  (т. е.  $5!/5!0!$ , или  $n!/n!0!$ , где  $n$  — число sibсов в данной семье). В семье с четырьмя детьми вероятность того, что все они получают рекомбинантную хромосому от дигетерозиготного родителя, составляет  $\theta^4$ . Далее, вероятность того, что в семье с девятью детьми пять получают нерекомбинантные хромосомы и четыре — рекомбинантные, равна  $K(1-\theta)^5(\theta)^4$ , где  $K = 126$ , т. е.  $9!/5!4!$ . Лод-балл выражается как отношение величин, имеющих одинаковые коэффициенты. Эти коэффициенты, стоящие в числителе и знаменателе, сокращаются, а потому при анализе сцепления не учитываются.

Проиллюстрируем подсчет лод-балла на примере sibсов одной семьи (рис. 20.9). Обозначения  $B$  и  $O$  на рис. 20,9 соответствуют аллелям  $ABO^*B$  и  $ABO^*O$  групп крови системы ABO. Закрашенными символами обозначено аутосомно-доминантное заболевание с полной пенетрантностью -- наследственный онихоартроз (NFS. nail-patella syndrom). Основные признаки NFS — нарушение роста ногтей на пальцах рук и ног и редукция или отсутствие надколенника. Ген NPS обозначается  $NPSI$ , а его рецессивный («нормальный») и доминантный («патологический») аллели —  $NPSI^*N$  и  $NPSI^*D$  соответственно. NPS представляет собой подходящий для изучения сцепления признак, так как он рано диагностируется, не влияет на жизнеспособность и репродуктивную функцию и присутствует при рождении.

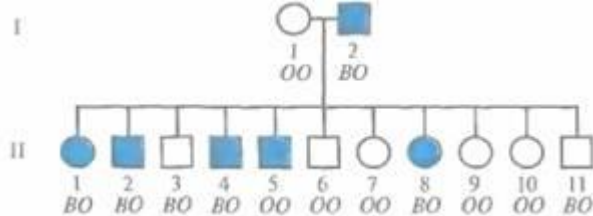


Рис. 20.9. Наследование генов онихоартроза и генов групп крови системы ABO. Закрашенными символами обозначены лица с наследственным онихоартрозом, незакрашенными — лица, у которых признаки данного заболевания отсутствуют. Буквы под каждым символом обозначают аллели группы крови системы ABO (использованы сокращенные обозначения:  $O$  соответствует  $ABO^*O$ ,  $B$  -  $ABO^*B$ ).

Отец 1-2 (рис. 20,9) гетерозиготен по локусу NPS, поскольку среди его детей есть как больные, так и здоровые. Он гетерозиготен и по локусу ABO ( $ABO^*B/ABO^*O$ ), так как у его детей встречаются фенотипы  $O$  и  $B$ , а генотип его супруги (1-1) --  $ABO^*O/ABO^*O$ . Следовательно, отец дигетерозиготен по этим двум аутосомным локусам ( $NPSI^*N/NPSI^*D; ABO^*B/ABO^*O$ ). Если локусы ABO и NPSI сцеплены, то фаза, в которой находятся их аллели у отца, неизвестна (состояние с неизвестной фазой). Она может быть как  $ABO^*B NPSI^*D/ABO^*O NPSI^*N$  (фаза 1), так и  $ABO^*B NPSI^*N/ABO^*O NPSI^*D$  (фаза 2). Или, в сокращенном виде,  $B D/O N$  (фаза 1) или  $BN/OD$  (фаза2).

Если предположить, что локусы ABO и NPS сцеплены и их аллели у отца находятся в фазе 1 ( $ABO^*B NPSI^*D/ABO^*O NPSI^*N$ ), то дети II-1, II-2, II-4, II-5, II-6, II-7, II-8, II-9 и II-10 получили от него нерекомбинантную хромосому  $ABO^*B NPSI^*D$  или  $ABO^*O NPSI^*N$  (рис. 20.10). Все дети получили от матери (I-1) хромосому  $ABO^*O NPSI^*N$ , поскольку она гомозиготна по двум локусам ( $ABO^*O NPSI^*N/ABO^*O NPSI^*N$ ). В данном случае генетический вклад матери известен и не влияет на анализ сцепления. Исходя из того, что рассматриваемые аллели у отца находятся в фазе 1, каждый из его детей II-3, II-5 и II-11 получил рекомбинантную хромосому. Следовательно, вероятность такого сочетания нерекомбинантных и рекомбинантных хромосом для данной семьи равна

$$(1-\theta)^8(\theta)^3.$$

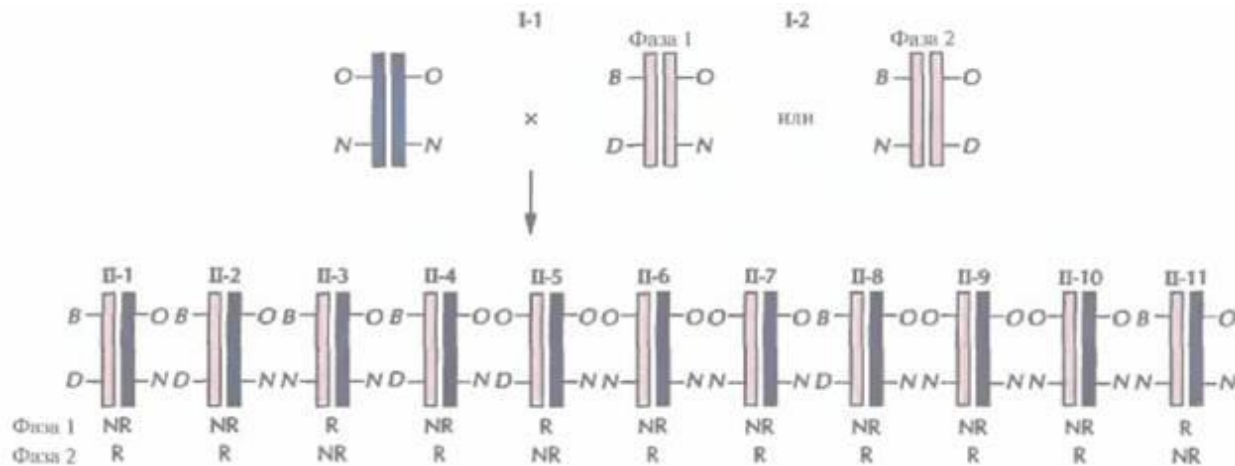


Рис. 20.10. Генетическая организация аллелей генов онихоартроза и групп крови *ABO* у членов родословной, приведенной на рис. 20.9, при условии сцепления этих двух локусов. Используются сокращенные обозначения аллелей групп крови системы *ABO*: *O* соответствует *ABO\*O*, а *B* — *ABO\*B*. Рecessивный («нормальный») и доминантный («патологический») аллели локуса наследственного онихоартроза обозначены *N* и *D* соответственно. Генотип отца (1-2) может находиться в любой из двух фаз (фаза 1, фаза 2). Хромосомы отца и хромосомы, унаследованные от него детьми, выделены синим цветом, хромосомы матери (1-1) и хромосомы, унаследованные от нее, — светло-коричневым. Отмечено, какие из хромосом, полученных от отца, являются нерекомбинантными (NR) или рекомбинантными (R) для фазы 1 и фазы 2.

Рассматриваемые аллели у отца с такой же вероятностью могут находиться в фазе 2, т. е. *ABO\*B NPSI\*N/ABO\*O NPSI\*D*. Тогда дети II-3, II-5 и II-11 получили от него нерекомбинантные хромосомы, а каждый из оставшихся детей унаследовал рекомбинантную хромосому (рис. 20.10). Вероятность такой комбинации для данной семьи равна  $(1-\theta)^3(\theta)^8$ .

Поскольку для генотипа отца обе фазы равновероятны, общая вероятность  $L(\theta)$  наблюдаемой в родословной комбинации хромосом у его детей равна  $\frac{1}{2}(1-\theta)^8(\theta)^3 + \frac{1}{2}(1-\theta)^3(\theta)^8$ . Далее находят значение данного выражения для разных  $\theta$ . Обычно используют следующий набор значений  $\theta$ : 0; 0,001; 0,05; 0,10; 0,2; 0,3; 0,4 и 0,50, а если нет ограничений во времени, можно взять весь спектр значений  $\theta$  от 0 до 0,50. Затем вычисляют логарифм отношения вероятности для каждого  $\theta$ , кроме 0,50, к вероятности для  $\theta = 0,50$ . Например, для  $\theta = 0,10$  отношение  $L(0,10)/L(0,50)$  равно

$$\frac{\frac{1}{2}(1-0,10)^8(0,10)^3 + \frac{1}{2}(1-0,10)^3(0,10)^8}{\frac{1}{2}(1-0,50)^8(0,50)^3 + \frac{1}{2}(1-0,50)^3(0,50)^8} = \frac{2,152 \cdot 10^{-4}}{4,883 \cdot 10^{-4}} = 0,441.$$

Десятичный логарифм 0,441 равен -0,356; это и есть лод-балл для данного отношения. Другими словами,  $Z(0,10) = -0,356$ .

Если фаза, в которой находятся рассматриваемые аллели у отца, известна, то и значение вероятности  $E(\theta)$  для данной семьи тоже будет известно. Например, если для генотипа 1-2 имеет место фаза 1 (*ABO\*B NPSI\*D/ABO\*O NPSI\*N*), то, как отмечалось выше, вероятность  $L(\theta)$  для данной семьи будет равна  $(1-\theta)^8(\theta)^3$ , и  $Z(\theta = 0,10)$  составит

$$\log \frac{(1-0,10)^8(0,10)^3}{(1-0,50)^8(0,50)^3} = \log \frac{4,305 \cdot 10^{-4}}{4,883 \cdot 10^{-4}} = -0,055.$$

Если же для генотипа 1-2 имеет место фаза 2 (*ABO\*B NPSI\*N/ABO\*O NPSI\*D*), то  $Z(0,10)$  будет равен

$$\log \frac{(1-0,10)^3(0,10)^8}{(1-0,50)^3(0,50)^8} = -4,826.$$

Для состояния с неизвестной фазой значения  $Z$  для родословной, приведенной на рис. 20.9, варьируют от -5,993 при  $\theta = 0,001$  до +0,029 при



Таблица 20.1. Значения  $Z$  при разных  $\theta$  для родословной, приведенной на рис. 20.9, в случае состояния с неизвестной фазой

|          |           |        |        |        |        |       |       |       |       |
|----------|-----------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|
| $\theta$ | 0         | 0,001  | 0,01   | 0,05   | 0,10   | 0,20  | 0,30  | 0,40  | 0,45  |
| $Z$      | $-\infty$ | -5,993 | -3,025 | -1,071 | -0,356 | 0,138 | 0,209 | 0,095 | 0,029 |

$\theta = 0,45$  (табл. 20,1). Если сибсы получили хотя бы одну рекомбинантную хромосому и  $\theta = 0$ , то  $Z = -\infty$ . Как видно из табл. 20.1, лод-балл максимален ( $Z_{\max}$ ) при  $\theta$ , близком к 0,30. Проведя дополнительные расчеты для  $\theta$  от 0,20 до 0,40, получим, что  $Z_{\max} = +0,214$  при  $\theta = 0,276$ .

Значение  $Z_{\max} = +0,214$  не позволяет с уверенностью говорить о сцеплении локусов *ABO* и *NPSI*. Условились, что два аутосомных локуса могут считаться сцепленными только в том случае, если значение максимального лод-балла большее или равно +3,000: вероятность сцепления в этом случае составляет 1000 к 1 или выше. В случае X-сцепленных генов, заведомо находящихся на одной хромосоме, значение  $Z_{\max}$ , при котором можно говорить о сцеплении, больше или равно +2,000; это соответствует шансам в пользу сцепления 100 к 1 или выше. Если  $Z = -2,000$ , то сцепление двух локусов исключается, поскольку в этом случае в пользу сцепления существует лишь 1 шанс из 100.

Чтобы выявить сцепление, необходимо подсчитать  $Z$ -балл при разных  $\theta$  для разных семей и найти максимальное его значение. Преобразование отношения правдоподобий для каждой из семей в десятичный логарифм позволяет суммировать полученные  $Z(\theta)$ . Для определения сцепления локусов *ABO* и *NPSI* было проанализировано 25 родословных, в том числе несколько с большим количеством детей, и получено значение  $Z(0,10) = +31,235$  (табл. 20.2); это больше, чем +3,000, следовательно, два указанных локуса сцеплены.

Значение  $\theta$ , при котором  $Z$  достигает максимума, дает грубую оценку рекомбинационного индекса для двух сцепленных локусов. В первой работе по определению сцепления локусов *ABO* и *NPSI* точное значение  $Z_{\max}$  не определялось, но  $Z$ -балл при  $\theta = 0,10$  был наибольшим из всех  $Z$ , подсчитанных для разных  $\theta$ , из чего был сделан вывод, что, по-видимому, расстояние между этими двумя локусами составляет примерно 10 сМ. Необходимо подчеркнуть, что при анализе разных родословных с *NPS* обнаружилось, что с локусом *NPSI* сцеплены разные аллели системы *ABO*. Другими словами, не существует специфического сцепления между конкретным аллелем системы *ABO* и локусом *NPSI*. Пока не доказано обратное, можно говорить только о генетическом сцеплении между локусами, а не между определенными аллелями. Следует также отметить, что метод подсчета лод-балла не позволяет определить аутосомную локализацию двух сцепленных локусов. Как мы увидим, для того чтобы установить, что локусы *ABO* и *NPSI* расположены на длинном плече (q) хромосомы 9 между районами 34 и 34.2, т. е. 9q34—9q34.2, потребовались дополнительные исследования.

Построение генетических карт хромосом человека

Генетический полиморфизм

Сцепление между локусом *ABO* и геном наследственного онихоартроза удалось обнаружить по двум причинам. Во-первых, каждый из основных аллелей системы *ABO* ( $1^A$ ,  $1^B$ ,  $1^O$ ) можно точно идентифицировать при помощи простого лабораторного теста, так что генотипы всех исследуемых родителей и детей оказываются известными. Во-вторых, каждый аллель системы *ABO* встречается в популяции с высокой частотой, и вероятность того, что родители будут гетерозиготны, достаточно высока. В Великобритании, где были проведены первые работы по изучению сцепления *ABO-NPS*, частоты аллелей  $1^A$ ,  $1^B$  и  $1^O$  составляют примерно 0,66; 0,28 и 0,06 соответственно.

Термин «частота аллеля» обозначает долю конкретного аллеля среди всех аллелей данного локуса в популяции. Например, для двухаллельного локуса ( $A$   $I$ ,  $A$   $2$ ) в популяции из 13 000 человек, где 3800 человек имеют генотип  $A$   $1$   $A$   $1$ , 6400 —  $A$   $1$   $A$   $2$  и 2800 —  $A$   $2$   $A$   $2$ , частота аллеля  $A$   $1$  составляет

Таблица 20.2. Суммарные значения  $Z$  при разных  $\theta$  для локусов *ABO* и *NPSI* <sup>1)</sup>

|          |        |        |        |        |        |        |       |
|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|
| $\theta$ | 0,05   | 0,10   | 0,15   | 0,20   | 0,25   | 0,30   | 0,40  |
| $Z$      | 28,159 | 31,235 | 30,405 | 27,756 | 23,983 | 19,434 | 9,048 |

<sup>1)</sup> Из работы Renwick, Schulze, *Ann. Hum. Genet.* 28: 379–392, 1965, с изменениями.

$$\frac{2 \cdot 3800 + 6400}{2 \cdot 13\,000} = 0,54,$$

а частота аллеля *A2* -

$$\frac{2 \cdot 2800 + 6400}{2 \cdot 13\,000} = 0,46.$$

Для большинства локусов частота одного аллеля (>0,999) значительно превышает частоту другого (других) (<0,001). Вследствие этого в больших популяциях подавляющее большинство (99,8%) особей оказываются гомозиготными по более часто встречающемуся аллелю, около 0,198% — гетерозиготными и 0,001% — гомозиготными по редкому аллелю. В подобных условиях практически невозможно установить сегрегацию аллелей данного локуса или его сцепление с другим локусом, поскольку большинство родителей будут гомозиготны по часто встречающемуся аллелю. Если же частоты двух аллелей данного локуса составляют 0,99 и 0,01, то гетерозиготными будут примерно 1% особей, и шансы обнаружить сегрегацию или сцепление возрастают, поскольку в популяции много особей, гетерозиготных по данному локусу (табл. 20.3). Таким образом, изучение сцепления у человека возможно только для локусов с часто встречающимися аллелями. Если два или больше аллелей данного локуса встречаются в популяции с частотой 0,01 и выше, то говорят, что имеет место генетический полиморфизм, и локус называют полиморфным. Поскольку генетический полиморфизм, подобный полиморфизму аллелей системы АВО, встречается редко, для осуществления проектов по картированию хромосом необходимо разрабатывать методы, которые позволяют с легкостью обнаруживать большое количество полиморфных сайтов.

Таблица 20.3. Частоты аллелей и генотипов в большой популяции со случайным скрещиванием <sup>1)</sup>

| Частоты<br><i>A1</i> | аллелей<br><i>A2</i> | Частоты<br><i>A1A1</i> | генотипов<br><i>A1A2</i> <i>A2A2</i> |        |
|----------------------|----------------------|------------------------|--------------------------------------|--------|
| 1,0                  | 0                    | 1,0                    | 0                                    | 0      |
| 0,9                  | 0,001                | 0,99800                | 0,00199                              | 0,0000 |
| 0,99                 | 0,01                 | 0,9801                 | 0,0198                               | 0,0001 |
| 0,90                 | 0,10                 | 0,81                   | 0,18                                 | 0,01   |
| 0,75                 | 0,25                 | 0,5625                 | 0,3750                               | 0,0625 |
| 0,50                 | 0,50                 | 0,25                   | 0,50                                 | 0,25   |
| 0,25                 | 0,75                 | 0,0625                 | 0,3750                               | 0,5625 |
| 0,10                 | 0,90                 | 0,01                   | 0,18                                 | 0,81   |
| 0,01                 | 0,99                 | 0,0001                 | 0,0198                               | 0,9801 |
| 0,0                  | 0,999                | 0,00000                | 0,00199                              | 0,9980 |
| 0,01                 | 0,99                 | 0,0001                 | 0,0198                               | 0,9801 |
| 0                    | 1,0                  | 0                      | 0                                    | 1,0    |

<sup>1)</sup> Серым цветом указаны те частоты аллелей, при которых имеет места полиморфизм.

Полиморфизм длины рестрикционных фрагментов

Для возникновения аллелей достаточно, чтобы два гомологичных гена различались всего одним нуклеотидом. Во многих случаях замена одного нуклеотида приводит к значительным различиям между продуктом измененного гена и нормальным белком. Однако множество однонуклеотидных замен не приводит к синтезу измененных генных продуктов, а кроме того, замены могут происходить в некодирующих областях ДНК и не приводить ни к каким последствиям. Такие «безвредные» замены, распределяясь по всей длине хромосомы, порождают полиморфные сайты (маркерные локусы, генетические маркеры), которые можно использовать для генетического картирования. Но сначала эти полиморфные сайты нужно обнаружить.

В 1980г. Д. Ботштейн, Р. Уайт, М Сколники В. Дэвис (D. Botstein, R.L. White, M.H. Skolnick, R.W. Davis) разработали теоретические основы идентификации однонуклеотидных полиморфных сайтов и использования их в качестве маркеров для построения хромосомных карт человека. Смысл методологии состоит в следующем. Рестрицирующие эндонуклеазы (рестриктазы) расщепляют ДНК в специфических сайтах. Когда однонуклеотидная замена происходит внутри такого сайта, рестриктаза перестает его расщеплять, но по-прежнему узнает и расщепляет интактный сайт в другой хромосоме (рис. 20.11, А). Поскольку один из аллелей содержит сайт узнавания для данной рестриктазы, а другой — нет, то при обработке ДНК этой рестриктазой образуются фрагменты разной длины. Наличие или отсутствие полиморфного сайта рестрикции можно установить, проведя гибридизацию ДНК с зондом, строго специфичным в отношении уникального участка хромосомы.



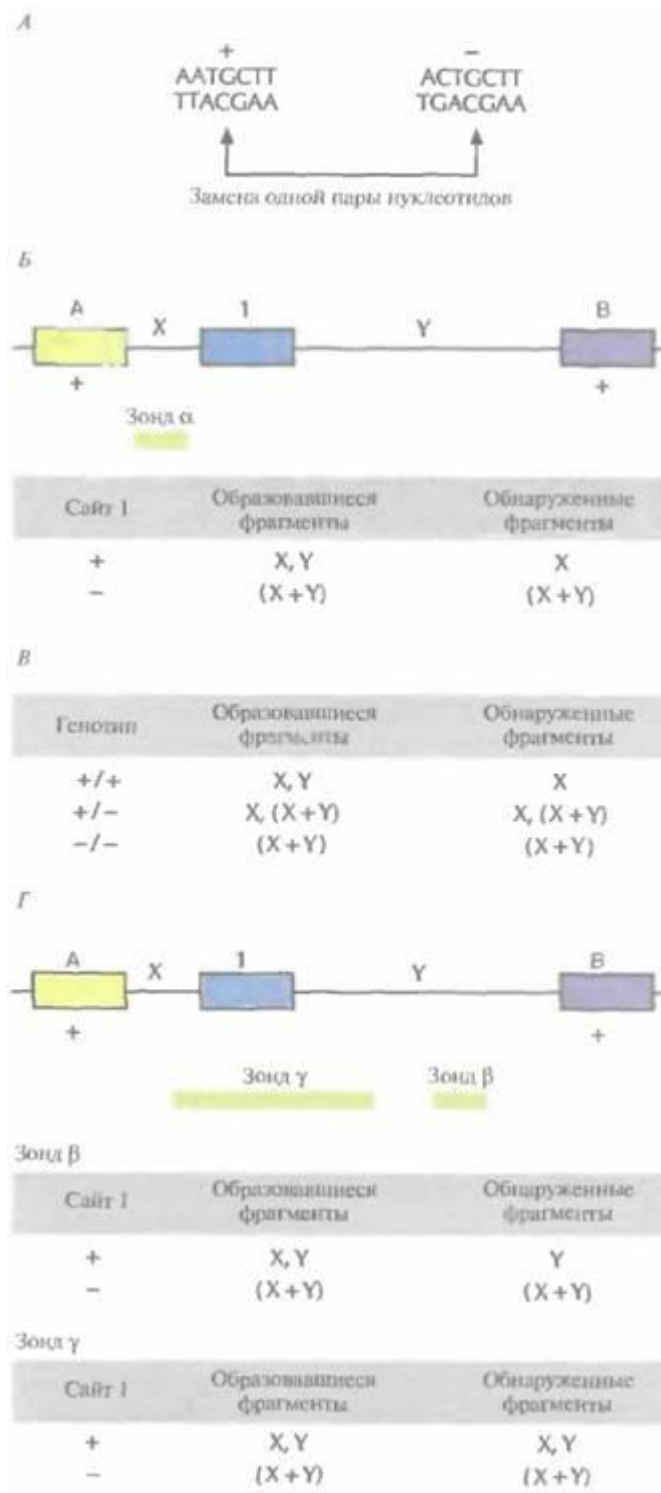


Рис. 20.11. Использование рестриционных сайтов в качестве генетических маркеров. **А.** Замена одной пары нуклеотидов в рестриционном сайте приводит к тому, что рестриктаза не распознает его и не расщепляет ДНК. Интактный и измененный сайты рестрикции отмечены знаками (+) и (—) соответственно. **Б.** Участок одной хромосомы, содержащий три сайта (А, I и В), узнаваемые одной и той же рестриктазой. X — расстояние между сайтами А и I, Y — расстояние между сайтами I и В, X + Y — расстояние между сайтами А и В. Сайты А и В во всех случаях интактны (оба +), а сайт I может быть как интактным (+), так и измененным (—). Если сайт I интактен (+), то после обработки ДНК рестриктазой образуются фрагменты X и Y. Если же он изменен (—), то образуется единственный фрагмент (X + Y). Если провести блот-гибридизацию по Саузерну с зондом α, то мы обнаружим фрагмент X в том случае, если сайт I интактен (+), и фрагмент (X + Y), если он изменен (—). **В.** Фрагменты, образующиеся после обработки рестриктазой, и фрагменты, выявляемые при гибридизации по Саузерну с зондом α, для каждого из генотипов (+/+, +/-, — /—). **Г.** Фрагменты одной хромосомы, образующиеся после обработки рестриктазой, и фрагменты, выявляемые при гибридизации с зондом β или γ.

Предположим, например, что какой-то участок хромосомы содержит три сайта, распознаваемых рестриктазой *Hind*III (рис. 20.11, *Б*), при этом у всех индивидуумов сайты А и В интактны. Это означает, что в популяции нет альтернативных аллелей по этим сайтам, т. е. отсутствует полиморфизм. В отличие от этого в сайте 1 с высокой частотой встречается однонуклеотидная замена, в результате чего он становится устойчивым к расщеплению *Hind*III. Таким образом, две хромосомы в популяции различаются по данному сайту: одна из них расщепляется (+), а другая нет (-).

Если расстояния от сайта А до сайта 1 и от сайта 1 до сайта В не совпадают, каждое из них не превышает 20 т. п. н. и существует однокопийный зонд, гибридизующийся с участком ДНК между сайтами А и 1 (рис. 20.11, *Е*), то после блот-гибридизации по Саузерну и разделения в агарозном геле фрагментов ДНК, полученных в результате обработки *Hind*III, мы сможем различить две ситуации. Первая — сайт 1 расщепляется, в результате чего образуется два фрагмента, и зонд гибридизуется с тем из них, который ограничивается сайтами А и 1. Вторая — сайт 1 не расщепляется и зонд гибридизуется с фрагментом ДНК, ограниченным сайтами А и В (рис. 20.11, *Б*).

Анализ реальных образцов ДНК несколько более сложен, поскольку хромосомы встречаются парами (рис. 20.11, *В*). Однако и в этом случае каждому генотипу (+/+, +/-, — /—) соответствует определенный набор фрагментов, образующийся в результате гибридизации с зондом. Кроме того, для выявления сайта рестрикции на участке I можно использовать зонды, гибридизующиеся с другими участками ДНК между сайтами А и В (рис. 20.11, *Г*). Феномен, состоящий в том, что наличие часто встречающегося в популяции измененного рестрикционного сайта приводит к образованию специфического набора фрагментов ДНК, называют полиморфизмом длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Полиморфные сайты рестрикции образуют маркерные локусы на той хромосоме, где они присутствуют.

Генетический статус каждого ПДРФ-локуса на одной хромосоме называют гаплотипом. В случае одного сайта существуют два возможных гаплотипа (+ или —), в случае двух разных сайтов — четыре (++ , + — , — + , — —); для *n* локусов число гаплотипов равно 2<sup>*n*</sup>. Определение аллелей ПДРФ-локуса (или любых других полиморфных локусов), присутствующих на хромосомах данного индивидуума, называется гаплотипированием (генотипированием, ДНК-тип ированием). Наследование ПДРФ-локусов происходит в соответствии с законами Менделя, и можно проследить их передачу в пределах родословной. Если изучается наследование двух и более ПДРФ-локусов в данной семье, то можно выявить рекомбинацию. На рис. 20.12 представлена следующая ситуация: отец (I-1) гетерозиготен по трем разным ПДРФ-локусам, расположенным на одной хромосоме, а у матери (I-2) сайты рестрикции в трех рассматриваемых локусах отсутствуют. Генетический статус хромосомы, унаследованной от отца каждым из детей, можно установить путем генотипирования. Сын II-2 получил от отца хромосому, в которой произошел кроссинговер; остальные дети унаследовали от него нерекомбинантные хромосомы.

На практике ДНК каждого индивидуума в отдельной пробирке обрабатывают различными

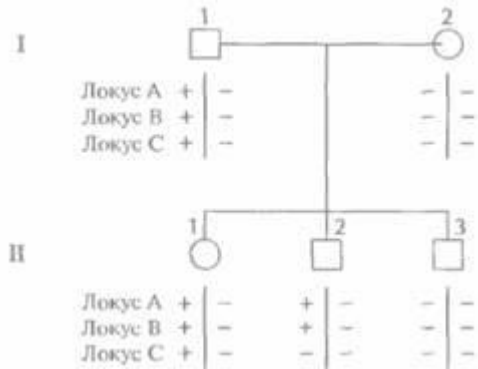


Рис. 20.12. Выявление сегрегации и рекомбинации ПДРФ-локусов в родословной. Знаками плюс (+) и минус (—) обозначены аллели, содержащие интактные и измененные сайты рестрикции, трех ПДРФ- локусов (А, В, С), расположенных на одной хромосоме. Генетический статус I-1 определен исходя из генотипов его родителей, +++/+++ и --- / --- (не показаны). Определение гаплотипов у детей показывает, что II-2 получил от I-1 рекомбинантную хромосому, а II-1 и II-3 — нерекомбинантные. Вертикальная черта, разделяющая наборы ПДРФ-аллелей под символом, обозначающим каждого члена семьи, разделяет гомологичные хромосомы.

рестриктазами, а затем гибридизуют с клонированными однокопийными фрагментами ДНК, которые используются в качестве зондов для выявления ПДРФ. Гибридизация ДНК-зонда с препаратом метафазных хромосом человека, распластанных на предметном стекле (гибридизация *in situ*), позволяет определить, соответствует ли данный зонд уникальному участку хромосомы (однокопийной ДНК). Для обозначения тысяч ПДРФ-локусов разработана стандартная номенклатура. Например, запись D21S18 соответствует локусу, идентифицированному с помощью ДНК-зонда (D), который гибридизуется с хромосомой 21 (21), представлен одной копией (S) и зарегистрирован Комитетом по систематизации карт сцепления человека (DNA Committee of the International System for Human Linkage Maps - ISLM) под восемнадцатым номером (18). Полиморфные маркерные сайты, расположенные внутри известных генов, обозначают по названию гена. Например, *ADH* — это полиморфный локус в гене алкогольдегидрогеназы (*ADH1*). Никакого стандартного обозначения для ПДРФ-аллелей не существует. В одних лабораториях аллели нумеруют по порядку (D1S34\*1, D1S43\*2 и т. д.), в других — по длине фрагмента (в т.п.н.), образующегося при наличии или в отсутствие сайта (сайтов) рестрикции (D4S56\*8, D4S56\*12, D4S564 и т. д.).

Уже идентифицированы тысячи ПДРФ-локусов, благодаря чему значительно увеличилось число аллелей, которые можно использовать для генетических исследований. Сцепление между ПДРФ-локусом (локуса-ми) и геном того или иного заболевания можно установить, подсчитав «парный» («двухлокусный») лод-балл для гаплотипированных семей, в которых выявлены случаи изучаемого генетического заболевания. Аналогично, сцепление между ПДРФ-локусами можно обнаружить, проанализировав данные по родословным, представленным несколькими поколениями. Использование

ПДРФ для картирования имеет несколько ограничений. Эти локусы распределены по хромосомам неравномерно, зонды в виде клонов поддерживать неудобно, а гаплотипирование большого числа индивидов из нескольких семей методом блот-гибридизации по Саузерну весьма трудоемко. К счастью, в геноме человека в большом количестве (>100 000) встречаются другие полиморфные локусы, содержащие простые повторяющиеся элементы из двух, трех или четырех пар нуклеотидов — короткие tandemные повторы (STR, от англ. short tandem repeats), которые легко регистрируются с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

### Полиморфизм коротких tandemных повторов

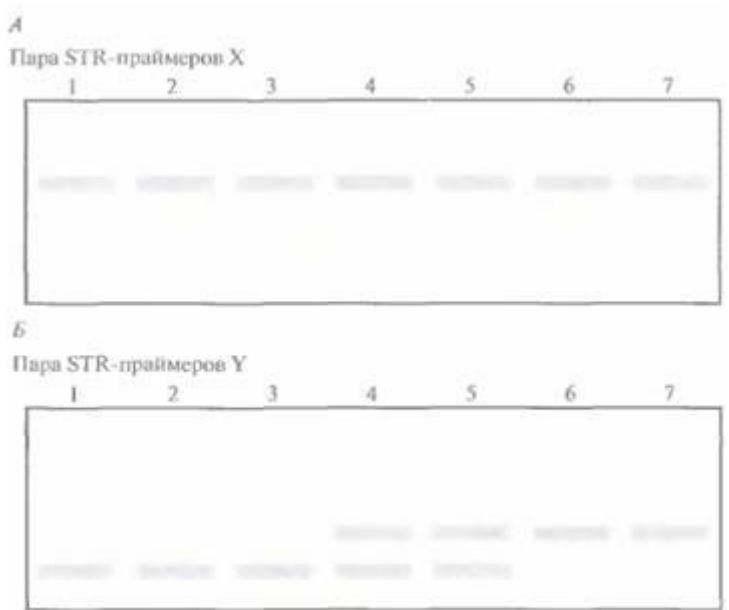
По геному человека равномерно распределены примерно 100 000 блоков динуклеотидных повторов CA/GT [(CA) · (GT)] (рис. 20.13), содержащих от 1 до 40 повторяющихся CA/GT-элементов. Любой такой блок, локализованный в определенном участке хромосомы, передается из поколения в поколение с сохранением числа повторяющихся элементов. Для CA/GT-повтора принято обозначение (CA)<sub>n</sub>, где *n* — число CA-повторов. В геноме человека встречаются и другие динуклеотидные повторы [например, (AT)<sub>n</sub> и т. д.], а также три-[(ATO)<sub>n</sub> и т. д.] и тетра-нуклеотидные [(ATCG)<sub>n</sub> и т. д.].

Чтобы идентифицировать полиморфные STR-локусы, нужно прежде всего провести скрининг геномной библиотеки человека, содержащей вставки небольшого размера (примерно 1000 п. н.), используя подходящий олиго-нуклеотидный зонд. Для идентификации клонированных (CA)<sub>n</sub>-повторов обычно используют зонд, состоящий из 15 CA-элементов. Каждую позитивную вставку секвенируют, чтобы установить длину CA-повтора и нуклеотидные последовательности фланкирующих его участков. Чтобы определить, являются ли фланкирующие последовательности однокопийны-



Рис. 20. 13. Динуклеотидный tandemный повтор (CA)<sub>24</sub>, содержащий 24 повторяющихся элемента.

Рис. 20.14. Типирование STR-локусов. *А.* ДНК, полученную от разных индивидов ( $n = 7$ ), амплифицировали с помощью ПЦР, используя пару праймеров (X) фланкирующих (CA)-(GT)-повтор. Размер всех образовавшихся ПЦР-продуктов одинаков (дорожки 1—7), следовательно, одинакова и длина STR. Судя по полученным данным, STR-локус представлен только одним аллелем. *Б.* То же, что и на рис. *А*, но с использованием другой пары праймеров (Y) для другого STR-локуса. Образование двух разных ПЦР-продуктов означает, что данный локус представлен двумя аллелями. Дорожки 1—3 соответствуют амплифицированному фрагменту ДНК индивидов, гомозиготных по одному STR-аллелю, дорожки 4 и 5 — амплифицированному фрагменту ДНК гетерозиготных индивидов, несущих два разных STR-аллеля, дорожки 6 и 7 — амплифицированному фрагменту ДНК индивидов, гомозиготных по другому STR-аллелю.

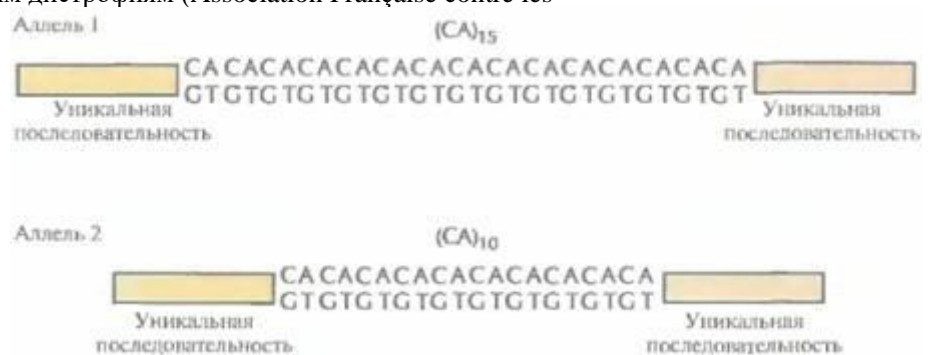


ми, проводят гибридизацию *in situ* с комплементарными им зондами, и если обнаруживается, что эти последовательности встречаются в геноме один раз, то синтезируют пару комплементарных им праймеров и проводят амплификацию СА-повтора. Далее, используя эту пару праймеров, проводят ПЦР-тестирование ДНК, полученной от большого числа индивидуумов. ПЦР-продукты, длина которых для удобства электрофоретического разделения выбирается примерно 200 п. н., разделяют в полиакриламидном геле. Если длина амплифицированного таким образом сегмента ДНК одинакова для всех образцов ДНК, значит, повтор не полиморфен (рис. 20.14, *А*), и наоборот, если образуются

ПЦР-продукты разной длины, это указывает на полиморфизм по данному STR (STR-полиморфизм, STRP) (рис. 20.14, Б). Различающиеся по длине СА-повторы данного локуса представляют собой аллели (рис. 20.15). Такие аллели нередко встречаются с частотой 0,20 и даже больше.

К настоящему времени уже обнаружены тысячи STRP-локусов. Для их обозначения используются те же правила, что и для ПДРФ-локусов. В то же время названия STRP-праймеров часто отличаются от названий локусов. Многие STRP-локусы были идентифицированы французскими исследователями при финансовой поддержке со стороны Французской ассоциации по мышечным дистрофиям (Association Française contre les

Рис. 20.15. Два STR-аллеля. Один из них (аллель 1) содержит повтор (CA)<sub>15</sub> другой (аллель 2) — (CA)<sub>10</sub>. Повторы в обоих случаях фланкированы одинаковыми уникальными последовательностями.



Myopathies), и это нашло свое отражение в том, что обозначения многих пар STRP-праймеров начинаются с аббревиатуры APM, после которой идет идентификационный номер (AFM349xc5). Обозначение пары праймеров часто сопровождается обозначением соответствующего локуса [AFM349xc5 (D3S2017)].

В настоящее время для картирования генома человека используются в основном не ПДРФ-локусы, а STRP. В отличие от ПДРФ-зондов, которые необходимо клонировать в векторе, очищать и метить, в случае STRP-локусов нужна информация лишь о нуклеотидной последовательности пары праймеров, которая может храниться в компьютерной базе данных. Кроме того, STRP-локусы равномерно распределены в геноме человека; частоты STR-аллелей очень высоки, что обеспечивает высокую гетерозиготность, а сами аллели без труда идентифицируются после ПЦР-амплификации.

## Картирование локуса генетического заболевания в определенном районе хромосомы

Анализ родословных не позволяет установить хромосомную локализацию гена того или иного заболевания, если только этот ген не находится на X-хромосоме. Однако можно исследовать сцепление между геном данного заболевания и полиморфными ПДРФ- или STRP-локусами, идентифицируя последние с помощью соответствующих зондов. Этот подход дает наилучший результат в том случае, когда заболевание имеет четкие симптомы, его наследование носит однозначный характер и известна степень его пенетрантности.

Для анализа сцепления прежде всего берут пробы крови у членов нескольких семей, представленных двумя-тремя поколениями, либо у членов одной большой семьи, представленной несколькими поколениями, с данным генетическим заболеванием (при этом необходимо проинформировать всех испытуемых о целях анализа и получить их согласие). Клетки крови культивируют, что позволяет постоянно получать ДНК для дальнейших процедур без повторного забора крови. Проводят генотипирование ДНК каждого индивида по нескольким полиморфным маркерам. В некоторых исследованиях используют более 250 маркеров, представляющих разные участки всех аутосом. Для всех информативных семей для каждого полиморфного локуса и локуса генетического заболевания вычисляют двухточечный (двухлокусный) лод-балл. Если  $Z > +3,00$ , то имеет место сцепление, при  $Z < -2,00$  сцепление исключается.

Для определения хромосомной локализации гена, ответственного за доброкачественные семейные судороги новорожденных (BFNC, benign familial neonatal convulsions), была изучена большая семья, представленная несколькими поколениями, члены которой страдали данным заболеванием (рис. 20.16). Это состояние проявляется приступами неконтролируемых подергиваний мышц лица, туловища, рук и ног в первые шесть месяцев жизни. Примерно в 90% случаев симптомы исчезают после 1 года. По-видимому, припадки не оказывают влияния на неврологический и интеллектуальный статус. BFNC — редкое заболевание, которое имеет четкие клинические признаки, наследуется по аутосомнодоминантному типу и имеет высокую пенетрантность.

В исследованной родословной, включающей несколько поколений, два из всех протестированных полиморфных маркеров, D20S19 и D20S20, были сцеплены с локусом BFNC (табл. 20.4; рис. 20.16). Аллели локусов *D20S19* и *D20S20* каждого генотипированного члена родословной, представленной на рис. 20.16, обозначены числами, расположенными одно над другим. Верхние числа соответствуют аллелям локуса *D20S19*, нижние — *D20S20*. Вертикальная черта разделяет аллели локусов одной хромосомы.

С помощью зонда D20S19 было выявлено 10 аллелей ПДРФ-локуса, с помощью зонда D20S20 — 2 аллеля. В некоторых ПДРФ-локусах несколько сайтов узнавания для одной рестриктазы группируются на небольшом сегменте ДНК (примерно 20 т. п. н.) и все вместе рассматриваются как один локус. Четыре близкорасположенных сайта для одной рестриктазы могут приводить к образованию 20 фрагментов разной длины, которые выявляются одним зондом. STRP-локусы также могут иметь более двух аллелей.



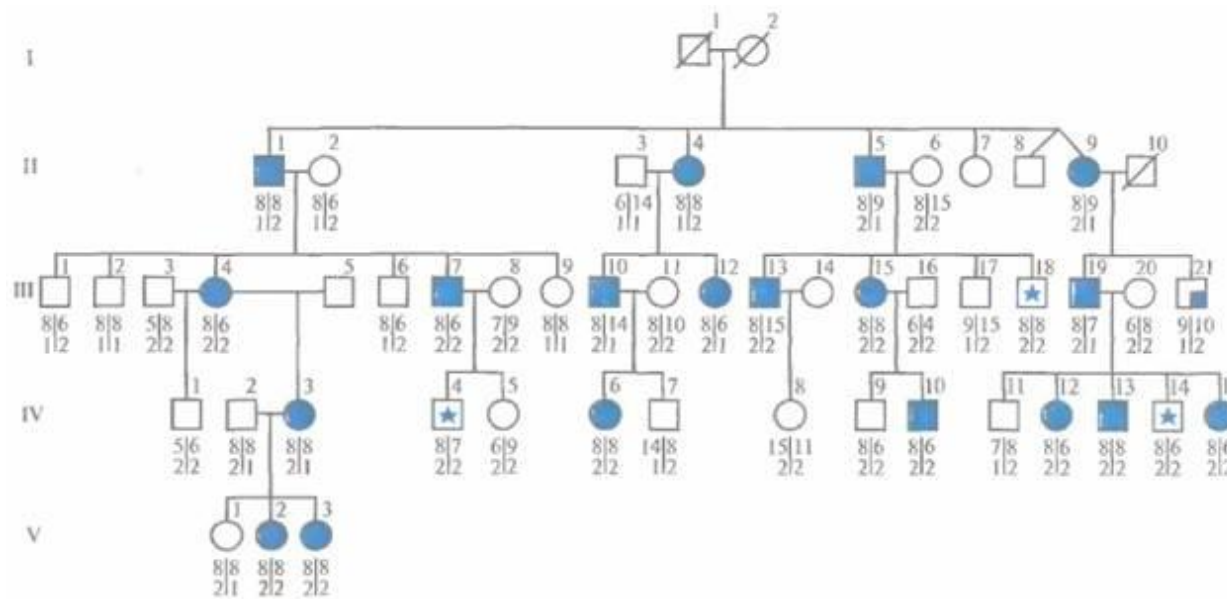


Рис. 20.16. Анализ гаплотипов двух хромосом по 20 полиморфным локусам в родословной, члены которой больны BFNC. Числа под символами - аллели двух полиморфных локусов, *D20S19* и *D20S20* (верхние и нижние числа соответственно). Гаплотипы двух хромосом индивидуума разделены вертикальной чертой. Перечеркнутые символы соответствуют умершим индивидуам, цветные — липам, страдающим данным заболеванием. Символ с закрашенной четвертью квадрата отвечает случаю, когда «клинический» фенотип индивида отличался от фенотипов других больных членов семьи. II-8 и II-9 - неидентичные (разнойцевые) близнецы. Символами со звездочкой отмечены случаи возможного проявления неполной пенетрантности (III-18, IV-4, IV- 14). У больных членов семьи обнаруживается косегрегация гаплотипа (8,2) с заболеванием, все они несут эту хромосому, унаследованную от общего предка. (По данным работы Leppert et al., *Nature* [London] 337: 647-64S, 1989.)

Среди членов представленной на рис. 20.16 родословной в большинстве случаев наблюдается косегрегация гаплотипа (8,2) с заболеванием; это позволяет предположить, что в данной семье locus BFNC находится именно на хромосоме 8,2. Можно было ожидать, что и индивиды III-18, IV-4 и IV-14, получившие от больного родителя хромосому (8,2), также будут больны, однако это предположение не подтвердилось. Возможно, эти исключения связаны с неполной

Таблица 20.4. Двухлокусный лод-балл для локуса BFNC и двух полиморфных локусов хромосомы 20<sup>1)</sup>

| Локус      | Рекомбинационный индекс, $\theta$ |    |    |    |     |     |  |  |
|------------|-----------------------------------|----|----|----|-----|-----|--|--|
| кус        | 0,                                | 0, | 0, | 0, | 0,3 | 0,4 |  |  |
|            | 00                                | 03 | 10 | 20 | 0   | 0   |  |  |
| <i>D20</i> | 3,                                | 3, | 2, | 2, | 1,5 | 0,6 |  |  |
| <i>S20</i> | 12                                | 05 | 88 | 32 | 7   | 9   |  |  |
| <i>D20</i> | 2,                                | 2, | 2, | 2, | 1,6 | 0,7 |  |  |
| <i>S19</i> | 87                                | 92 | 83 | 36 | 3   | 6   |  |  |

<sup>1)</sup> По данным работы Leppert et al., *Nature* (London) 337: 647-648, 1989,

пенетрантностью заболевания. Другими словами, у индивидов III-18, IV-4 и IV-14 есть ген BFNC, но он не экспрессируется. Аналогичные случаи при анализе сцепления других заболеваний могут обуславливаться ошибками в диагностике или тем, что у некоторых индивидов, несущих ген заболевания, симптомы еще не проявились.

В нескольких случаях дети родителя, больного BFNC, несут хромосому (8,2) (например, IV-7 и IV-11), но никаких симптомов заболевания у них не обнаруживается. В обоих упомянутых выше случаях можно определить происхождение данной хромосомы. Например, индивид IV-7 унаследовал хромосому (14,1) от больного отца, а хромосому (8,2) с нормальным геном BFNC — от здоровой матери. Сложнее объяснить генотипы индивидов IV-9 и V-1. С одной стороны, они могли получить хромосому (8,2) с нормальным геном BFNC от здоровых предков.



**Построение генетической карты сцепления человека с помощью метода, основанного на полиморфизме длины рестрикционных фрагментов**

D. Botstein, R. L. White, M. Skolnick, R. W. Davis  
*Am. J. Hum. Genet.* 32: 314-331, 1980

**Часто встречающиеся типы полиморфизма у человека, которые можно типировать с помощью полимеразной цепной реакции**

J. L. Weber, P. E. May *Am. J. Hum. Genet.* 44: 388-396. 1989

Бурное развитие молекулярной генетики этого гена. Эта идея не была весьма трудоемкой и часто дает человеку, начавшееся в 1980-х годах, высказана ими прямо, но она ошибочные результаты. Все эти гг., стало возможным благодаря непосредственно вытекала из их проблемы удалось решить, когда новаторским идеям Д. концепции, Ботштейн и др., Вебер и Мэй обнаружили, что по Ботштейна, Р. Уайта, М. пришли к абсолютно верному всему геному человека Скольника и С. Дэвиса. Они выводили: «Применение набора разбросано множество обратили внимание, что зондов, специфичных в высокополиморфных ди-, три- и полиморфизм длины отношении полиморфных тетра-нуклеотидных повторов рестрикционных фрагментов участков ДНК, для анализа ДНК (коротких tandemных повторов; (ПДРФ) человека порождает членов родословных с большим STS, от англ. short tandem полиморфные аллели числом поколений откроет repeats), вариации которых легко (маркерные локусы), новые горизонты в генетике различаются при помощи ПЦР, поддающиеся картированию человека». К 1992 г., на разных Как писали авторы, «...данный Как писали авторы в своей хромосомах человека были тип полиморфных статье, «мы хотим предложить идентифицированы и последовательностей, вероятно, новый способ построения картированы сотни ПДРФ- найдет широкое применение при генетической карты сцепления маркеров. С их помощью были изучении многих генов человека, В его основе лежит изолированы гены таких наследственных заболеваний и создание при помощи наследственных заболеваний, позволит значительно увеличить технологии рекомбинантных как миодистрофия Дюшенна и разрешение генетических карт ДНК случайных однокопийных муковисцидоз. К сожалению, человека», STR, особенно ДНК-зондов, способных высокополиморфные локусы динуклеотидные tandemные выявлять полиморфные расположены на разных повторы, эффективны как нуклеотидные хромосомах человека маркеры; в этом качестве они последовательности при неравномерно и не всегда на уже вытеснили ПДРФ-локусы и гибридизации с близком расстоянии друг от в настоящее время используются индивидуальными ДНК, друга. Кроме того, ПДРФ- для построения подробных обработанными рестриктазой». анализ, основанный на генетических карт всех Более того, они осознали, что, гибридизации зонда с хромосом человека. используя сцепление гена того или иного заболевания с маркерным локусом, можно определить хро-

Например, индивид IV-9 мог унаследовать хромосому (8,2) через свою мать (III-15) от бабушки (II-6). С другой стороны, отсутствие у IV-9 и V-1 признаков заболевания может объясняться неполной пенетрантностью в том случае, если они унаследовали хромосому (8,2) с геном *BFNC\*D* от больного родителя. Необходимо подчеркнуть, что в других семьях с *BFNC* может не наблюдаться сцепления аллелей *D20S19\*S* и *D20S20\*2* с аллелем данного заболевания. Так получилось, что в рассмотренном нами случае именно эти полиморфные аллели находятся на той же хромосоме, которая несет аллель *BFNC\*D* и которая унаследована от одного предка. В общем случае сцеплены локусы, а не аллели.

Из данных табл. 20.4 можно предположить, что расстояние от локусов *D20S19* и *D20S20* до локуса *BFNC* не превышает 5 сМ ( $<5 \cdot 10^6$  п. н.). В общем случае анализ сцепления не позволяет разграничить два локуса, если расстояние между ними меньше 1—2 сМ, Поскольку локусы *D20S19* и *D20S20* расположены внутри района 13.2—13.3 длинного плеча (q) хромосомы 20

(20q13.2-13.3), то и локус *BFNC* должен находиться вблизи данного района хромосомы или внутри него. К настоящему времени при помощи метода, основанного на вычислении лод-балла и использовании полиморфных маркеров, в специфических хромосомных участках было картировано более ста генов различных заболеваний.

## Построение мультилокусных хромосомных карт человека

Использование многих тысяч разбросанных по всему геному полиморфных маркеров позволило определять как порядок расположения локусов, так и расстояния между ними на каждой хромосоме. Карта сцепления полиморфных участков оказывается неоценимой при локализации генов различных заболеваний. Для идентификации таких генов можно использовать зонды, специфичные в отношении последовательностей, которые фланкируют данный ген.

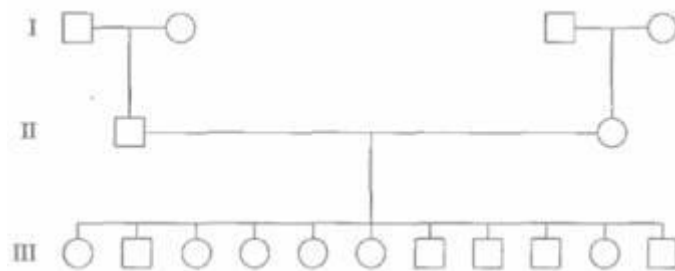
Идеальными для картирования полиморфных локусов являются семьи, представленные тремя поколениями, в которых живы обе прабабки и оба прадеда, а родители имеют большое число детей ( $>8$ ). Исходя из генотипов бабок и дедов, можно установить генетическую фазу, в которой находятся исследуемые локусы у каждого из родителей, а наличие большого числа детей повышает вероятность того, что рекомбинация произойдет. В Центре по изучению полиморфизма человека (СЕРН, Centre d'Etude du Polymorphisme Humain) в Париже собраны данные и образцы ДНК членов 65 семей, представленных в большинстве случаев тремя поколениями и имеющих в среднем по 8,5 детей (см., например, рис. 20.17). Этот банк семей (СЕРН-семей) предоставляет информацию о генотипах

всех членов лабораториям всего мира, занимающимся картированием. В действительности он состоит из культур лимфобластных клеточных линий большинства членов СЕРН-семей и служит готовым источником ДНК для картирования новых полиморфных локусов по мере их обнаружения.

Построение мультилокусной генетической карты (карты сцепления) хромосомы человека — непростая задача; для ее решения используют специализированную компьютерную программу, позволяющую установить порядок расположения локусов, наилучшим образом согласующийся с данными по рекомбинациям. Проблема упорядочивания локусов усложняется по мере возрастания числа локусов, которые необходимо картировать. Для  $N$  локусов существует  $N!/2$  возможных вариантов их расположения. Так, для 10 локусов их число равно 1 814 400. И хотя некоторые комбинации заведомо нереальны, даже если основываться на визуальной проверке данных, все же число возможных вариантов остается очень большим. Обычно сначала находят наиболее вероятное расположение нескольких сцепленных локусов, а затем комбинируют эти «наилучшие» варианты и строят статистически достоверную карту сцепления всех локусов. Критерием того, расположен ли один локус рядом с другим, является значение десятичного логарифма правдоподобия (лод-балла); если он равен или превышает +3,00, то ответ будет положительным.

В общем случае построение карты проводят поэтапно. Сначала отбирают несколько полиморфных маркеров, расположенных на одной хромосоме. Потом генотипируют образцы ДНК, полученные от нескольких СЕРН-семей, по каждому полиморфному маркеру. Структура СЕРН-семей такова, что нет необходимости в

Рис. 20.17. СЕРН-семья K1331.



определении генотипов всех образцов ДНК. Привлечение других семей не дает повышения качества карты, которое оправдывало бы дополнительную работу. Обычно используют 15, иногда — 40 семей. Для генотипирования 40 СЕРН-семей по 20 полиморфным маркерам необходимо провести примерно 10 000 анализов. Генотип каждого индивида по каждому локусу вводят в базу данных. На этом этапе происходит проверка базы данных на предмет ошибок. Компьютерная программа проводит поиск случаев несоответствия генотипов родителей и детей; эти ошибки возникают во время введения данных или генотипирования. Иногда для уточнения полученных результатов проводят повторное типирование. Ошибки могут приводить к неправильным выводам о расположении локусов и расстояниях между ними. Ошибочные данные по возможности исключаются из анализа. Для генотипированных СЕРН-семей определяют все «двухлокусные» лод-баллы и рекомбинационные индексы ( $\theta$ ), и исходя из этих данных конкретная компьютерная программа строит генетическую карту (карту сцепления).

Карты сцепления хромосом человека постоянно обновляются по мере идентификации дополнительных полиморфных локусов. С увеличением числа локусов повышается разрешение карты и уменьшается расстояние между локусами. К 1994 г. были определены генотипы членов СЕРН-семей примерно по 6000 полиморфным маркерам и с помощью мультилокусного картирования установлено положение примерно 1000 локусов по всему геному человека со средним расстоянием между локусами около 4 сМ. Задача широкомасштабных проектов картирования состоит в том, чтобы, используя дополнительные полиморфные маркеры, построить карту каждой хромосомы с расстоянием между локусами 1—2 сМ.

### ***Локализация гена заболевания на карте сцепления***

Для решения этой задачи проводят генотипирование членов семей с определенным генетическим заболеванием по полиморфным маркерам, которые, по данным картирования, находятся на том же плече хромосомы, что и ген заболевания. Используют те же подходы, что и при вычислении двухточечного лод-балла при анализе

сцепления. В данном случае локус гена заболевания произвольно размещают среди четырех упорядоченных локусов и вычисляют лод-балл для каждой позиции. В случае мультилокусного картирования лод-балл равен логарифму отношения 1) вероятности того, что ген заболевания занимает определенное положение на карте из четырех упорядоченных локусов, к 2) вероятности того, что ген заболевания не сцеплен ни с одним из рассматриваемых полиморфных локусов. Использование именно четырех полиморфных локусов обусловлено тем, что при большем их числе слишком сильно усложняются расчеты. Ген заболевания может располагаться до первого локуса, в разных областях между локусами или за последним локусом. Рассчитав лод-балл для каждого положения гена, которое он может занимать в различных наборах из четырех локусов, выбирают максимальное его значение, превышающее +3,00; оно дает наиболее вероятную локализацию данного гена.

### ***Картирование с использованием радиационных гибридов***

Для картирования с использованием радиационных гибридов (РГ-картирования) не нужно собирать родословные и генотипировать членов банка СЕРН-семей. В основе метода лежит работа с соматическими клетками и скрининг (с использованием ПЦР-зондов) клеточных линий, содержащих части (фрагменты) хромосом человека. РГ-картирование целой хромосомы или какой-то ее области начинается с создания гибридной (человек/грызун) клеточной линии, содержащей одну хромосому человека. Клетки такой монохромосомной гибридной клеточной линии подвергают воздействию летальных доз ионизирующей радиации (рентгеновских или гамма-лучей), в результате чего разрушаются клеточные мембраны, инактивируются ферменты, происходит фрагментация хромосом. Единицей измерения дозы ионизирующего излучения, поглощенной биологическим объектом, является рад (rad, от англ. radiation absorbed dose). Один рад равен 0,01 Дж на 1 кг ткани или 100 эргам на 1 г ткани. Обычно клетки в культуре погибают при 3000 рад. Чем больше доза, тем более сильные повреждения возникают и тем меньше размер образующихся фрагментов

ДНК, При дозе 10 000 рад фрагменты слишком малы для РГ-картирования.

Очень важным моментом при РГ-картировании является высвобождение и сохранение фрагментов ДНК человека, полученных после облучения. Чтобы решить эту задачу, проводят слияние облученных (донорских) клеток с необлученными (реципиентными) клетками грузынов. Облученные клетки, слившиеся друг с другом или оставшиеся изолированными, не способны расти в культуре вследствие радиационных повреждений. В свою очередь, реципиентные клетки, как слившиеся друг с другом, так и не слившиеся, лишены селективного маркера, который присутствует в донорских клетках и обеспечивает их рост в куль-туральной среде, используемой для слияния. Следовательно, в данной среде будут пролиферировать лишь слившиеся клетки донор—реципиент, несущие селективный маркер, при этом большинство фрагментов ДНК облученных клеток окажутся встроенными или транслоцироваинными на функциональные хромосомы реципиентных клеток. Выжившие слившиеся клетки культивируют вместе до тех пор, пока не установятся отдельные клеточные линии — так называемые радиационные гибриды {РГ}. Группу радиационных гибридов, полученных в результате одного эксперимента, называют панелью радиационных гибридов (РГ-панелью). В ней в виде фрагментов хранится большая часть хромосомной ДНК человека, полученной из монохромосомной клеточной гибридной линии.

Таблица 20,5. Данные по сохранению маркеров при РГ-картировании <sup>1)</sup>

| РГ-панель | Наличие или отсутствие маркера |   |   |   |   |   |   |
|-----------|--------------------------------|---|---|---|---|---|---|
|           | А.                             | Б | В | Г | Д | Е | Ж |
| 1         | +                              | — | — | + | — | — | + |
| 2         | +                              | + | — | — | + | + | — |
| 3         | —                              | — | + | + | — | + | — |
| 4         | +                              | — | + | + | + | — | — |
| 5         | —                              | — | + | — | — | — | — |
| 6         | +                              | + | — | — | — | + | — |
| 7         | —                              | — | + | + | — | — | + |
| 8         | —                              | + | — | — | — | — | — |
| 9         | +                              | + | — | + | + | — | + |
| 10        | —                              | — | — | — | — | + | — |

<sup>1)</sup> Номера и буквы - радиационные гибриды и ПЦР-маркеры соответственно. Знаки плюс и минус указывают наличие или отсутствие маркерных сайтов в данном радиационном гибриде

ДНК каждого члена РГ-панели анализируют с помощью нескольких хромосомоспецифичных ПЦР-зондов, многие из которых «узнают» полиморфные участки. Однако полиморфизм как таковой не требуется для РГ-картирования. Цель такого картирования — выяснить, присутствует ли данный участок хромосомы в клеточных линиях РГ-панели. Следовательно, для скрининга можно использовать и ПЦР-праймеры, специфичные в отношении уникальных (однокопийных) последовательностей ДНК. Мономорфные ПЦР-идентифицируемые хромосомоспецифичные участки называют ДНК-маркирующими сайтами (STS, от англ. sequence tagged sites). Все клеточные линии РГ-панели проверяют на наличие (+) или отсутствие (—) такого сайта (табл. 20.5), используя весь набор зондов, и гибриды,

ДНК которых не амплифицируется, отбраковывают. Для эффективного РГ-картирования необходима панель примерно из 100 РГ, полученных из одной монохромосомной гибридной клеточной линии.

Теоретическая основа РГ- и мейотического картирования весьма сходна. Чем ближе друг к другу на хромосоме находятся два участка, тем выше вероятность того, что оба они окажутся в одном фрагменте ДНК после облучения. Точно так же, чем ближе друг к другу находятся сайты, тем с большей вероятностью они не разойдутся при мейотическом картировании в результате рекомбинации. Основные положения, на которых базируется РГ-картирование, состоят в следующем: 1) индуцированный облучением разрыв между двумя сайтами не зависит от сохранения маркера; 2) сохранение фрагмента с одним маркером не зависит от сохранения любого другого фрагмента в этой же клетке.

Полученные для всех клеточных линий РГ-панели паттерны (паттерны сохранения, сигнатура) наличия (+) или отсутствия (-) каждого маркера используют для построения РГ-карты. Лод-балл рассчитывают как логарифм отношения вероятности получения конкретного паттерна сохранения двух сайтов к вероятности того, что при облучении эти сайты всегда разделяются разрывом. В отличие от мейотической рекомбинации,  $\theta$  для частоты радиационных разрывов принимает значения от 0 до 1;  $\theta = 0$

означает, что два маркерных сайта никогда не разделяются при определенной дозе облучения, т. е. они тесно сцеплены. При  $\theta = 1$  маркеры всегда разделяются при определенной дозе облучения, т. е. вообще не сцеплены. Если лод-балл равен или больше +3,00, можно с уверенностью говорить о сцеплении двух маркеров. Разработаны компьютерные программы, позволяющие упорядочивать сайты и определять расстояние между ними на РГ-карте.

Расстояние между сайтами на РГ-карте измеряется в так называемых сантирэях (сР). Поскольку размер фрагментов обратно пропорционален дозе облучения, необходимо указывать дозу, при которой была получена данная РГ-панель и построена РГ-карта. Например, расстояние в 1 сР<sub>8000</sub> означает, что при дозе 8000 рад между двумя маркерами происходит разрыв в 1% случаев.

Прямой связи между сантирэями и числом пар нуклеотидов не существует. Можно лишь сказать, что чем выше доза в радах, тем меньше физическое расстояние для конкретной величины в сантирэях. Например, расстояния в 1 сР<sub>9000</sub>, 1 сР<sub>8000</sub>, 1 сР<sub>6000</sub>, 1 сР<sub>5000</sub>, 1 сР<sub>3000</sub> эквивалентны примерно 50, 53, 62, 90 и 100 т. п. н. соответственно. Мейотическое же (генетическое) картирование способно дифференцировать сайты, находящиеся на расстоянии друг от друга в лучшем случае 1 сМ, т. е. 1000 т. п. н. РГ-карты не только имеют более высокое разрешение, но и являются более полными, чем генетические. Кроме того, РГ-картирование проще мейотического в техническом плане, а новые сайты можно быстро включать в ранее построенную РГ-карту. К сожалению, РГ-картирование не позволяет локализовать гены тех или иных заболеваний в специфических районах хромосомы. Несмотря на это при построении мультилокусных карт хромосом человека РГ-картирование, вероятно, вытеснит картирование по сцеплению, основанное на генотипировании членов СЕРН-семей.

### **Физическое картирование генома человека**

Генетические и РГ-карты указывают линейное расположение маркерных сайтов. Расстояния между сайтами измеряются в условных едини-

цах, которые отражают частоту рекомбинации (сМ) или вероятность сохранения двух сайтов в одном радиационном гибриде (сР). Эти единицы можно перевести (в некотором приближении) в единицы реальных физических расстояний — пары нуклеотидов, которые используются в физических картах. Физическая карта целой хромосомы или ее области дает непосредственное представление о расположении генов в ДНК, что облегчает их идентификацию и характеристику и систематическое секвенирование хромосомной ДНК.

Для построения физической карты необходимо прежде всего выделить из библиотеки геномной ДНК клоны, содержащие перекрывающиеся сегменты. Исходя из данных о перекрывающихся участках и другой информации о положении клонов, можно реконструировать непрерывный ряд клонированных сегментов какого-то района хромосомы, целой хромосомы или всего генома. Были получены упорядоченные наборы смежных (contiguous) клонов (контиги) на основе YAC-(yeast artifitil chromosome, искусственная хромосома дрожжей), BAC-(bacterial artifitil chromosome, искусственная хромосома бактерий), PAC-(bacterio-phage PI artifitil chiomosome, искусственная хромосома бактериофага P1) и космидных библиотек ДНК человека. Отметим, что стратегия построения контигов из крупных фрагментов ДНК человека, содержащихся в YAC-, BAC- или PAC-библиотеках, немного отличается от таковой для P1- или космидных контигов,

### ***Построение контигов из YAC-, BAC-и PAC-библиотек***

При построении физических карт тех или иных районов хромосом или целых хромосом из геномных библиотек, содержащих крупные вставки (YAC-, BAC- или PAC-библиотек), наиболее приемлем метод картирования, основанный на использовании STS. STS — это короткий одно-копийный участок ДНК (примерно 100—300 п. н.), который можно выявить при помощи П ЦР с использованием уникального набора праймеров. Для получения протяженного контига, охватывающего значительный участок хромосомы, требуется большое число STS, находящихся на расстоянии 50—100 т. п. н. друг от друга. Напри-



мер, для физического картирования хромосомы длиной примерно 200 миллионов пар нуклеотидов (м. п. н.) необходимо от 1500 до 3000 STS. Для построения же достаточно точной физической карты всего генома человека их нужно по меньшей мере 30 000.

Для создания STS были разработаны различные подходы. В одном из них ДНК из очищенного препарата одной хромосомы человека, изолированной при помощи проточной цитофотометрии, обрабатывают рестриктазой и клонируют в векторе, способном акцептировать небольшие (< 1000 п. н.) фрагменты ДНК. Затем секвенируют вставки из клонов, выбранных случайным образом, и отбрасывают те клоны, в которых вставки короче 100 п. н., и те, которые содержат последовательности из повторяющихся элементов ДНК человека. Наличие повторов определяют при помощи компьютерных программ, сравнивая нуклеотидную последовательность вставки с последовательностями всех известных повторов ДНК человека. Затем для каждого отобранного клона находят нуклеотидные последовательности праймеров. Каждый STS тестируют на предмет уникальности амплифицируемого фрагмента хромосомной ДНК.

С помощью ПЦР-скрининга выявляют STS в индивидуальных клонах библиотеки с крупными вставками, а затем, основываясь на распределении STS в клонах, численными методами находят вероятный набор перекрывающихся клонов и относительное положение имеющихся STS (рис. 20.18). С разработкой метода РГ-картирования появилась возможность без особого труда упорядочить STS, что облегчает идентификацию составляющих контига (рис. 20.19). Выявив перекрывающиеся клоны, определяют степень их перекрывания, размер контига и общую длину охватываемой им ДНК, с помощью эндонуклеазного картирования с использованием электрофоретической системы, разделяющей фрагменты ДНК длиннее 105 п. н. (например, импульсный электрофорез). Уже получены контиги хромосомных районов, охватывающие от 1 до более чем 20 м. п. н., а в ряде случаев — и целые хромосомы. В конце концов будут получены контиги из крупных фрагментов ДНК, перекрывающие весь геном.

### ***Построение контигов из космидных, P1- и $\lambda$ -библиотек***

Более удобными для генетических исследований и широкомасштабного секвенирования часто оказываются контиги из небольших фрагментов ДНК, чем из крупных. Для построения контигов определенных районов хромосом или целых хромосом нередко используют космид-ные библиотеки. Обычно перекрывающиеся космидные клоны идентифицируют методом геномной дактилоскопии. Для этого из каждого клона экстрагируют ДНК и обрабатывают ее рестриктазой. Полученные фрагменты метят, разделяют при помощи электрофореза и визуализируют радиоавтографическими методами. Каждый клон порождает специфический набор фрагментов —уникальный отпечаток его ДНК; у перекрывающихся клонов один или несколько фрагментов совпадают.

Для концевой мечености ДНК-фрагментов -независимо от характера образующихся после эндонуклеазной обработки концов (5'-, 3'-выступающих или тупых) — можно использовать реакцию замещения, катализируемого ДНК-полимеразой Т4. В этом случае к препарату космидной ДНК, обработанной рестриктазой, добавляют ДНК-полимеразу и один меченый дезоксинуклеотид (рис. 20.20). Под действием 3'-экзонуклеазной активности ДНК-полимеразы происходит последовательное отщепление 3'-концевых нуклеотидов. Процесс продолжается до тех пор, пока в противоположной цепи не экспонируется нуклеотид, комплементарный меченому дезоксинуклеотиду, добавленному в реакционную смесь. Далее включается полимеразная активность ДНК-полимеразы, и к 3'-концу присоединяется свободный меченый нуклеотид. Поскольку другие нуклеотиды в реакционной смеси отсутствуют, дальнейшего роста цепи не происходит.

Для мечености эндонуклеазных фрагментов существуют и другие способы. Усеченный 3'-конец фрагмента можно удлинить (достроить) при помощи фрагмента Кленова, использующего выступающий 5'-конец в качестве матрицы; достраивание осуществляется за счет добавленных в реакционную смесь дезоксирибонуклеотидов, один из которых несет метку. Кроме того, к вы-



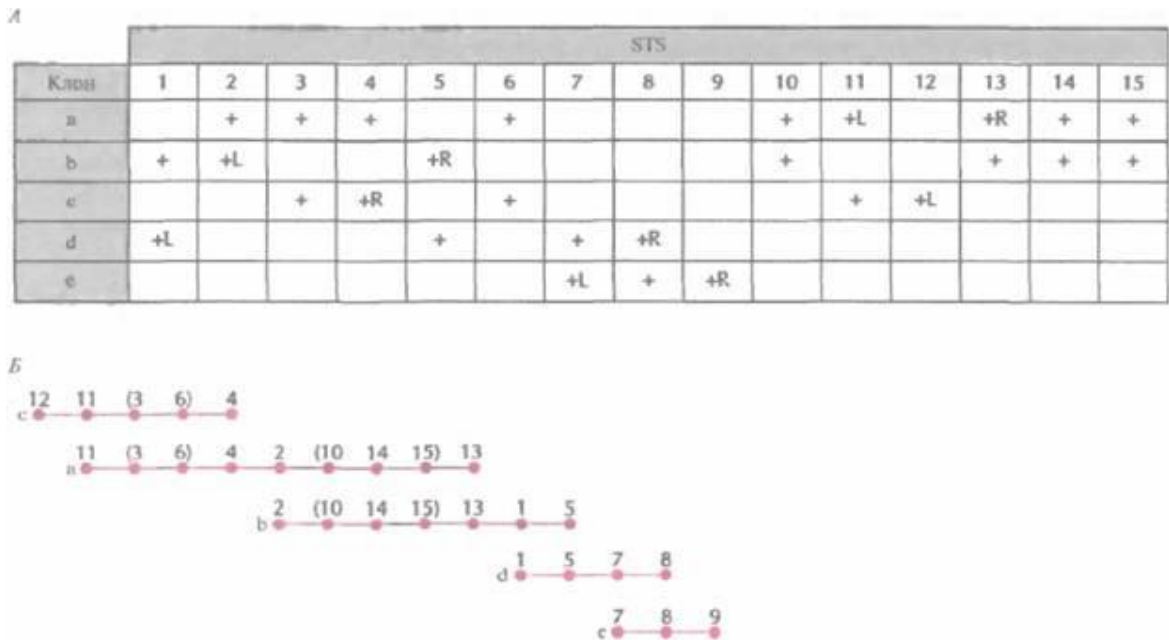
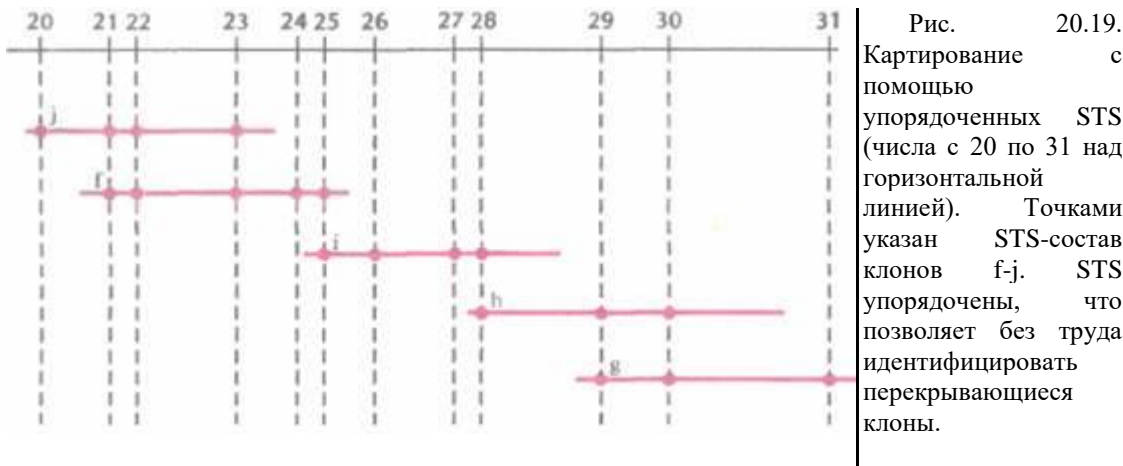


Рис. 20.18. STS-картирование. А. STS (с 1 по 15), обнаруженные с помощью ПЦР-скрининга В клонaх а-е, обозначены знаком плюс (+). Буквами L и R указаны STS, находящиеся на 5'- и 3'-концах вставки (на ее левом и правом концах соответственно). Б. Идентифицировав перекрывающиеся участки, можно построить контиг из пяти клонов и карту расположения STS. Полученные данные не позволяют установить порядок некоторых из них (номера в скобках). Интервалы между STS представлены одинаковыми; в действительности они неизвестны.



ступающим концам рестрикционных фрагментов можно присоединять меченые линкеры.

Для выявления перекрывающихся участков необходимо проанализировать очень большое число космидных клонов, поэтому для поиска меченых рестрикционных фрагментов, общих для пары клонов, используют специальные компьютерные программы. ДНК-отпечаток каждого клона сканируют, информацию вводят в компьютер и проводят попарные сравнения. По результатам этих сравнений организуют из клонов контиги. Наличие перекрывающихся участков в клонaх созданного контига подтверждается построением подробных рестрикционных карт вставок. Пробелы между контигами заполняют, выбирая зонды из ближайших концов соседних

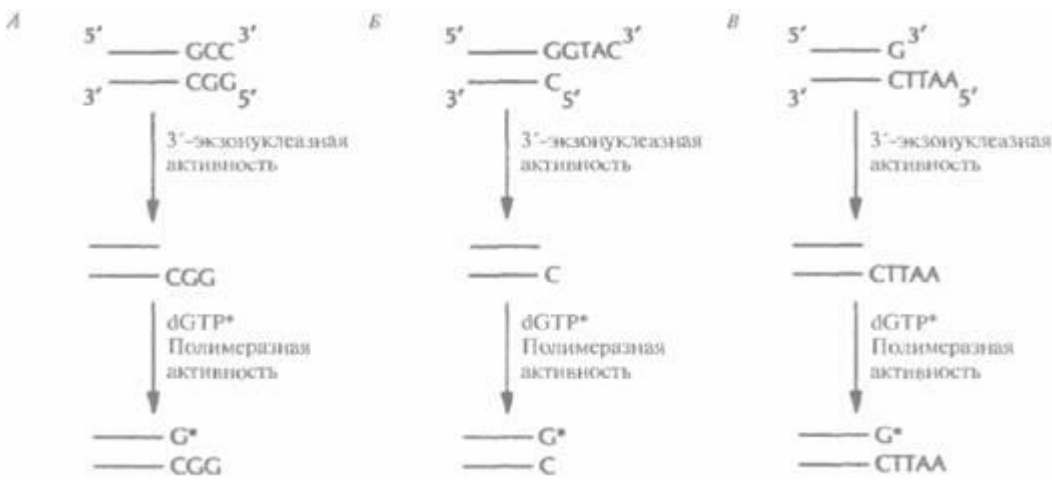


Рис. 20.20. Концевое мечение двух цепочечных ДНК с помощью ДНК-полимеразы Т4. 3'-экзонуклеазная активность ДНК-полимеразы катализирует отщепление 3'-концевых нуклеотидов фрагментов ДНК с тупыми концами (А), с выступающими 3'-концам и (Б) или с выступающими 5'-концам и (Б). Отщепление происходит до тех пор, пока на противоположной цепи не экспонируется основание, комплементарное меченому дезоксирибонуклеотиду, введенному в реакционную смесь (dGTP\*); затем «включается» полимеразная активность ДНК-полимеразы Е4, и к 3'-концу присоединяется свободным меченый дезоксирибонуклеотид. Метка включается в оба конца фрагментов ДНК (на рисунке это не показано). Для мечения можно использовать любой дезоксирибонуклеотид.

контигов и проводя скрининг библиотеки, содержащей крупные вставки, для поиска недостающих участков ДНК.

Транскрипционное картирование

Клоны кДНК-библиотеки представляют собой ДНК-копии тех транскриптов экспрессирующихся генов, которые присутствовали в конкретной ткани в момент экстракции из нее мРНК. «Привязка» индивидуальных клонов кДНК к хромосомным районам создает предпосылки к выявлению возможных кандидатов на роль генов тех или иных заболеваний. Если анализ генетического сцепления показывает, что ген данного заболевания находится в той же области хромосомы, что и кДНК-последовательность(ти), то можно проверить, не происходят ли данные клоны кДНК из гена этого заболевания.

Привязку кДНК-клонов и других типов нуклеотидных экспрессируемых последовательностей к специфическим хромосомным районам называют транскрипционным картированием. Для построения транскрипционных карт используют различные методы. В одном из них частично секвенируют отдельные кДНК-клоны и на основе транслированной части каждой кДНК-вставки получают STS. Данный тип STS называют экспрессируемым STS (eSTS). Для определения хромосомной локализации eSTS используют линии соматических гибридных клеток, которые содержат единственную хромосому человека (монохромосомные гибриды) или фрагменты конкретной хромосомы человека (делеционную панель). Для этого ДНК каждого из монохромосомных гибридов амплифицируют методом ПЦР с использованием eSTS-праймеров и идентифицируют ту хромосому, которая содержит данный eSTS. Затем методом ПЦР-амплификации ДНК клеточных линий делеционной панели идентифицируют район хромосомы, в котором находится данный eSTS (рис, 20.21). Кроме того, внутригенные STS можно нанести на существующие РГ-карты. К 1996 г. на всех аутосомах и X-хромосоме было картировано около 20 000 внутригенных STS человека.

Помимо экспериментов по картированию кДНК-клонов в хромосомных районах, в Институте исследования генома в Роквилле, Мэриленд (The Institute for Genome Research) и других

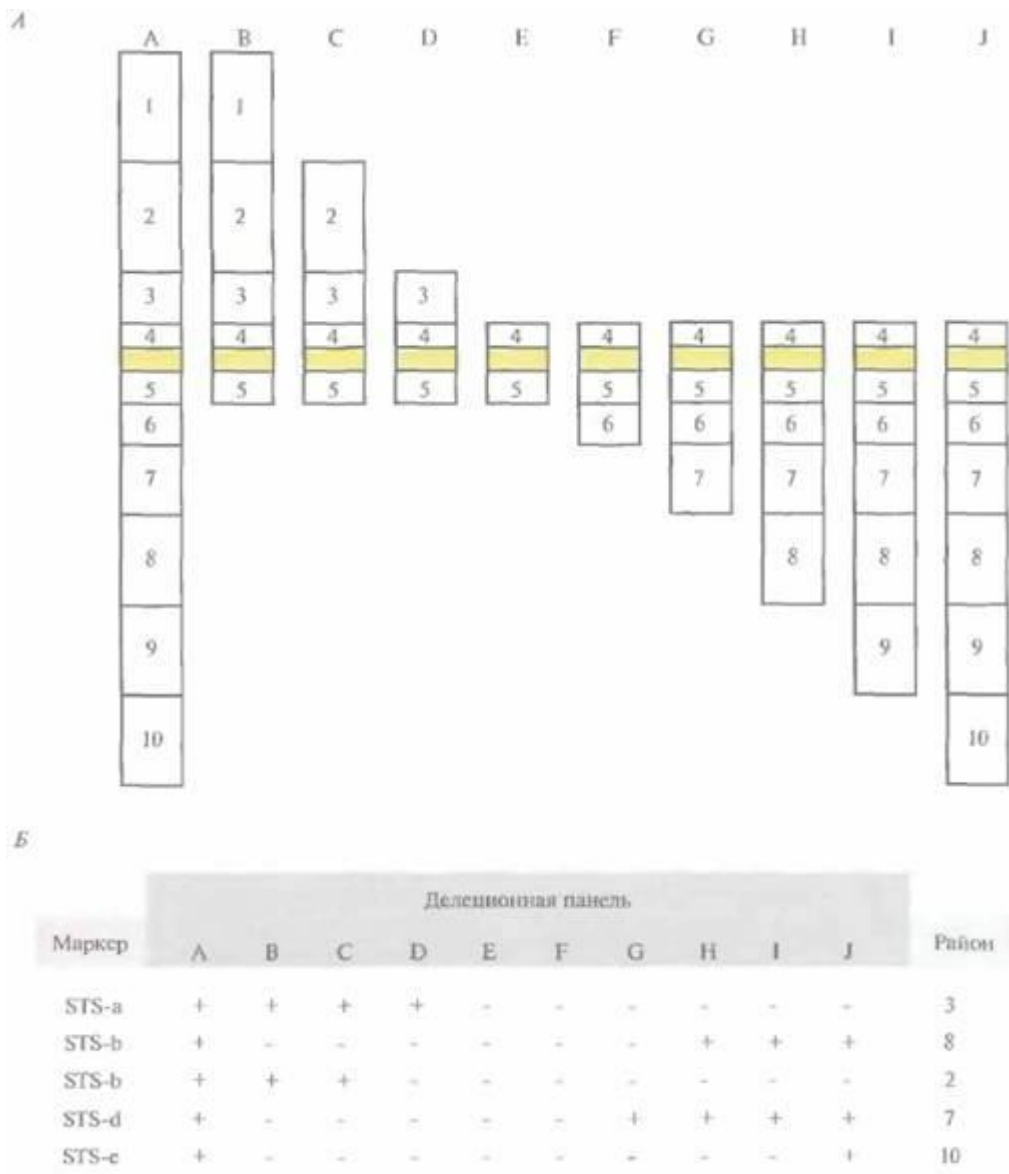


Рис. 20.21. Привязка маркера к специфическому хромосомному району с использованием делеционной панели гибридных клеток. *А*. Схематическое представление районов хромосомы, присутствующих в монохромосомном клеточном гибриде (А) и в клеточных линиях В—J делеционной панели гибридных клеток. Районы (с 1 по 10) определяются границами дел еци и в хромосомах делеционной панели. Закрашенный прямоугольник - центромера каждой хромосомы. *Б*. Результаты ПЦР-амплификации ДНК гибридных клеточных линий (А— J) с использованием STS-маркеров (с STS-a по STS-e). Наличие или отсутствие ПЦР-продукта указано знаком плюс или минус соответственно. Данные о наличии или отсутствии ПЦР-продуктов клеточных линий делеционной панели с STS-маркером используются для определения хромосомного района, в котором находится STS. Например, STS-d отнесен к району 7, поскольку соответствующий ПЦР-продукт образуется при амплификации каждой клеточной линии делеционной панели, в которой присутствует район 7.

лабораториях приступили к реализации проекта по частичному секвенированию клонов кДНК-библиотек всех органов и тканей человека. Одной из задач этой программы является создание каталога коротких последовательностей (150—300 нуклеотидов) для каждого экспрессируемого гена человека. Такие короткие кодирующие последовательности называют маркерными экспрессируемыми последовательностями (EST, *от англ.* expressed sequence tags). С их помощью можно изучать размеры, разнообразие и транскрипционную активность экспрессирующихся генов человека. Более того, на основе EST можно создавать STS и использовать их для картирования и отбора геномных клонов, содержащих данный ген.

Частичное секвенирование кДНК-клонов и обработка полученных данных полностью автоматизированы. Каждую новую EST сравнивают с теми, которые уже были секвенированы, и если последовательность действительно является новой, ее вносят в базу данных по EST. Для поиска гомологии EST с известными генами или семействами генов и для определения категории, к которой относится функция представляемого ей гена, проводят дополнительные сравнения. К 1995 г. было идентифицировано примерно 300 000 EST из 300 кДНК-библиотек 37 органов и тканей. Примерно 90 000 EST представляют собой различающиеся экспрессирующиеся последовательности человека, из них примерно 10 000 соответствуют генам, роль которых в клетке известна, а остальные 80 000 — еще неоткрытым генам.

## Клонирование генов заболеваний человека

Как правило, ген конкретного заболевания человека нельзя клонировать, руководствуясь каким-то заранее составленным набором экспериментальных протоколов. Выбор имеющихся в распоряжении исследователя методов и средств зависит от конкретных условий. Начало поиска гена заболевания определяется имеющейся информацией о продукте данного гена. В одних случаях генный продукт бывает хорошо известен, в других можно лишь догадываться, что он собой представляет. Наконец, для многих наследственных заболеваний природа генного продукта вообще неизвестна. Для каждого из этих случаев разработана своя стратегия. В целом для поиска гена заболевания существует четыре подхода: функциональное, кандидатное, позиционное и позиционно-кандидатное картирование. Независимо от применяемого подхода утверждать, что данный ген ассоциирован с интересующим исследователя заболеванием, можно лишь после того, как у больных обнаружены нуклеотидные изменения в гене, не встречающиеся в том же гене у здоровых индивидов.

## Выявление мутаций в генах человека

Для выявления мутаций разработан целый ряд простых и недорогих подходов, таких как анализ конформационного полиморфизма одноцепочечной ДНК (SSCP, single-strand conformational polymorphism), градиентный гель-электрофорез в денатурирующих условиях (DGGE, denaturing gradient gel electrophoresis), гетеродуплексный анализ (HA, heteroduplex analysis), химическое расщепление некомплементарных сайтов (CMC, chemical mismatch cleavage), тест на укороченный белок (PTT, protein truncation test).

Наиболее широко среди перечисленных подходов применяется SSCP. Суть метода состоит в следующем. Как можно большее (по возможности все) число экзонов исследуемого гена по отдельности амплифицируют методом ПЦР, используя в качестве матрицы ДНК больных и здоровых индивидов. Каждая пара праймеров выбирается из последовательностей, фланкирующих экзон, или из его концевых участков. Кроме того, используя данные секвенирования, выбирают праймеры для амплификации 5'-области, предшествующей первому экзону гена, 3'-области, следующей за последним экзоном, и участков, содержащих сайты сплайсинга.

ПЦР-продукты каждой реакции денатурируют, быстро охлаждают и разделяют с помощью электрофореза. Благодаря внутри цепочечному спариванию комплементарных оснований и образованию других связей денатурированная одноцепочечная молекула ДНК принимает определенную трехмерную конформацию, зависящую от ее нуклеотидной последовательности. Вследствие комплементарности две цепи одной молекулы ДНК имеют разную нуклеотидную после-

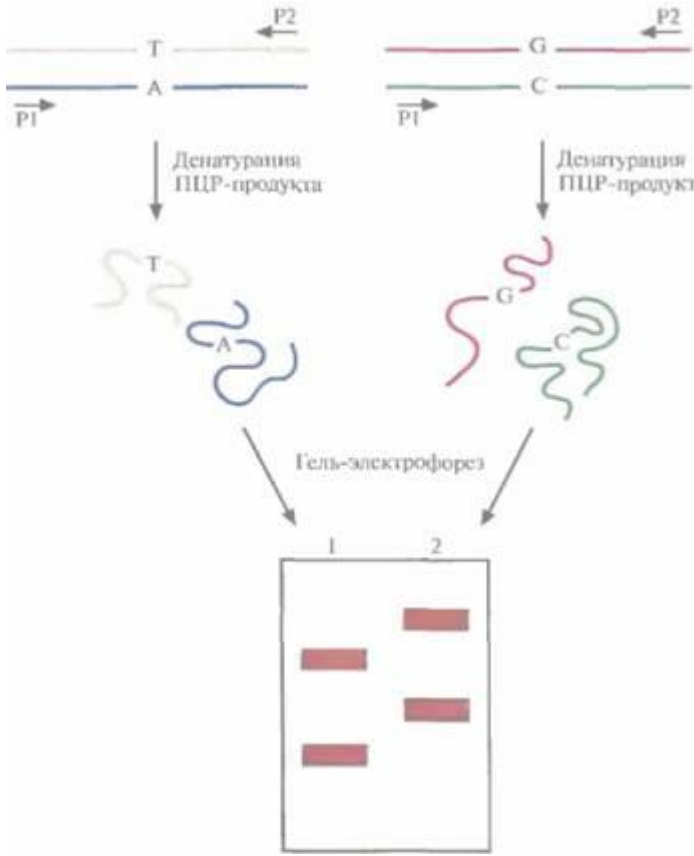


Рис. 20.22. Анализ конформационного полиморфизма одноцепочечной ДНК (SSCP). Препараты ДНК, различающихся одной парой нуклеотидов (А:Т<--> G:С), амплифицируют ПЦР-методом с использованием одинаковых праймеров (Р1 , Р2). ПЦР-продукты денатурируют и разделяют с помощью гель-электрофореза на двух дорожках (1,2). Расстояние, на которое перемещается одноцепочечная молекула ДНК, зависит от ее конформации, а последняя, в свою очередь, — от нуклеотидной последовательности. Даже если ДНК различаются лишь одним нуклеотидным сайтом, одиночные цепи могут иметь разную конформацию, а следовательно, ПЦР-продукты образуют в геле не две, а четыре полосы.

довательность, а поэтому принимают разную трехмерную конформацию и мигрируют при гель-электрофорезе с разной скоростью. В результате после разделения в геле наблюдаются две полосы, отвечающие разным комплементарным цепям. Если две молекулы ДНК, представляющие один и тот же участок гена, но полученные из разных источников, различаются одной парой нуклеотидов, то с большой вероятностью конформации одиночных цепей таких молекул ДНК будут различаться. Другими словами, каждая из четырех цепей будет перемещаться при гель-электрофорезе со своей скоростью (рис. 20,22). С помощью метода SSCP можно лишь локализовать нуклеотидные изменения в определенном экзоне или специфической области гена, но не определить природу мутации; такую информацию может дать лишь секвенирование. Метод SSCP имеет свои ограничения: он выявляет около 90% однонуклеотидных изменений в ПЦР-продуктах длиной не более 200 п. н.

**Функциональное картирование**

Функциональное картирование гена начинается с определения аминокислотной последовательности белка с известной функцией, что позволяет реконструировать нуклеотидную последовательность кодирующей области соответствующего гена (гена-мишени). Основываясь на этих данных, синтезируют олигонуклеотидные зонды и проводят скрининг кДНК-библиотеки, полученной для ткани, в которой данный белок присутствует в большом количестве. Если можно получить очищенную мРНК, с которой транслируется данный белок, то на ней как на матрице можно синтезировать полноразмерную кДНК и клонировать ее. Правильность выбора или синтеза кДНК-клона проверяют секвенированием.

Хромосомную локализацию гена-мишени определяют методом гибридизации in situ с кДНК-клоном или выбранным с его помощью геномным клоном. Для более точной локализации



гена-мишени можно также провести скрининг панели монохромосомных клеточных гибридов, а затем и соответствующей делеционной панели при помощи кДНК-клона или отобранного геномного клона.

Затем для определения клонов, гибридизующихся с данным кДНК-клоном, проводят скрининг космидного контига, охватывающего хромосомный район, в котором локализован ген-мишень. Отобранные геномные клоны секвенируют и, используя данные о нуклеотидной последовательности кДНК, идентифицируют экзоны, интроны и 5'-, 3'-фланкирующие последовательности гена. В отсутствие космидного контига, охватывающего район нужной хромосомы, который содержит ген-мишень, выделяют клон с крупной вставкой, содержащей данный район, при помощи кДНК- или геномного зонда. Из клона с крупной вставкой получают субклоны с небольшими вставками, и проводят их скрининг при помощи кДНК-зонда. Позитивные клоны секвенируют и характеризуют ген-мишень (рис. 20.23).



Рис. 20.23. Функциональное картирование. Идентификация гена для случая, когда известна аминокислотная последовательность его продукта.



Рис. 20.24. Кандидатное картирование. Идентификация гена, основанная на анализе симптомов обусловленного им заболевания и соображений, какой из уже охарактеризованных генов может претендовать на роль искомого гена.

**Кандидатное картирование**

Хотя этот подход не очень эффективен при картировании генов человека, в ряде случаев он может оказаться весьма полезным. Суть метода состоит в следующем. Анализируют симптомы генетического заболевания и на их основе пытаются понять, какого типа белок может быть с ним ассоциирован. Затем просматривают нуклеотидные последовательности всех клонированных на настоящий момент генов и выбирают ген(ы)-кандидат(ы). Основываясь на нуклеотидной последовательности гена-кандидата, вырабатывают стратегию поиска мутаций и с ее помощью пытаются установить, является ли ген-кандидат искомым геном (рис. 20.24). Принимая во внимание, что геном человека содержит очень большое число генов, а охарактеризованы лишь некоторые из них, не стоит удивляться, что правильный выбор гена случается не так уж часто. Но ценен и отрицательный результат, поскольку он позволяет исключить данный ген из числа ответственных за конкретное генетическое заболевание.

**Позиционное картирование**

Стратегия позиционного картирования применяется в тех случаях, когда ничего не известно о продукте гена, ответственного за наследствен-



ное заболевание, и нет никаких генов-кандидатов (рис. 20.25). В подобных случаях определяют хромосомную локализацию (позицию) гена заболевания и проводят его поиск, применяя различные инструменты и средства («охота за геном»). Благоприятной для позиционного картирования является ситуация, когда у нескольких больных встречается хромосомная перестройка типа транслокации или крупной делеции ( $> 10$  т. п. н.). Предположив, что она затрагивает ген, ответственный за патологический фенотип, при анализе сцепления используют только один специфический район хромосомы вместо того, чтобы проводить сканирование всего генома при помощи большого числа полиморфных маркеров. После локализации гена в конкретном районе хромосомы определяют его положение более точно и идентифицируют ближайшие фланкирующие маркеры, используя мультилокусное картирование с дополнительными полиморфными зондами. Минимальное расстояние между картированными маркерными сайтами, при котором их можно разграничить, в лучшем случае составляет 1 сМ, что соответствует примерно  $10^6$  п. н. На таком участке может уместиться в среднем от 20 до 50 генов. Задача позиционного картирования состоит в том, чтобы определить, какой именно из них ответствен за данное заболевание.

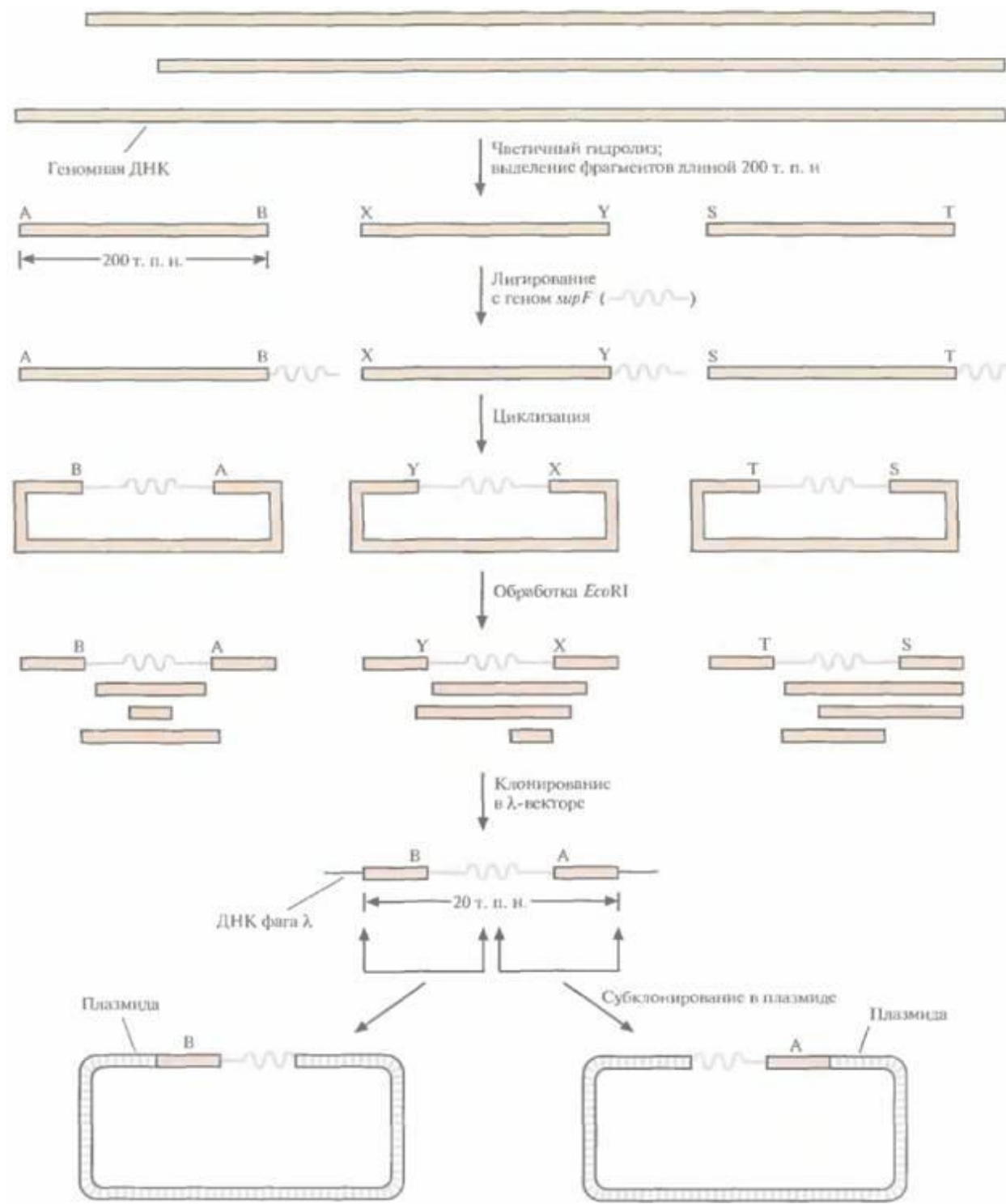


Рис. 20.25. Позиционное картирование. Идентификация гена, продукт которого неизвестен, с помощью хромосомного картирования и зондов, специфичных в отношении тесно сцепленных маркеров.

Из контига, охватывающего район хромосомы, содержащий ген заболевания, выбирают геномные клоны, которые включают фланкирующие маркеры и заключенный между ними участок ДНК. Если такой контиг отсутствует, то с помощью зондов, специфичных в отношении тесно сцепленных маркерных сайтов, проводят скрининг библиотек геномных ДНК для выявления клонов, происходящих из того района, который содержит искомый ген. Между 1986 и 1990 гг., когда метод «охоты за генами» человека еще только разрабатывался, для идентификации нужных геномных клонов использовали метод «прыжков по хромосоме» (рис. 20.26) или метод «прогулки по хромосоме» (рис. 20.27). После создания геномных библиотек, содержащих крупные фрагменты ДНК человека, и контигов эти стратегии утратили свою актуальность.

Независимо от того, как именно получены нужные геномные клоны, важно знать, какие из

Рис. 20.26. Создание библиотеки методом «прыжков по хромосоме». Проводят частичный гидролиз геномной ДНК рестриктазой, делающей небольшое число разрывов, и выделяют фрагменты длиной примерно 200 т. п. н. Сшивают их с геном *supF* (~7 т. п. н.) и замыкают в кольцо. Буквами А и В, Х и Y, S и Т обозначены сайты, исходно находящиеся друг от друга на расстоянии 200 т. п. н., но после циклизации фрагментов разделенные 7 т. п. н. Кольцевые молекулы, содержащие множество сайтов для *EcoRI*, обрабатывают этой рестриктазой, в результате чего среди прочих образуются фрагменты, содержащие ген *supF* и фланкирующие его последовательности (А и В; Х и Y; S и Т). Из всех фрагментов отбирают лишь те, длина которых составляет примерно 20 т. п. н., и встраивают их в вектор на основе фага  $\lambda$ . Векторы, несущие ген *supF*, будут амплифицироваться в *SupF*<sup>-</sup>-клетках-хозяевах. Идентифицируют клон, гибридизующийся с зондом, специфичным в отношении исходной последовательности (А, Х, S), затем субклонируют его; при этом та его часть, которая не гибридизуется с зондом, содержит участок ДНК (В, Y, Т), находящийся на расстоянии 200 т. п. н. от исходной последовательности.



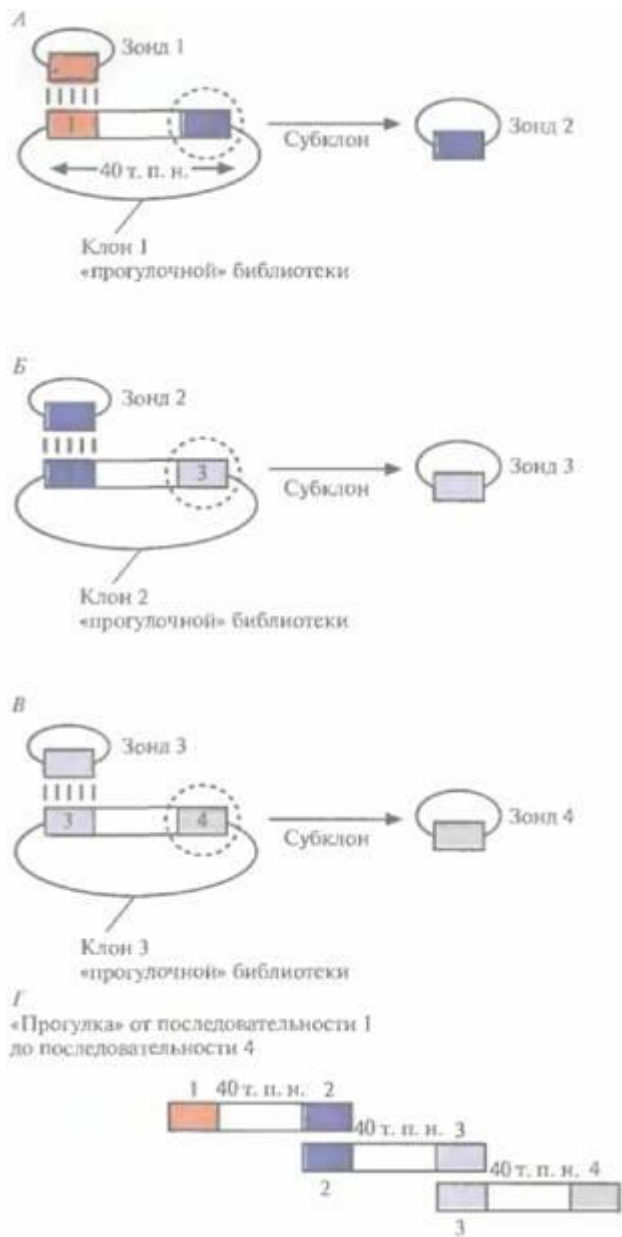


Рис. 20.27. «Прогулка по хромосоме». *А.* Зонд 1 гибридизуют с клонированным фрагментом ДНК длиной 40 т.п.н. После субклонирования и построения рестрикционной карты последовательность, дистальную по отношению к гибридизовавшейся, используют для создания зонда 2, *Б.* При помощи зонда 2 из библиотеки выбирают другой клон (отличный от клона 1) и используют последовательность, дистальную по отношению к гибридизовавшейся с ним, для создания зонда 3. Клоны 1 и 2 вместе составляют примерно 80 т.п.н. (за вычетом перекрывающегося участка — зонд 2 — между ними), *В.* Проводят манипуляции, аналогичные *А* и *Б*, используя зонд 3. Третий клон «прогулочной» библиотеки позволяет продвинуться по хромосоме еще на 40 т. п. н. *Г.* Три перекрывающихся фрагмента ДНК охватывают примерно 120 т. п. н. хромосомной ДНК. «Прогулку» по хромосоме можно совершать в двух направлениях, руководствуясь при этом рестрикционной картой.

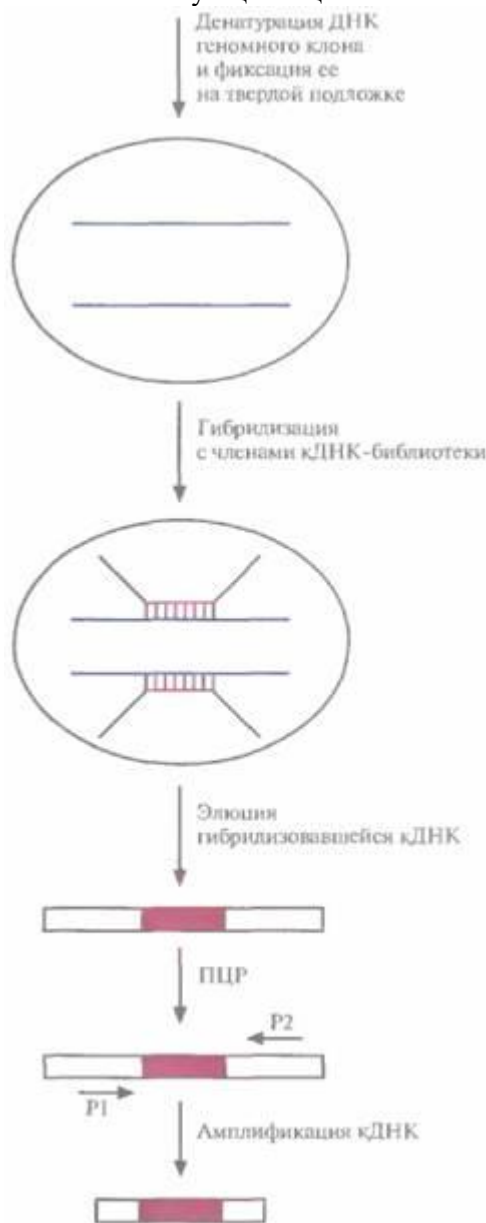
них или из субклонов содержат экзоны. Для этого можно использовать целый ряд прямых и косвенных методов, таких как идентификация CpG-островков, межвидовой Саузерн-блоттинг, отбор гибридов, улавливание экзонов, секвенирование ДНК, компьютерный поиск.

Транскрибируемым участкам геномов позвоночных часто предшествуют кластеры нуклеотидов, богатые остатками С и G (CpG-островки). Группу CpG-островков можно идентифицировать по скоплению на рестрикционной карте сайтов для рестрицирующих эндонуклеаз *EagI*, *BssII* и *SacII*. Если как минимум два таких сайта отделены 5—10 т. п. н. друг от друга, значит, они находятся в пределах CpG-островка. Это не гарантирует, что именно здесь находится экзон, но указывает на наличие где-то поблизости транскрибируемого гена.

Геномные клоны или субклоны можно гибридизовать по Саузерну с рестрицированной геномной ДНК различных позвоночных, например с ДНК мыши, крысы, кролика, обезьяны, коровы, цыпленка, рыбы (зооблот, межвидовой блоттинг, блоттинг «Ноев ковчег»). Положительная перекрестная гибридизация означает, что данный клон с большой вероятностью содержит кодирующие последовательности, поскольку многие экзоны в ходе эволюции не изменялись, в то время как повторяющиеся и некодирующие последовательности ДНК, в том числе и интроны, претерпели существенные изменения. Положительный зооблот означает, что клон содержит экзон(ы), однако не показывает, есть ли в нем ген искомого заболевания.

Отбор гибридов позволяет быстро и с высокой эффективностью идентифицировать геномный клон, содержащий экзон(ы), и одновременно изолировать соответствующую кДНК. Отбор можно проводить разными способами. Обычно ДНК геномного клона из той области хромосомы, которая содержит ген заболевания, фиксируют на твердой подложке, проводят пре-гибридизацию с повторяющимися последовательностями ДНК, а затем гибридизуют с линейными векторными молекулами со вставками из кДНК-библиотеки, происходящей из ткани, вероятнее всего экспрессирующей ген-мишень. Нсгибридовавшиеся векторные молекулы смывают с фильтра, а гибридизовавшиеся элюируют и амплифицируют методом ПЦР, используя праймеры из векторных последовательностей, фланкирующих кДНК-вставку (рис. 20.28). Если точно неизвестно, в какой ткани экспрессируется ген-мишень, то кДНК-библиотеки разных тканей объединяют и проводят гибридизацию с отдельными геномными клонами. ПЦР-продукт можно затем клонировать и тестировать, с тем чтобы проверить, содержит ли он кодирующую часть гена данного заболевания. Для этого можно секвенировать кДНК и провести компьютерное сравнение нуклеотидных последовательностей этой ДНК и известных генов. Если будет получена высокая степень гомологии, можно сделать определенные выводы о том, какого типа белок кодирует данная кДНК, и если этот белок таков, что его с высокой вероятностью можно считать продуктом гена-мишени, то данный(е) клон(ы) секвенируют и идентифицируют экзоны, интроны и 5'-, 3'-фланкирующие области. Альтернативный подход состоит в поиске мутаций с целью выявления нуклеотидных различий между ДНК

Рис. 20.28. Отбор гибридов. Гибридизацией с ДНК геномного клона «отлавливают» кДНК-клон, амплифицируют его, клонируют и тестируют.



больных и здоровых индивидов. Если подход, основанный на определении степени гомологии нуклеотидных последовательностей, оказывается безуспешным, то секвенируют и анализируют другие гены из данной области. Реально при поиске гена-мишени для экономии времени и средств характеризуют в первом приближении сразу несколько генов, пока не найдут наиболее вероятный ген-кандидат, который исследуют детально, в том числе с помощью мутационного анализа.

Улавливание экзонов («поимка» экзонов, экзонная амплификация) — это метод, позволяющий идентифицировать и клонировать экзоны, находящиеся в субклонах, полученных из геномных клонов (рис. 20.29). Его суть состоит в

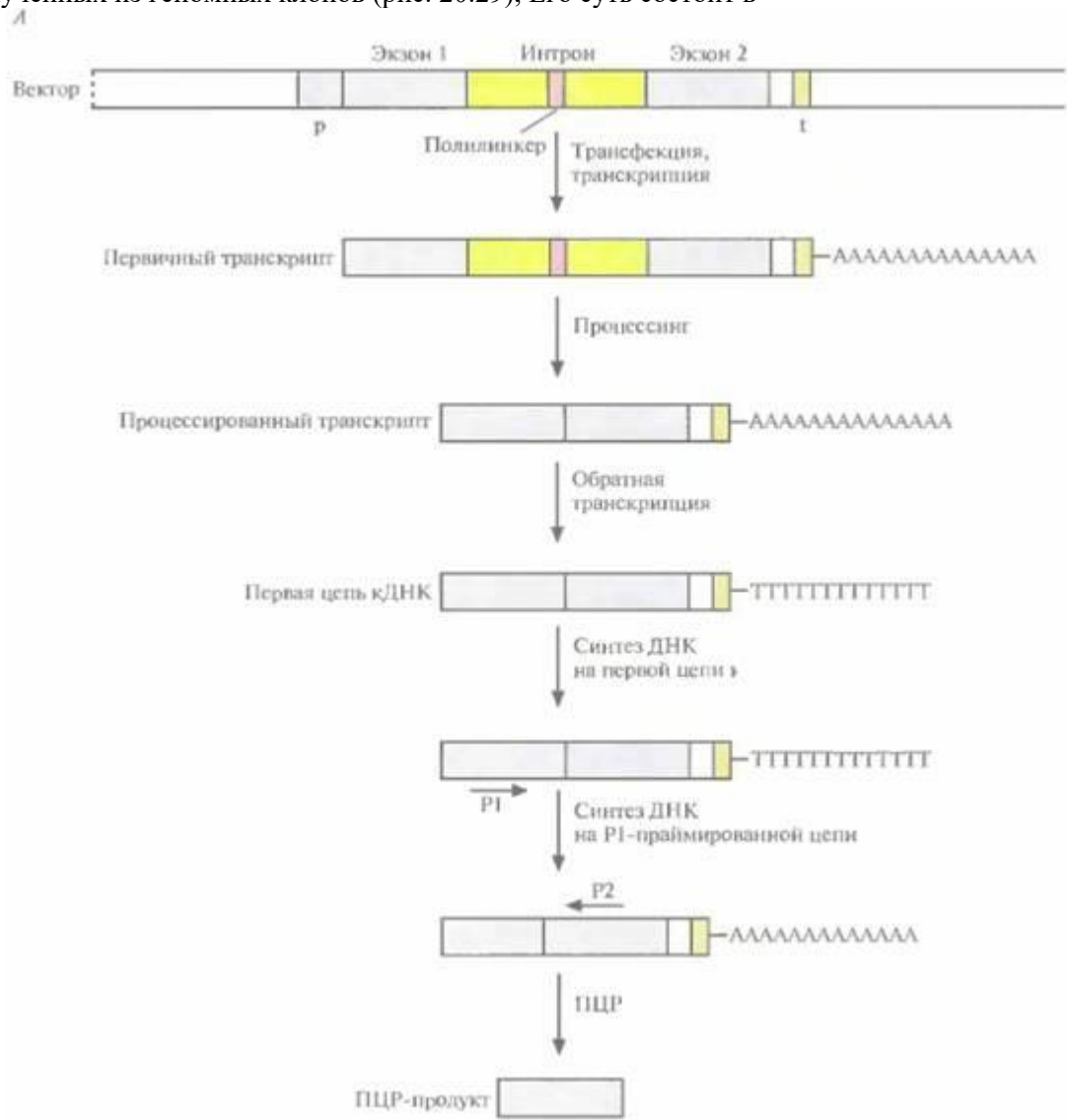


Рис. 20.29. Улавливание экзонов. А. Вектор для улавливания экзонов содержит искусственный ген, состоящий из промотора р, двух экзонов, разделенных интроном, который несет полилинкер, и сайта терминации транскрипции t. После введения вектора в эукариотическую клетку искусственный ген транскрибируется и из первичного транскрипта удаляется интрон. Для получения ПЦР-продукта определенной длины, который содержит часть обоих экзонов, используют ПЦР-амплификацию обратного транскрипта.

следующем. ДНК геномного клона расщепляют так, чтобы получить фрагменты длиной 1-6 т. п. н., и клонируют эти фрагменты в специально сконструированном векторе. Сайт множественного клонирования (полилинкер) вектора расположен внутри интрона, фланкированного двумя экзонами (экзон I и экзон 2). Этот искусственный ген (экзон 1—интрон—экзон 2) находится под контролем сильного эукариотического промотора и может реплицироваться в *E. coli* или в культуре клеток млекопитающих. После введения (трансфекции) вектора без вставки в клетку млекопитающего происходит транскрипция искусственного гена и удаление интрона из пер-

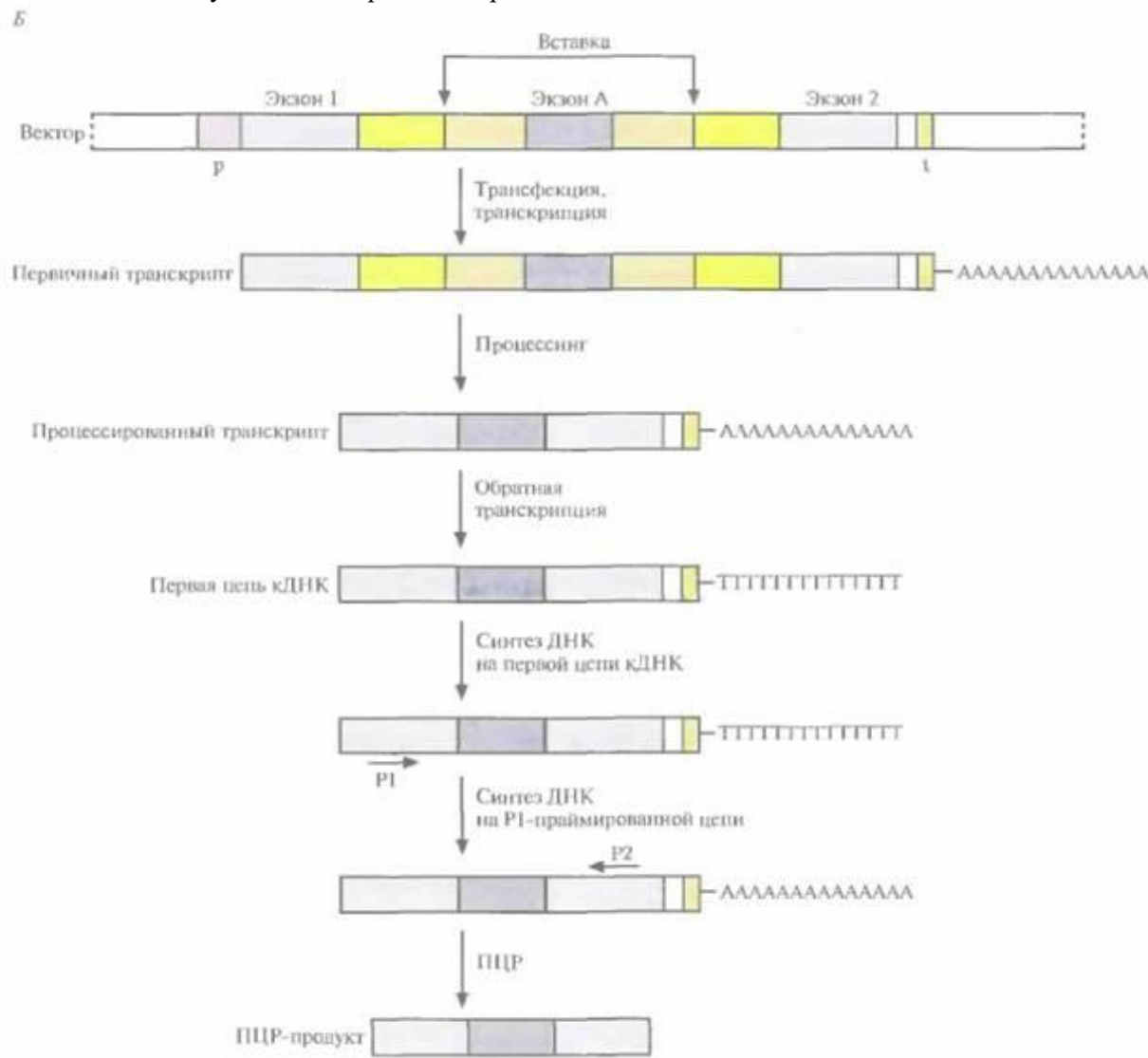


Рис. 20.29. (Продолжение) Б. В полилинкер вектора для улавливания экзонов встроен фрагмент ДНК человека, и эта конструкция введена в эукариотическую клетку (трансфекция). В данном случае экзон содержит функциональные акцепторный и донорный сайты сплайсинга. При процессинге первичного транскрипта удаляются интроны, фланкирующие экзон А, и он оказывается между экзонами 1 и 2. Длина ПЦР-продукта обратного транскрипта показывает, «пойман» ли искомый экзон между экзонами 1 и 2 и, следовательно, содержит ли его данная вставка.



винного транскрипта. Процессированную РНК (экзон 1 —экзон 2) можно выявить, проведя ПЦР-амплификацию обратного транскрипта. Сначала с помощью обратной транскриптазы на мРНК синтезируют ДНК (синтез первой цепи). Вторую цепь синтезируют при участии праймера, комплементарного части экзона 1 первой цепи. Затем в реакционную смесь добавляют второй праймер, комплементарный части экзона 2 второй цепи ДНК, и проводят ПЦР-амплификацию. Длину ПЦР-продукта определяют с помощью гель-электрофореза.

Если в вектор встроить рестрикционный фрагмент, содержащий некий экзон А и фланкирующие его интроны, то после трансфекции процессированный транскрипт будет содержать три экзона: экзон 1—экзон А—экзон 2. Длина ПЦР-продукта будет больше, чем в тех случаях, когда в векторе нет вставки, когда вставка содержит экзон без функциональных сайтов сплайсинга (донорного и акцепторного) или когда вставка вообще не содержит экзона. Если во вставке присутствует более одного экзона, каждый из которых имеет функциональные сайты сплайсинга, то процессированный транскрипт будет содержать все эти экзоны.

В том случае, если в каждом праймере содержатся рестрикционные сайты, клонируют ПЦР-продукт, несущий «пойманный» экзон, и используют последний в качестве зонда для скрининга кДНК-библиотеки. Зная нуклеотидную последовательность «пойманного» экзона, предпринимают поиск гомологичных ему последовательностей в базе данных. Если есть основания полагать, что «пойманный» экзон с большой вероятностью является частью гена данного заболевания, то характеризуют и секвенируют геномные клоны, охватывающие место расположения данного гена, и исследуют образцы ДНК больных и здоровых индивидов с целью выявления мутаций. Поскольку мутации, ответственные за патологию, не всегда бывают равномерно распределены по всем экзонам, чем больше размер сканированной кодирующей области предполагаемого гена, тем больше вероятность обнаружения мутации.

Для идентификации экзонов используют различные компьютерные программы, например GRAIL (Gene Recognition and Analysis Internet Line). Они созданы исходя из некоторых характерных для экзона особенностей. Одна из них — ожидаемая нуклеотидная последовательность кодирующей области. Если лаборатория оснащена оборудованием для широкомасштабного секвенирования, можно секвенировать геномные клоны, охватывающие область расположения искомого гена, и провести компьютерную обработку полученных данных с целью выявления экзонов. Нуклеотидную последовательность предполагаемого экзона можно использовать для поиска гомологичных ей последовательностей в генной базе данных или синтезировать на ее основе олигонуклеотидный зонд для скрининга кДНК-библиотеки. Наконец, как и в случае других методов идентификации экзонов в геномных клонах, необходимо доказать, что предполагаемый экзон является частью гена-мишени.

Реализация любого проекта по позиционному картированию гена занимает много времени. За период с 1986 по 1995 г, с помощью данного подхода удалось обнаружить более 50 генов различных заболеваний человека, что можно считать большим достижением. Иногда поиск гена занимает 1—2 года, в то же время для обнаружения гена хорей Гентингтона консорциуму из нескольких исследовательских лабораторий потребовалось 10 лет. Отметим, что с клонированием все новых и новых генов и построением транскрипционных карт с высоким разрешением позиционное картирование постепенно уступает место позиционно-кандидатному.

### *Позиционно-кандидатное картирование*

Позиционно-кандидатное картирование состоит в определении хромосомной локализации гена болезни, продукт которого неизвестен, и последующем анализе современных генетических и транскрипционных карт, с тем чтобы выявить кодирующие последовательности (гены, внутригенные EST), находящиеся в этом же районе (рис. 20.30). Весьма вероятно, что одна из этих последовательностей и окажется геном данного заболевания. Если какой-либо из генов-кандидатов охарактеризован, можно провести его мутационный анализ. Как альтернативу можно использовать «кандидатные» EST в качестве зондов, отобрать с их помощью геномный клон и секвенировать его, а затем также провести му-



Рис. 20.30. Позиционно-кандидатное картирование. Идентификация гена заболевания в том случае, когда продукт гена неизвестен, но ген картирован в том же хромосомном районе, что и некоторые функциональные гены и EST. Из этих генов и EST отбирают "кандидатные" и определяют, какие из них соответствуют искомому гену.

тационный анализ. По мере детализации физических и транскрипционных карт позиционно-кандидатное картирование становится все более популярным при поиске генов различных заболеваний человека.

### Программа «Геном человека»

Работа над реализацией программы «Геном человека» (HGP, Human Genome Project) официально началась 1 октября 1990 г. в США и контролирует ее Министерство энергетики (Department of Energy) совместно с Государственными институтами здоровья (National Institutes of Health) США. Ее конечная цель состоит в определении нуклеотидной последовательности всего генома человека. Полученная обширная генетическая информация станет основой для более узких проектов исследования всех моногенных генетических заболеваний и послужит трамплином для изучения сложных наследственных патологий. В 1990 г. предполагалось, что работа в рамках HGP займет 15 лет, а ее стоимость составит

2 млрд. долл. За короткое время программа стала международной, ее проекты финансируются правительствами Великобритании, Франции, Канады, Германии и Японии. В настоящее время происходит кооперация и координация усилий многих государственных и межгосударственных агентств, частных компаний и некоммерческих исследовательских институтов. HGP - обширная программа, охватывающая множество различных направлений.

Та часть программы «Геном человека», которая выполняется в США, включает следующие подпрограммы: построение генетических и физических карт с высоким разрешением; снижение себестоимости и повышение эффективности крупномасштабного секвенирования ДНК; разработка новых технологий картирования генов и секвенирования ДНК; усовершенствование компьютерных технологий для обработки и хранения больших массивов данных; изучение этического, правового и социального аспектов исследований, проводимых в рамках программы. Цель последней подпрограммы состоит в создании руководств для исследователей и врачей и обосновании политики правительства, касающейся использования генетической информации. В рамках подпрограммы «Новые технологии» консорциумом нескольких групп исследователей был полностью секвенирован геном дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (150 т. п. н.). Кроме того, определены полные пуклеотидные последовательности ДНК других «модельных» организмов, таких как нематоды (*Caenorhabditis elegans*, 100 м. п. н.), плодовая мушка (*Drosophila melanogaster*, 120 м. п. н.), бактерии (*E. coli*, 4,2 т. п. н.), мышь (*Mus musculus*, 3000 м. п. н.).

Некоторые из намеченных на период 1990—1995 гг. задач той части HGP, которая выполняется в США, в 1993 г. были пересмотрены; это связано с быстрым прогрессом в генетическом картировании благодаря внедрению микросателлитных полиморфных маркеров и построению практически полных физических карт. К 1996 г. удалось решить несколько вновь поставленных задач. Например, в 1994 г. была опубликована карта (генетического) сцепления человека, которая содержала 5826 локусов, охватывающих 4000 сМ. Хотя только для 908 локусов шансы сцепления составили больше 1000:1, ко-

нечная плотность маркеров равнялась 0,7 сМ (4000 сМ/5826 локусов), что больше ожидаемой в 1995 г. плотности карты 2-5 сМ. К 1996 г. было запланировано построение физической карты, основанной на STS, с разрешением 300 т. п. н., то есть один STS-сайт должен был приходиться на каждые 300 т. п. н. ДНК человека. Однако уже в 1995 г. была построена полная физическая карта с разрешением 200 т. п. н.

Успехи в оптимизации технологии секвенирования ДНК вполне ощутимы, но не столь эффективны. Стоимость секвенирования пары оснований снизилась с 5 долл. США в 1990 г. до 0,3 долл. в 1996 г. Скорость секвенирования возросла с 10 000 оснований в день в 1990 г. до 50 000 в 1996 г. К 1998 г. предполагается секвенировать 80 м. п. н., или 2,5%, генома человека. Если не произойдет никаких кардинальных изменений, то при помощи «фабрики» из 30 автоматических секвенаторов, работающих круглые сутки, и полного набора физических карт космидных клонов можно будет секвенировать примерно 3000 м. п. н. ДНК за 6 лет, потратив на это - 900 млн. долл. США. Какие-то время и средства придется потратить еще на проверку ошибок и получение окончательной последовательности. Однако, прежде чем приступить к реализации столь крупномасштабного проекта, ученые пытаются добиться значительного повышения скорости секвенирования при помощи автоматических флуоресцентных секвенаторов, в которых используется метод Сэнгера. Кроме того, предпринимаются поиски других способов быстрого секвенирования ДНК.

Чтобы регулировать работу над различными аспектами всей программы, HGP распределяет финансы между разными исследовательскими группами. В большинстве случаев ответственность за создание генетических и физических карт конкретной хромосомы делят между собой крупные центры и небольшие лаборатории, которые сотрудничают друг с другом. Некоторые из наиболее крупных исследовательских институтов занимаются укомплектованием данных о генетических и физических картах генома. В результате молекулярно-генетических исследований генома человека появляется огромное количество новых данных о полиморфных зондах, STS-клонах, содержании генетических, физических и объединенных карт, рестрикционных фрагментах, геномной дактилоскопии и нуклеотидных последовательностях ДНК. Эти данные необходимо собирать, упорядочивать, хранить, объяснять, сравнивать, объединять и предоставлять другим исследователям как в исходном, так и в окончательном виде. Эффективное использование этой информации было бы невозможно без компьютерного обеспечения, включающего в себя базы данных, системы управления базами данных, алгоритмы математического моделирования и программы автоматизации экспериментов. Область знаний, которая занимается созданием численных методов обработки информации, называется информатикой. Биоинформатика имеет дело с компьютерным анализом и управлением биологической информацией.

В рамках программы HGP, касающейся усовершенствования компьютерных технологий, достигнуты значительные успехи в создании компьютерных программ, позволяющих проводить всестороннюю обработку данных по геному человека. Созданы электронные сайты, где специалисты и общественность могут получить информацию о содержании различных хромосомных карт, включая их полное графическое изображение, о методах исследования генома и программном обеспечении. Например, WWW-сайт Государственного центра по изучению генома человека в США (<http://www.nhgri.nih.gov/index.html>) содержит информацию о программе «Геном человека» и множество ссылок на другие центры, занимающиеся этой проблемой.

С самого начала своего существования HGP должна была решать этические, правовые и социальные проблемы, связанные с картированием и секвенированием генома человека, вырабатывать стратегию, тактику и разрабатывать законопроекты, гарантирующие ответственное использование информации по генетике человека. На самом деле HGP не ставит каких-либо принципиально новых этических, правовых или социальных вопросов, которые не возникали бы при проведении медико-генетических исследований в целом. Однако реализация HGP неизбежно приведет к идентификации большого числа генов различных заболеваний и к определению последовательности многих из них, и эта

информация будет использоваться при разработке ДНК-диагностических тестов.

Здесь возникает множество поводов для беспокойства. Не будет ли генетическая информация использоваться для дискриминации людей при медицинском страховании, приеме на работу или иммиграции? Не приведет ли ее доступность к социальному неравенству? Все ли меры приняты, чтобы сохранить конфиденциальность персональной генетической информации? Как найти баланс между нуждами личности и общества? Обладают ли частнопрактикующие врачи и врачи, работающие в клиниках, достаточными знаниями по медицинской генетике, чтобы они могли разъяснить пациентам смысл конкретного генетического теста? Сможет ли генетическое консультирование уменьшить обеспокоенность обратившегося? Не скажется ли отрицательно доступность генетической информации на семейных отношениях? Можно ли надеяться на то, что удастся получить согласие на проведение диагностического теста у достаточно осведомленного пациента? Следует ли предлагать тестирование в том случае, когда данное наследственное заболевание неизлечимо? Как повысить образовательный уровень населения, чтобы оно понимало значение генетической информации? На эти и многие другие вопросы, возникающие при изучении генетики человека, нет однозначных ответов. В США в рамках подпрограммы по изучению этического, правового и социального аспектов генетических исследований организован целый ряд мероприятий: разработаны обучающие программы, проводятся семинары и выставки для студентов, учителей, врачей, общественности, адвокатов и судей; исследована возможность генетического тестирования муковисцидоза и наследственных форм рака молочной железы, яичников и толстой кишки, созданы две комиссии (по генетической информации и страхованию; по генетическому тестированию) для исчерпывающего изучения конкретных вопросов; разрабатываются предложения для выработки федеральных законов США, которые обеспечивали бы конфиденциальность генетической информации, получаемой при идентификации личности.

На основе этой программы и других исследований были сформулированы пять основных принципов, которыми следует руководствоваться при использовании генетической информации и в работе генетических консультаций: право на автономию, конфиденциальность, справедливость, беспристрастность и качество. Концепция права на автономию в данном случае означает необходимость соблюдения прав человека, обращающегося в генетическую консультацию. Например, генетическое тестирование должно проводиться добровольно и только после того, как пациент в достаточной степени информирован; тестированию должны подвергаться лишь лица, относящиеся к группе риска; тестируемые должны сами решать, будут ли они знакомиться с результатами теста. Консультируемые должны быть хорошо осведомлены о всех особенностях теста: его прогностической ценности, медицинских аспектах, характере терапии, если она возможна.

Обычно считается, что генетическая информация отличается от других видов личностной информации, поэтому необходимо предусмотреть особые меры предосторожности, гарантирующие ее конфиденциальность. Справедливость и беспристрастность -- это довольно близкие понятия. Достигнуто соглашение, что генетическое консультирование должно быть доступно всем, кто в нем нуждается. Как и в случае социальных и медицинских программ, необходимо защитить права умственно неполноценных пациентов и детей. Что касается качества, то тестирование должны проводить высококвалифицированные сотрудники, используя при этом надлежащие методы и средства; все этапы должны соответствующим образом контролироваться, чтобы гарантировать правильность их использования.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучая родословные семей, представленных несколькими поколениями, члены которых имеют четко выраженную патологию, можно определить тип наследования многих генетических заболеваний. Зная характер наследования в семьях, можно установить, является ли данное генетическое заболевание аутосомно-доминантным, аутосомно-рецессивным, X-сцеп-

ленным доминантным или Х-сцепленным рецессивным. В случае Х-сцепленного заболевания его ген расположен на Х-хромосоме, для ау-тосомных болезней хромосомная локализация гена неизвестна. Чтобы картировать ген в специфическом районе хромосомы, можно идентифицировать сцепленные с ним маркерные сайты, используя для этого метод ПДРФ и STRP-картирование. Для оценки сцепления между маркерным сайтом и геном заболевания используют метод максимального правдоподобия. Порядок расположения ПДРФ- и STRP-сайтов на хромосоме определяют при помощи анализа наследования гаплотипов в группе семей, представленных тремя поколениями и имеющих большое количество детей (СЕРН-семей). Кроме того, порядок расположения на хромосоме уникальных сайтов, идентифицируемых при помощи ПЦР (STS), можно проверить картированием с использованием радиационных гибридов. Физические карты хромосом (контиги) строят на основе геномных библиотек, содержащих крупные (YAC, BAC и PAC) и небольшие (космиды, P1 и  $\lambda$ ) фрагменты ДНК человека, используя STS-картирование или другие подходы, в том числе геномную дактилоскопию. Транскрипционные карты состоят из участков кДНК и маркерных экспрессируемых последовательностей (EST), расположенных вдоль хромосомы. Построение генетических, физических и транскрипционных карт облегчает идентификацию и характеристику генов заболеваний.

Аутентичность обнаруженного гена человека можно считать доказанной, если у больных индивидов в нем найдены изменения, отсутствующие в генах здоровых лиц. Для выявления мутаций часто используют анализ конформат шинного полиморфизма одноцепочечной ДНК (SSCP).

Для идентификации нужного гена человека используют четыре метода. В первом из них, функциональном картировании, на основе данных о геномном продукте синтезируют зонды для скрининга кДНК-библиотеки. Положительный кДНК-клон, содержащий кодирующую область гена-мишени, используют для отбора геномных клонов и характеристики гена в целом. Второй подход, кандидатное картирование, основывается на выборе генов, которые по имеющимся данным могут отвечать за данное генетическое заболевание. В этом случае проводят поиск мутаций в генах-кандидатах у больных и здоровых индивидов и по результатам поиска делают вывод, какой из них является геном заболевания. Третий подход, позиционное картирование, применяют в тех случаях, когда ничего не известно ни о возможном гене заболевания, ни о его продукте. Этот подход весьма трудоемок и имеет множество модификаций. Сначала, используя ПДРФ- или STRP-зонды и данные о семьях с исследуемым наследственным заболеванием, определяют район хромосомы, в котором локализован искомый ген. Затем с помощью зондов, специфичных в отношении тесно сцепленных с ним маркеров, выявляют клоны, охватывающие район локализации гена заболевания. Проверяют геномные клоны или полученные из них субклоны на наличие в них экзонов. Используя данные о нуклеотидных последовательностях различных экзонов, в той или иной степени соответствующих нуклеотидной последовательности гена заболевания, разрабатывают стратегию поиска мутаций. Четвертый подход, позиционно-кандидатное картирование, состоит в картировании гена заболевания в определенном районе хромосомы, просмотре функциональных генов и маркерных экспрессируемых последовательностей, локализованных в том же хромосомном районе, и выборе тех из них, которые могут являться искомым геном. Чтобы определить, какой именно из генов-кандидатов является таковым на самом деле, используют мутационный анализ.

«Геном человека» — это широкомасштабная исследовательская программа, конечной целью которой является полное секвенирование генома человека. Различные ее направления включают построение генетических и физических карт всех хромосом человека с высоким разрешением; секвенирование геномов различных модельных организмов типа *E. coli*, *C. elegans*, *S. cerevisiae*, *M. musculus* и *A. thaliana*; создание компьютерных технологий для обработки и анализа данных по генетическому и физическому картированию и секвенированию ДНК; информирование общественности по всем проблемам, связанным с получением и использованием данных по генетике человека, изучение этиче-



ских, правовых и социальных аспектов генетических исследований. На этом пути уже достигнуты впечатляющие успехи, и есть основания полагать, что геном человека будет секвенирован к 2005 г.

## ЛИТЕРАТУРА

- Bellane-Chantelot C., B. Lacroix, F. Ougen, A. Billault, S. Beaufils, S. Bertrand, L. Georges, F. Gilbert, I. Gros, G. Lucotte, L. Susini, J. Codani, P. Gesnouin, S. Pook, G. Vaysseix, J. Lu-Kuo, T. Ried, D. Ward, L. Chumakov,  
 D. Le Pastier, E. Barillot, D. Cohen. 1992. Mapping the whole human genome by fingerprinting yeast artificial chromosomes. *Cell* 70:1059-1068.
- Botstein D., R. L. White, M. Skolnick, R. W. Davis. 1980. Construction of a genetic map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314-331.
- Chumakov L. M., P. Rigault, L. Le Gall, C. Bellane-Chantelot, A. Billault, S. Guillou, P. Soularue,  
 G. Guasconi, E. Poullier, I. Gros, M. Belova, J. Sambucy, P. Gervy, I<sup>1</sup>. Gilbert, S. Beaufils, H. Bui, C. Massart, M. De Tand, F. Dukasz, S. Lecoulant, P. Ougen, V. Perrot, M. Saunier,  
 C. Soravito, R. Bebouaylla, A. Cohen-Akenine,  
 E. Barillot, S. Bertrand, J. Codani, D. Caterina, I. Georges, B. Lacroix, G. Lucotte, M. Sahbatou, C. Schmit, M. Sangouard, E. Tubacher, C. Dib, S. Faure, C. Fizames, G. Gyapay, P. Millasseau, S. Nguyen,  
 D. Muselet, A. Vignal, J. Morissette, J. Mennjnger, J. Lieman, T. Desay, A. Banks, P. Bray-Ward, D. Ward, T. Hudson, S. Gerety, S. Foote, L. Stein, D. C. Page, E. S. Lander, J. Weissenbach, D. Le Paslier, D. Cohen, 1995. A YAC contig map of the human genome. *Nature* (London) 377(Suppl.): 175-297.
- Collins F. S. 1995. Positional cloning moves from perditional to traditional. *Nat. Genet.* 9: 347-350.
- Collins F., D. Galas. 1993. A new five-year plan for the U.S. Human Genome Project. *Science* 262: 43-46.
- Cooperative Human Linkage Center (CH LC): J. C. Murray, K. H. Buetow, J. L. Weber, S. Liihvigsen, T. Schierpbkr-llertdcnia, P. Manion,  
 J. Quillen, V. C. Sheffield, S. Süden, G. M. Duyk; Genethon: J. Weissenbach, G. Gyapay, C. Dib, J. Morissette, G. M. Lathrop, A. Vignal; University nf Utah: R. White, N. IVfatsunami, S. Gerken, R. Mells, H. Albertsen, R. Plaetke, S. Odelberg; Yale University: D. Ward; Centre d'Etude du Polymorphisme Humain (CEPH): J. Dausset, D. Cohen, H. Cann, 1994. A comprehensive human linkage map with centimorgan density. *Science* 265: 2049-2054.
- Cox D. R., M. Burmeister, E. R. Price, S. Kim, R. M. Myers. 1990. Radiation hybrid mapping: a somatic cell genetic method for constructing high-resolution maps of mammalian chromosomes. *Science* 250; 245-250.
- Fickett J, W. 1996, Finding genes by computer: the state of the art. *Trends Genet.* 12: 316-320.
- Green E. D., P. Green. 1991. Sequence-tagged site (STS) content mapping of human chromosomes: theoretical considerations and early experiences. *PCR Methods Appi.* 1: 77-90.
- Grompe M. 1993. The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nat. Genet.* 5: 111-120.
- Guyer M. S., F. S. Collins. 1995. How is the Human Genome Project doing, and what have we learned so far? *Proc. Natl. Acad Sei. USA* 92: 10841-10848.
- Cyapay G., J. Morissette, A. Vignal, C. Dib, C. Fizames, P. Millasseau, S. Marc, G. Bernardi, M. Lathrop, J. Weissenbach, 1994. The 1993—1994 Genethon human genetic linkage map. *Nat. Genet.* 7: 246-287.
- Hudson T. J., L. D. Stein, S. S. Gerety, J. Ma,  
 A. B. Castle, J. Silva, D. K. Slonim, R. Baptista, L. Kruglyak, S. Xu, X. Hu, A. M. E. Colbert, C. Rosenberg, M. P. Peeve-Daly, S. Rozen, L Hui, X. Wu, C. Vestergaan), K. M. Wilson, J. S. Bae, S, Maitra, S. Ganiatsas, C. A. Evans, M. M. DeAngelis, K. A. Ingalls, R. W. Nahf, L. T. Horton, M. O. Anderson, A. J. Collymore, W. Ye, V. Kouyoumjian, I. S. Zemsteva, J. Tarn, R. Devine, D. F. Courtney, M. T, Renaud, H. Nguyen, T. O'Connor, C. Fizames, S. Faure, G. Gyapay, C. Dib, J. Morissette, J. B. Orlin,  
 B. W. Girren, N. Goodman, J. Weissenbach, T. L. Hawkins, S. Foote, D. C. Page, E. S. Lander. 1995. An STS-based map of the human genome. *Science* 270: 1945-1954.



- Knoppers B. M., R. Chadwick. 1994. The Human Genome Project: under an international ethical microscope. *Science* 265: 2035—2036.
- Leppert M., V. E. Anderson, T. Quattlebaum, D. Stauffer, P. O<sup>1</sup> Cornell, Y. Nakamura, J.-M. Lalouel, R. White. 1989. Benign familial neonatal convulsions linked to genetic markers on chromosome 20. *Nature* (London) 337:647-648.
- Ott J. 1992. Analysis of Human Genetic Linkage. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Md.
- Poustka A., T. M. Pohl, D. P. Barlow, A.-M. Frischauf, H. Lehrach. 1987. Construction and use of human chromosome jumping libraries from NotI-digested DNA. *Nature* (London) 325: 353-355.
- Schüler G. D., M. S. Boguski, E. A. Stewart, L. D. Stein, G. Gyapaj, K. Rice, R. F., While, P. Rodriguez-Tomé, A. Aggarwal, E. Bajorek, S. Bentolila, B. И. Birren, A. Butler, A. B. Castle, N. Chiannikulchai, A. Chu,
- C. Clee, S. Cowles, P. J. R. Day, T. Dibling, N. Drouot, I. Dunham, S. Duprat, C East, C. Edwards, J.-B. Fan, N. Fang, C. Fizames, C. Garrett, L. Green,
- D. Hadley, M. Harris, P. Harrison, S. Brady, A. Hfcks, E, HoUoway, L. Hui, S. Hussain, C. Louis-DH-Sully, J. Ma, A. MacGilvery, C. Mader, A. Maratukulam, T. C. Matise, K. B. McKuskk, J. Morissette, A. Mungafl, D. Musekt, H. C Nasbaum, D. C. Page, A. Peck, S. Perkins, M. Piercy, F. Qin, .1. Quackenbush, S. Ranby, T. Reif, S. Ktizcn, C. Sanders, X. She, J. Suva, D. K. Slonim, C. Sodertund, W.-L. Sun, P. Tabar, T. Thangarajah, N. Vega-Czarny, D. Voürath, S. Voytkky, T. Wümer, X. Wu, M. D. Adams, C. Auffray, N. A. R. Walter, R. Brandon, A. Dehajia, P. N. GoodfeUow, R. Houlgatte, J. R. Hudson, Jr., S. E. Ide, K. R. Iorio, W. Y. Lee, N. Seki, T. Nagase, K. Ishikawa, N. Nomura, C. Phillips, M. H. Pdymeropoulos, M. Sandusky, K. Schmitt, R. Beny, K. Swanson, R. Torres, .i. C Venter, J. M. Síkela, J. S. Beckmann, J. Weissenbach, R. M. Myers, D. R. Cox, M. R. James, D. Bentley,
- P. Dekukas, E. S. Lander, T. J. Hudson. 1996. Agene**  
map of the human genome. *Science* 274:540—546.
- Taylor K., N. Hornigold, D. Conway, D. Williams, Z. Ulinowski, M. Agoehiya, P. Fattorini, P. De Jong, P. F. R. Little, J. Wolfe. 1996. Mapping the human Y chromosome by fingerprinting cosmid clones. *Genome Res.* 6: 235—248.
- Terwilliger J. D., J. Ott. 1994. Handbook of Human Genetic Linkage. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Md.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Что такое независимое наследование аллелей?
2. Нарисуйте родословную, включающую четыре поколения, у членов которой встречается заболевание, имеющее аутосомно-доминантный тип наследования. Пенетрантность заболевания составляет 70%. Что такое пенетрантность? Как неполная пенетрантность влияет на изучение генетических заболеваний человека?
3. Что такое лод-балл? Как он определяется?
4. Что такое генетический полиморфизм? Почему полиморфные локусы важны для картирования генов заболеваний человека?
5. Как с помощью STRP-зондов можно локализовать ген заболевания человека?
6. Что такое банк CEPH-семей? Как он «работает»?
7. Что такое STS? Как определяют хромосомную локализацию STS?
8. Что такое контиг? Опишите подробно, как строится контиг хромосомы.
9. Как установить, что вставка геномного клона содержит кодирующую область гена?
10. Каково теоретическое обоснование позиционно-кандидатного картирования гена?

# ГЛАВА 21.

## Генная терапия

Долгое время медицинская генетика занималась одной проблемой: установлением генетических основ наследственных заболеваний человека. Были разработаны диагностические тесты для выявления ряда таких заболеваний у новорожденных или плода, и по их результатам проводилось генетическое консультирование семей, относящихся к группе риска. Это позволяло подготовить консультируемых к возможности проявления данного заболевания у их потомков. Кроме того, иногда удавалось смягчить негативные последствия генетического дефекта с помощью медикаментозной терапии, переливания крови или назначения диеты.

Нормальная работа организма обеспечивается функциями множества взаимосвязанных генов, и мутация даже в одном из них может иметь самые разные последствия. Так, мутация, в результате которой изменяется активность того или иного фермента, может приводить к накоплению токсичного субстрата или дефициту соединения, необходимого для нормального функционирования клетки, а мутация в гене, кодирующем структурный белок, — к серьезным нарушениям на уровне клеток, тканей или органов. Кроме того, мутация в гене, экспрессирующемся в одной ткани, может сказаться самым серьезным образом на совсем другой ткани и привести к появлению множества симптомов. Например, мутация в гене печеночного фермента фенилаланиндегидроксилазы, в результате которой блокируется превращение фенилаланина в тирозин, оказывает серьезное влияние на нервную систему. У индивидуума, гомозиготного по дефектному гену, этот фермент не вырабатывается вообще или вырабатывается в очень небольших количествах; это приводит к повышению уровня эндогенного фенилаланина в крови, к неправильному формированию миелиновой оболочки вокруг аксонов нервных клеток центральной нервной системы и как следствие — к тяжелой умственной отсталости. Это врожденное заболевание, называемое фенилкетонурией, встречается у европейцев с частотой 1 на 10 000 новорожденных. В каждой ткани организма экспрессируется свой набор из всей совокупности генов, но есть мутации, которые приводят к болезням, затрагивающим буквально все органы и ткани: мышцы, глаза, печень, кости, почки, сердце, нервную систему, кожу, мозг, желудок, кишечник, систему кроветворения.

Конечной целью медико-генетических исследований является создание методов лечения всех наследственных заболеваний. В табл. 21.1 перечислены продукты некоторых генов, коротко описаны симптомы заболеваний, которые обуславливаются мутациями в этих генах, указаны способы их лечения. Наследственные заболевания имеют сложные клинические проявления, и их лечение носит во многом симптоматический характер. Некоторые нарушения метаболизма корректируют назначением специальной диеты, что приводит к снижению уровня токсичных веществ в организме, накопление которых обуславливается мутациями в определенных генах. Так, при фенилкетонурии, которую выявляют у новорожденных с помощью специфического биохимического анализа крови, назначают безаланиновую диету. Для облегчения симптомов наследственных заболеваний, связанных с дефектом определенного белка, вводят внутривенно его функциональную форму, не вызывающую иммунной реакции. Такую «заместительную» терапию используют, например, для лечения гемофилии, тяжелого комбиниро-

Таблица 21.1. Применяемые в настоящее время методы лечения некоторых моногенных заболеваний человека

| Генный продукт                          | Заболевание и его симптомы   | Частота встречаемости                    | Лечение   | Прогноз  |
|---|--|--|---|--|
| Аденозиндезаминаза                      | Тяжелый комбинированный иммунодефицит (SCID)<br>Утрата Т- и В-лимфоцитов   | 1:1 000000                               | Трансплантация костного мозга;<br>введение аденозиндезаминазы   | Без лечения: летальный исход к двум годам С лечением: улучшение состояния пациента                     |
| Рецептор липопротеинов низкой плотности | Семейная гиперхолестеролемия<br>Повышенный уровень холестерина в крови, ишемическая болезнь сердца   | 1:500 (гетерозиготы)                     | Диета, медикаментозное лечение<br>трансплантация печени   | Улучшение состояния пациента   |
| Глюкоцереброзидаза                      | Болезнь Гоше Накопление гл юкоицереброзидов в макрофагах, приводящее к поражению печени, селезенки и костей  | 1:2 500 (среди евреев); редко у неевреев | Симптоматическое лечение: удаление селезенки, введение антибиотиков, лечение поражений костей, трансплантация костного мозга, введение глюкоцереброзидазы | Улучшение состояния пациента   |
| Фактор VIII системы свертывания крови   | Гемофилия А Изменение фактора VIII, приводившее к нарушению свертываемости крови, хронические кровоизлияния в суставы; обширные кровотечения при травмах | 1:10000 (у мужчин)                       | Повышение концентрации фактора VIII с помощью переливания плазмы  | Увеличение продолжительности жизни при постоянном лечении; при переливании есть риск вирусной инфекции |
| Фенилаланин-гидроксилаза                | Фенилкетонурия Избыток фенилаланина в крови новорожденных, умственная отсталость   | 1: 10000                                 | Диета, исключаящая фенилаланин  | При ранней диагностике и непрерывном лечении — обычно благоприятный                                    |
| α <sub>1</sub> - Антитрипсин            | Эмфизема Дефицит ингибитора сывороточных протеаз, поражение легких, цирроз печени  | 1:3500                                   | Заместительная терапия; снижение экологических факторов риска   | Заболевание прогрессирует медленнее  |

ванного иммунодефицита (SCID, от англ, severe combined immunodeficiency) и болезни Гоше. Иногда для компенсации каких-то утраченных функций проводят трансплантацию костного мозга или других органов. К сожалению, нередко интенсивное лечение многих наследственных болезней начинают проводить только тогда, когда пациент находится в критическом состоянии и удастся лишь ненамного продлить его жизнь. Поскольку генетические заболевания часто носят системный характер и постепенно приводят к ослаблению организма, разработка эффективных методов лечения представляет собой непростую задачу. Существующая терапия, как правило, малоэффективна, лишь немногие пациенты доживают до старости и могут иметь детей. В большинстве случаев лечение необходимо проводить многократно, оно очень дорогое и длительное. Поэтому разработка новых видов терапии очень актуальна.

После того как были установлены молекулярные основы трансформации бактерий (переноса генов из одного штамма в другой), у ученых появилась надежда, что аналогичный механизм — введение нормальных генов в дефектные соматические клетки — можно будет использовать для лечения наследственных заболеваний человека. Перспективы генной коррекции соматических клеток стали более реальными в 1980-х гг.; к этому времени были

Таблица 21.1. (Продолжение)

| Генный продукт  | Заболевание и его симптомы   | Частота встречаемости   | Лечение  | Прогноз   |
|---|--|---|--|---|
| Трансмембранный белок, нарушения в котором приводят к муковисцидозу | Муковисцидоз Системное поражение органов, в ряде случаев недостаточность поджелудочной железы, закупорка кишечника, закупорка бронхов  | 1:2500 (европеоиды)   | Введение антибиотиков, физикальная очистка легких, общеукрепляющая диета   | Летальный исход в возрасте до 20 лет  |
| Орнитин-транскарбамилаза  | Гипераммониемия Нарушение цикла мочевины, накопление аммония, дефицит аргинина Ранняя форма, развивающаяся в первые 72 ч после рождения: летаргия, рвота, кома, смерть; в случае выживания — необратимое повреждение мозга Поздняя форма: рвота, летаргия, эпилептические припадки | 1:40 000  | Диета с ограничением белка, диета, обогащенная аргинином, лекарственные Средства, трансплантация печени                              | Поздняя форма; благоприятный Ранняя (тяжелая) форма: снижение тяжести симптомов |
| Дистрофин   | Мышечная дистрофия Дюшенна Прогрессирующая слабость мышц   | 1:7 500 (у мужчин)  | Только поддерживающее лечение; полноценное питание, помощь в функционировании дыхательной системы, передвижение в инвалидной коляске | Летальный исход к 20 годам  |
| β-Глобин  | Серповидноклеточная анемия Хроническая анемия, системное поражение органов, селезенки, сердца, почек, печени, мозга; у гетерозиготных носителей наблюдается мягкая форма болезни   | 1:500 (для гетерозигот в популяциях афроамериканцев ; в других популяциях — у реже) | Переливание крови, медикаментозная терапия, анальгетики, трансплантация костного мозга   | Снижение тяжести симптомов; эффективное лечение отсутствует                     |

разработаны методы получения изолированных генов, созданы эукариотические экспрессирующие векторы, стали рутинными эксперименты по переносу генов на мышах. В 1990 г. была предпринята первая попытка применения генотерапии для лечения SCID (табл. 21.1) у двух девочек. Использовался следующий подход. Клонированную кДНК аденозиндезаминазы (АДА) ввели в лимфоциты, полученные от каждой из пациенток. Модифицированные клетки, синтезирующие АДА, культивировали и в течение двух лет с определенной периодичностью вводили девочкам. Через четыре года после начала лечения у обеих пациенток наблюдалась экспрессия гена АДА и отмечалось облегчение симптомов SCID. Однако истинная причина улучшения осталась не совсем ясной: был ли это эффект заместительной терапии (внутривенного введения защищенной формы АДА - полиэтиленгликоль-АДА) или собственно генной терапии. Бесспорно одно: этот опыт показал безопасность генной терапии. Сходные результаты были получены и для других пациентов с SCID, одновременно получавших оба вида лечения. Исследования были продолжены на большем числе больных.

В соответствии с законодательством США, прежде чем новый лекарственный препарат будет разрешен к применению, он должен пройти четыре строго оговоренных стадии проверки.

- 1. Доклинические испытания, которые включают многочисленные эксперименты, проводимые in vitro и на лабораторных животных.
- 2. I фаза клинических испытаний проводится на небольшом числе (от 6 до 10) пациентов и часто имеет целью проверку безопасности препарата.
- 3. II фаза клинических испытаний проводится на большем числе пациентов и имеет целью проверку эффективности действия препарата.
- 4. III фаза клинических испытаний проводится с привлечением большого числа испытуемых и включает исчерпывающий анализ надежности и эффективности препарата, при этом используется информация, полученная на предыдущих этапах.

Прежде чем начать проверку препарата, необходимо, чтобы протокол его испытаний был одобрен и утвержден в соответствующих контролирующих инстанциях. С 1990 по 1992 г. было одобрено более десяти протоколов испытаний по генной терапии, находящихся в I фазе, а к 1997 г. — более 200 протоколов испытаний по генной терапии разных видов злокачественных новообразований, гемофилии, СПИДа, муковисцидоза, гиперхолестеролемии, бокового амиотрофического склероза и др. (табл. 21.2). Прежде чем приступить к I фазе клинических испытаний, необходимо учесть ряд важных моментов: предполагаемое исследование должно быть направлено на разработку методов лечения однозначно диагностируемой болезни, соответствовать существующим правилам проведения медико-биологических экспериментов и осуществляться с минимальным для пациента риском. Поскольку генная терапия представляет собой новое направление, а заболевания, которые предполагают лечить с ее помощью, столь различны, рассматривают множество разных подходов. В настоящее время все исследования по генной терапии направлены на коррекцию генетических дефектов соматических, а не половых (зародышевых) клеток. Это объясняется этическими и чисто техническими причинами, а так-

Таблица 21.2. Некоторые заболевания, генная терапия которых проходит испытания с 1990 г.

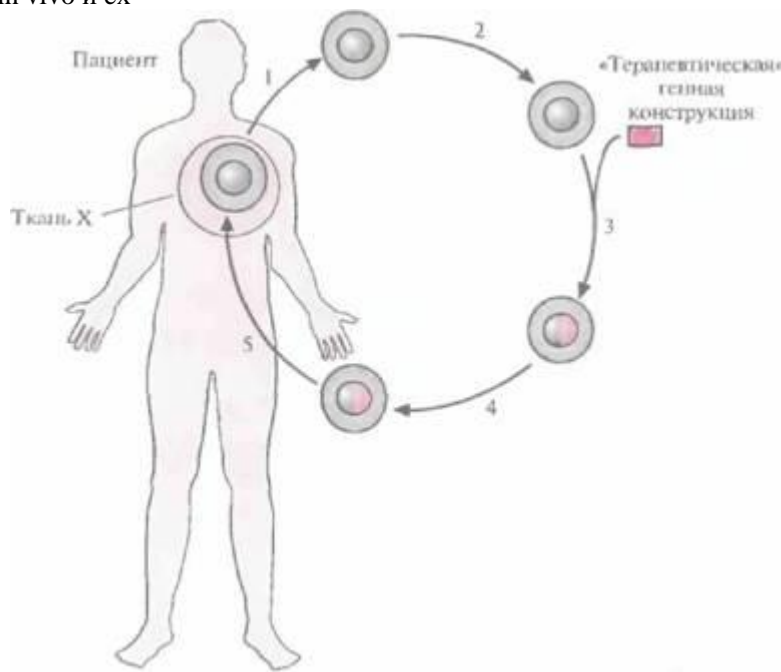
| Заболевание                                     | Генотерапевтический препарат  |                             |           | Клетки-мишени  |
|---|---|-----------------------------|-----------|--|
| Тяжелый комбинированный иммунодефицит           | Аденозиндезаминаза  |                             |           | Лимфоциты, клетки костного мозга                               |
| Меланома  | Фактор некроза опухоли  |                             |           | Инфильтрирующие опухоль лимфоциты, аутологичные клетки опухоли |
| Меланома, глиобластома, рак почки               | Интерлейкин-2   |                             |           | Аутологичные клетки опухоли, клетки опухоли                    |
| Гемофилия В                                     | Фактор IX   |                             |           | Аутологичные фибробласты кожи                                  |
| Гиперхолестеролемия                             | Рецептор липопротеинов  | низкой                      | плотности | Аутологичные гепатоциты  |
| Меланома, рак толстой и прямой кишки, рак почки | Антиген гистосовместимости HLA-B7 и β <sub>2</sub> - микроглобулин  |                             |           | Клетки опухоли   |
| Глиобластома, СПИД, рак яичников                | Тимидинкиназа вируса простого герпеса                               |                             |           | Клетки опухоли, Т-лимфоциты                                    |
| Муковисцидоз                                    | Трансмембранный белок, нарушения в котором приводят к муковисцидозу |                             |           | Эпителий носовой полости и дыхательных путей                   |
| Рак молочной железы                             | Фактор типа I устойчивости к препаратам                             | множественной лекарственным |           | CD34 <sup>+</sup> - клетки крови                               |
| Меланома  | Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор                         |                             |           | Клетки опухоли   |
| Артрит  | Антагонист рецептора интерлейкина-1                                 |                             |           | Аутологичные фибробласты                                       |
| Боковой амиотрофический склероз                 | Цилиарный нейротрофический фактор (CNTF) человека                   |                             |           | Инкапсулированные трансдуцированные экзогенные клетки          |
| Плоскоклеточный рак головы и шеи                | p53   |                             |           | Клетки опухоли   |
| Анемия Фанкони                                  | Фактор анемии Фанкони группы C                                      |                             |           | Клетки головного мозга   |

же соображениями безопасности: ведь ДНК, введенная в половые клетки человека, передавалась бы последующим поколениям.

В самом общем смысле под генной терапией соматических клеток человека понимают коррекцию специфического наследственного заболевания путем введения в клетку-мишень функционального экспрессирующегося гена. Однако за этим простым определением скрывается целый ряд проблем. Например, как получить доступ к клеткам, предназначенным для коррекции? Как осуществить доставку терапевтического гена? Какая доля клеток-мишеней должна получить такой ген, чтобы болезнь отступила? Необходим ли точный контроль транскрипции введенного гена для обеспечения ее эффективности? Не вызовет ли избыточная экспрессия введенного гена побочных эффектов? Будут ли модифицированные клетки поддерживаться бесконечно или потребуются повторные введения?

Хотя генная терапия соматических клеток делает только свои первые шаги, на ряд вопросов, касающихся некоторых наследственных заболеваний, уже получены ответы. Появляются все новые подходы к генной терапии соматических клеток, которые можно разделить на две большие категории: генная терапия *in vivo* и *ex vivo*.

Рис. 21.1. Схематическое представление генной терапии *ex vivo*. Процедура включает: 1) получение от пациента клеток с генным дефектом; 2) культивирование изолированных клеток; 3) трансфекцию «терапевтической» генной конструкции в изолированные клетки; 4) отбор, выращивание и тестирование трансфицированных клеток; 5) трансплантацию или трансфузию трансфицированных клеток пациенту.



*in vivo*. Разрабатывают и специфические лекарственные препараты на основе нуклеиновых кислот: антисмысловые олигонуклеотиды; РНК-ферменты, модифицированные с помощью генной инженерии; олигонуклеотиды, корректирующие генные мутации *in vivo*.

## Генная терапия *ex vivo*

Генная терапия *ex vivo*, как правило, включает следующие этапы (рис. 21.1).

1. Получение клеток от больного.
2. Исправление генетического дефекта с помощью переноса нужного гена в изолированные клетки.
3. Отбор и наращивание генетически «исправленных» клеток.
4. Инфузия или трансплантация этих клеток пациенту.

Использование собственных клеток пациента (аутологических клеток) гарантирует, что после инфузии или трансплантации у него не разовьется иммунный ответ.

Необходимо, чтобы процедура переноса генов, используемая для генной терапии *ex vivo*,



была эффективной, а «терапевтический» ген стабильно поддерживался и непрерывно экспрессировался. Этим условиям отвечают векторы, полученные на основе мышиных ретровирусов. Но ретровирусы имеют существенный недостаток — они могут приводить к злокачественной трансформации клеток. Такую вероятность необходимо уменьшить, а лучше полностью исключить.

Геном ретровируса дикого типа представлен двумя идентичными одноцепочечными молекулами РНК, каждая из которых состоит из шести участков: длинного концевой повтора (5'-LTR, от англ. *long terminal repeat*); некодирующей последовательности пси<sup>+</sup> ( $\psi^+$ ), необходимой для упаковки РНК в вирусную частицу; трех генов, кодирующих структурный белок внутреннего капсида (*gag*), белок, обладающий функциями обратной транскриптазы и интегразы (*pol*), и белок оболочки (*env*); 3'-LTR-последовательности (рис. 21.2). Жизненный цикл ретровируса включает следующие стадии.

1. Инфицирование клетки-мишени.
2. Синтез ДНК-копии генома с помощью собственной обратной транскриптазы,
3. Транспорт вирусной ДНК в ядро.
4. Встраивание вирусной ДНК в один из хромосомных сайтов клетки-хозяина.
5. Транскрипцию мРНК с вирусной ДНК под контролем сильного промотора, локализованного в 5'-LTR.
6. Трансляцию белков Gag, Pol и Env в цитоплазме.
7. Образование вирусного капсида и упаковку в него двух РНК-цепей и молекул обратной транскриптазы.
8. Высвобождение вирионов из клетки.

Для получения ретровирусного вектора полноразмерную ДНК ретровируса встраивают в плазмиду, с помощью эндонуклеазного расщепления удаляют большую часть гена *gag* и гены *pol* и *env*, оставляя 5'-концевой участок гена *gag* и 5'- и 3'-LTR, а затем рядом с  $\psi^+$ -областью встраивают «терапевтический» ген, транскрипция которого будет контролироваться 5'-LTR-промо-тором; при необходимости можно встроить и маркерный селективный ген с собственным промотором (рис. 21.3). Такая конструкция позволяет экспрессировать оба клонированных гена. На основе этой схемы созданы различные ретровирусные векторы. Максимальный размер ДНК-вставки, которую может переносить ретровирусный вектор, — примерно 8 т. п. н.

ДНК ретровирусного вектора можно использовать для трансформации клеток саму по себе, но эффективность доставки ее в ядро и интеграции в геном клетки-хозяина крайне низка. Поэ-

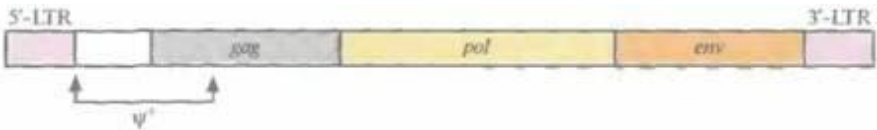


Рис. 21.2. Генетическая карта типичного ретровируса.  $\psi^+$  — последовательность, ответственная за упаковку, *gag*, *pol* и *env* — области, кодирующие соответственно белок капсида, белок, обладающий активностью обратной транскриптазы и интегразы, и белок оболочки. 5'-LTR содержит сигналы инициации транскрипции, причем весь геном транскрибируется как одна молекула РНК. 3'-LTR содержит сигнал полиаденилирования.



Рис. 21.3. Генетическая карта ретровирусного вектора, несущего два гена. Транскрипция «терапевтического» гена (Ген X) контролируется 5'-LTR-промотором, транскрипция селективного маркерного гена (*Neo<sup>r</sup>*) — внутренним промотором (*p*), 3'-LTR содержит сигнал полиаденилирования.  $\psi^+$  — последовательность, ответственная за упаковку.

тому была разработана методика упаковки полноразмерной РНК ретровирусного вектора в интактные вирусные частицы, с высокой частотой проникающие в клетку, что гарантирует встраивание соответствующей ей ДНК в геном клетки -хозяина. Для этого с помощью генной инженерии была создана «пакующая» клеточная линия, в одном из участков генома которой содержится  $\Delta\psi^+$ -сегмент 5'-LTR-*gag*-3'-LTR (т. е. сегмент, лишенный функциональной  $\psi^+$ -последовательности), а в другом —  $\Delta\psi^+$ -сегмент 5'-LTR-*pol-env*-3'-LTR. Оба этих сегмента транскрибируются, но из-за отсутствия  $\psi^+$ -последовательности и образования вирусных молекул РНК меньшего, чем в норме, размера формируются пустые вирусные частицы. При трансфекции ДНК ретровирусного вектора в такие клетки она встраивается в хромосомную ДНК и транскрибируется с образованием полноразмерной РНК ретровируса, содержащей  $\psi^+$ -последовательность. В таких условиях в вирусные капсиды упаковывается только РНК вектора. Образующиеся интактные вирусные частицы можно использовать для высокоэффективной доставки ретровирусного вектора в клетки-мишени (рис. 21.4).

В «пакующей» клеточной линии не образуются компетентные по репликации ретровирусы дикого типа, способные встраиваться в гены и приводить к неконтролируемой пролиферации некоторых клеток (т. е. к превращению их в раковые клетки). Это весьма существенно, особенно если частицы ретровирусного вектора предполагается использовать для генной терапии соматических клеток человека. В качестве меры предосторожности все же проводят регулярное тестирование готовых ретровирусных векторов, с тем чтобы выявить ретровирусы дикого типа. Кроме того, в «пакующей» клеточной линии нуклеотидные последовательности ретровируса и вектора локализованы в трех разных областях хромосомы, что делает весьма маловероятной возможность последовательных рекомбинационных событий, которые могли бы привести к образованию компетентного по репликации ретровируса.

Ретровирусы активно инфицируют реплицирующиеся клетки. Для переноса генов в интенсивно растущие клетки-мишени последние обрабатывают очищенными частицами упакованного ретровирусного вектора либо проводят их совместное культивирование с производящей его клеточной линией, а затем осуществляют дифференциальную селекцию для разделения клеток-мишеней и «пакующих» клеток. Трансдуцированные клетки-мишени (те, в которые при помощи вируса была перенесена невирусная ДНК) тестируют, чтобы удостовериться, что: 1) в них синтезируется продукт терапевтического гена; 2) не образуются компетентные по репликации ретровирусы; 3) ДНК ретровирусного вектора не встроилась в сайт, изменяющий способность клеток к росту либо препятствующий их нормальному функционированию. После тестирования трансдуцированные клетки наращивают в больших количествах и с разными интервалами вводят пациенту.

Наиболее вероятными кандидатами для проведения генной терапии *ex vivo* (рис. 21.5) являются пациенты с наследственными заболеваниями, для лечения которых применяют трансплантацию костного мозга. Терапевтический эффект трансплантации костного мозга в отношении целого ряда болезней связан с наличием в нем тотипотентных эмбриональных стволовых клеток, которые встречаются с частотой  $10^{-4}$ — $10^{-5}$ , могут пролиферировать и дифференцироваться в различные типы клеток, такие как В- и Т-лимфоциты (В-клетки и Т-клетки), макрофаги, эритроциты, тромбоциты и остеокласты. Например, в том случае, когда генная мутация нарушает функции макрофагов, трансплантация костного мозга обеспечивает реципиенту постоянный запас компетентных макрофагов, происходящих из популяции тотипотентных стволовых клеток.

Генноинженерная модификация тотипотентных стволовых клеток с их последующей инфузией или трансплантацией пациенту для замещения утраченного типа клеток или генного продукта может стать основным способом генной терапии *ex vivo*. В качестве примера можно рассмотреть дефект АДА, приводящий к повышению в крови уровня аденозина и дезоксиаденозина, токсическое действие которых приводит к гибели В- и Т-лимфоцитов и развитию тяжелого иммунодефицита. Поскольку В- и Т-лимфоциты происходят из тотипотентных стволовых клеток, перенос в последние функционального гена АДА с последующим введением

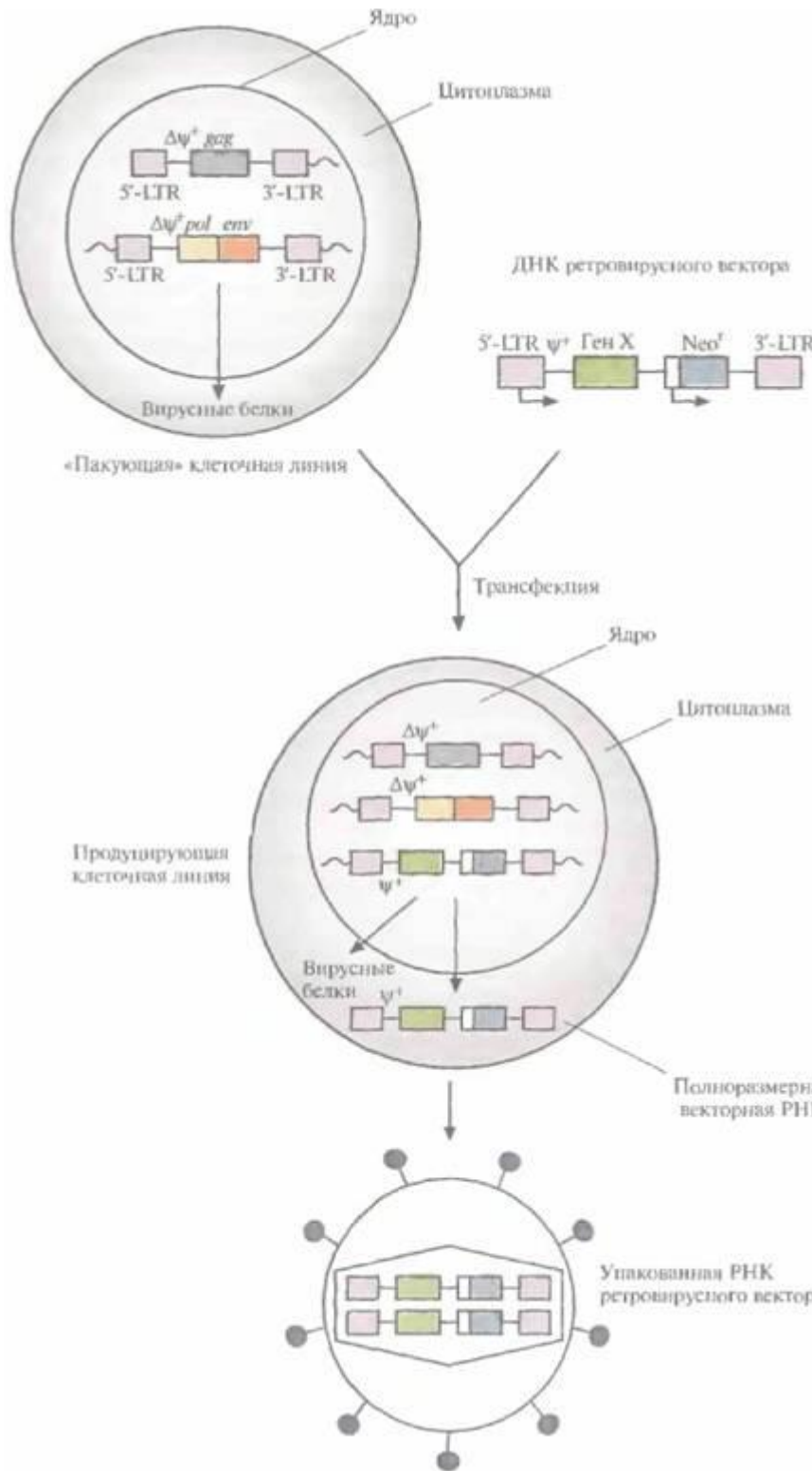


Рис. 21.4. Получение упакованного ретровирусного вектора. В двух разных участках хромосом «пакующей» клеточной линии содержатся ретровирусные гены: в одном — *gag*, в другом — *pol* и *env*. Их транскрипция контролируется 5'-LTR-промотором; оба участка лишены последовательности, необходимой для упаковки ( $\Delta\psi^+$ ). «Пакующая» линия клеток синтезирует вирусные белки, но из-за отсутствия в любой из ретровирусных мРНК последовательности, ответственной за упаковку, образуются пустые вирусные капсиды. После трансфекции «пакующей» клеток ретровирусным вектором, содержащим необходимую для упаковки последовательность ( $\psi^+$ ), его полноразмерные РНК транскрибируются и упаковываются в капсиды. Высвобождаемые вирусные частицы не способны реплицироваться и в данном случае содержат «терапевтический» ген (Ген X) и селективный маркерный ген (*Neo<sup>r</sup>*).

|   |               |                 |
|---|---------------|-----------------|
| АДА-зависимый                                   | тяжелый       | комбинированный |
| иммунодефицит                                   |               |                 |
| Адренолейкодистрофия                            |               |                 |
| Синдром Чедиака— Хигаси                         |               |                 |
| Хронический гранулематоз                        |               |                 |
| Анемия Фанкони                                  |               |                 |
| Болезнь Гоше                                    |               |                 |
| Дефицит gpL-115                                 |               |                 |
| Дефицит актина в гранулоцитах                   |               |                 |
| Болезнь Хантера                                 |               |                 |
| Синдром Гурлера                                 |               |                 |
| Агранулоцитоз                                   | новорожденных | (детский        |
| агранулоцитоз)                                  |               |                 |
| Болезнь Марото-Лами (мукополисахаридоз VI типа) |               |                 |
| Метахроматическая лейкодистрофия                |               |                 |
| АДА-независимый                                 | тяжелый       | комбинированный |
| иммунодефицит                                   |               |                 |
| Остеопороз                                      |               |                 |
| Дефицит пуринофосфорилазы                       |               |                 |
| Ретикулярная дисплазия                          |               |                 |
| Синдром Санфилиппо                              |               |                 |
| Серповидноклеточная анемия                      |               |                 |
| Талассемия                                      |               |                 |
| Синдром Вискотта— Олдрича                       |               |                 |
| Х-сцепленная агаммаглобулинемия                 |               |                 |

Рис. 21.5. Наследственные заболевания, для лечения которых применяют трансплантацию костного мозга.

их пациенту способствует понижению в крови уровней аденозина и дезоксиаденозина и предотвращает разрушение В- и Т-лимфоцитов. Стволовые клетки можно получить от самого пациента (оптимальный вариант) или от совместимых доноров, которых обычно нелегко найти.

К сожалению, тотипотентные стволовые клетки очень трудно выделять из костного мозга и культивировать. Исследования по *ex vivo*-генной терапии SCID, вызванного дефицитом АДА, проводили на аутологичных Т-клетках, модифицированных с помощью ретровирусных векторов. Т-лимфоциты имеют ограниченное время жизни, поэтому необходимо проводить их повторные инфузии. В первом испытании двум девочкам вливали с интервалом в несколько месяцев собственные генетически «исправленные» Т-клетки, продуцирующие АДА. Наблюдаемый положительный эффект, возможно, объяснялся снижением уровня аденозина и дезоксиаденозина в крови и предотвращением гибели В- и Т-клеток.

Т-клетки — не оптимальная система доставки, применяемая при генной терапии заболеваний гемопоэтических (происходящих из костного мозга) клеток. Предпочтительнее (хотя это не всегда возможно) использовать пуповинную кровь, содержащую стволовые клетки. Так, при однократном введении новорожденным с дефицитом АДА СО34+-клеток, полученных из их пуповинной крови и трансдуцированных кДНК АДА, эта кДНК поддерживалась и экспрессировалась в клетках крови незритроидного ряда как минимум 18 мес.

В качестве примера успешной генной терапии *ex vivo* с использованием аутологичных клеток можно привести случай с пациенткой, гомозиготной по рецессивному гену семейной гиперхолестеролемии. Ее гепатоциты были лишены рецепторов липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и не разрушали холестерол; он постоянно циркулировал в крови, приводя к закупорке артерий и тяжелой болезни сердца. Лекарственные средства в подобных случаях неэффективны, а шунтирование коронарных артерий дает непродолжительный эффект.

В описываемом случае пациентке удалили около 15% печени, гепатоциты поместили в культуральную среду и ввели в них ДНК реком-бинантного ретровируса, содержащую кДНК ЛПНП-рецептора. Затем осуществили инфузию трансдуцированных гепатоцитов в печень пациентки, где они прижились, экспрессировали кДНК ЛПНП-рецептора и вырабатывали функциональный рецептор как минимум 18 мес. Если брать за основу показатели содержания липидов, то состояние пациентки значительно улучшилось. Более того, в ее организме не образовывались антитела кЛПНП-рецептору.

Генная терапия *ex vivo* основана на трансплантации генетически модифицированных клеток, производящих терапевтический белок. Использование собственных клеток пациента предотвращает их отторжение, но ограничивает сферу применения генной терапии *ex vivo*. Так, число клеток ткани-мишени может быть недостаточно для их извлечения и культивирования *in vitro*, некоторые соматические клетки неэффективно поглощают ДНК, а экспрессия клонированного гена иногда оказывается временной. Поэтому в настоящее время разрабатывают системы, которые защищают неаутологичные (ксе-ногенные, аллогенные) клетки от иммунного

## Создание «пакующей» клеточной линии и ее использование для производства хелпер-независимого дефектного ретровируса

R. Mann, R. C. Mulligan, D. Baltimore Сей 33: 153-159, 1983

Вопрос о применении в режидет клетки и она упаковывалась в геной терапии всегда вызывал нередко приводит к их вирусные частицы, которые споры, но большинство ученых злокачественной затем использовали для согласны с Т. Фридманом и Р. трансформации. Наиболее доставки «терапевтического» Роблином, которые еще в 1972 значимым достижением на гена в нужные клетки. Этот г. (*Science* 175: 949-955) пути практической подход был принят на писали: «Мы считаем, что реализации генной терапии вооружение другими генная терапия сможет стала разработка системы для исследователями, облегчить симптомы упаковки «терапевтических» занимающимися генной некоторых наследственных генов в инфекционные терапией. Спустя несколько заболеваний человека, вирусные частицы, лет исходную «пакующую» поэтому необходимо сохранившие способность клеточную линию продолжать исследования, прикрепляться к клеткам- адаптировали и для других направленные на ее хозяевам. Манн и др. вирусных векторов. В 1985 г., развитие.» Ключевые моменты сконструировали первую имея в виду результаты Манна генной терапии — адресная клеточную линию для и др., У. Андерсон отметил: «В доставка «терапевтического» упаковки ретровирусов. Для последнее время появились гена и обеспечение его этого они встроили вирусный эффективные системы экспрессии в определенных геном с предварительно доставки— экспрессии, клетках или тканях. Сначала в удаленной нуклеотидной которые позволяют сделать качестве основного средства последовательностью, генную терапию реальностью». доставки «терапевтических» ответственной за упаковку, в А 22 мая 1989 г. Андерсон и генов рассматривали хромосому клеточной линии, его коллеги начали первое векторы, полученные на основе которая в этих условиях клиническое испытание по вирус человека. Это было производит не инфекционные генной терапии. связано с наличием у них вирусные частицы. После Предпринимавшиеся до механизмов проникновения в трансфекции этих клеток ДНК- недавнего времени попытки специфические клетки. конструкцией, которая генной терапии не отличались Наиболее многообещающими содержала последовательность, особым успехом, но считали векторы на основе необходимую для полученная информация ретровирусов. Но нативный упаковки, и терапевтический свидетельствует о том, что в ретровирус — это ген, но не содержала будущем она станет вполне инфекционный агент, который ретровирусные гены, обычным методом лечения по-

ответа и позволяют высвобождать «терапевтический» белок.

Неаутологичная генная терапия *ex vivo* включает выделение тканеспецифичных клеток, хорошо растущих в культуре (например, фибробластов или кератиноцитов кожи, астроцитов мозга, гепатоцитов или миобластов), и их генетическую модификацию с помощью «терапевтического» гена. Рекомбинантные клетки заключают в искусственную полупроницаемую полимерную мембрану, через которую выходит рекомбинантный белок и поступают в клетки питательные вещества. Мембрана неиммуногенна и не вызывает сенсibilизации пациента и отторжения имплантированных клеток. В качестве инкапсулирующего материала используют разные полимеры:

альгинат—поли-L-лизин—альгинат, полиэфир-сульфон, поли(акрилонитрил-ко-винилхлорид).

Доклинические испытания, проведенные *in vitro* и на модельных животных, показали, что инкапсулированные рекомбинантные клетки могут пролиферировать и длительное время производить большие количества рекомбинантного белка. Чтобы попытаться предотвратить гибель мотонейронов, приводящую к нейродегенеративному заболеванию боковому амиотрофическому склерозу, была проведена I фаза клинических испытаний с использованием инкапсулированных клеток, вырабатывающих цилиарный нейротрофический фактор (CNTF, от англ. *ciliary neurotrvphic factor*). Пропедуа была признана безопасной, но у пациентов с боковым

амиотрофическим склерозом улучшения состояния не наблюдалось. При имплантации инкапсулированных CNT F-производящих клеток в мозг животных с химически индуцированным повреждением, моделирующим другое фатальное нейродегенеративное заболевание, хорею Гентингтона, клетки мозга не разрушались. Метод инкапсуляции клеток, модифицированных с помощью генной инженерии, находится на ранней стадии развития, но может стать эффективным способом доставки терапевтических генных продуктов при лечении многих заболеваний.

### Генная терапия *in vivo*

Генная терапия *in vivo* предполагает доставку «терапевтического» гена непосредственно в клетки определенной ткани пациента (рис. 21.6). Ретровирусные векторы проникают только в делящиеся клетки-мишени, однако во многих тканях, на которые направлена генная терапия, большинство клеток не делится. Поэтому были разработаны разнообразные вирусные и невирусные векторные системы доставки «терапевтических» генов, учитывающие большое число потенциальных тканей-мишеней (кожа, мышцы, легкие, мозг, толстая кишка, селезенка, печень, клетки крови) и расположение их в организме человека. «Идеальная» система доставки должна обеспечивать высокую эффективность поглощения «терапевтического» гена клетками-мишенями, минимальность его внутриклеточного разрушения при транспорте в ядро и поддержание уровня экспрессии, достаточного для облегчения состояния больного.

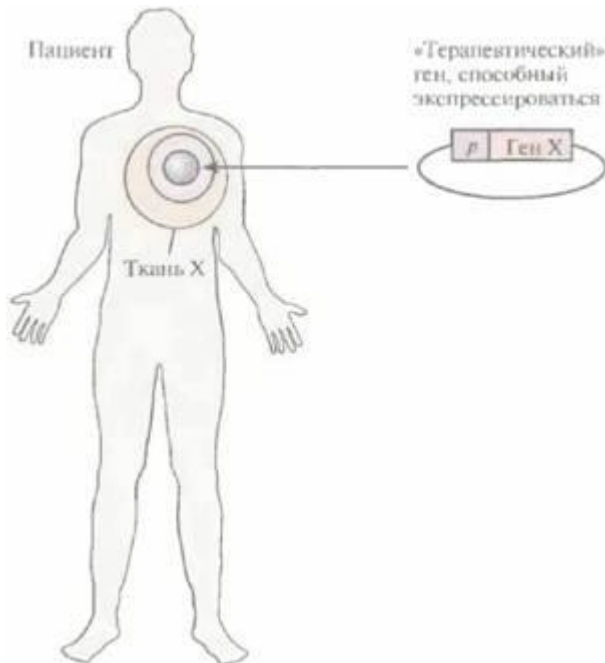


Рис. 21.6. Схематическое представление генной терапии *in vivo*. Клонированный «терапевтический» ген (Ген X) кодирует белок, корректирующий генетический дефект. Этот ген доставляется к клеткам определенной ткани пациента с наследственным заболеванием и экспрессируется в них. Промотор *p*, под контролем которого осуществляется транскрипция, тканеспецифичен.

## Вирусные системы доставки генов

### Ретровирусные векторы

Опыт клинических испытаний с участием более 200 пациентов показывает, что дефектные по репликации ретровирусные векторы не оказывают каких-либо неблагоприятных побочных эффектов. Тем не менее безопасности их применения продолжают придавать большое значение. Создана конструкция, называемая плазмовирусом, которая содержит ретровирусные гены *gag* и *pol*, находящиеся под контролем 5'-LTR-промотора, а также «терапевтический» ген и ген *env*, управляемые цитомегаловирусным промотором. После трансфекции плазмовирус запускает образование дефектных по репликации вирусных частиц, причем вероятность рекомбинации с образованием компетентных по репликации ретровирусов очень мала. Вектор может переносить не более 3,5 т. п. и. ДНК, но и длина большинства потенциальных «терапевтических» кДНК и генов — супрессоров опухолей составляет 0,5—2 т. п. н.

В ретровирусную векторную систему внесены дополнительные усовершенствования: увеличено число образующихся вирусных частиц, повышена эффективность трансдукции, осуществлена генноинженерная модификация, обеспечивающая их проникновение в неделящиеся клетки, повышена специфичность инфекции. В последнем случае геном рекомбинантного ретровирусного вектора упаковывается в оболочку другого вируса, белок которой и определяет специфичность связывания ретровируса и спектр



инфицируемых им клеток. Это явление называется фенотипическим смешиванием (*pseudotype formation*). Фенотипически смешанный вирус получают с помощью котрансфекции клеточной линии, которая синтезирует продукты генов *gag* и *pol*, рекомбинантным ретровирусным вектором и вектором, экспрессирующим ген *env* другого вируса. Изменяя ген *env*, можно как сузить спектр инфицируемых вирусом клеток до строго определенного типа, так и расширить его. Кроме того, в ген *env* ретровируса можно встроить нуклеотидную последовательность, кодирующую пептид, который связывается с определенным клеточным рецептором и обеспечивает внедрение рекомбинантного ретровируса в нужные клетки. И наконец, можно добиться специфичности экспрессии терапевтического гена, осуществляя ее под контролем промотора, специфичного для определенных клеток.

### Аденовирусные векторы

Аденовирусы инфицируют неделящиеся клетки человека и широко используются в качестве живых вакцин, которые предотвращают респираторные инфекции и гастроэнтериты, не оказывая побочного действия. Эти свойства делают аденовирусы перспективными для доставки генов в клетки-мишени.

Для получения аденовирусного вектора провели котрансфекцию клеточной линии, синтезирующей продукты аденовирусного гена E1, двумя участками генома аденовируса (рис. 21.7). Один из них может существовать в виде плазмиды в *E. coli* и содержит вместо E1-области «терапевтический» ген, фланкируемый нуклеотидными последовательностями аденовируса, а второй представляет собой молекулу ДНК аденовируса, которая лишена 5'-концевого участка, включающего E1-область, и имеет перекрывающийся участок с несущей терапевтический ген плазмидой. Рекомбинация между двумя трансфицирующими фрагментами ДНК в области их перекрывания приводит к восстановлению полноразмерного аденовирусного гена, в котором вместо E1-области находится терапевтический ген. Продукты гена E1, поставляемые клеткой-хозяином, иницируют образование вирусных частиц, высвобождающихся из клетки в результате лизиса. Клонированная емкость аденовирусного вектора составляет около 7,5 т. п. н. В отсутствие рекомбинации трансфицирующие молекулы ДНК, обладающие недостаточной длиной, не могут упаковываться в вирусные частицы. Вероятность того, что между областью E1 в геноме клетки-хозяина и ДНК рекомбинантного аденовируса произойдет рекомбинация с образованием компетентных по репликации вирусов, чрезвычайно мала.

После того как рекомбинантный аденовирус инфицирует клетку-мишень, его ДНК проникает в ядро, где и происходит экспрессия «терапевтического» гена. Рекомбинантная ДНК не интегрирует в хромосому и сохраняется непродолжительное время, поэтому при проведении генотерапии с использованием аденовирусных векторов необходимо вводить их с определенной периодичностью.

Аденовирусные векторы использовали в клинических испытаниях по генной терапии муковисцидоза. Первые результаты не обнадеживали: ген трансмембранного регуляторного белка, нарушения в котором приводят к муковисцидозу (CFTR, от англ. *cystic fibrosis transmembrane regulator*), был перенесен лишь в небольшое число клеток пациента, а многократное введение рекомбинантного аденовируса и низкий уровень экспрессии некоторых аденовирусных генов привели к развитию у пациентов выраженного иммунного ответа и гибели трансдуцированных клеток.

Эту проблему решали разными путями. Например, сконструировали «паковую» клеточную линию, содержащую E1-область и ряд аденовирусных генов, которые не входят в состав трансдуцирующей ДНК и не попадают в клетки-мишени. Затем удалось добиться того, чтобы ни один из аденовирусных генов не включался в трансдуцирующую ДНК. Для этого линеаризовали плазмиду *E. coli* (28 т. п. н.), которая обеспечивает экспрессию одного или большего числа терапевтических генов и не содержит аденовирусных генов, и пришили к ее концам фрагменты ДНК (по 4 т. п. н.), содержащие точку начала репликации аденовирусной ДНК, последовательность, ответственную за ее упаковку, и сигнал терминации. Длина продукта лигирования (36 т. п. н.) соответствует длине полноразмерного генома аденовируса. Затем полученным продуктом и аденовирусным гено-

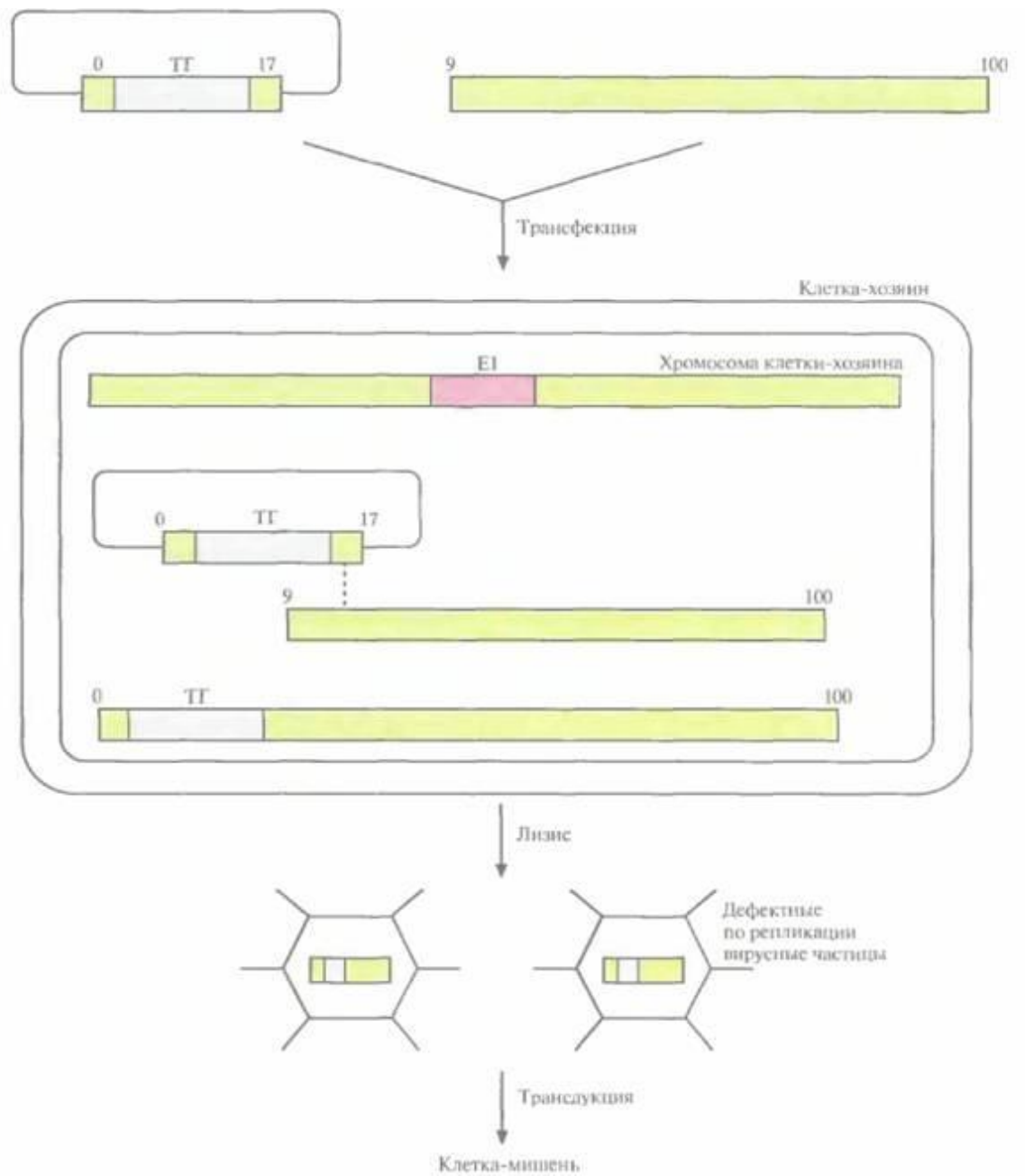


Рис. 21.7. Аденовирусный вектор. В клетку-хозяина, несущую интегрированный в геномную ДНК функциональный ген E1 аденовируса, вводят встроенную в сегмент аденовирусного генома (0—17 единицы карты) плазмиду с «терапевтическим» геном (ТГ) и участок геномной ДНК аденовируса (9—100 единицы карты). Длина генома аденовируса равна 100 единицам. В результате рекомбинации (штриховая линия) между перекрывающимися участками плазмиды и ДНК аденовируса образуется молекула ДНК, эквивалентная полноразмерному вирусному геному. Рекомбинантная ДНК, содержащая «терапевтический» ген, упаковывается и высвобождается из клетки после лизиса. Образующиеся вирусные частицы дефектны по репликации. Плазмидная ДНК, входящая в состав конечной генетической конструкции, не влияет на упаковку рекомбинантной ДНК (не показано).

мом без E1-области и последовательности, ответственной за упаковку, провели котрансфекцию клетки-хозяина, экспрессирующей E1-гены. Молекула ДНК аденовируса, дефектная по репликации и упаковке, поставляет гены для синтеза компонентов вируса, а продукт лигирования реплицируется и упаковывается в вирусные частицы. При этом около 99% высвобождаемых вирусных частиц содержат молекулу ДНК с «терапевтическим» геном (генами). С помощью центрифугирования их можно отделить от дефектных по репликации вирусов, которые все же образуются в незначительном количестве. ДНК-клонирование такой системы достигает 28 т. п. н.

Эффективность аденовирус-опосредованного переноса генов можно повысить, если сконструировать вирус, проникающий преимущественно в определенную клетку-мишень. Для этого в ген, ответственный за образование нитей аденовируса, следует включить последовательность, кодирующую домен белка, который связывается с клеточноспецифичным рецептором.

### **Векторы на основе аденоассоциированных вирусов**

Аденоассоциированные вирусы (ААВ) — это небольшие непатогенные вирусы человека с одноцепочечным ДНК-геном (4,7 т. п. н.), который может интегрировать в специфический сайт 19-й хромосомы. Такое название они получили потому, что для продуктивной инфекции им необходимы белки другого вируса (вируса-помощника), например аденовируса. После того как ААВ попадает в ядро, его геном с помощью полимераз клетки-хозяина преобразуется в двухцепочечную ДНК и транскрибируется.

Отсутствие патогенности делает ААВ весьма перспективным вектором для доставки в организм человека «терапевтических» генов. Рекомбинантный ААВ получают с помощью котранс-фекции клетки-хозяина, инфицированной каким-нибудь аденовирусом (вирусом-помощником), двумя плазмидами (рис. 21.8). Одна из них несет «терапевтический» ген, фланкированный инвертированными концевыми повторами (длиной от 125 п. н.) ААВ, а вторая — два его гена, *rep* и *cap*, ответственные за репликацию генома и синтез капсида соответственно. После лизиса инфицированных клеток рекомбинантные ААВ отделяют от аденовируса с помощью центрифугирования и диализа, а оставшиеся в образце аденовирусы (вирусы герпеса) инактивируют нагреванием. Рекомбинантный ААВ может нести ДНК-вставку размером до 4,5 т. п. н., не вызывает развития иммунного ответа, поскольку не содержит ААВ-генов, но и не может интегрировать в 19-ю хромосому из-за отсутствия гена *rep*.

В одном из доклинических испытаний эффективность *in vivo* трансдукции гепатоцитов мыши (рекомбинантный ААВ вводили внутривенно) была повышена в 900 раз с помощью предварительного облучения печени нетоксическими дозами и введения нерекомбинантного (дикого типа) ААВ. В этом случае кДНК фактора IX системы свертывания крови («терапевтический» ген) экспрессировалась в течение как минимум 5 мес на уровне, достаточном для коррекции дефекта при гемофилии. В I фазе клинических испытаний по генной терапии муковисцидоза в легкие вводили CFTR-ААВ-вектор; при этом не развивалась воспалительная реакция, а вектор сохранялся до 70 сут. Чтобы определить, образуется ли продукт гена *CFTR* в количестве, достаточном для достижения терапевтического эффекта, нужны дальнейшие клинические испытания.

### **Векторы на основе вируса простого герпеса**

Для того чтобы ретро- и аденовирусные векторы инфицировали специфические типы клеток, нужно модифицировать их с помощью генной инженерии, однако в природе существуют вирусы, уже обладающие средством к определенному

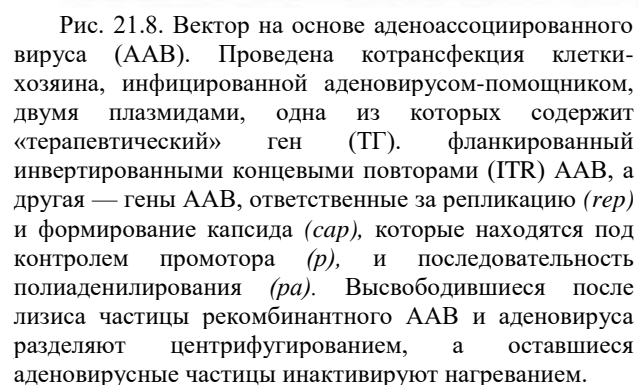
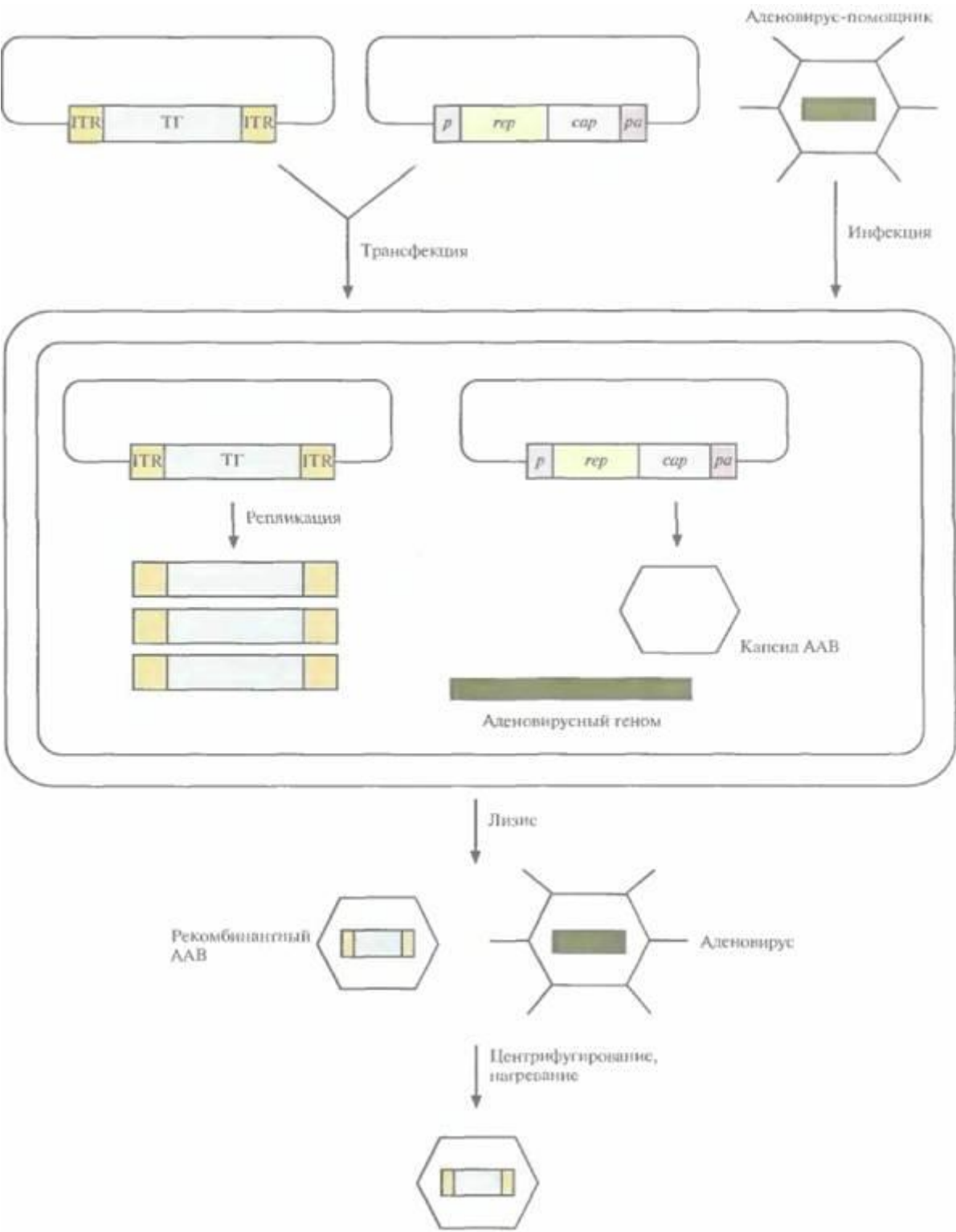


Рис. 21.8. Вектор на основе аденоассоциированного вируса (ААВ). Проведена котрансфекция клетки-хозяина, инфицированной аденовирусом-помощником, двумя плазмидами, одна из которых содержит «терапевтический» ген (ТГ), фланкированный инвертированными концевыми повторами (ITR) ААВ, а другая — гены ААВ, ответственные за репликацию (*rep*) и формирование капсида (*cap*), которые находятся под контролем промотора (*p*), и последовательность полиаденилирования (*pa*). Высвободившиеся после лизиса частицы рекомбинантного ААВ и аденовируса разделяют центрифугированием, а оставшиеся аденовирусные частицы инактивируют нагреванием.



типу клеток. Так, вирус простого герпеса 1 типа (HSV) инфицирует нейроны и персистирует в них, часто вызывая у человека так называемые «простудные» высыпания, а иногда — энцефалит с летальным исходом. Вирус присутствует в нейронах в латентной форме, а при стрессе и гормональных нарушениях инициируется литический цикл.

Существует множество заболеваний, поражающих центральную и периферическую нервную систему: опухоли, метаболические и иммунные нарушения, нейродегенеративные заболевания (болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона). Неврологические заболевания, как правило, бывают хроническими и приводят к госпитализации больного чаще, чем все остальные болезни вместе взятые. Вследствие тропности HSV к нервным клеткам он является подходящим вектором для генной терапии таких заболеваний.

Геном HSV представляет собой двухцепочечную молекулу ДНК длиной 152 т. п. н. Капсид вируса сливается с мембраной нейрона, и его ДНК транспортируется в ядро. Репродуктивный цикл вируса состоит из литической (репликация ДНК и образование вирусных частиц) и латентной (конденсация вирусного генома и активация как минимум двух так называемых латентно-ассоциированных промоторов) фаз.

Замена сегмента генома длиной примерно 30 т. п. н. ДНК-вставкой не оказывает заметного влияния на репликацию HSV, его упаковку или инвазионную способность. С другой стороны, большой размер генома HSV затрудняет генетические манипуляции с ним. Для решения этой проблемы в плазмиду *E. coli*, которая может переносить до 8 т. п. н. чужеродной ДНК, встроили «усеченный» геном HSV, состоящий из точки инициации репликации и последовательности, ответственной за упаковку. Полученные HSV-производные назвали ампликонами (ампликон-плазмидами),

Большинство систем доставки генов на основе HSV предполагает использование вируса-помощника, который поставляет белки, необходимые для репликации и сборки вируса, но не образует инфекционные вирусные частицы, поскольку его геном модифицирован и не способен упаковываться. Для получения рекомбинантного HSV осуществляют трансфекцию ампликон-плазмиды в инфицированную вирусом-помощником клетку-хозяина. ДНК ампликона реплицируется по типу «катящегося кольца»: внутренняя кольцевая цепь играет роль матрицы, а во внешней происходит разрыв, и к свободной 3'-концевой ОН-группе ковалентно присоединяются нуклеотиды. Растущая цепь представляет собой линейную тандемную последовательность сегментов, комплементарных внутренней цепи, и, отсоединяясь от нее, сама становится матрицей для синтеза комплементарной цепи. В результате образуется линейная двухцепочечная молекула — множественная копия ампликона. Длина каждого ампликона составляет 15 т. п. н., поэтому набор из 10 тандемных копий соответствует полноразмерному геному HSV и упаковывается в HSV-капсид (рис. 21.9).

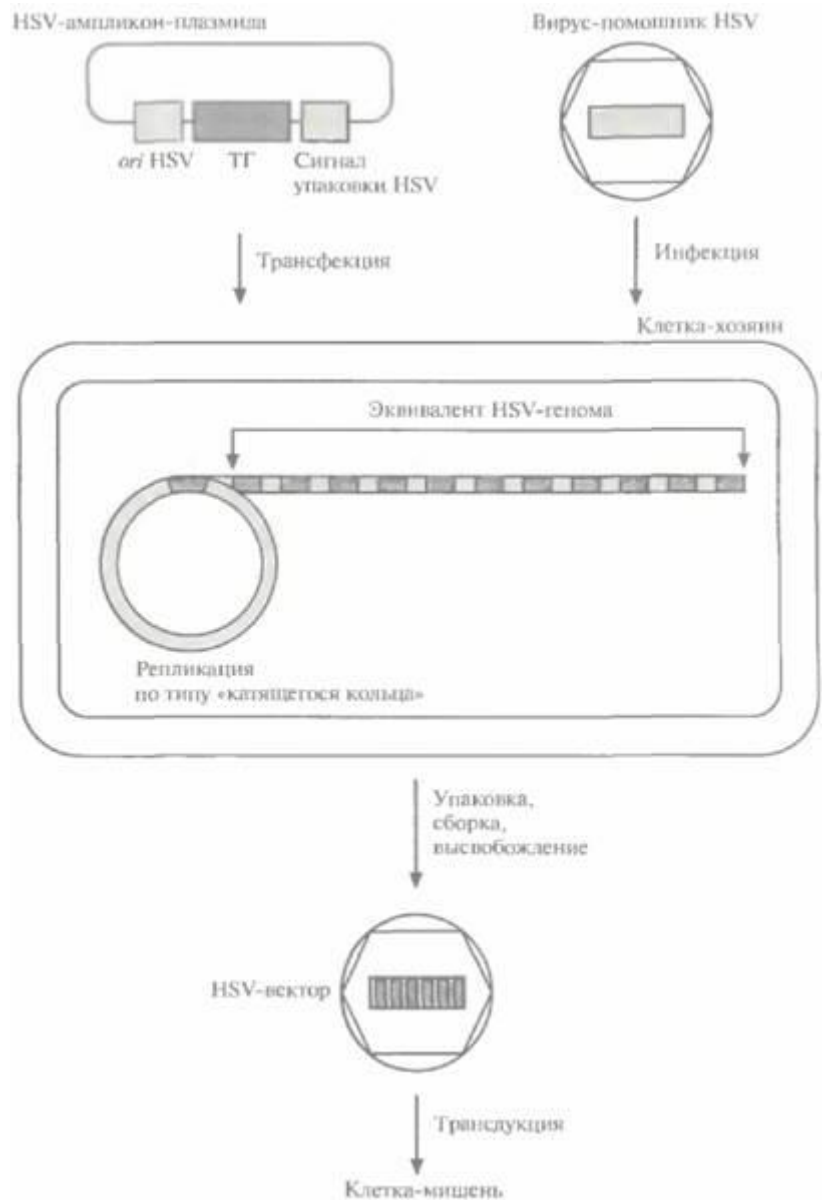
Рекомбинантный HSV можно получить и с помощью котрансфекции клеток-хозяев, в которых вирус может реплицироваться, с помощью ДНК HSV дикого типа и плазмиды, которая содержит «терапевтический» ген, фланкированный последовательностями ДНК из вспомогательных участков HSV-генома, ДНК HSV дикого типа реплицируется в ядре клетки-хозяина, при этом в результате рекомбинации «терапевтический» ген может встроиться в HSV-геном. Затем частицы как рекомбинантного, так и дикого типа HSV упаковываются и высвобождаются из клеток. Доля рекомбинантных HSV в общем вирусном пуле очень мала, поэтому вирусы размножают, а затем с помощью ПЦР или гибридизации выявляют «терапевтический» ген в образовавшихся бляшках. Рекомбинантный вирус хранят в условиях, не допускающих его загрязнения HSV дикого типа (рис. 21.10).

Доклинические испытания на экспериментальных животных показали, что гены, доставленные с помощью HSV-векторов в клетки мозга и периферической нервной системы, экспрессируются и поддерживаются длительное время. Однако до начала I фазы клинических испытаний HSV-векторов необходимо провести дополнительные исследования.

## Невирусные системы доставки генов

В опосредованной вирусами доставке генов участвуют клеточные рецепторы, с помощью которых вектор проникает в клетку-мишень, не разрушаясь лизосомными ферментами, и векторная

Рис. 21.9. Вектор на основе HSV-ампликон-плазмиды. Точка инициации репликации HSV(*ori* HSV). сигнал упаковки HSV и «терапевтический» ген (ТГ) встраивают в плазмиду *E. coli* (HSV-ампликон-плазида). Проводят трансфекцию клетки-хозяина, инфицированной вирусом-помощником HSV, полученной плазмидой. ДНК ампликон-плазмиды реплицируется по типу «катящегося кольца». 10 ампликонов, соответствующих полноразмерному геному HSV, упаковываются в HSV-капсид, который поставляет вирус-помощник HSV. Геном этого вируса не упаковывается. HSV-частицы, несущие множество копий «терапевтического» гена, высвобождаются при лизисе клетки и используются для трансдукции нейронов.



ДНК попадает в ядро. Однако вирусные векторы имеют ряд недостатков: они дорогостоящи и часто обладают ограниченной клонирующей емкостью, что не позволяет регулировать экспрессию «терапевтического» гена с помощью тканеспецифичных последовательностей. Кроме того, вирусные белки могут вызывать воспалительную реакцию, что исключает повторное введение вектора. Поэтому были разработаны невирусные системы доставки генов.

Самая простая из них — прямое введение ДНК-конструкций в клетки ткани-мишени. Если в скелетную мышцу мыши инъектировать плазмидную ДНК, то она проникнет в некоторое число клеток, о чем свидетельствует экспрессия гена-репортера в течение по крайней мере 50 сут. Однако применение этого подхода ограничивается тем, что не все ткани доступны для инъекций, а кроме того, нужны большие количества ДНК. Можно бомбардировать с помо-



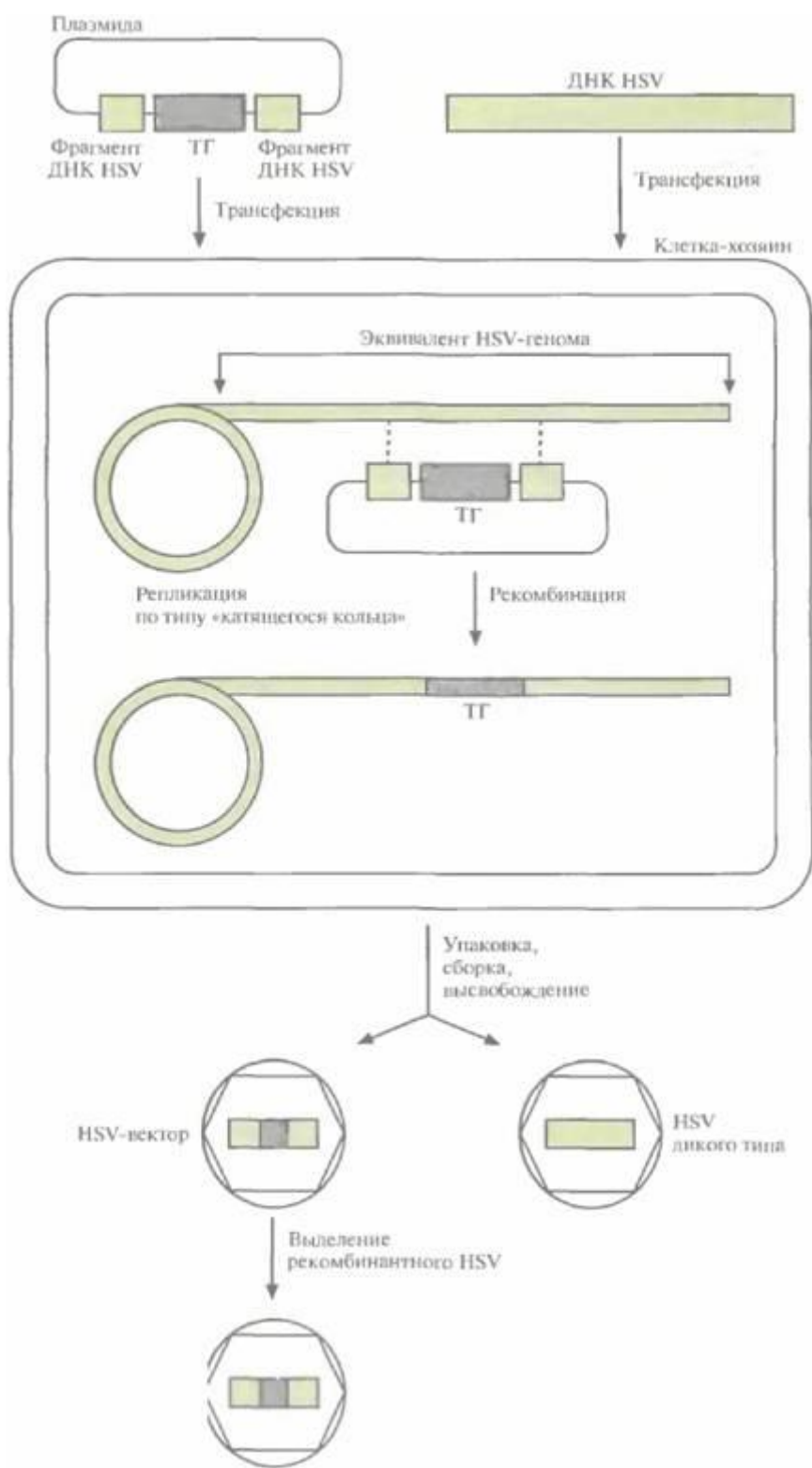


Рис. 21.10. Образование HSV-вектора с помощью рекомбинации. Проводят котрансфекцию клетки-хозяина плазмидой, которая содержит «терапевтический» ген, фланкированный последовательностями ДНК из вспомогательных областей HSV-генома, и ДНК HSV дикого типа. HSV-геном реплицируется в клеточном ядре по типу «катящегося кольца», при этом между фрагментами ДНК HSV, входящими в состав плазмиды, и ДНК HSV дикого типа может произойти рекомбинация (штриховая линия). Молекулы ДНК HSV дикого типа и рекомбинантного HSV упаковываются в вирусные частицы, высвобождающиеся из клетки после лизиса. Вирусы размножают и проводят скрининг бляшек для идентификации рекомбинантных HSV. Полученные HSV-векторы хранят в условиях, исключающих их загрязнение HSV дикого типа.

щью генного «ружья» клетки кожи или — через надрез — клетки подкожной опухоли конъюгированными с ДНК частицами золота диаметром 1—3 мкм. Введенные таким образом «терапевтические» гены экспрессируются в тканях-мишенях, а их продукты поступают в кровь. Это может облегчить доставку терапевтического белка в ткань-мишень, прямой доступ к которой затруднен. Однако большинство белков, в норме не присутствующих в крови, инактивируются или разрушаются ее компонентами. Для решения этой проблемы нужны дополнительные исследования.

Проникновение ДНК через клеточную мембрану можно облегчить, окружив генетическую конструкцию искусственной липидной оболочкой, образующей липидную сферу (липосому) с водным содержимым. Созданы липосомы с самыми разными свойствами, например катион-ные липосомы, поверхность которых заряжена положительно; они связываются с отрицательно заряженной молекулой ДНК, образуя ДНК-липидный комплекс (липоплекс). Липоплексы легко образуются, относительно нетоксичны и неиммуногенны, но эффективность переноса генов с их помощью невысока, поскольку большая часть ДНК после попадания в клетку захватывается лизосомами и разрушается. Так, в одном из клинических испытаний по генной терапии муковисцидоза с использованием комплекса липосома—*CFTR*-ген частота трансфекции клеток назального эпителия оказалась довольно низкой, а экспрессия гена — непродолжительной.

Для доставки в клетки крупных генетических конструкций (>10 т. п. н.) с помощью эндосомного клеточного транспорта, позволяющего избежать лизосомного разрушения ДНК, образуют конъюгат ДНК с другими молекулами. Для этого поли-L-лизин ковалентно сшивают с молекулой, связывающейся со специфическим клеточным рецептором, а затем добавляют ДНК. В результате получается компактная, плотно скрученная структура (тор), на внешней поверхности которой располагаются сайты связывания с клеточным рецептором (рис. 21.11). К сожалению, подобный конъюгат, несмотря на свою специфичность, обладает низкой эффективностью трансфекции. Все созданные к настоящему времени невирусные системы доставки имеют два основных недостатка: 1) низкая частота трансфекции, не позволяющая достичь нужного терапевтического эффекта; 2) непродолжительное время экспрессии «терапевтического» гена, не обеспечивающее эффективного лечения.

Возможно, подходящим терапевтическим вектором станет искусственная хромосома человека. Это связано с: 1) возможностью включения в нее протяженных сегментов чужеродной ДНК вместе с полным набором регуляторных элементов для одного или нескольких «терапевтических» генов; 2) возможностью использования геномного варианта «терапевтического» гена, обеспечивающего высокую эффективность его экспрессии; 3) стабильностью «терапевтического» гена и его длительной экспрессией как в пролиферирующей, так и в неделящейся клетке-мишени.

Искусственная хромосома содержит три основных элемента: концевые участки (теломеры), центромеру и точки инициации репликации. Свойства теломерных областей хромосом человека хорошо изучены, чего нельзя сказать о центромерах и точках инициации репликации, и существовали опасения, что искусственную хромосому человека не удастся сконструировать, пока не будут досконально изучены все ее элементы. Однако уже получены и поддерживаются в трансфицированной культуре клеток стабильные линейные искусственные хромосомы человека (микрохромосомы), состоящие из множества ДНК-повторов (длиной около 1 м. п. н.) центромерной области Y-хромосомы, высокомолекулярных фрагментов геномной ДНК и теломерных участков. В их центромерную область был встроен ген устойчивости к неомицину, что позволило использовать среду G418 в качестве селективной. В нескольких G418-устойчивых клетках были обнаружены микрохромосомы длиной от 6 до 10 м. п. н.

Две из трех микрохромосом были получены «усечением» существующей хромосомы. В одном случае исходная центромера была сохранена, а в другом заменена трансфицированной центромерной областью. Третью, полностью искусственную микрохромосому получили лигированием *in vitro* трех трансфицированных

ДНК-элементов. Ясно, что создание искусственной хромосомы человека, содержащей «терапевтический(е)» ген(ы), вполне реально, но основной проблемой станет доставка этой огромной молекулы ДНК в ядро клетки-мишени. Кроме того, экспрессия генов, входящих в состав ДНК-блоков, из которых построена искусственная хромосома, может оказывать вредные воздействия на клетки-мишени. Для начала в ткани пациента можно попытаться имплантировать инкапсулированные клетки с искусственными хромосомами.

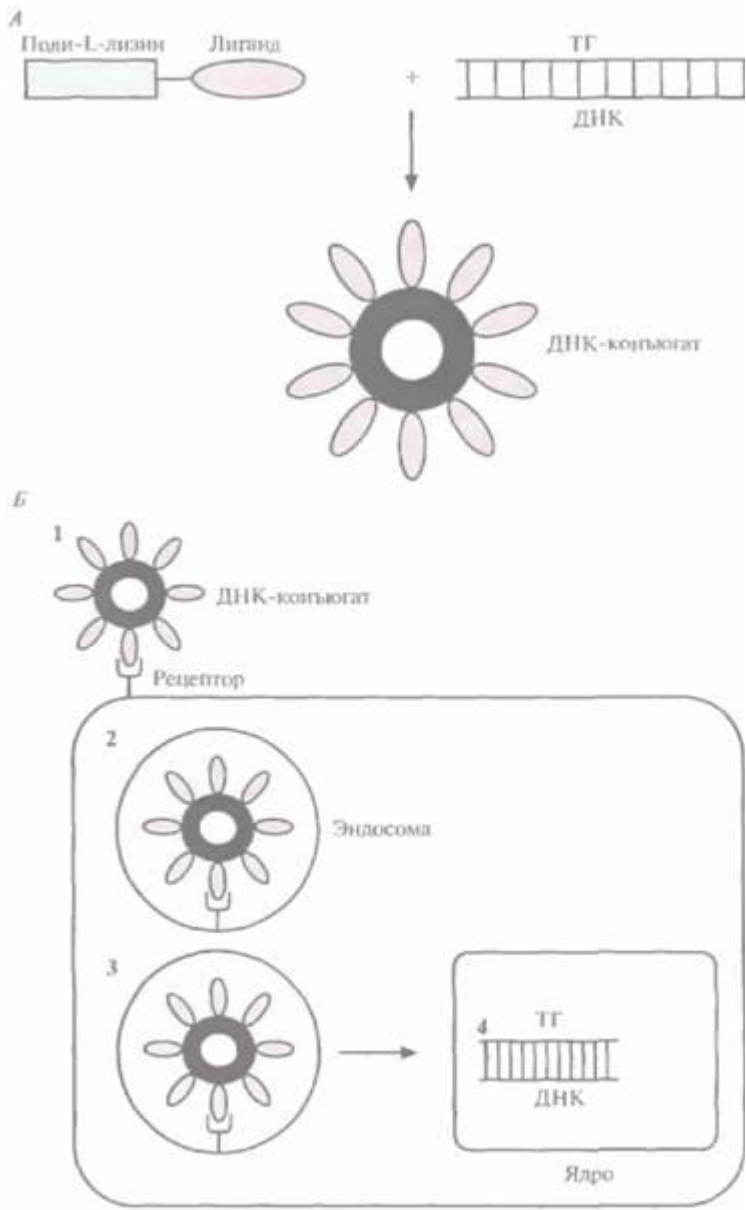


Рис. 21.11. Система доставки «терапевтических» генов с использованием ДНК-конъюгата, А. К поли-Л-лизину пришивают лиганд, соединяющийся с поверхностным клеточным рецептором, и добавляют ДНК, содержащую «терапевтический» ген. В результате образуется конденсированная структура, на поверхности которой располагаются лиганды. Б. ДНК-конъюгат связывается со специфическим клеточным рецептором (1) и обволакивается клеточной мембраной (2) с образованием эндосо-мы (3), которая защищает его от лизосом. В эндосоме часть молекул ДНК высвобождается из конъюгата и проникает в ядро клетки (4), где и происходит экспрессия «терапевтического» гена.

## Активация предшественника лекарственного вещества («пролекарства»)

Несмотря на широкое применение хирургических методов лечения, лучевой и химиотерапии, злокачественные новообразования по-прежнему остаются одной из основных причин смерти людей, поэтому задача разработки новых способов их лечения является весьма актуальной. Одним из таких способов является уничтожение пролиферирующих опухолевых клеток с помощью ганцикловира [GCV; 9-(1,3-Дигидрокси-2-пропоксиметил)гуанина], активированного продукта гена тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSVtk). Для этого проводят *in vivo* трансдукцию или трансфекцию опухолевых клеток геном HSVtk, находящимся под контролем активного промотора, а через несколько дней вводят ганцикловир. Вирусная тимидинкиназа фосфорилирует ганцикловир с образованием ганцикловирмонофосфата. Киназы клетки-хозяина почти не фосфорилируют ганцикловир, зато охотно присоединяют фосфатные группы к его монофосфату с образованием ганцикловир-трифосфата, который ингибирует ДНК-полимеразу и останавливает синтез ДНК, вызывая гибель пролиферирующих клеток. Кроме того, через межклеточные контакты ганцикловиртрифосфат может проникать в нетрансфицированные опухолевые клетки, приводя и к их гибели. Одна экспрессирующая ген HSVtk опухолевая клетка может уничтожить до 10 немодифицированных клеток. Это явление называется «эффектом свидетеля».

Ген, вызывающий при определенных условиях гибель собственной клетки, называют геном «самоубийства», а термин «пролекарство» относится к неактивной форме лекарственного вещества, которая активируется с помощью другого компонента терапевтической системы. Разработаны и другие комбинации «пролекарство» — ген-активатор, но система GCV—HSVtk используется чаще других.

Эффективность системы GCV-HSVtk доказана целым рядом доклинических испытаний. Однако I фаза ее клинических испытаний, в которых участвовали больные с терминальной стадией рака, не показала регресса опухоли. Возможно, ген HSVtk был трансдуцирован в слишком малое число опухолевых клеток и, несмотря на «эффект свидетеля», не мог подавить рост опухоли. В настоящее время разрабатываются новые подходы, которые смогут повысить частоту трансдукции и доставить ген HSVtk в клетки по всему объему опухоли.

Для генной терапии рака разработаны также комбинированные подходы, использующие две разные системы генов. В одном из них сочетаются GCV—HSVtk-терапия и генная иммунотерапия (рис. 21.12). Одну часть опухолевых клеток трансдуцируют геном HSVtk, другую — клонированной кДНК (или геном) одного из цитокинов. Цитокины (интерлейкин-2, интерлейкин-12 и другие) играют роль сигнала, мобилизующего клетки иммунной системы и стимулирующего иммунный ответ. Показано, что опухолевые белки, которые высвобождаются из клетки, уничтоженной в результате терапии с помощью гена «самоубийства», взаимодействуют с иммунными клетками, привлекаемыми к месту локализации опухоли цитокином, и запускают противоопухолевую иммунную реакцию. Кроме того, противоопухолевые антитела, поступая в кровоток и циркулируя по всему организму, предотвращают появление метастазов.

Этот подход к генной терапии рака был проверен экспериментально: в печень животных имплантировали клетки рака толстой кишки, отдельно трансдуцированные генами HSVtk одного из цитокинов. Введение ганцикловира останавливало рост опухоли в печени. Опухоль не возникала и при введении нетрансдуцированных опухолевых клеток в другие ткани такого животного. У контрольных животных в аналогичных условиях происходило развитие опухолей во всех местах введения нетрансдуцированных клеток рака толстой кишки. Несмотря на столь многообещающие результаты, прежде чем приступить к клиническим испытаниям терапии с использованием гена «самоубийства» или различных комбинаций генной терапии, необходимо установить, какие опухоли будут поддаваться такому лечению и не вызовет ли оно побочных эффектов.

## Лекарственные средства на основе олигонуклеотидов

В большинстве протоколов генной терапии *ex vivo* и *in vivo* используются клонированные генетические конструкции, возмещающие функциональную форму белка, который не синтезируется в организме больного или синтезируется в дефектной форме. Однако многие заболевания

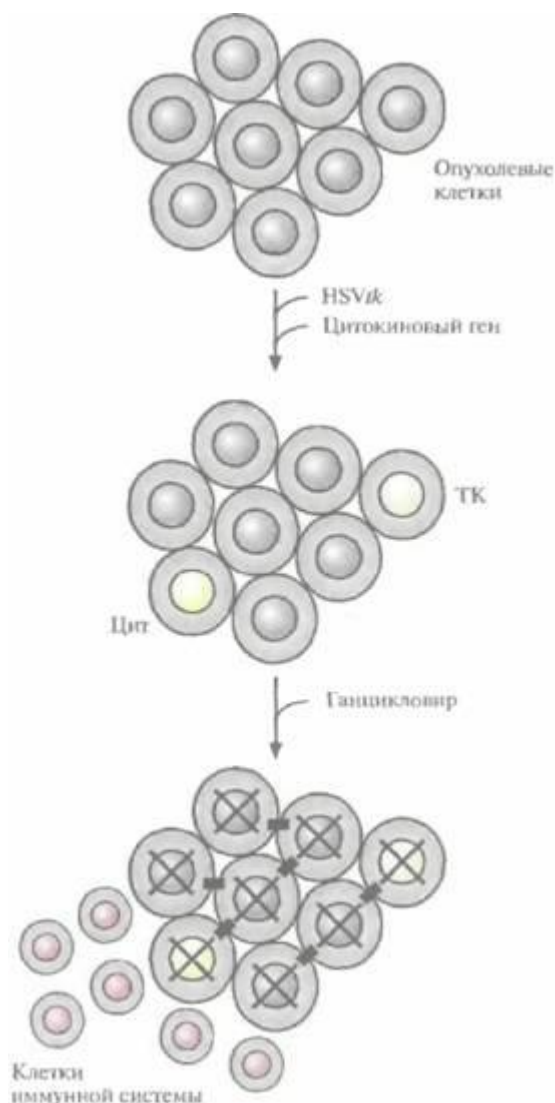


Рис. 21.12. Комбинированный подход с использованием GCV— HSVtk-терапии и генной иммунотерапии. Опухолевые клетки трансдуцировали *in vivo* геном тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSVtk) и цитокиновым геном. Трансдуцированные клетки опухоли, которые синтезируют цитокин (Цит), привлекают иммунные клетки, а те, которые синтезируют тимидинкиназу (ТК), фосфорилируют ганцикловир. Фосфорилированный ганцикловир проникает через межклеточные контакты (черные прямоугольники) в соседние клетки и, связываясь с ДНК, уничтожает их (X).

человека (рак, воспаления, вирусные и паразитарные инфекции) связаны, напротив, с гиперпродукцией нормального белка. Для лечения таких состояний разработаны терапевтические системы с использованием олигонуклеотидов. Небольшой олигонуклеотид может гибридизоваться со специфическим геном или мРНК и снижать уровень транскрипции или трансляции, уменьшая тем самым количество синтезируемого белка, ответственного за патологию. Олигонуклеотид, который гибридизуется с самим геном и блокирует его транскрипцию, называется «антигенным», а тот, который гибридизуется с соответствующей мРНК, — «антисмысловым». Снизить уровень транскрипции и трансляции гена-мишени может также олигонуклеотид, который связывается с фактором транскрипции, контролирующим экспрессию специфического гена. Для предотвращения активации транскрипции специфических генов можно использовать и двухцепочечные олигонуклеотиды, присоединяющиеся к ДНК-связывающим белкам. Можно создать также синтетические молекулы ДНК, которые присоединяются к специфическим белкам-мишеням, исходно не являющимся ДНК-связывающими, и тем самым блокируют их функционирование. Наконец, для уменьшения количества определенной мРНК и синтезируемого на ней белка можно модифицировать рибозимы — природные РНК-последовательности, которые связываются со специфическими молекулами РНК и разрезают их. В будущем лекарственные средства на основе нуклеиновых кислот, по-видимому, найдут широкое применение, при этом главным объектом научных исследований и клинических испытаний будут «антисмысловые» последовательности и особенно — «антисмысловые» олигонуклеотиды.

### Синтез «антисмысловых» мРНК *in vivo*

«Антисмысловая» РНК, которую предполагается использовать в качестве лекарственного средства, должна связываться с определенной мРНК и ингибировать трансляцию кодируемого ей белка, подавляя тем самым патологический процесс (рис. 21.13). Для получения таких РНК использовали экспрессирующие векторы, несущие ДНК-вставки в такой ориентации, чтобы их транскрипты были антисмысловыми по отношению к мРНК. В качестве примера можно привести эписомные экспрессирующие векторы, в которые встроены кДНК инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1) или его рецептора

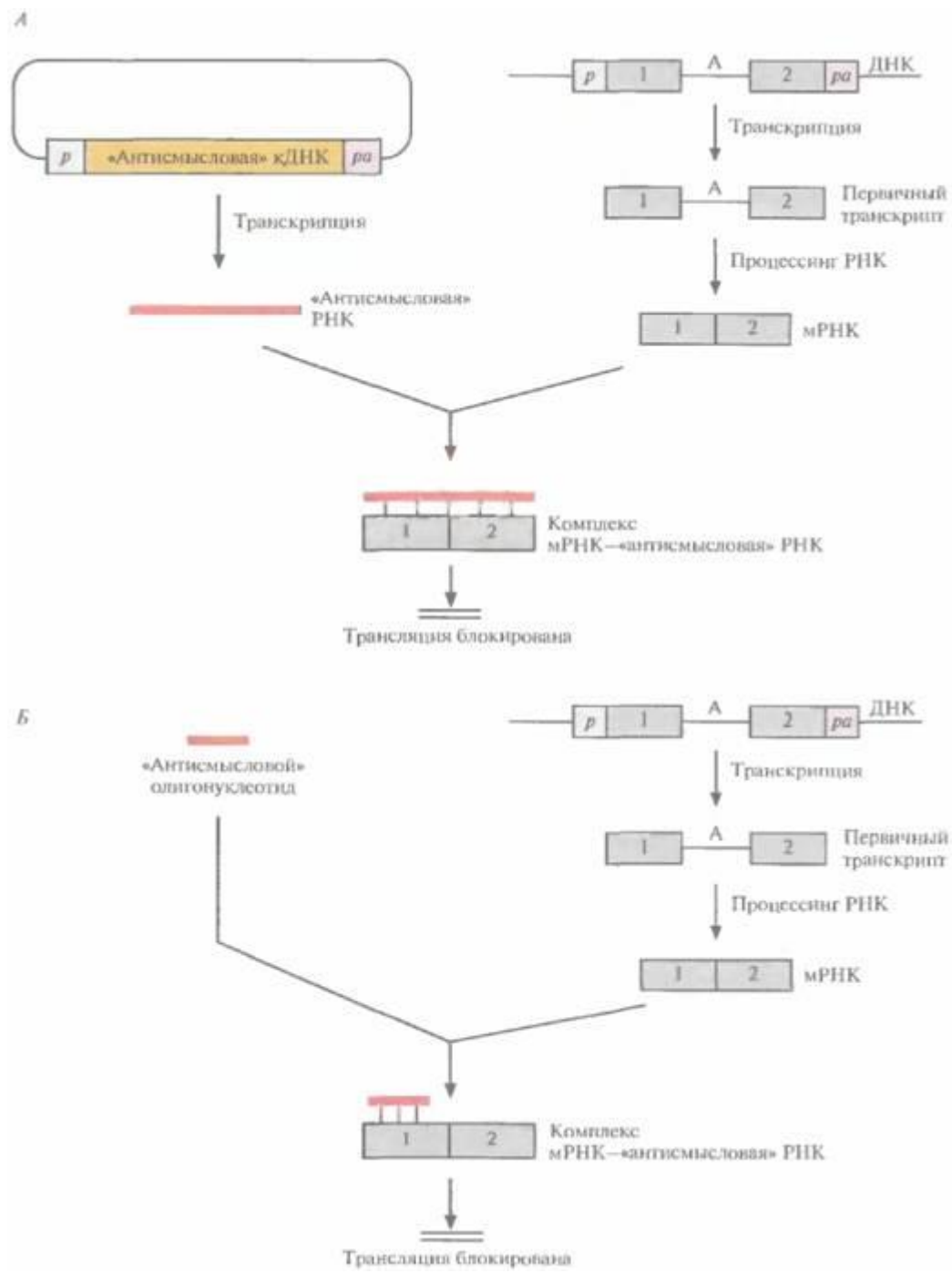


Рис. 21.13, Ингибирование трансляции специфических мРНК с помощью «антисмысловых» нуклеиновых кислот. *А.* кДНК встраивают в экспрессирующий вектор в обратной ориентации и полученную генетическую конструкцию вводят в клетки, где происходит синтез «антисмысловой» РНК. Эта РНК гибридизуется с мРНК-мишенью и блокирует трансляцию. *Б.* В клетку вводят антисмысловый олигонуклеотид, который гибридизуется с мРНК-мишенью и блокирует трансляцию. Обозначения: *p* — промотор, *pa* — сигнал полиаденилирования, *A* — интрон, 1 и 2 — экзоны.



(IGF-IR), находящиеся в обратной ориентации под контролем металлотионеинового промотора, активируемого  $\text{ZnSO}_4$ . IGF-1 вырабатывается в избыточном количестве клетками злокачественной глиомы, наиболее распространенной опухоли головного мозга, а IGF-1R — клетками карциномы предстательной железы.

Вектор, обуславливающий синтез «антисмысловой» мРНК IGF-1, трансфицировали в культуру клеток глиомы. Если  $\text{ZnSO}_4$  в культуральной среде отсутствовал, то гиперпродукция IGF-1 опухолью сохранялась, если же в среду добавляли  $\text{ZnSO}_4$ , то она исчезала. В другом эксперименте изучали последствия введения крысам нетрансфицированных клеток глиомы и клеток, трансфицированных «антисмысловой» кДНК IGF-1. В первом случае опухоли развивались, а во втором — нет.

Если клетки карциномы предстательной железы крыс, трансфицированные «антисмысловой» кДНК IGF-1R, вводили мышам, то у них образовывались лишь небольшие опухоли или не образовывались совсем. Если же им вводили нетрансфицированные или трансфицированные нормальной кДНК IGF-1R клетки, то развивались опухоли большого размера. По-видимому, в обоих случаях «антисмысловая» РНК гибридизуется с комплементарной ей мРНК и ингибирует трансляцию IGF-1 и IGF-1R, предотвращая пролиферацию опухолевых клеток.

### **«Антисмысловые» олигонуклеотиды как лекарственные средства**

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. 15—20-нуклеотидные последовательности гибридизуются с уникальными мРНК с достаточно высокой специфичностью. Потенциальные сайты-мишени определяют тестированием набора «антисмысловых» олигонуклеотидов с использованием культуры клеток, синтезирующих мРНК-мишень. Для этого 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. Никаких 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 двухцепочечным областям. Олигодезоксинуклеотиды разрушаются внутриклеточными нуклеазами, поэтому важно защитить их от действия последних так, чтобы они не утратили способности к гибридизации с мишенью. Для этого можно модифицировать определенным образом пиримидиновые основания и дезоксирибозу (рис. 21.14). Так, у наиболее широко применяющихся сейчас «антисмысловых» олигонуклеотидов свободный атом кислорода фосфодиэфирной связи заменен на сульфогруппу (рис. 21.14, Б), в результате чего образуется тиофосфатная связь. Модифицированные таким образом олигонуклеотиды растворяются в воде, несут отрицательный заряд и не расщепляются под действием эндонуклеаз. При гибридизации с сайтом-мишенью они образуют РНК—ДНК-дууплексы, которые активируют рибонуклеазу (РНКазу) H, эндогенный фермент, расщепляющий мРНК в гибридной молекуле. Проведены первые клинические испытания таких олигонуклеотидов — лекарственных средств «первого поколения». Мишенями являются РНК цитомегаловируса, вируса иммунодефицита человека, а также мРНК генов, ответственных за развитие рака, болезней кишечника и других заболеваний.

Синтезированы «антисмысловые» олигонуклеотиды с фосфорамидитной и полиамидной (пептидной) связями (рис. 21.14, В и Г). Такие молекулы очень устойчивы к действию нуклеаз. Химические группы, присоединенные к 2'-углеродному атому сахарного остатка и С-5-атому пиримидинов, также защищают «антисмысловые» олигонуклеотиды и облегчают их связывание с сайтом-мишенью (рис. 1.14, Д и Е). Все преимущества этих и других модификаций сейчас интенсивно изучаются.

Проникновение «антисмысловых» олигонуклеотидов в клетку можно значительно облегчить, поместив их в липосомы. Такая высоко-

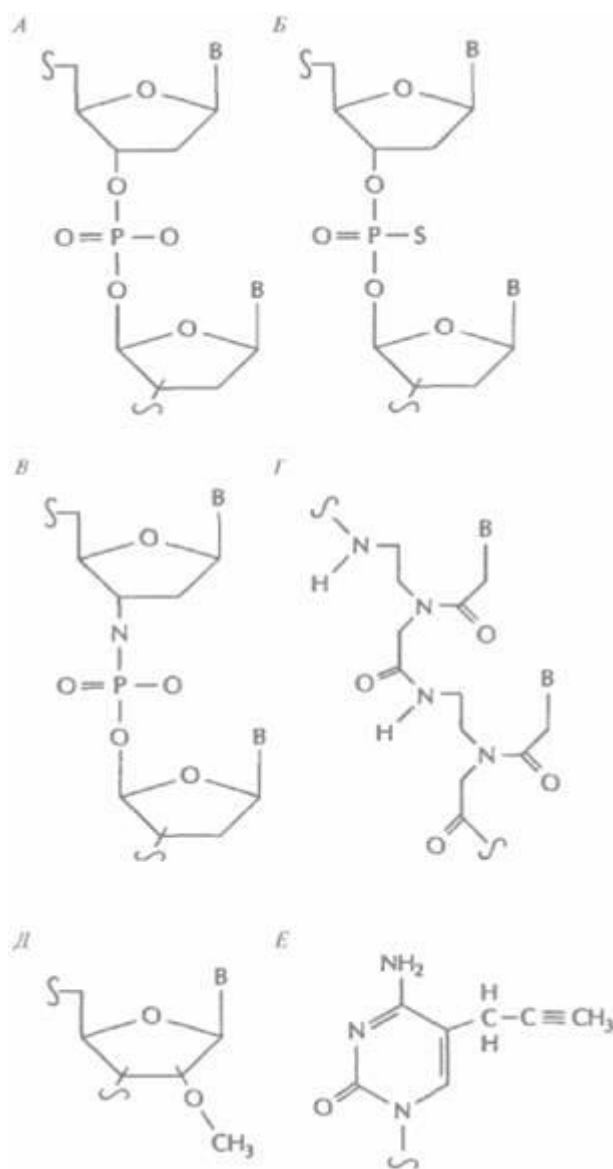


Рис. 21.14. Модификации «антисмысловых» олигонуклеотидов. А. Фосфодиэфирная связь. Б. Тиофосфатная связь. В. Фосфорамидитная связь. Г. Полиамидная связь (пептидная нуклеиновая кислота). Д. 2'-О-метилрибоза. Е. С-5-пропинилцитозин.

эффективная система доставки позволяет использовать «антисмысловые» олигонуклеотиды в небольших концентрациях. Если же конъюгировать липосомы с сайтами связывания, специфичными для определенных клеток, то можно будет осуществлять адресную доставку олигонуклеотидов.

Проведенные доклинические испытания показали, что «антисмысловые» олигонуклеотиды являются весьма эффективными лекарственными средствами. Изучена возможность их применения для лечения стеноза коронарных и сонных артерий, который приводит к инфарктам и инсультам. В этих случаях часто прибегают к ангиопластике, расширению артерий с помощью баллонного катетера, но примерно у 40% больных через 6 мес вновь возникают стенозы, поскольку ангиопластика стимулирует пролиферацию гладкомышечных клеток и секрецию межклеточного вещества во внутренний слой артерии в месте ее расширения. В одном из экспериментов в сонные артерии крыс после ангиопластики вводили «антисмысловые» олигонуклеотиды с тиофосфатными связями, комплементарные мРНК, которые кодируют важные для клеточного цикла млекопитающих белки; в результате частота повторных стенозов уменьшилась на 90%. Пролиферация гладкомышечных клеток происходит также при атеросклерозе, сахарном диабете, осложнениях после коронарного шунтирования. Вероятно, все эти состояния можно будет контролировать аналогичными способами.

«Антисмысловые» олигонуклеотиды можно применять и для лечения вирусных инфекций и малярии. Кроме того, результаты I фазы клинических испытаний лечения болезни Крона с помощью орального введения «антисмыслового» олигонуклеотида проиллюстрировали четко выраженный терапевтический эффект без заметных побочных эффектов. В этом случае мРНК-мишень кодировала межклеточный адгезии типа 1, который вырабатывается в избытке у пациентов с болезнью Крона. Предполагается исследовать эффективность этого же олигонуклеотида для терапии других воспалительных заболеваний, например ревматоидного артрита, псориаза и язвенного колита.

В принципе «антисмысловые» олигонуклеотиды могут образовывать тройную спираль с хромосомной ДНК-мишенью и блокировать транскрипцию. Однако пока специфичность «антигенных» олигонуклеотидов не соответствует стандартам, принятым для лекарственных средств.

### Олигонуклеотиды, связывающиеся с белками: антитромбиновый аптамер

Блокировать экспрессию гена-мишени можно не только с помощью «антисмысловой» терапии, но и введением в клетку олигонуклеотида, связывающегося с фактором транскрипции или трансляции, однако этот подход пока недостаточно изучен. Далее, поскольку нуклеиновые кислоты способны связываться с белками, можно синтезировать такой олигонуклеотид (так называемый аптамер), который будет присоединяться к определенному белку, в норме не связанному ни с какими нуклеиновыми кислотами, и блокировать его функцию. Так, анти-тромбиновый 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, где в каждом из 60 положений может находиться любой из четырех нуклеотидов. Теоретически такой набор содержит примерно  $1,3 \cdot 10^{36}$  ( $4^{60}$ ) олигонуклеотидов с разной центральной последовательностью. Образец пропустили через колонку, содержащую связанные молекулы тромбина, присоединившиеся к тромбину олигонуклеотиды элюировали и повторно пропустили через колонку со связанным тромбином. Эту процедуру повторяли не менее трех 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 высокими 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), а в тех случаях, когда необходимо длительное введение противосвертывающих веществ (например, при ангиопластике), он неприменим. Очевидно, что описанную процедуру идентификации аптамеров можно использовать и в случае других белков-мишеней.

### Рибозимы как лекарственные средства

Рибозимы — это природные РНК, обладающие каталитической активностью (РНК-ферменты); их субстратсвязывающий домен присоединяется к комплементарной РНК-мишени с помощью водородных и, возможно, других связей, а каталитический расщепляет ее в специфическом сайте. Модифицируя субстратсвязывающую последовательность, можно получить рибозим, специфичный в отношении определенной мРНК (рис. 21.15).

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 (примерно 20 нуклеотидов), фланкированный гибридизующимися с мРНК-мишенью последовательностями (они же выступали в роли праймеров), амплифицировали его, встроили в эукариотический экспрессирующий вектор и трансфицировали полученной конструкцией клетки. Образовавшийся после транскрипции рибозим расщеплял мРНК-ми-

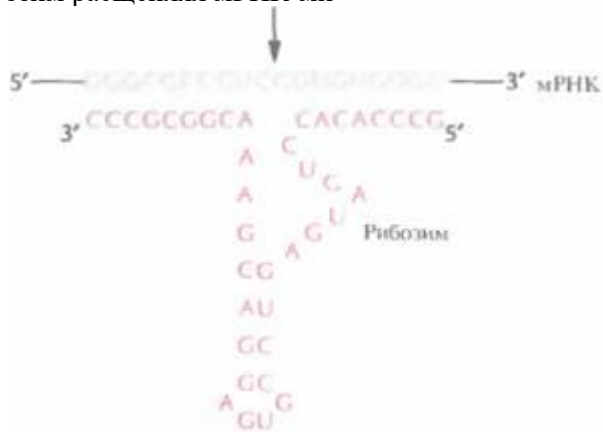


Рис. 21.15. Расщепление мРНК под действием рибозима. Рибозим, субстратсвязывающий домен которого модифицирован с помощью генной инженерии, гибридизуется с мРНК-мишенью и расщепляет ее в специфическом сайте (показано стрелкой). (Из работы Tone et al., *In Vivo* 7: 471—476, 1993, с изменениями.)

шень и подавлял трансляцию белка, ответственного за развитие того или иного заболевания. Рибозимы, созданные методами генной инженерии, можно использовать для лечения рака и вирусных инфекций.

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 упаковать в липосомы и доставить в клетку-мишень. Однако создание эффективных ДНК-ферментов находится пока на начальном этапе развития.

Коррекция генетических дефектов с помощью олигонуклеотидов

Многие генетические дефекты можно скорректировать, заменив связанную с данным дефектом пару нуклеотидов в мутантном гене на «правильную» пару. В одном из экспериментов для этой цели использовался 68-членный химерный (ДНК-РНК) олигонуклеотид, который образует шпильку с двумя головками и содержит метилированный кислород при 2'-углерод-ном атоме рибозы (рис. 21.16). Выбор такого необычного олигонуклеотида основывается на следующих экспериментальных данных: 1) ге-теродуплексы РНК-ДНК легче, чем двухцепочечные ДНК, спариваются с гомологичными нуклеиновыми последовательностями; 2) го-ловки шпилек, не участвующие в спаривании, защищают олигонуклеотид от экзонуклеаз; 3) 2'-О-метилирование предотвращает разрушение молекулы РНКазой Н. Важно и расположение нуклеотидов в химерной молекуле: десять рибонуклеотидов фланкируют пять центральных дезоксирибонуклеотидов, причем этот сегмент имеет одинаковую с мишенью последовательность и содержит нормальную пару нуклеотидов.

Возможность коррекции мутаций с помощью химерных олигонуклеотидов изучали с использованием как кДНК, входящей в состав плазмиды, так и хромосомной ДНК. В обоих случаях мутантный сайт с высокой частотой заменялся нормальным. Но для того чтобы химерные олигонуклеотиды стали эффективными лекарственными средствами, необходимы дополнительные исследования.

Если мутация в интроне распознается системой процессинга РНК как аутентичный сайт сплайсинга, то в процессированную мРНК включается часть интрона (рис. 21.17, А). Это приводит к сдвигу рамки считывания и образованию укороченного белка. При этом количество нормального белка снижается, что может стать причиной заболевания. Разумно предположить, что если «антисмысловый» олигонуклеотид, комплементарный мутантному интрону, гибридизуется с ним, то ошибочный сплайсинг блокируется, что повысит вероятность сплайсинга в нормальном сайте. Это предположение проверили на В-глобиновом гене с мутацией во



Рис. 21.16. Исправление генетического дефекта, состоящего в замене одной пары нуклеотидов, с помощью химерного олигонуклеотида. Стрелкой указаны мутантный сайт в последовательности-мишени и нормальная пара оснований в химерном олигонуклеотиде. Соответствующие нуклеотиды подчеркнуты. Прописными буквами обозначены дезоксирибонуклеотиды, а строчными — рибонуклеотиды. Жирным шрифтом выделены нуклеотиды, образующие головки шпильки. Вертикальная черта указывает 3'- и 5'-концы химерного олигонуклеотида. (Из работы Yoon et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2071 -2076, 1996, с изменениями.)

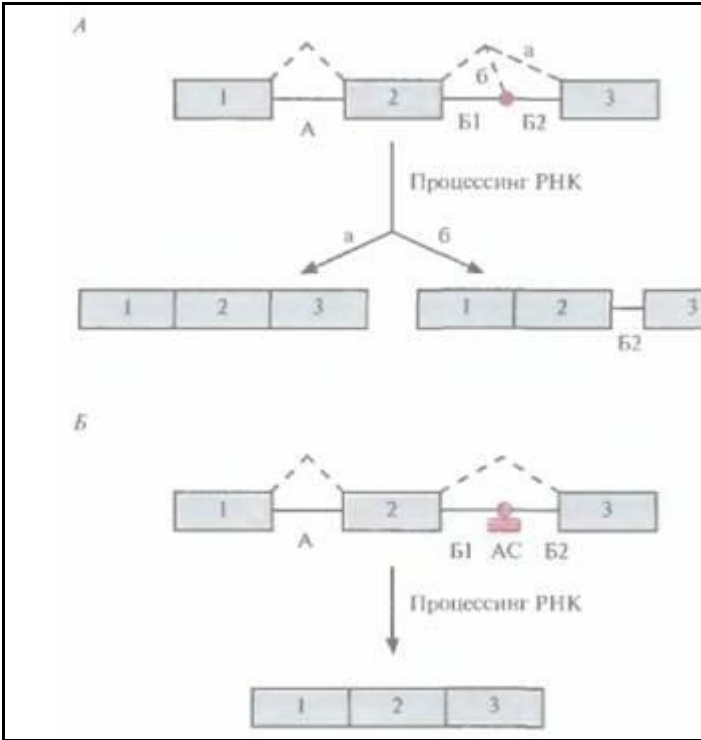


Рис. 21,17. Коррекция дефекта, приводящего к ошибочному сплайсингу, с помощью «антисмыслового» олигонуклеотида, А. Результат мутации, приводящей к ошибочному сплайсингу. Обозначения: цифры — экзоны, А - первый интрон, Б — второй интрон, содержащий мутацию (красный кружок), разделяющую его на две части (Б 1 и Б2). Штриховые линии охватывают сегменты РНК, вырезаемые при процессинге. Возможны два варианта сплайсинга: вариант а приводит к образованию функциональной мРНК, вариант б — к образованию РНК, включающей часть второго интрона (Б2). Б. «Антисмысловой» олигонуклеотид (АС), связывающийся с мутантным сайтом сплайсинга, препятствует его распознаванию при процессинге, и в результате образуется только функциональная мРНК.

втором интроне (рис. 21.17, Б), обуславливающей одну из форм β-талассемии, наследственного заболевания крови, которое приводит к разрушению эритроцитов (анемии). В клетки, гомозиготные по мутантному гену (1VS2-654), ввели содержащий тиофосфатные связи «антисмысловой» 2'-О-метилолигонуклеотид, комплементарный мутантному сайту сплайсинга. В результате число нормальных β-глобиновых цепей увеличилось на 50%. Дальнейшие исследования покажут, является ли этот подход достаточно эффективным для лечения талассемии и других состояний, вызванных подобными мутациями.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Для многих наследственных заболеваний никаких достаточно эффективных способов лечения не существует, и во многом это связано с трудностями получения и адресной доставки соответствующего генного продукта. После разработки методов идентификации и клонирования нормальных вариантов дефектных генов (часто в виде кДНК) были предприняты попытки использовать их для коррекции генетических дефектов. Для лечения заболеваний на молекулярном уровне применяются два основных подхода: генная терапия ex vivo и генная терапия in vivo.

При генной терапии ex vivo «терапевтический» ген переносят в изолированные клетки больного с помощью ретровирусных векторов или других систем доставки, трансдуцированные клетки культивируют и вводят пациенту. При этом у реципиента не развивается нежелательного иммунного ответа, но сама процедура является весьма дорогостоящей и трудоемкой. Альтернативный способ генной терапии ex vivo использует генноинженерную модификацию неаутологичных клеток, заключенных в мембрану, которая предотвращает развитие нежелательного ответа и не препятствует высвобождению «терапевтического» генного продукта.

При генной терапии in vivo «терапевтический» ген вводят непосредственно в клетки ткани-мишени больного. Для этого разработаны разные системы доставки: вирусные (ретрови-



русные, аденовирусные, аденоассоциированные векторы и векторы на основе вируса простого герпеса) и невирусные (инъекция чистой ДНК, бомбардировка ткани-мишени частицами, конъюгированными с ДНК, захват клетками ДНК, заключенной в липидную оболочку). Кроме того, разработаны вирусные и невирусные системы доставки генов, специфичные для определенных клеток.

Весьма перспективным способом разрушения быстроделющихся раковых клеток представляется генная активация лекарственного вещества. При этом наиболее широко используется подход, включающий последовательное введение в опухолевые клетки гена тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSVtk) и ганцикловира. В результате образуется ганцикловиртрифосфат, токсичный для быстроделющихся клеток. Погибают и нетрансформированные клетки, контактирующие с HSVtk-модифицированными клетками («эффект свидетеля»).

В качестве лекарственных средств можно использовать не только генные продукты, но и олигонуклеотиды. С помощью так называемых «антисмысловых» олигонуклеотидов можно подавить полностью или частично экспрессию гена того или иного наследственного заболевания. В одном из вариантов такой терапии клонированный ген встраивают в экспрессирующий вектор в обратной ориентации, в результате чего образуется комплементарный нормальной мРНК ДНК-транскрипт, который спаривается с ней и ингибирует трансляцию. В более распространенном варианте введенный в клетку-мишень «антисмысловой» олигонуклеотид гибридизуется со специфической мРНК и блокирует ее трансляцию. Эффективность «антисмысловых» олигонуклеотидов и время их жизни повышаются в результате модификаций, затрагивающих фосфодиэфирную связь, пиримидины и остатки Сахаров. В настоящее время изучается терапевтическое действие различных олигонуклеотидов: модифицированных с помощью генной инженерии рибозимов, расщепляющих специфические мРНК; аптамеров, которые связываются со специфическими белками и блокируют их функции; олигонуклеотидов, с помощью которых можно корректировать замену одной нуклеотидной пары и мутации, приводящие к неправильному сплайсингу.

## ЛИТЕРАТУРА

- Agrawal S.** (ed.) 1996. *Antisense Therapeutics*. Humana Press Inc., Totowa, N. J.
- Altmail S.** 1993. RN A enzyme-directed gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10898-10900.
- Anderson W. F.** 1992. Human gene therapy. *Science* 256: 808-813.
- Blaese R. M., K. W. Culver, A. D. Miller, C. S. Carter, T. Fleisher, M. Clerici, G. Shearer, L. Chang, Y. Chiang, P. Tolstnshev, J. J. GreenMatt, S. A. Rosenberg, H. Klein, M. Berger, C. A. Mullen, W. J. Ramsey, L. Muul, R. A. Morgan, W. F. Anderson.** 1995. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA<sup>-</sup> SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 270: 475-480.
- Bordignon C., L. D. Ntarangelo, N. Nobili,** (т. Ferrari, G. Casorati, I. Panina, F. Mazznlari, D. Maggioni, C. Rossi, P. Servida, A. G. Lgazio, F. Mavilio. 1995. Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA immunodeficient patients. *Science* 270:470—475.
- Breaker R. R.** 1997. DNA enzymes. *Nat. Biotechnol* 15:427-431.
- Burfeind P., C. L. Chernicky, F. Rininsland, J. Han, J. Han.** 1996. Antisense RNA to the type I insulin-like growth factor receptor suppresses tumor growth and prevents invasion by rat prostate cancer cells in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 7263-7268.
- Caplen N. J., E. W. F. W. Alton, P. G. Middleltn, J. R. Dorin, B. J. Stevenson, X. Gao, S. R. Durham, K. Jeffery, M. F. Hndson, C. Coutelle, L. Huang, D. J. Porteus, R. Williamson, D. M. Geddes.** 1995. Liposome-mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Nat. Med.* 1: 39-46.
- Cole-Strauss A., K. Yoon, Y. Xiang, B. C. Bryne, M. C. Rice, J. Gryn, W. K. Hollouian, E. B. Kmiec.** 1996. Correction of the mutation responsible for sickle cell anemia by an RNA-DNA oligonucleotide. *Science* 273: 1386-1389.
- Cornetta K., R. A. Morgan, W. F. Anderson.** 1991. Safety issues related to retroviral-mediated gene transfer in humans. *Hum. Gene Ther.* 2: 5—14.
- Crystal R. G.** 1995. Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success. *Science* 270: 404-410.



- Culver K. W., F. W. Anderson, R. M. Blaese.** 1991. Lymphocyte gene therapy. *Hum. Gene Ther.* 2: 107-109.
- Culver K. W., Z. Ram, S. Wallbridge, H. Ishii, E. H. Oldfield, R. M. Blaese.** 1992. In vivo trans-*ver* with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science* 256: 1550-1552.
- Ellington A. D., R. Conrad.** 1995. Aptamers as potential nucleic acid pharmaceuticals. *Biotechnol. Annu. Rev.* 1: 185-214.
- Emerich D. F., S. R. Winn, P. M. Hantraye, M. Peschanski, E.-Y. Chen, Y. Chu, P. M. c Demon, E. E. Baetge, J. H. Kordower.** 1997. Protective effect of encapsulated cells producing neurotrophic factor CNTF in a monkey model of Huntington's disease. *Nature* 386: 315-319.
- Fender P., R. W. H. Ruigrok, E. Gout, S. Buffet, J. Chroboczek.** 1997. Adenovirus dodecahedron, a new vector for human gene transfer. *Nat. Biotechnol.* 15: 52-56.
- flotte T. R., B. J. Carter.** 1995. Adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Gene Ther.* 2: 357-362.
- Grossman M., S. E. Kaper, K. Kozarsky, E. A. Stein, J. F. Engelhardt, D. Muller, P. J. Lupien, J. M. Wilson.** 1994. Successful *ex vivo* gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia. *Net. Genet.* 6: 335-341.
- Harrington J. J., G. V. Bnkkelen, R. W. Mays, K. Gustashaw, H. F. Willard.** 1997. Formation of *de novo* centromeres and construction of first-generation human artificial microchromosomes. *Nat. Genet.* 15: 345-355.
- Ishii-Morita H., R. Agbaria, C. A. Mullen, H. Hirano, D. A. Koeplin, 7. Kam, E. H. OMfiew, D. G. Johns, R. M. Blaese.** 1997. Mechanism of 'bystander effect' killing in the herpes simplex thymidine kinase gene therapy model of cancer treatment. *Gene Ther.* 4: 244-251.
- Jiao S., P. Williams, R. K. Berg. B. A. Hodgeman, L. Liu, G. Repetto, J. A. Wolff.** 1992. Direct gene transfer into nonhuman primate myofibres *in vivo*. *Hum. Gene Ther.* 3: 21-33.
- Kochanek S., P. R. Clemens, K. Mitani, H.-H. Chen, S. Chan, C. T. Caskey.** 1996. A new adenoviral vector: replacement of all viral coding sequences with 28 kb of DNA independently expressing both full-length dystrophin and  $\beta$ -galactosidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 5731-5736.
- Koeberl D. D., I. E. Alexander, C. L. Haibert, D. W. Russell, A. D. Miller.** 1997. Persistent expression of human clotting factor IX from mouse liver after intravenous injection of adeno-associated virus vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1426-1431.
- Lanza R. P., J. L. Hayes, W. L. Chick.** 1996. Encapsulated cell technology. *Nat. Biotechnol.* 14: 1107-1111.
- Leib D. A., P. D. Olivo.** 1993. Gene delivery to neurons: is herpes simplex virus the right tool for the job? *BioEssays* 15: 547-554.
- Lewis J. G., K.-Y. Lin, A. Knthavale, W. M. Flangan, M. D. Matteucci, R. B. De Prince, R. A. Mook, Jr., R. W. Hendren, R. W. Wagner.** 1996. A serum-resistant cytofectin for cellular delivery of antisense oligodeoxynucleotides and plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 3176-3181.
- Lyon J., P. Corner.** 1995. *Altered Fates: Gene Therapy and the Retooling of Human Life*. W. W. Norton & Company, Inc., New York, N.Y.
- Michael S. L., D. T. Curiel.** 1994. Strategies to achieve targeted gene delivery via the receptor-mediated endocytosis pathway. *Gene Ther.* 1: 223-232.
- Miller A. D.** 1992. Human gene therapy comes of age. *Nature* 357: 455-460.
- Mulligan R. C.** 1993. The basic science of gene therapy. *Science* 260: 926-932.
- Pochon N. A.-M., B. Heyd, N. Déglon, J.-M. Joseph, A. D. Zürn, E. E. Baetge, J. P. Hamming, M. Goddard, M. Lysaght, F. Kaplan, A. C. Kato, M. Schluep, L. Hirt, F. Regli, F. Porchet, N. De Tribolet.** 1996. Gene therapy for amyotrophic lateral sclerosis (ALS) using a polymer encapsulated xenogenic cell line engineered to secrete hCNTF. *Hum. Gene Ther.* 7: 851-860.
- Putnam D. A.** 1996. Antisense strategies and therapeutic applications. *Am. J. Health-Syst. Pharm.* 53: 151-160.
- Santoro S. W., G. F. Joyce.** 1997. A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 4262-4266.

Sierakowska H., M. J. Sambade, S. Agrawal, R. Kole\* 1996. Repair of thalassemic human- $\beta$ -globin mRNA in mammalian cells by antisense oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sei. USA* 93: 12840-12844.

Sun W. H., J. K. Burkholder, J. Sun, J. Culp, J. Turner, X. G. Lu, T. D. Pugh, W. B. Ershler, N.-S. Yang. 1995. *In vivo* cytokine gene transfer by gene gun reduces tumor growth in mice. *Proc. Natl. Acad. Sei. USA* 92: 2889-2893.

Tone T., M. Kashani-Sabet, T. Funato, T. Shitara, E. Yoshida, B. I. Kashfian, M. Horng, O. Fodstadt, K. J. Scanion. 1993. Suppression of EJ cells tumorigenicity. *In Vivo* 7:471—476.

Trojan J., B. K. Blosscy, T. R. Johnson, S. D. Rudin, M. Tjkocinski, J. Dan, J. Dan. 1992. Loss of tumorigenicity of rat glioblastoma directed by episome-based antisense cDNA transcription of insulin-like growth factor 1. *Proc. Natl. Acad. Sei. USA* 89: 4874-4878.

Wagner R. W. 1994. Gene inhibition using antisense oligodeoxynucleotides. *Nature* 372: 333—335.

Yoon K., A. Cole-Strauss, B. B. Kmiec. 1996. Targeted gene correction of episomal DNA in mammalian cells mediated by a chimeric RNA-DNA oligonucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sei. USA* 93:2071-2076.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Что такое генная терапия *ex vivo*?
2. Опишите использование неаутологических клеток, модифицированных с помощью генной инженерии, для генной терапии *ex vivo*. Почему этот подход представляется весьма перспективным?
3. Что такое генная терапия *in vivo*?
4. Опишите подробно по крайней мере две вирусные системы адресной доставки генов.
5. Опишите подробно по крайней мере три невирусные системы доставки генов.
6. Что такое терапия с использованием «антисмысловых» олигонуклеотидов?
7. С помощью каких модификаций можно увеличить время жизни и повысить эффективность «антисмысловых» олигонуклеотидов как лекарственных средств?
8. Опишите способ лечения злокачественных новообразований с помощью гена HSVtk.
9. Как нужно модифицировать рибозим, чтобы его можно было использовать в качестве лекарственного средства?
10. Как выделяют «терапевтический» аптамер? В чем преимущества аптамеров перед другими видами лекарственных средств?



# **ЧАСТЬ IV.**

## **Контроль исследований в области молекулярной биотехнологии и патентование биотехнологических изобретений**

Все революционные технологии так или иначе влияют на развитие общества. С их появлением возникают разные проблемы экономические, социальные, этические; все они обуславливаются внедрением в практику новых подходов, вытесняющих традиционные методы. Молекулярная биология не является исключением. Более того, имея дело с живыми организмами, она затрагивает действительно жизненно важные, давно сформировавшиеся устои, будоража общество. Возникают вопросы о правомерности использования новых биотехнологических подходов и о том, как обеспечить их контролируемое и безопасное внедрение. В ч. IV мы проанализируем некоторые социально значимые аспекты развития и применения методов молекулярной биотехнологии, в частности вопросы контроля исследований в

области рекомбинантных ДНК, производства генетически модифицированных пищевых продуктов, деятельности служб по контролю за распространением трансгенных организмов в окружающей среде, санкционирования разработок и практического применения методов генной терапии, а также проблемы патентования биотехнологических изобретений.

# ГЛАВА 22.

## Контроль применения биотехнологических методов

Внедрение революционных технологий, в том числе и молекулярной биотехнологии, всегда сопровождается повышенным вниманием со стороны общественности. Для одних новые технологии — это предвестник неминуемых катастроф, подрывающих самые основы общества. Такие люди полагают, что любые новшества неизбежно таят в себе опасность, и избежать ее можно, только прекратив всякие разработки. Другие смотрят на новые технологии как на рог изобилия, из которого на человечество посыплются несказанные блага, и считают, что любые препятствия на пути их развития лишают общество неоценимых преимуществ. Они полагают, что новая технология слишком «хрупкая» вещь и нуждается в защите, чтобы она могла принести ожидаемые плоды. Третья группа людей придерживается промежуточной точки зрения. Ее представители считают, что ничего принципиально нового вообще не существует и любая «новая» технология — это развитие старой. Таких людей вполне устраивают существующие методы контроля, уменьшающие риск, а эффект от новой технологии неизбежно наступит, как только она встанет на ноги.

Поскольку молекулярная биотехнология может оказать влияние на самые разные стороны жизни современного общества, в том числе на сельское хозяйство и медицину, необходимо учитывать все возникающие при этом проблемы - этические, правовые, экономические и социальные. Еще в 1973 г. были высказаны серьезные сомнения по поводу безопасности технологии рекомбинантных ДНК. Ученым пришлось даже наложить мораторий на некоторые исследования в этой области до принятия официальных правил работы с рекомбинантными микроорганизмами. Согласно этим правилам, эксперименты можно было проводить только с теми из них, которые неспособны размножаться вне лаборатории, а сами исследователи должны были быть защищены от какой бы то ни было опасности. Правила разрабатывались в 1974—1975 гг. в ходе открытых дебатов и под пристальным вниманием прессы, так что общественность получила полное представление о последствиях — как негативных, так и позитивных — генетического манипулирования с живыми организмами. Тем не менее в конце 1970-х гг. все еще высказывались сомнения в безопасности работ с рекомбинантными ДНК. В частности, существовало мнение, что попадание генетически модифицированных организмов в окружающую среду может привести к неконтролируемому распространению их в экосистемах. Пришлось ввести дополнительные нормы, уменьшающие и без того небольшую вероятность событий такого рода.

Развернулась широкая дискуссия и по поводу этичности проведения генетических экспериментов на человеке. Цель ее заключалась в том, чтобы попытаться разграничить то, что совершенно недопустимо, и то, что вполне приемлемо. К сожалению, нельзя дать однозначного ответа на все этические, правовые и социальные вопросы, возникающие в связи с разнообразными применениями молекулярной биотехнологии. Однако ставки в игре чрезвычайно высоки, поэтому детальный анализ проблем необходим.



## Контроль экспериментов с рекомбинантными ДНК

В 1974 г., когда стало ясно, что с помощью технологии рекомбинантных ДНК можно создавать организмы, несущие чужеродные гены, ученые, общественность и официальные лица забили тревогу по поводу безопасности этого нового подхода и возможных этических последствий его применения. Такие выражения, как «заигрывание с Богом», «манипулирование жизнью», «самые опасные из проводившихся когда-либо научных исследований», «творимая человеком эволюция» без конца мелькали в прессе. Больше всего тревожило то, что случайно, а возможно, и намеренно, в военных целях, будут созданы уникальные, ранее не существовавшие в природе микроорганизмы, которые станут причиной эпидемий или экологических катастроф. В ответ на эти панические ожидания группа ведущих молекулярных биологов предложила наложить мораторий на некоторые эксперименты с рекомбинантными ДНК, особенно на те, в которых используются патогенные микроорганизмы.

В 1976 г. Национальные институты здравоохранения (NIH от National Institutes of Health), ведущее исследовательское ведомство США, выделяющее денежные средства на работы в области медицины и здравоохранения, разработали директиву, регламентирующую проведение всех субсидируемых ими экспериментов с рекомбинантными ДНК. В ней жестко оговаривались условия работы с рекомбинантными ДНК в лаборатории и выдвигалось требование, чтобы в качестве хозяев для чужеродных ДНК использовались только микроорганизмы, неспособные размножаться вне стен лаборатории и передавать свою ДНК другим микроорганизмам. Для экспериментов с известными патогенными организмами, например, было рекомендовано использовать специально сконструированные, находящиеся под постоянным контролем изолированные боксы, в которых поддерживается отрицательное давление, и работы с менее опасными организмами можно было проводить в помещениях, оборудованных высокоэффективными системами фильтрации. Несмотря на то что директивы NIH не имели правового статуса, большинство компаний, приступающих к работам с применением технологии рекомбинантных ДНК, добровольно выполняли все указанные требования. Более того, другие страны, принимая директивы NIH за основу, разработали собственные ограничения для экспериментов с рекомбинантными ДНК.

Исходные директивы NIH были очень жесткими, и многие ученые считали, что их требования избыточны. Например, стоимость необходимого оборудования, обеспечивающего соблюдения всех оговоренных мер биологической безопасности, была столь высока, что небольшие компании и исследовательские группы были вынуждены отказываться от работ с рекомбинантными ДНК. Для возможного пересмотра этих директив был создан Консультативный комитет NIH по рекомбинантным ДНК (NIH Recombinant DNA Advisory Committee, NIH-RAC). Он должен был контролировать исследования, связанные с рекомбинантными ДНК, и при необходимости изменять действующие правила. В его обязанности входили также организация открытых дискуссий по обсуждению принимаемых решений, информирование о планируемых заседаниях, согласование времени их проведения. Необходимо было организовать работу так, чтобы любые лица, не члены Комитета, могли обращаться в него по всем входящим в его компетенцию вопросам. Большинство членов Комитета составляли ученые, но в него входили также специалисты по вопросам этики и представители общественности.

В соответствии с первоначальными директивами NIH, к категории экспериментов, «которые не могли проводиться в настоящее время» ни при каких условиях, относились такие, которые были связаны с «преднамеренным высвобождением в окружающую среду любых организмов, содержащих рекомбинантную ДНК». Однако само создание генетически модифицированных организмов (ГМО), способных выживать в природных экосистемах, было неизбежным.

К 1980 г. первоначальные директивы NIH были пересмотрены в сторону смягчения требований, в основном благодаря экспериментальным данным, полученным в ходе исследований, финансируемых NIH-RAC и NIH. Например, было установлено, что микроорганизм *Escherichia*

*coli* K-12, чаще других использовавшийся в работах с рекомбинантными ДНК, не способен размножаться и длительное время существовать вне стен лаборатории. Кроме того, микробиологи убедили молекулярных биологов и других заинтересованных лиц в том, что те меры безопасности, которые принимаются при работе с патогенными организмами, соответствуют самым высоким стандартам и более жесткие нормы не требуются. И наконец, было признано чрезвычайно маловероятным появление патогенного организма, если используемый для клонирования ген не «отвечает» за патогенные свойства того организма, из которого он был выделен. По мнению большинства, при должном оснащении лабораторий можно обеспечить безопасность работающего персонала. Однако к директивам НИН были добавлены специальные правила по обеспечению мер предосторожности, исключающих случайный выброс в окружающую среду генетически модифицированных организмов при их крупномасштабном культивировании.

После того как требования к мерам безопасности для большинства рутинных экспериментов были смягчены, технология рекомбинантных ДНК стала быстро развиваться. Разработанные NIH-RAC и НИН правила частично сняли существовавшие ранее опасения. Однако остались две важных проблемы. Во-первых, как контролировать производство и потребление пищевых продуктов, содержащих генетически измененные организмы или полученных с их использованием? Во-вторых, как уследить за преднамеренным высвобождением ГМО в окружающую среду?

Третью возможную проблему удалось разрешить, когда контролирующие органы пришли к выводу, что лекарственные препараты, полученные с помощью технологии рекомбинантных ДНК, аналогичны препаратам, полученным традиционными методами. В большинстве стран существует четкая установка, что действующих норм, которые регламентируют коммерческое использование лекарственных препаратов, достаточно для того, чтобы обезопасить как производителей, так и потребителя, независимо от способа получения препарата (традиционная технология или технология рекомбинантных

ДНК). Положение, согласно которому проверке на безопасность и эффективность должен подвергаться только сам продукт, привело к одобрению лекарственных средств, вакцин, диагностических систем и других продуктов, полученных с помощью технологии рекомбинантных ДНК.

## **Контроль за производством и потреблением пищевых продуктов и пищевых добавок**

В США контроль за производством и поступлением на рынок пищевых продуктов, лекарственных и медицинских средств осуществляет Управление по контролю за качеством пищевых продуктов, медикаментов и косметических средств (FDA, от англ. Food and Drug Administration). Безопасность пищевых продуктов и пищевых ингредиентов, в том числе добавок, придающих продуктам специфический вкус и запах, должна быть гарантирована еще до получения лицензии, разрешающей их введение в товарооборот и подтверждающей, что такие продукты можно употреблять в пищу. FDA в своей деятельности руководствуется многократно апробированной, но не в полной мере узаконенной системой сертификации новых пищевых продуктов и пищевых компонентов. Ее недоброжелатели отмечают, что эта организация старается соблюсти интересы промышленных предприятий и не слишком торопится ввести в действие свои собственные нормативные акты. Как FDA, так и производители пищевых продуктов, чьи интересы представляет Международный совет по пищевой биотехнологии, отстаивают (в чем-то весьма убедительно) ту точку зрения, что нет никакой необходимости в разработке новых нормативных актов, регулирующих производство и потребление пищевых продуктов и пищевых компонентов, получаемых с помощью технологии рекомбинантных ДНК, поскольку любой нелицензированный пищевой продукт или пищевой ингредиент (независимо от способа его получения) и так должен пройти проверку на токсичность, чистоту и аллергенность. Если в результате генетических манипуляций (например, связанных с процедурой селекции или использованием самой технологии рекомбинантных ДНК) состав утвержденных

FDA пищевых продуктов или пищевых ингредиентов изменяется, то компания-производитель, проверив такие продукты на безопасность, должна снабдить их специальным ярлыком, уведомляющим о том, что новый продукт отличается от традиционного.

### Химозин

Новые пищевые продукты обычно подвергаются многочисленным проверкам. Однако, чтобы упростить процедуру тестирования и снизить себестоимость продукта, при лицензировании учитывается сходство нового продукта с известным, который и предполагается заменить на рынке. Например, FDA утвердила к применению фермент химозин, полученный с помощью технологии рекомбинантных ДНК и предназначенный для производства сыров, хотя соответствующие испытания не были проведены в полном объеме. Химозин, один из ключевых ферментов сычуга жвачных животных, является сбраживающим молоко протеолитическим ферментом, который гидролизует к-казеин. В результате такого гидролиза в молоке образуется сгусток, который в свою очередь ферментируется с образованием сыра. Обычно сбраживающий молоко агент, используемый при производстве сыра, получают из четвертого отдела желудка жвачных животных (сычуга); он представляет собой смесь веществ, известных под общим названием «сычужный фермент».

Чтобы обеспечить надежный, удобный и по возможности наиболее дешевый промышленный способ получения химозина, кодирующий его ген клонировали и экспрессировали в *E. coli* K-12. Готовый продукт был выделен из бактериальных клеток, и в FDA направлена просьба дать разрешение на коммерческое использование рекомбинантного химозина для промышленного производства сыров. Перед FDA встал вопрос: какие критерии использовать в этом случае? Поскольку применение сычужного фермента, содержащего химозин, в сыроваренной промышленности имеет долгую историю, FDA резонно заключила, что если рекомбинантный химозин идентичен природному ферменту, то дополнительное тестирование проводить не обязательно. По существу лицо, запрашивающее разрешение, должно было лишь подтвердить, что рекомбинантный химозин аналогичен сычужному ферменту. Идентичность клонированного и природного генов химозина была подтверждена рестрикционным картированием, ДНК-гибридизацией и секвенированием ДНК. Более того, было показано, что рекомбинантный химозин обладал такой же молекулярной массой, что и природный очищенный химозин телят, и одинаковой с ним биологической активностью.

Далее, необходимо было показать, что рекомбинантный химозин безопасен для применения. Компания представила данные, подтверждающие, что конечный препарат, экстрагированный из бактериальных телец включения и прошедший все необходимые этапы очистки, не загрязнен целыми бактериальными клетками, клеточным дебрисом и другими примесями, в том числе нуклеиновыми кислотами. Кроме того, многочисленные исследования показали, что штамм *E. coli* K-12 нетоксичен и непатогенен для человека. Результаты тестирования на животных не выявили никаких побочных эффектов препарата, что свидетельствовало об отсутствии в нем токсинов. После изучения всей полученной информации FDA пришла к выводу, что рекомбинантный химозин может быть разрешен для коммерческого использования.

### Триптофан

Организации, занимающиеся контролем производства и поступления на рынок пищевых продуктов и пищевых ингредиентов, полученных с помощью технологии рекомбинантных ДНК, часто руководствуются в своей работе так называемым прецедентным правом (case-by-case law). В каждом случае вопрос рассматривается отдельно, и в зависимости от решения официального органа проводятся те или иные тесты на безопасность продукта. Производители предпочитают (и оказывают давление на правительство), чтобы соответствующие государственные органы разработали универсальный набор тестов для всех продуктов, полученных методами генной инженерии, однако такая инициатива не находит поддержки. Включение пищевых продуктов, полученных на основе технологии рекомбинантных ДНК, в число това-

ров, разрешенных к употреблению, проходит чрезвычайно осторожно, прежде всего потому, что неправильные выводы, изначально кажущиеся правомерными, впоследствии могут привести к неожиданным и даже трагическим последствиям.

В течение 1989—1990 гг. в США отмечалось резкое увеличение встречаемости синдрома эозинофилии—миалгии (СЭМ). Это в общем-то редкое заболевание характеризуется тяжелыми, изнурительными мышечными болями и может закончиться смертью больного в результате спазма дыхательных путей. Большинство пациентов с СЭМ употребляли в качестве пищевой добавки аминокислоту триптофан, причем в больших количествах. Каждый раз, когда пытались установить происхождение триптофана, выходили на одну и ту же химическую компанию. Обнаружившаяся корреляция между потреблением триптофана и развитием СЭМ обескураживала, поскольку до этого не было обнаружено никаких негативных последствий применения триптофана в качестве пищевой добавки. В ходе дальнейших изысканий обнаружилось, что все партии «некачественного» триптофана были получены с помощью штамма генетически трансформированных бактерий, специально сконструированного для того, чтобы обеспечить сверхпродукцию триптофана. Компания сочла, что этот штамм идентичен предыдущему и поэтому не стала проводить дополнительные тесты на безопасность продукта. В то же время одна из стадий очистки триптофана, как считалось — несущественная, изменилась, хотя все контрольные тесты на качество очистки конечного продукта остались прежними.

Как показали результаты химического анализа коммерческих продуктов, полученных с помощью генетически модифицированного штамма, эти продукты содержат метаболиты триптофана, в том числе 1-1'-этилен-бис[триптофан] (ЭБТ). Вначале образование ЭБТ было связано с нарушением метаболизма триптофана у нового штамма. Параллельно основным исследованиям, целью которых было установить, способен ли ЭБТ вызывать СЭМ, проводились другие эксперименты, в ходе которых выяснилось, что ЭБТ продуцируют и штаммы дикого типа. Анализ на токсичность выявил способность ЭБТ вызывать патологические изменения у крыс, сходные с симптомами СЭМ, а также — что было совсем неожиданно — способность самого триптофана, хотя и в меньшей степени, вызывать некоторые симптомы СЭМ. Как следствие L-триптофан, даже не содержащий никаких примесей, был запрещен в США для употребления человеком. С чем было связано появление ЭБТ в составе прежде безопасного продукта, так и осталось неясным. Большинство сошлось во мнении, что причиной было изменение в методе очистки. Возможно, при «старом» способе очистки ЭБТ эффективно удалялся, хотя компания об этом не подозревала.

Один из уроков, который можно извлечь из этой истории, заключается в том, что хотя генетическая инженерия может оказаться и ни при чем, биологическая идентичность между исходным штаммом и его генетически модифицированным двойником не должна упускаться из виду. Это относится как к штаммам, полученным традиционными способами, так и к штаммам, полученным генноинженерными методами. Более того, производители теперь осознают, что даже несущественные технические изменения в способе очистки могут привести к изменению свойств продукта. Другое дело — что они дальше предпринимают. Многие компании не хотят подвергать всестороннему исследованию на токсичность те продукты, которые, как они считают, уже были тщательно проверены. Однако большинство производителей придерживаются мнения, что, несмотря на издержки, «лучше безопасность, чем неприятности».

### ***Бычий соматотропин***

Безопасность продуктов, полученных с помощью новых технологий, — это только одна из тех проблем, которые возникают перед обществом в связи с появлением таких технологий. Примером эффективной и безопасной инновации, не принятой, однако, обществом с распростертыми объятиями, может служить получение рекомбинантного бычьего соматотропина (БСТ), известного также под названием гормона роста крупного рогатого скота.

В 1930-х гг. было показано, что введение БСТ коровам в значительной степени повышает их

удойность. Поскольку получение природного БСТ в больших количествах весьма трудоемко и дорого, он не нашел широкого применения в молочной промышленности. С помощью технологии рекомбинантных ДНК ген БСТ был клонирован в *E. coli*, синтезированный рекомбинантный БСТ выделен из бактериальных клеток и очищен. Как и ожидалось, удойность коров, которым был введен рекомбинантный БСТ, увеличилась на 25—30%.

БСТ, содержащийся в молоке, был исчерпывающим образом проверен на безопасность. У коров, получавших рекомбинантный БСТ, его концентрация в молоке была не выше, чем у контрольных животных. Более того, БСТ неактивен в организме человека, и все тесты на токсичность не выявили никаких побочных эффектов. Используя все доступные результаты исследований, FDA пришла к выводу, что как мясо, так и молоко коров, получавших рекомбинантный БСТ, безопасны для человека. Это заключение поддержало Ведомство по оценке технологий США после того, как был проведен независимый анализ многочисленных данных по тестированию БСТ.

Однако одна мощная лоббирующая группа выступила единым фронтом за то, чтобы разрешение к использованию рекомбинантного БСТ, выданное FDA, было заблокировано. В основе ее действий лежали экономические соображения, касающиеся последствий применения рекомбинантного БСТ для молочной промышленности. Члены группы считали, что это приведет к разорению многочисленных мелких молочных ферм, поскольку для получения того же количества молока понадобится меньше коров. Кроме того, высказывалась обеспокоенность, что молочная промышленность будет монополизирована крупными корпорациями в ущерб интересам независимых производителей. По-видимому, эти экономические аргументы были обоснованными и уж, конечно, любая группа людей имеет право протестовать против того, что может представлять угрозу для ее существования. Однако основной причиной рекламной кампании, развернувшейся против использования рекомбинантного БСТ, послужило соображение, что «гормоны, полученные генноинженерными методами», могут нанести вред человеку и вызвать образование злокачественных опухолей. То, что для получения БСТ использовалась технология рекомбинантных ДНК, еще более повысило эмоциональный накал.

Помимо экономических аргументов, противники БСТ высказывали соображение, что его использование увеличит частоту бактериальных инфекций молочных желез (маститов) у коров. Это потребует применения большего количества антибиотиков, что приведет к повышению их концентрации в молоке и в свою очередь может вызвать аллергические реакции у людей, употребляющих такое молоко в пищу. Кроме того, повышение количества антибиотиков может привести к усилению давления отбора и к появлению устойчивых к ним патогенов. Однако Консультативный комитет по ветеринарии при FDA, проведя соответствующий анализ, пришел к выводу, что частота маститов у коров, получавших БСТ, не выше, чем у коров, не получавших этого препарата.

Рекомбинантный БСТ был лицензирован в США для применения в молочной промышленности в 1994 г. Однако во многих других странах до сих пор существует временный запрет на продажу молока от коров, получающих такой БСТ. По-видимому, этот запрет обуславливается социально-экономическими причинами, а не обеспокоенностью возможным влиянием БСТ на здоровье людей.

Многие высказывавшиеся вначале опасения, связанные с производством и потреблением пищевых продуктов, полученных с помощью технологии рекомбинантных ДНК, постепенно рассеялись после того, как FDA и аналогичные организации в других странах обеспечили выполнение всех процедур, необходимых для оценки возможного риска от использования таких продуктов. Производители предпочитают, чтобы число тестов, которые должен пройти тот или иной продукт — начиная с этапа разработки и заканчивая поступлением на рынок, — было минимальным. Двойная ответственность при этом ложится на правительственные организации. Они должны заботиться об охране здоровья общества в целом и в то же время — об устранении лишних барьеров на пути внедрения новых разработок. Со временем, по мере накопления новых данных, жесткость существующих норм



может быть ослаблена и приняты более простые тесты. Очень важно, чтобы все эти изменения не вводились для удобства, в ущерб безопасности.

### **Контролируемое высвобождение генетически модифицированных организмов в окружающую среду**

К 1982 г. стало ясно, что имеет смысл разработать правила проведения открытого тестирования в полевых условиях организмов, полученных с помощью методов генной инженерии, с тем чтобы иметь возможность контролировать их высвобождение в окружающую среду. Однако ни правила, ни протоколы, которые могли бы подсказать создателям таких организмов, какую информацию необходимо включать в заявки на разрешение подобного тестирования, написаны не были. Такая неспешность объяснялась бытовавшим среди молекулярных биологов мнением, что организмы, полученные с помощью методов генной инженерии, мало чем отличаются от своих немодифицированных предшественников. А если различие все-таки существует, то его легко выявить с помощью подходящих биологических тестов.

В 1982 г. в NIH-RAC поступили три заявки на проведение полевых испытаний ГМО. Две из них относились к генетически модифицированным растениям (кукурузе и табаку), а третья касалась тестирования генетически модифицированного штамма микроорганизма *Pseudomonas syringae*. предстояло определить, способен ли такой штамм снижать уровень повреждения растений при заморозках. Этот прецедент стал поворотным моментом в регламентировании процедур, призванных контролировать высвобождение ГМО в окружающую среду.

#### ***Pseudomonas syringae*, не образующие кристаллов льда**

Генетическое модифицирование *P. syringae* включало, в частности, удаление гена, который кодирует белок, ответственный за образование кристаллов льда. Тестирование должно было определить, способен ли модифицированный штамм при распылении на листьях растений предотвращать их повреждение при заморозках. *P. syringae* дикого типа, обычно обитающий на листьях, секретирует белок, который при низких температурах вызывает образование кристаллов льда, что и является причиной повреждений. Стратегия защиты состояла в нанесении модифицированных бактерий на листья еще до их колонизации бактериями дикого типа. Это мероприятие должно было дать значительный экономический эффект; например, в США ущерб, наносимый заморозками, оценивается в 1 млрд. долларов в год.

Получая заявки на проведение полевых испытаний ГМО, NIH-RAC предпринимал такие же действия, как и для тестирования экспериментов с рекомбинантными ДНК, а именно:

1. Заявки включались в Федеральный регистр США.
2. Информация о них рассылалась 3000 заинтересованным лицам.
3. Предложения рассматривала коллегия экспертов.
4. Каждое предложение обсуждалось на открытых слушаниях.
5. Параллельно заявки рассматривались и самим NIH-RAC, а также Министерством сельского хозяйства США.

После тщательного анализа Министерство и NIH-RAC вынесли положительное решение по заявке на тестирование штамма *P. syringae* с deletированным геном белка, ответственного за образование кристаллов льда, а в 1983 г. директор NIH окончательно одобрил указанное решение. Однако в тот самый день, когда было выдано разрешение на проведение полевых испытаний, был подан судебный иск на их блокирование. Его подала организация под названием Фонд экономической политики, возглавляемая Джереми Рифкином, которая находилась в безоговорочной оппозиции по отношению ко всем экспериментам в области генной инженерии. Иск был удовлетворен, причем в решении указывалось, что NIH-RAC не провел должных слушаний в соответствии с законодательством США и, что более важно, не затребовал данных о безопасности модифицированных организмов для окружающей среды.

Это законное решение четко продемонстрировало, что, несмотря на научно обоснованное



мнение NIH-RAC и заключение работающих в нем экспертов, существующие нормы, регулирующие полевые испытания ГМО, нельзя признать адекватными. За пределами NIH-RAC преобладало мнение, что попадание генетически модифицированного организма в окружающую среду может иметь отдаленные последствия, поскольку живые микроорганизмы размножаются, персистируют и распространяются в окружающей среде и иногда передают свою генетическую информацию другим микроорганизмам. Некоторые критики программ по регуляции высвобождения ГМО в окружающую среду утверждали, что генетически модифицированные организмы вытеснят существующие виды из их экологических ниш, что приведет к серьезным неблагоприятным изменениям в окружающей среде. Кроме того, высказывалось опасение, что гены могут передаваться от ГМО природным штаммам, а значит, могут появиться (хотя и непредумышленным путем) экологически опасные организмы. Конечно, все эти аргументы отвечали наихудшим и крайне маловероятным сценариям воздействия ГМО на окружающую среду, однако несомненно, что правила, регулирующие полевые испытания ГМО, должны были предусматривать доскональную оценку возможного риска.

В настоящее время за оценку заявок, предусматривающих контролируемое высвобождение ГМО в окружающую среду, в США отвечают Агентство по охране окружающей среды и Министерство сельского хозяйства. Национальные институты здравоохранения только разработали набор критериев для полевых испытаний ГМО, а затем передали свои права в этой области другим организациям.

Агентство по охране окружающей среды приняло решение рассматривать две заявки, которые касались бактерий, дефектных по гену белка, ответственного за образование кристаллов льда, как стандарт для разработки правил, регламентирующих полевые испытания всех ГМО. Каждое предложение подвергалось критическому анализу, который включал оценку испытаний с точки зрения безопасности для окружающей среды, экологических последствий и возможного влияния на здоровье человека, а также подробное изучение самого ГМО. В работе принимали участие следующие организации:

- Управление по оценке программ по использованию пестицидов Агентства по охране окружающей среды.
- Комитет по планированию исследований токсичных веществ и Экспертный комитет Агентства по охране окружающей среды.
- Административный совет Агентства по охране окружающей среды.
- Министерство сельского хозяйства, FDA и NIH.
- Научная консультативная коллегия, состоящая из микробиологов, фитопатологов и специалистов по общей экологии.
- Различные государственные агентства, в том числе Департамент сельского хозяйства шт. Калифорния.

Кроме того, должны были проводиться открытые публичные слушания.

Нельзя было представить, что столь сложная, занимающая много времени и зачастую кажущаяся избыточной процедура может войти в повседневную практику утверждения полевых испытаний ГМО. Высказывались предположения, что по мере накопления опыта такой подход будет упрощен без потери эффективности оценки возможного вреда для окружающей среды. После очень сложной аналитической процедуры по каждой заявке наконец было выдано разрешение на проведение полевых испытаний бактерий, дефектных по гену белка, который ответствен за образование кристаллов льда. Однако в обоих случаях, несмотря на различия в условиях испытаний, местным жителям, обеспокоенным высвобождением ГМО в окружающую среду в непосредственной близости от их домов, удалось получить решения суда о временной приостановке таких испытаний. А тем временем Агентство по охране и Министерство сельского хозяйства разработали более совершенные методики оценки риска от попадания ГМО в окружающую среду. Кроме того, за это короткое время персонал данных ведомств повысил свою квалификацию, необходимую для обработки и анализа данных, представленных в заявках на разрешение поле-

вых испытаний. Усилиями ученых, в том числе и экологов, были «запущены» исследовательские программы, позволяющие оценивать последствия высвобождения ГМО в окружающую среду на модельных системах, а научные организации сформулировали основные положения, позволяющие решить, оказывает ли данный ГМО побочное воздействие на окружающую среду.

В конце концов в 1987 г. на специально выбранных участках в шт. Калифорния были проведены полевые испытания указанных бактерий. Результаты показали, что эти бактерии не распространяются за пределы участков, где проводилось тестирование, и не персистируют на их территории. На одном из участков образование кристаллов льда на растениях происходило при температуре, на 1 °C более низкой по сравнению с обычной температурой. Сейчас «антифризные» бактерии практически не используются для защиты сельскохозяйственных растений от повреждений при заморозках.

### **Открытые полевые испытания других генетически модифицированных организмов**

С момента первого тестирования бактерий, о которых шла речь выше, было проведено множество открытых полевых испытаний других ГМО. Они показали, что, как правило, внесенные в окружающую среду ГМО не распространяются за пределы участка, где проводится тестирование, не персистируют, не передают свои гены природным микроорганизмам и проявляют сходную биологическую активность как в лабораторных, так и в природных условиях. Поскольку с каждым ГМО могут быть связаны разные побочные эффекты, при вынесении окончательного решения о полевых испытаниях каждый случай рассматривался в отдельности. Подобного рода испытания проводились в США, Великобритании, Австралии и других странах. Однако биотехнологические компании неохотно занимались созданием генетически модифицированных микроорганизмов, предназначенных для использования в природных условиях, поскольку стоимость полевых испытаний была чрезвычайно высока, при том что не было уверенности в положительном исходе даже при условии успешного проведения полевых испытаний. И все же можно констатировать, что становится все больше сторонников точки зрения, что высвобождение в окружающую среду генетически модифицированных микроорганизмов, прошедших лабораторные и полевые испытания, не будет иметь неблагоприятных экологических последствий.

Что касается полевых испытаний генетически модифицированных животных, то специалисты высказываются о них с большой осторожностью. Например, для определения способности некоторых трансгенных рыб существовать в природных условиях в США был построен чрезвычайно сложный аквариум, в котором были воссозданы эти условия, гарантирующий изоляцию рыб и невозможность их отлова браконьерами. В отличие от этого к тестированию трансгенных растений с улучшенными характеристиками, предназначенных для использования в пищу, относились не так строго. Преобладало мнение, что большинство таких растений не отличаются от обычных сортов, полученных путем селекции. В США все генетически модифицированные растения — независимо от способа модификации — должны проходить испытания в полевых условиях и все процедуры тестирования, необходимые для получения лицензии на их применение. При этом к полевым испытаниям трансгенных растений, содержащих гены инсектицидов или гены, обеспечивающие защиту от вирусной инфекции, предъявляются дополнительные требования.

В США трансгенные растения, несущие ген токсина *Bacillus thuringiensis*, в том числе кукуруза, соя, картофель и хлопок, были утверждены к использованию всеми компетентными организациями. В противоположность этому, попытки использования таких растений на Филиппинах были блокированы международным объединением неправительственных союзов, а во Франции было запрещено выращивание (но не потребление) трансгенной V.t.-кукурузы. Очень многие люди по различным причинам (из-за непредсказуемости последствий или по социально-этическим и экономическим соображениям) по-прежнему относятся с недоверием ко всем ГМО.

ВАЖНАЯ ВЕХА

Возможная биологическая угроза, связанная с рекомбинантными ДНК

P. Berg, D. Baltimore, H. W. Boyer, S. N. Cohen, R. W. Davis, D. S. Hogness, R. Roblin, J. D. Watson, S. Weissman, and N. D. Zinder *Science* 185: 303, 1974

После того как Коэн и др. препаратам, и гены, пасности, которые (Proc. Natl. Acad. Sei. USA 70: обеспечивающие образование необходимо соблюдать в 3240-3244, 1973) описали токсинов; 2) клонирования лабораториях при проведении стратегию встраивания вирусных генов, вызывающих исследований, имеющих чужеродной ДНК в плазмиду, в рак, в бактериальных клетках- минимальную, низкую, научном мире начались хозяйства. Более того, авторы умеренную или высокую серьезные дискуссии по поводу письма отмечали, что степень риска. Асиломарская безопасности и этических правительственным структурам, конференция (Berg et al., Science последствий использования которые представляют интересы 188: 991-994, 1975) внесла вклад технологии рекомбинантных общественности, следует в разработку Национальными ДНК. Такие дискуссии привели разработать руководства и институтами здравоохранения в к созданию временного правила, регламентирующие 1976 г. руководства, строго Комитета по рекомбинантным проведение экспериментов с регламентирующего все нуклеиновым кислотам, куда использованием технологии эксперименты с вошли ведущие молекулярные рекомбинантных ДНК. Они рекомбинантными ДНК. Письмо биологи. Ему предстояло также указывали на Берга обратило внимание проанализировать все проблемы необходимость проведения общественности на возможную более детально. В 1974 г. международной встречи ученых, опасность и преимущества Комитет опубликовал короткое с тем чтобы обсудить методы технологии рекомбинантных сообщение, так называемое работы с потенциально ДНК и вызвало горячие «Письмо Берга», одновременно в опасными с биологической публичные дискуссии. Оно трех основных научных точки зрения рекомбинантными представляет собой интересный журналах: Science, Nature и ДНК. Письмо имело большое пример того, как ученые Proceedings of the National значение. Оно инициировало попытались оценить риск, Academy of Sciences. В своем проведение Асиломарской связанный с разработкой новой сообщении Берг и др. конференции в Калифорнии, на технологии, еще до того, как рекомендовали ученым которой ученые попытались были получены какие-либо воздержаться от: 1 ) создания оценить риск экспериментов с осязательные свидетельства его микроорганизмов, содержащих рекомбинантными ДНК и существования. новые гены устойчивости к разработать меры безо- лекарственным

Введение в действие законодательных норм, регулирующих высвобождение ГМО в окружающую среду, — непростая задача, и лишь немногие страны сделали это. Как мы уже говорили, необходимо гарантировать безопасность применения ГМО для человека и окружающей среды — как в краткосрочной, так и в долгосрочной перспективе, и в то же время не блокировать полезные разработки. Еще греческий законодатель Солон, живший в 638—559 г. до н. э., однажды сказал: «Законы похожи на паутину: все мелкое в них запутывается, а крупное проваливается». Если говорить о контролируемом высвобождении ГМО в окружающую среду, то ни одно правительство не хочет, чтобы «крупная добыча» ускользнула.

Генная терапия человека

Генная терапия человека в широком смысле предусматривает введение в клетки функционально активного гена (генов) с целью исправления генетического дефекта. Существуют два возможных пути лечения наследственных болезней. В первом случае генетической трансформации подвергают соматические клетки (клетки, отличные от половых). При этом коррекция генетического дефекта ограничивается определенным органом или тканью. Во втором случае изменяют генотип клеток зародышевой линии (сперматозоидов или яйцеклеток) или оплодотворенных яйцеклеток (зигот), чтобы все клетки развившегося из них индивидуума имели «исправленные» гены. В результате ген-

ной терапии с использованием клеток зародышевой линии генетические изменения передаются из поколения в поколение.

### *Политика в области генной терапии соматических клеток*

В 1980 г. представители католической, протестантской и иудейской общин США написали открытое письмо Президенту с изложением своих взглядов на использование генной инженерии применительно к человеку. Для оценки этических и социальных аспектов этой проблемы были созданы Президентская комиссия и комиссия Конгресса. Это были очень важные инициативы, поскольку в США введение в действие программ, затрагивающих интересы общества, часто осуществляется на основе рекомендаций подобных комиссий. В окончательных заключениях обеих комиссий проводилась четкая граница между генной терапией соматических клеток и генной терапией клеток зародышевой линии. Генная терапия соматических клеток была отнесена к стандартным методам медицинского вмешательства в организм, сходным с трансплантацией органов. В противоположность этому генная терапия клеток зародышевой линии была сочтена технологически очень сложной и проблематичной с точки зрения этики, чтобы безотлагательно начинать ее практическое применение. Был сделан вывод о необходимости выработки четких правил, регулирующих исследования в области генной терапии соматических клеток; разработка подобных документов применительно к генной терапии клеток зародышевой линии была сочтена преждевременной. Чтобы пресечь все незаконные действия, было решено прекратить все эксперименты в области генной терапии клеток зародышевой линии.

К 1985 г. NIH разработали документ, озаглавленный «Положения о составлении и подаче заявок на проведение экспериментов в области генной терапии соматических клеток». В нем содержалась вся информация о том, какие данные должны быть представлены в заявке на разрешение испытаний в области генной терапии соматических клеток на человеке. За основу были взяты правила, регулирующие лабораторные исследования с рекомбинантными ДНК; они были лишь адаптированы применительно к биомедицинским целям.

Биомедицинское законодательство было пересмотрено и дополнено в 1970-х гг. в ответ на обнародование в 1972 г. результатов 40-летнего эксперимента, проводившегося Национальной службой здравоохранения США в Алабаме на группе из 400 неграмотных афроамериканцев, больных сифилисом. Эксперимент был поставлен для того, чтобы изучить естественное развитие указанного заболевания, передающегося половым путем, никакого лечения при этом не проводилось. Известие о таком чудовищном опыте на неинформированных о нем людях потрясло многих в США. Конгресс немедленно прекратил эксперимент и издал закон, запрещающий когда-либо впредь проведение подобных исследований.

Среди вопросов, адресуемых лицам, которые подавали ходатайство на разрешение экспериментов в области генной терапии соматических клеток, были следующие:

- \* Что представляет собой заболевание, которое предполагается лечить?
- \* Насколько оно серьезно?
- \* Существуют ли альтернативные методы лечения?
- \* Насколько опасно предполагаемое лечение для больных?
- \* Какова вероятность успеха лечения?
- \* Как будут отбираться больные для клинических испытаний?
- \* Будет ли этот отбор беспристрастным и репрезентативным?
- \* Как больные будут информироваться об испытаниях?
- \* Какого рода информацию следует им сообщать?
- \* Каким образом будет получено их согласие?
- \* Как будет гарантироваться конфиденциальность сведений о больных и проведении исследований?

Когда эксперименты в области генной терапии только начинались, большая часть заявок на клинические испытания вначале рассматривалась Комитетом по этике того учреждения, где предполагалось осуществлять исследования, и

только потом они пересылались в Подкомитет по генной терапии человека NIH-RAC. Последний оценивал заявки с точки зрения их научной и медицинской значимости, соответствия действующим правилам, убедительности доводов. Если заявка отклонялась, ее возвращали назад с необходимыми комментариями. Авторы заявки могли пересмотреть предложение и переработать его. Если заявка утверждалась, то NIH-RAC обсуждал ее в публичных дискуссиях, используя те же самые критерии. После одобрения заявки на таком уровне директор NIH утверждал ее и подписывал разрешение на клинические испытания, без которого они не могли быть начаты. Кроме того, поскольку тестирование методов генной терапии соматических клеток подразумевало использование новых генетических конструкций, заявка рассматривалась также FDA. В этом последнем случае особое внимание обращалось на способ получения продукта, методы качественного контроля его чистоты, а также на то, какие доклинические испытания были проведены, чтобы убедиться в безопасности продукта.

Но, поскольку число заявок со временем увеличивалось, а генная терапия становилась, по словам одного комментатора, «выигрышным билетом в медицине», принятая первоначально процедура утверждения заявок была признана неоправданно трудоемкой и избыточной. Соответственно после 1997 г. NIH уже не входил в число учреждений, контролирующих исследования в области генной терапии человека. Если NIH-RAC и будет существовать, то он скорее всего станет организатором форумов по обсуждению этических проблем, связанных с генной терапией человека. А пока требование, согласно которому все заявки в области генной терапии должны обсуждаться публично, снято. FDA, ответственная за контроль производства и использования биологических продуктов, проводит все необходимые оценки конфиденциально, чтобы гарантировать соблюдение права собственности разработчиков. В настоящее время генная терапия человека считается безопасной медицинской процедурой, хотя и не особенно эффективной. Высказывавшиеся ранее опасения рассеялись, и она стала одним из основных новых подходов к лечению заболеваний человека.

Большинство специалистов считают процедуру утверждения испытаний в области генной терапии соматических клеток человека в США вполне адекватной; она гарантирует беспристрастный отбор больных и их информированность, а также осуществление всех манипуляций должным образом, без причинения вреда как конкретным больным, так и человеческой популяции в целом. В настоящее время в других странах тоже разрабатываются правила проведения испытаний в области генной терапии. В США это было сделано в результате тщательного взвешивания каждого предложения. Как сказал один из участников слушаний, организованных NIH-RAC в январе 1989 г., доктор Лерой Уолтере, директор Центра по биоэтике при Джорджтаунском университете в Вашингтоне, округ Колумбия: «Я не знаю никакой другой биомедицинской науки или технологии, которая бы подвергалась столь всесторонней проверке, как генная терапия».

### *Накопление дефектных генов в будущих поколениях*

Существует мнение, что лечение генетических заболеваний с помощью генной терапии соматических клеток неизбежно приведет к ухудшению генофонда человеческой популяции. Оно основывается на представлении, что частота дефектного гена в популяции будет увеличиваться от поколения к поколению, поскольку генная терапия будет способствовать передаче мутантных генов следующему поколению от тех людей, которые до этого были неспособны произвести потомство или не могли дожить до половозрелого возраста. Однако эта гипотеза оказалась неверной. По данным популяционной генетики, для существенного повышения частоты вредного или летального гена в результате эффективного лечения требуются тысячи лет. Так, если какое-то редкое генетическое заболевание встречается у одного из 100 000 жизнеспособных новорожденных, то пройдет примерно 2000 лет после начала применения эффективной генной терапии, прежде чем частота указанного заболевания удвоится и составит 1 случай на 50 000.

Помимо того что частота летального гена от поколения к поколению почти не повышается, в результате длительного лечения всех, кто в этом



нуждается, генотип отдельных индивидуумов тоже остается неизменным. Это положение можно проиллюстрировать примером из истории эволюции. Приматы, в том числе и человек, неспособны синтезировать жизненно важный витамин С, они должны получать его из внешних источников. Таким образом, можно сказать, что мы все генетически дефектны по гену этого жизненно важного вещества. В противоположность этому амфибии, рептилии, птицы и млекопитающие, не относящиеся к приматам, синтезируют витамин С. И тем не менее генетический дефект, обуславливающий неспособность к биосинтезу витамина С, не «помешал» успешной эволюции приматов на протяжении более миллионов лет. Сходным образом, и коррекция других генетических дефектов не приведет к существенному накоплению «нездоровых» генов у будущих поколений.

### *Генная терапия клеток зародышевой линии*

Эксперименты в области генной терапии клеток зародышевой линии человека сейчас строго запрещены, однако приходится признать, что некоторые генетические заболевания можно вылечить только таким путем. Методология генной терапии клеток зародышевой линии человека разработана пока недостаточно. Однако не вызывает сомнения, что с развитием методов генетического манипулирования на животных и диагностического тестирования преимплантационных эмбрионов этот пробел будет восполнен. Более того, поскольку генная терапия соматических клеток становится все более рутинной процедурой, это скажется и на отношении людей к генной терапии клеток зародышевой линии человека, и через некоторое время возникнет необходимость ее тестирования. Остается только надеяться, что к тому времени все проблемы, связанные с последствиями практического применения генной терапии клеток зародышевой линии человека, в том числе социальное и биологическое, будут урегулированы.

Считается, что генная терапия человека может помочь в лечении серьезных заболеваний. Действительно, она способна обеспечить коррекцию ряда физических и психических нарушений, хотя остается неясным, сочтет ли общество приемлемым такое применение генной терапии. Подобно любому другому новому медицинскому направлению, генная терапия клеток зародышевой линии человека вызывает многочисленные вопросы, а именно:

- \* Какова стоимость разработки и внедрения методов генной терапии клеток зародышевой линии человека?
- \* Должно ли правительство устанавливать приоритеты медицинских исследований?
- \* Не приведет ли приоритетное развитие генной терапии клеток зародышевой линии к свертыванию работ по поиску других способов лечения?
- \* Удастся ли охватить всех больных, которые в этом нуждаются?
- \* Сможет ли физическое лицо или компания получить исключительные права на проведение лечения конкретных болезней с помощью генной терапии?

### *Клонирование человека*

Интерес общественности к возможности клонирования человека возник в 1960-х гг., после того как были проведены соответствующие эксперименты на лягушках и жабах. Эти исследования показали, что ядро оплодотворенной яйцеклетки можно заменить ядром недифференцированной клетки, и при этом эмбрион будет развиваться нормально. Таким образом, в принципе можно выделить ядра из недифференцированных клеток какого-либо организма, ввести их в оплодотворенные яйцеклетки того же самого организма и получить потомство с тем же генотипом, что и у родителя. Другими словами, каждый из организмов-потомков можно считать генетическим клоном исходного донорного организма. В 1960-е гг. казалось, что, несмотря на отсутствие технических возможностей, не составляет труда экстраполировать результаты клонирования лягушки на человека. В прессе появилось множество статей на эту тему, были даже написаны научно-фантастические произведения. Один из рассказов был посвящен клонированию вероломно убитого президента США Джона Ф. Кеннеди, однако более популярной темой было клонирование злодеев. Произведения о клонировании человека были не только неправдоподобными, но и пропагандировали ошибочную и весьма опасную идею, что личностные особенности, характер и другие качества



человека обусловлены исключительно его генотипом. На самом же деле человек как личность формируется под влиянием как своих генов, так и условий среды, в частности культурных традиций. Например, злостный расизм, который проповедовал Гитлер, — приобретенное поведенческое качество, не определяемое каким-то одним геном или их комбинацией. В другой среде с иными культурными особенностями из «клонированного Гитлера» не обязательно сформировался бы человек, подобный реально существовавшему Гитлеру. Сходным образом, из «клона матери Терезы» не обязательно «получилась» бы женщина, посвятившая свою жизнь помощи бедным и больным в Калькутте.

По мере развития методов репродуктивной биологии млекопитающих и создания различных трансгенных животных становилось все более очевидным, что клонирование человека — дело не столь отдаленного будущего. Предположение стало реальностью и 1997 г., когда была клонирована овечка, названная Долли. Для этого использовалось ядро дифференцированной клетки донорной суягной овцы. Методический подход, который использовался при «создании» Долли, в принципе пригоден для получения клонов любых млекопитающих, в том числе и человека. И даже если он не оправдывает себя применительно к млекопитающим других видов, по-видимому, не потребуется слишком много экспериментов, чтобы разработать подходящий метод. В результате клонирование человека тотчас станет предметом любой дискуссии, затрагивающей этические проблемы генетики и биологической медицины.

Без сомнения, клонирование человека — сложная и противоречивая проблема. Для одних сама мысль о создании копии уже существующего индивидуума путем экспериментальных манипуляций представляется неприемлемой. Другие считают, что клонированный индивидуум — это то же самое, что и однояйцовый близнец, несмотря на разницу в возрасте, и, следовательно, клонирование по своей природе не злонамеренно, хотя, возможно, не так уж необходимо. Клонирование может дать положительный медицинский и социальный эффект, оправдывающий его проведение в исключительных случаях. Например, оно может оказаться жизненно важным для родителей больного ребенка. Ответственность за опыты по клонированию человека по многим странам регулируется законодательно, причем все исследования, связанные с клонированием человека, запрещены. Таких ограничений достаточно, чтобы исключить возможность клонирования людей. Однако вопрос о неизбежности клонирования человека обязательно возникнет.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Революционные технологии, к которым относится и молекулярная биотехнология, редко встречают безоговорочную поддержку. Обеспокоенность общественности по поводу создания различных организмов методами генной инженерии имела серьезные последствия и привела к разработке строгих правил, регулирующих исследования в области рекомбинантных ДНК, и утверждению требований, которым должны удовлетворять биотехнологические продукты, поступающие на рынок. В этой главе мы рассмотрели различные аспекты регуляции исследований в области рекомбинантных ДНК, производства и потребления пищевых продуктов, полученных с помощью методов генной инженерии, высвобождения генетически модифицированных организмов в окружающую среду, экспериментов, связанных с генной терапией соматических клеток и клеток зародышевой линии, клонированием человека.

Правила, регламентирующие проведение экспериментов с рекомбинантными ДНК, были разработаны Национальными институтами здравоохранения США в конце 1970-х гг. и пересмотрены в начале 1980-х гг. Однако остались две неразрешенные проблемы. Во-первых, как регулировать производство и поступление на рынок продуктов, полученных с помощью генной инженерии? Во-вторых, как осуществлять контроль за высвобождением генетически модифицированных организмов в окружающую среду? Производители считают, что никакие специальные правила, регулирующие производство и поступление на рынок продуктов, полученных с помощью генноинженерных технологий, не нужны и аргументируют свою точку зрения тем, что самое главное — природа продукта

и его свойства, а не то, как он был получен. Такой подход используется в США для апробации фармацевтических препаратов. Однако по поводу пищевых добавок, полученных с помощью методов генной инженерии, возникают большие опасения. В целом FDA США, которая несет ответственность за безопасность как фармацевтических средств, так и пищевых компонентов, использует прецедентный подход для решения вопроса о безопасности пищевых продуктов, полученных с помощью методов генной инженерии. Каждый продукт должен пройти тестирование на соответствие ряду специфических критериев в зависимости от своей природы, прежде чем он будет разрешен к употреблению человеком.

Напротив, высвобождение организмов, полученных с помощью методов генной инженерии, в окружающую среду регулируется на основании общих правил. Сразу после того как общественность узнала об экспериментах с рекомбинантными ДНК, возникли опасения, что ученые смогут получить — преднамеренно или случайно — организм, способный принести большой вред окружающей среде. В результате в США были разработаны специальные и достаточно жесткие правила, регламентирующие полевые испытания организмов, полученных с помощью методов генной инженерии.

Возможность генетического изменения человека всегда вызывала серьезные беспокойства. С методологической точки зрения генная инженерия человека подразделяется на генную терапию соматических клеток и генную терапию клеток зародышевой линии. Поскольку генная терапия клеток зародышевой линии может оказать нежелательное воздействие на последующие поколения, в настоящее время она запрещена. В то же время генная терапия соматических клеток становится все более важным методом лечения различных заболеваний человека. Разработанные в США правила, регламентирующие ее осуществление, включают нормы, регулирующие исследования в области рекомбинантных ДНК, и биомедицинские этические критерии, которым должны соответствовать все эксперименты, связанные с медициной.

После того как в 1997 г. удалось клонировать млекопитающее, овцу Долли, вопрос о клонировании человека привлек внимание общественности и вызвал бурные дискуссии. Сейчас все эксперименты по клонированию человека в большинстве стран запрещены. Однако вопрос о принципиальной возможности клонирования человека еще ждет своего решения.

## ЛИТЕРАТУРА

**Anonymous. 1990. Biotechnologies and food: assuring the safety of foods produced by genetic modification. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 12: S1-S196.**

**Berg P., M. Singer. 1995. The recombinant DNA controversy: twenty years later. *Bio/Technology* 13: 1132-1134.**

**Busch L., W. B. Lacy, J. Burkhardt, L. R. Lacy. 1991. *Plants, Power, and Profit: Social, Economic, and Ethical Consequences of the New Biotechnologies*. Blackwell Publishers, Cambridge, Mass.**

**Carmen I. 1992. Debates, divisions, and decisions: recombinant DNA Advisory Committee (HAC) authorization of the first human gene transfer experiments. *Am. J. Hum. Genet.* 50: 245—260.**

**Cook-Decgan R. M. 1994. *The Gene Wars: Science, Politics and the Human Genome*. W. W. Norton & Co. Inc., New York., N.Y.**

**Djerassi C. 1993. Basic research: the gray zone. *Science* 261:972-973.**

**Drahos D. J. 1991. Field testing of genetically engineered microorganisms. *Biotechnol. Adv.* 9: 157-171.**

**Howard T., J. Rifkin. 1977. *Who Should Play God? The Artificial Creation of Life and What It Means to the Human Race*. Dell Publishing Co. New York, N.Y.**

**Juengst E. T. 1990. The NIH "Points to Consider" and the limits of human gene therapy. *Hum. Gene Ther.* 1:425-433.**

**Juskewch J., C., C. G. Guyer. 1990. Bovine growth hormone: human food safety evaluation. *Science* 249: 875-884.**

**Kamb M. L., J. J. Murphy, J. L. Jones, J. C. Caston, K. Nederiof, L. F. Homey, L. A. Swygert, H. Faut, E. M. Kilbounie. 1992. Eosinophilia-myalgia syndrome in L-tryptophan-exposed patients. *JAMA* 267:77-82.**

**Kessler D. A., M. R. Taylor, J. H. Maryanski, E. L. Flamm, L. S. Kahl. 1992. The safety of foods**

developed by biotechnology. *Science* 256: 1747-1749.

**Levin M. A., R S. Strauss.** 1991. *Risk Assessment in Genetic Engineering*. McGraw-Hill, Inc., New York, N.Y.

**Lyon J., P. Corner.** 1995. *Altered Fates: Gene Therapy and the Retooling of Human Ufe*. W. W. Norton & Co. Inc., New York., N.Y.

**Mayeno A. M, G. J. Gleich.** 1994. Eosinophilia-myal-gia syndrome and tryptophan production: a cautionary tale. *Trends Biotechnot.* **12**: 346-352.

**Mffler H. L** 1992. Putting the bST human-health controversy to rest. *Bio/Technology* **10**: 147.

**Tреф J. M., R. K. ColweU, Y. L. Grossman, R. E. Hudson, R. E. Lenski, R. N. Mack, P. J. Regal** 1989. The planned introduction of genetically engineered organisms: ecological considerations and recommendations. *Ecolo&* **70**: 298-315.

**Walters L.** 1991. Human gene therapy: ethics and public policy. *Hum. Gene Ther.* **2**:115-122.

**Wilson M., S. E. Lindow.** 1993. Release of recombinant organisms. *Annu. Rev, Microbioi* **47**:913—944.

**Wivel N., L. Walters.** 1993. Germ-line gene modification and disease prevention: some medical and ethical perspectives. *Science* **262**:533-540.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какова роль Национальных институтов здравоохранения и Консультативного комитета по рекомбинантным ДНК (NIH-RAC) в контроле исследований в области рекомбинантных ДНК?
2. Какие критерии использует FDA при вынесении мнения о возможности использования рекомбинантного белка в качестве пищевого продукта или пищевой добавки?
3. Обсудите тезис «Генная инженерия... — это технология, противоречащая фундаментальным законам природы».
4. Как контролируется создание генетически модифицированных организмов, предназначенных для высвобождения в окружающую среду, и почему такой контроль необходим?
5. Обсудите положительные и отрицательные аспекты лицензирования рекомбинантного бычьего соматотропина.
6. Как регламентируются эксперименты по генной терапии соматических клеток в США?
7. Обсудите тезис «Генная терапия клеток зародышевой линии приведет к увеличению частоты встречаемости дефектных генов в будущих поколениях».
8. Объясните, почему запрещены исследования в области генной терапии клеток зародышевой линии.
9. Обсудите положение «Человек — это то, что представляют собой его гены».
10. Подготовьте аргументы для обеих сторон, участвующих в дебатах на тему: «Следует ли запрещать клонирование человека».

# ГЛАВА 23.

## Патентование биотехнологических изобретений <sup>1)</sup>

Основная задача биотехнологии — это получение разнообразных коммерческих продуктов. Однако ни одна компания не будет реализовывать долгосрочные проекты с высокой степенью риска, если не удостоверится в том, что результаты ее разработок будут надежно защищены от использования конкурентами. Со своей стороны, государство старается поощрять инновации, направленные на развитие промышленности. Стратегия, объединяющая интересы обеих сторон, заключается в том, что государство предоставляет изобретателям исключительные права на новые продукты или способы их получения. Такие санкционированные привилегии называются правами на интеллектуальную собственность и включают права на коммерческие секреты, авторские разработки, товарные знаки и изобретения. Коммерческие секреты — это конфиденциальная информация о специфических особенностях способа производства и состава продуктов, которые компания хочет сохранить в тайне и оградить от использования третьими лицами. Авторские разработки, в частности опубликованные работы, защищаются от несанкционированного и незаконного использования институтом авторского права. Товарные знаки — это слова или символы, которые призваны идентифицировать определенный продукт или способ, разработанный конкретной компанией. Например, товарный знак GigaPack относится к набору для экспериментов *in vitro*, который содержит упаковывающий экстракт бактериофага  $\lambda$  и выпускается биотехнологической компанией Stratagene. Другие фирмы продают сходные наборы под своими собственными товарными знаками.

Самая важная форма интеллектуальной собственности для биотехнологии — это изобретение. Изобретение охраняется патентом, который представляет собой узаконенный документ, обеспечивающий исключительные права патентовладельца на коммерческое использование изобретения. Более того, опираясь на формулу изобретения, защищенную патентом, патентовладелец имеет право разрабатывать другие продукты, которые могут быть получены на основе его изобретения, в то время как конкуренты вынуждены покупать для этого права на использование изобретения. С другой стороны, патент — это общедоступный документ, который содержит подробное описание изобретения и таким образом информирует третьи лица о сущности новшества и его ограничениях. Это позволяет указанным лицам решить вопрос, стоит ли им продолжать работу в данном направлении или же попытаться использовать запатентованное изобретение в качестве стартовой площадки для других возможных разработок.

Процедуры патентования и патентные законы неодинаковы в разных странах, несмотря на то что предпринимались попытки их унифицировать. Например, до недавнего времени в США исключительное патентное право сохранялось в течение 17 лет с даты выдачи патента, в Канаде — в течение 20 лет, а во многих европейских странах — в течение 20 лет, но с даты подачи заявки. В настоящее время в соответствии с междуна-

<sup>1)</sup> Данная глава посвящена практике патентования изобретений в США, которые могут отличаться от той, что принята в РФ, — Прим. перев.

родным соглашением в большинстве стран, в том числе и в США, срок действия патента составляет 20 лет с даты подачи заявки. Однако в отличие от многих других стран правительство США придерживается мнения, что дата выдачи патента важнее, чем дата подачи заявки. Обычно с момента подачи заявки на изобретение до получения патента проходит от двух до пяти лет. В любом случае владение патентом может приносить значительные дивиденды и его не так-то просто получить, поэтому к заявке на патент и к самому изобретению предъявляются жесткие требования.

## Общие вопросы патентования изобретений

Для того чтобы какой-то продукт или способ были патентоспособны, они должны удовлетворять четырем основным требованиям.

1. Любое изобретение, для которого доказана возможность практического применения, должно быть новым. Понятие «новизна» в данном случае означает, что изобретение нигде не запатентовано, не относится к уже существующим продуктам и способам или в печати не было никаких сведений о нем до даты подачи заявки на патент. Последнее касается всех стран, кроме США, в США же изобретатель имеет право подать заявку на патент не позднее чем через год после того как были опубликованы сведения о соответствующем изобретении.

2. Патент не может быть выдан на то, что ранее просто не было известно; изобретение должно обладать изобретательским уровнем, т. е. не должно быть очевидным для специалистов в данной области (заключение о соответствии изобретения условию патентоспособности «изобретательский уровень» выносит Патентное ведомство).

3. Изобретение должно быть «полезным» независимо от того, идет ли речь о способе, устройстве, веществе, микроорганизме или многоклеточном организме,

4. Заявка на патент должна содержать описание изобретения, раскрывающее его с полнотой, достаточной для применения специалистами.

К изобретениям и открытиям, не являющимся патентоспособными, относятся научные теории, математические методы, эстетические теории и терапевтические методы лечения человека и животных<sup>1)</sup>. Кроме того, согласно основному положению патентного права, патент не может быть выдан на «природные продукты». Это связано с тем, что общество не заинтересовано в предоставлении кому-либо монопольных прав на то, что существует в природе и принадлежит всем. Однако компании и частные лица часто обходят это ограничение, подавая патентную заявку на способ очистки продукта и тем самым избегая прямого вопроса о том, что будет защищено патентом: природный продукт или организм, с помощью которого данный продукт получен.

Простой и быстрой системы выдачи патентов не существует. Заявка должна быть подготовлена специалистом, обычно патентным поверенным, и составлена в соответствии с определенными правилами. Заявка, подаваемая в США, должна содержать название изобретения; реферат, в котором кратко изложена сущность изобретения; раздел, называемый «Предпосылки создания изобретения», в котором максимально подробно описывается положение дел в той области, к которой относится изобретение; раздел, называемый «Сущность изобретения», в котором раскрываются основные признаки изобретения; чертежи и рисунки, помогающие лучше понять существо вопроса; раздел, содержащий сведения, которые подтверждают возможность осуществления изобретения, и, наконец, формулу изобретения, выражающую его сущность и способствующую пониманию того, каким образом изобретение может быть использовано. Заявка на патент подается в Ведомство по патентам и товарным знакам США (ПТО, от англ. Patent and Trademark Office), где она подлежит экспертизе на новизну, неочевидность, применимость, осуществимость, т. е. на соответствие условиям патентоспособности.

Если эксперт приходит к выводу, что изобретение соответствует условиям патентоспособности, то выносится решение о выдаче патента.

<sup>1)</sup> В РФ все эти категории считаются патентоспособными. — Прим. перев.

Однако получение патента еще не означает, что можно беспрепятственно производить и продавать запатентованный продукт. До того как продукт поступит на рынок, он должен быть сертифицирован в соответствии с предусмотренными законом требованиями. Например, если патент был выдан на генетически модифицированный микроорганизм, то такое изобретение должно удовлетворять всем критериям, которые разработаны для тестирования продуктов, полученных с помощью технологии рекомбинантных ДНК: производитель должен представить данные о безопасности способа культивирования микроорганизма, его распространении и высвобождении в окружающую среду. Контроль за соблюдением вытекающих из патента прав возлагается на патентовладельца; это означает, что против любого лица, которое нарушило действие патента, может быть возбуждено судебное дело. Такие споры решаются в судах, а не в Патентном ведомстве. Сходным образом, если третья сторона (частное лицо или промышленная компания, фирма, организация и т. д.) сочтет неправомерной или незаконной выдачу патента, то оно имеет право подать иск в суд.

Если эксперт отклоняет заявку на патент, то заявитель может подать возражение в Патентную палату жалоб, а в случае отрицательного решения — оспорить его в судебном порядке. Для некоторых заявителей патентование — это горький опыт обманутых ожиданий. Известны многочисленные патентные тяжбы, где ставки столь высоки, что судебные разбирательства длятся годами, при этом оплачивают их конфликтующие стороны. Томас Эдисон, который к концу жизни был держателем более тысячи патентов, однажды сказал, что «каждый патент — это приглашение к судебному процессу».

Среди основных категорий патентов — патенты на продукты и патенты на способы. К продуктам относятся гомогенные вещества, композиции и различные устройства, к способам — методы получения продуктов, действия и операции, способы использования продуктов (табл. 23.1). Патентование биотехнологических изобретений основано на историческом опыте патентования изобретений, созданных в области сельского хозяйства, пищевой, микробиологической, фармацевтической и медицинской промышленности. Один из таких примеров — получение патента Луи Пастером на способ производства пива путем ферментации. В настоящее время большая часть заявок на выдачу патентов в области биотехнологии относятся к охраноспособным, и патенты на них выдаются без особых проблем. Менее однозначным был случай с первым патентом, выданным на генетически модифицированный микроорганизм. Заявка была подана А. Чакрабартти, работавшим в то время в компании General Electric, а новшество состояло во введении в бактериальную клетку нескольких плазмид, каждая из которых несла гены, ответственные за один из путей расщепления углеводов. Полученный микроорганизм был способен расщеплять многочислен-

Таблица 23. 1. Основные категории патентов в области технологии рекомбинантных ДНК

| Категория                  | Примеры   |
|----------------------------|---|
| Патенты на продукты        |   |
| Вещества                   | Клонированные гены, рекомбинантные белки, моноклональные антитела, плазмиды, промоторы, векторы, кДНК, моновалентные вакцины  |
| Композиции                 | Поливалентные вакцины, биоудобрения, биоинсектициды, сложные фармацевтические смеси, микроорганизмы, трансгенные организмы  |
| Устройства                 | Аппарат для импульсного гель-электрофореза, прибор для секвенирования ДНК, устройство для микроинъектирования генов в клетки  |
| Патенты на способы         |   |
| Методы получения продуктов | Выделение ДНК, синтез двухцепочечных ДНК конструирование векторов, получение продуктов с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), способы очистки рекомбинантных белков |
| Действия и операции        | Гибридизация нуклеиновых кислот, диагностические процедуры, способы детекции при использовании ПЦР, мутационный анализ  |
| Способы использования      | Применение биоудобрений и биоинсектицидов, культивирование генетически модифицированных организмов, нетерапевтические способы лечения животных                            |



ные компоненты сырой нефти и мог принести большую пользу при очистке от нефтяных загрязнений. Тем не менее патентная заявка была отклонена РТО на том основании, что микроорганизмы — это природные продукты и поэтому не охраноспособны. Однако в 1980 г. в своем знаменательном решении Верховный Суд США постановил, что бактерии Чакрабарти все-таки могут быть защищены патентом в соответствии с действующим законодательством, поскольку «созданный руками человека микроорганизм можно считать охраноспособным объектом изобретения... как продукт или композиция».

Основные дебаты по поводу патентования указанного генетически модифицированного микроорганизма велись вокруг способа его получения. Ранее индуцируемый мутагенез с последующей селекцией с целью получения организмов с новыми свойствами уже был признан патентоспособным изобретением. Однако генетическая инженерия рассматривалась как процедура, «посягающая на саму природу», а потому выдвигалось возражение, что изобретатель не имеет права получать выгоду от манипулирования «природными продуктами». Такая аргументация не нашла поддержки, и в США начиная с 1980 г. (а затем и в других странах) в законодательном порядке было регламентировано, что живые организмы — независимо от способа их получения — являются охраноспособными. Чтобы вынести решение о выдаче на них патента, необходимо провести экспертизу на их соответствие таким условиям, как «новизна», «изобретательский уровень» («неочевидность») и «применимость».

### Патентование изобретений в разных странах

Патентные ведомства различных стран часто выносят совершенно разные решения по одной и той же заявке. Например, в 1989 г. биотехнологическая компания Genentech подала в Патентное ведомство Великобритании заявку, которая относилась в том числе к способу получения тканевого активатора пламиногена (tPA) человека с помощью технологии рекомбинантных ДНК. Этот белок, присутствующий в организме человека в небольших количествах, отвечает за превращение пламиногена в плазмин. Плазмин — это фермент, расщепляющий фибрин кровяного сгустка, и поэтому tPA человека может использоваться как терапевтическое средство для предотвращения и лечения тромбоза коронарных сосудов. После многочисленных попыток компания Genentech получила полноразмерную нуклеотидную последовательность, комплементарную геномной ДНК tPA человека (кДНК), и клонировала ее в *Escherichia coli*, намереваясь синтезировать большие количества чистого tPA. Подавая заявку, компания хотела получить патент на tPA человека, синтезированный с помощью разработанных ею биотехнологических процедур, а также на клонирующую векторную систему и генетически трансформированный микроорганизм. Кроме того, Genentech заявляла свои права на применение tPA в качестве фармацевтического средства. Формула изобретения, представленная в первоначальной заявке, состояла из 20 пунктов. Одни из них были слишком широкими и неконкретными, другие достаточно узкими. Заявка была отклонена Патентным ведомством Великобритании, и Genentech подала иск в Апелляционный суд Великобритании, который после тщательного разбирательства признал все пункты формулы непатентоспособными. В судебном решении отмечалось, что изобретение отвечает требованиям новизны, однако некоторые эксперты пришли к выводу об очевидности заявленных технических решений и соответственно о невозможности их патентования.

В отличие от этого в США Genentech получила патент на tPA человека. Он не только защищал ту форму tPA человека, которую Genentech выпустила на рынок, но и предоставил этой компании исключительные права на все сходные, но не идентичные формы. Genentech выиграла судебные иски к двум другим биотехнологическим компаниям, которые, как было решено, нарушили права Genentech, хотя они продавали другие формы tPA, чем та, которую выпускала Genentech.

Патент, выданный по той же самой заявке в Японии, ограничивал притязания Genentech аминокислотной последовательностью именно того tPA человека, который был клонирован. Здесь другие компании имели право продавать

варианты tРА человека. Таким образом, у одной и той же патентной заявки в трех разных странах была разная судьба: в первом случае она была отклонена, во втором принята к рассмотрению с последующей выдачей патента на широкие притязания, в третьем принята к рассмотрению с выдачей патента на более узкие притязания. Следовательно, в настоящее время могут существовать разные точки зрения на патентоспособность одного и того же изобретения в патентных ведомствах разных стран.

### Патентование ДНК-последовательностей

Начиная с 1980 г. в Патентные ведомства всего мира было подано более 5000 заявок на полноразмерные гены, примерно на 1500 из них были выданы патенты. Наиболее значимым патентом, выданным на способ получения продукта с использованием гена человека, можно считать патент на способ получения рекомбинантного эритропоэтина, который принес заявителю за один только 1996 г. доход более 1 млрд. долларов. Эритропоэтин стимулирует образование эритроцитов и используется для предупреждения анемии у больных с почечной недостаточностью, которые подвергаются диализу. Множество других запатентованных нуклеотидных последовательностей используются в качестве диагностических зондов (биомаркеров).

С началом осуществления проекта «Геном человека», в том числе с частичным секвенированием кДНК человека из различных тканей и органов, много вопросов и споров стало вызывать патентование неполноразмерных генов. В 1991 г. Национальные институты здравоохранения США (НИН) подали патентную заявку на 315 частично секвенированных последовательностей кДНК человека (EST). Еще две заявки увеличивали общее число частично секвенированных EST, на которые испрашивались патенты, до 6869. В 1994 г. РТО уведомило НИН, что оно намерено отклонить заявки на том основании, что функции последовательностей неизвестны. Другими словами, было сочтено, что сами по себе частично секвенированные последовательности не удовлетворяют условию патентоспособности «промышленная применимость». НИН принял решение не подавать апелляцию, и вопрос о возможности патентования EST остается открытым до сих пор.

Между тем к 1997 г. было подано свыше 350 патентных заявок на более чем 500 000 неполноразмерных генов, в основном частными фирмами. Только в одной из таких заявок испрашивалась патентная защита примерно 18 500 EST. РТО США еще не вынесло решения ни по одной из таких заявок. Однако в будущем для ускорения процесса экспертизы и более адекватного подхода авторов к числу заявленных изобретений в одну заявку предлагается включать не более 10 последовательностей.

Противники патентования фрагментов ДНК с неизвестной функцией утверждают, что несмотря на несомненную ценность таких последовательностей пока преждевременно обеспечивать их патентную защиту. Кроме того, есть опасность, что выдача таких патентов не только предоставит патентовладельцам слишком широкие права, но и будет препятствовать разработке различных диагностических и терапевтических средств. В связи с этим тысячи EST рассматриваются сейчас как некие промежуточные, а не конечные продукты. С другой стороны, сторонники патентования EST утверждают, что такие последовательности являются новыми, поскольку они комплементарны матричной РНК (мРНК) из различных тканей и органов, а также что они имеют промышленную применимость, поскольку каждый набор EST можно использовать в диагностических целях, с тем чтобы определить, в какой мере то или иное заболевание сопряжено с изменением мРНК в различных органах. Более того, высказывается мнение, что, как показывает история, патентная охрана не сдерживает разработку новых продуктов, а наоборот, стимулирует ее.

Таким образом, проблема патентования EST остается открытой. Может пройти некоторое время, прежде чем она будет окончательно решена, особенно если заявители отклоненных РТО заявок подадут в суд. Кроме того, исследования продолжаются, и со временем будут расшифрованы полные последовательности многих частично секвенированных кДНК и поданы соответствующие заявки. В таком случае может

Трансгенные млекопитающие, не относящиеся к человеку

Авторы: P. Leder, T. A. Stewart

Заявитель: President and Fellows of Harvard College, Cambridge, Mass. U. S. Patent 4 736 866 Дата выдачи патента; 12 апреля 1988г.

В 1980 г. Верховный суд и Стьюарта, введение гуманное обращение с США вынес определение, что конструкции LTR MMTV-тус в животными. Несмотря на все это, изобретение, которое включает клетки мышей «увеличивает в США начиная с 1988 г. выдано «что-либо, созданное под солнцем вероятность развития множество патентов на руках человека», является неопластических образований у различные трансгенные охраноспособным, В 1988 г. было животных». Таких трансгенных организмы. Среди них — патенты запатентовано первое животное, животных можно использовать на трансгенные животные, полученное с помощью методов для тестирования различных которые используются в качестве генной инженерии, -трансгенная соединений на их способность моделей для изучения развития мышь, В ее ДНК был встроен ген, индуцировать или предотвращать доброкачественной опухоли ответственный за образование возникновение опухолей. Кроме простаты, воспалительных злокачественных опухолей того, они могут служить заболеваний, нарушений (онкоген), который находился под источником клеток различных метаболизма в жировой ткани, контролем промотора на основе тканей (например, сердечной тромбо-цитопении. До настоящего длинного концевой повтора мышцы) , которые обычно бывает времени ни у судов, ни у вируса опухоли молочных желез трудно выращивать в культуре. правительства США не возникало мыши (LTR MMTV). Онкоген Начиная с 1980 г. фирма Du Pont сомнений в правомерности представлял собой ген тус вируса продает одну из линий таких патентов такого рода. В США миелодисплазия цыпленка ОК10. трансгенных мышей под торговым патентование трансгенных Изобретение заключалось в названии «Онко-Мыши». Другие животных больше не является клонировании химерного гена предпочитают использовать предметом дискуссий. Однако в LTR MMTV-тус в плазмиде, название «Гарвардская Европе и других странах оно введении линеаризованной онкомышь» или просто остается серьезной проблемой, плазмид-ной ДНК в мужской «онкомышь». Выдача патента которая до конца не решена, хотя пронуклеус оплодотворенных США № 4 736 866 вызвала Гарвардская онкомышь одноклеточных мышинных многочисленные споры, причем запатентована Европейским яйцеклеток, идентификации большинство опасений носило Патентным ведомством. Вынося потомков, экспрессирующ-ших ген этический характер. Противники положительное решение, эксперты тусе, и получении линий патентования трансгенных сочли, что польза от такой трансгенных мышей. У животных животных считали, что трансгенной системы одних л иний ген тусе подобные патенты посягают на перевешивает возможные экспрессиро-вался в различных незыблемые жизненные негативные последствия. Однако тканях, у животных других принципы, угрожают целостности часть общественности и экспрессия ограничивалась одной видов и поощряют не- некоторые политические партии или несколькими тканями. По продолжают выступать против утверждению Ледера указанного решения.

возникнуть противоречие между патентоспособностью частично секвенированных и полноразмерных кДНК.

До недавнего времени в США было трудно запатентовать впервые идентифицированные гены, даже если такие изобретения признавались полезными. Обычно РТО выносило решение, что данное изобретение не соответствует условию патентоспособности «изобретательский уровень», оно признавалось очевидным и, следовательно, непатентоспособным. Говоря в двух словах, эксперты РТО пришли к выводу, что получение гена или кДНК с помощью синтетических зондов, синтезированных исходя из опубликованных данных о частично или полностью секвенированных аминокислотных последовательностях, является рутинной процедурой для любого специалиста в данной области и прямо следует из всей предыдущей практики, а потому данная методика не может считаться патентоспособной. В двух случаях юристы Апелляционного суда федерального округа США вынесли заключение, что знание аминокислотной последовательности не позволяет однозначно

определить нуклеотидную последовательность соответствующей кДНК или гена вследствие вырожденности генетического кода, т. е. при данной аминокислотной последовательности ни кДНК, ни последовательность гена не являются очевидными. Другими словами, как сказано в одном из нормативных документов, «то, что не является предопределенным, не может считаться очевидным». Тем не менее РТО США придерживается существующего подхода к патентованию генов и недавно отклонил по крайней мере одну заявку на том основании, что методы, которые использовались для определения нуклеотидной последовательности гена, были рутинными и очевидными. Патентные поверенные в свою очередь считают, что патентоспособность изобретения не зависит от того, каким образом оно было сделано, а определяется тем, соответствует ли оно условиям патентоспособности. Вопрос о том, является ли использование известного способа получения гена препятствием к признанию такого гена неочевидным, следует решать в судебном порядке. Поскольку РТО использует прецедентный подход к вынесению решений по биотехнологическим заявкам, по-видимому, не существует абсолютного стандарта для оценки соответствующих изобретений, и суды скорее будут играть интегративную роль при рассмотрении вопроса о патентоспособности генов.

### **Патентование многоклеточных организмов**

Патентование многоклеточных организмов тоже вызывает опасения как этического, так и социального характера. Однако с точки зрения предоставления исключительных прав на живые организмы здесь нет ничего принципиально нового. Традиционно патентуются микроорганизмы, разработаны нормы, согласно которым селекционерам предоставляются права на новые сорта растений, в США и Европе запатентована трансгенная мышь («онкомышь»), несущая активируемый ген, отвечающий за формирование опухоли, охраноспособными изобретениями считаются растения, полученные с помощью методов генной инженерии.

Серьезные возражения против патентования трансгенных животных основаны скорее на соображениях морального порядка. Другими словами, вопрос заключается в том, считает ли общество патентование таких животных приемлемым или нет. С точки зрения исторической перспективы маловероятно, чтобы чисто этические соображения могли исключить патентование всех трансгенных животных. Например, если изобретение относится к новому способу лечения человека, то в соответствии с существующей точкой зрения права и потребности человека преобладают над «интересами» животных. Однако патентование — это не абсолютное право, и правительство в законодательном порядке решает, что может быть охраноспособно, а что — нет. Если различные заинтересованные круги считают, что изобретение способно оказать негативное экономическое влияние, например на сельское хозяйство, то вполне возможно, что в законодательном порядке внедрение новой технологии будет запрещено. Например, парламент Дании издал закон, согласно которому животные исключаются из сферы интеллектуальной собственности. Таким образом, они не являются объектами патентной защиты.

### **Патентование и фундаментальные исследования**

Не все уверены в целесообразности патентования, некоторые считают, что предоставление монопольных прав ограничивает конкуренцию, приводит к повышению цен, сдерживает новые разработки, способствует процветанию больших корпораций в ущерб интересам отдельных изобретателей и небольших компаний. Несмотря на все это, патентная система стабильна и хорошо развита. Более того, стало ясно, что патентование не тормозит фундаментальные исследования и научную деятельность фирм и компаний. Так, если бы оно служило серьезным препятствием для инноваций, то патент США за номером 4 237 224, выданный Стэнли Коэну и Герберту Бойеру в 1980 г. на использование вирусных и плазмидных векторов для создания рекомбинантных ДНК, должен был в значительной степени затормозить развитие молекулярной биотехнологии (рис. 23.1). Совершенно очевидно, что ничего подобного не произошло.

Ранее патентование и внедрение запатентованных биотехнологических изобретений в основном волновало ученых, работающих в области биологии. Однако теперь в научном сообществе существует мнение, что патентование и его последствия могут нанести ущерб фундаментальным научным ценностям. Традиционно наука, особенно университетская, представляла собой открытую систему со свободным обменом идеями и результатами исследований через научные публикации и личные сообщения. К идеям коллег относились с уважением, а прогресс в той или иной области во многих случаях достигался совместными усилиями. Однако позже некоторые ученые стали склоняться к мысли, что интеграция научных исследований вторична по отношению к частным интересам, а побудительными мотивами для занятий наукой являются публичное признание и финансовая прибыль от внедрения инноваций. Ранее фундаментальные исследования в основном проводились открыто. Ученые были уверены, что прогресс в целом будет идти быстрее, если результаты экспериментов будут опубликованы в научных журналах, доступных любому желающему. Это поможет правильно выбрать направление исследований и только выиграть от открытий, сделанных другими. В условиях секретности может уйти много времени на проведение уже выполненных экспериментов. Сейчас патентные поверенные советуют ученым держать свои работы в тайне до тех пор, пока не будет подана заявка на патент. В патентование изобретений вовлекается все большее число ученых, вынужденных молчать о своих исследованиях, по крайней мере до того момента, как соответствующая заявка будет оформлена и подана в Патентное ведомство.

Более того, в результате сокращения финансирования со стороны государства некоммерческие институты и в особенности университеты вынуждены искать другие источники доходов. Новыми источниками денежных средств становятся пошлины и роялти от продажи лицензий и переуступки прав на патенты. Ярким примером здесь может служить патент, выданный Козну и Бойеру на методики работы с рекомбинантными ДНК. За все время своего действия с 1980 по 1997 г. он принес Станфордскому и Калифорнийскому университетам доход примерно 45 млн. долл. США. Массачусетский технологический институт ежегодно подает более 100 заявок на патенты во всех областях исследований, и его доход от продажи лицензий составляет 5,5 млн. долл. в год. Большинство университетов имеют хорошо организованные патентные отделы, которые занимаются процедурой патентования и передачей разработанных технологий в промышленность. Авторы обычно получают часть доходов от своих изобретений. Таким образом, коммерческая посредническая деятельность — это реальная часть жизни многих университетов в США и других странах. Важно, чтобы она не доминировала над другими направлениями работы академических учреждений.

Энтузиазм, с которым патентуются научные разработки, вызывает опасения, что наука может стать заложником патентовладельцев, а научные исследования будут все менее плодотвор-

Метод репликации функциональной ДНК, включающий трансформацию в подходящих условиях соответствующих одноклеточных организмов с помощью функциональной ДНК с целью получения трансформантов, при этом функциональная ДНК получена *in vitro* следующим образом: а) расщеплением вирусной или кольцевой плазмидной ДНК, совместимой с указанным одноклеточным организмом, с получением линеаризованного фрагмента, содержащего интактный репликон и концевой участок с заранее заданными свойствами; б) объединением первого линеаризованного фрагмента со вторым, чужеродным по отношению к указанному одноклеточному организму и содержащим по меньшей мере один интактный ген и концевой участок, способный к лигированию с концевым участком первого линеаризованного фрагмента, причем по меньшей мере один из линеаризованных фрагментов содержит ген определенного фенотипического признака в условиях, подходящих для такого объединения, причем концевые участки первого и второго фрагментов объединяются с образованием функциональной ДНК, способной к репликации и транскрипции в указанном одноклеточном организме; выращивание указанного одноклеточного организма в подходящей питательной среде и выделение трансформантов, обладающих данным фенотипическим признаком, проявление которого обуславливается указанной функциональной ДНК,

Рис. 23.1. Первый пункт формулы Патента США № 4 237 224, выданного С. Козну и Г. Бойеру 2 декабря 1980 г. и озаглавленного «Способ получения биологически функциональных молекулярных химер». <sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Согласно действующему патентному законодательству, каждый пункт формулы изобретения должен излагаться в виде одного предложения, поэтому часто бывает довольно громоздким и трудным для восприятия. — *Прим, перев.*



ными. Но есть и другое мнение: некоторые считают, что традиционный путь развития науки устарел и неэффективен, а патентные права и их реализация будут стимулировать новые разработки. Разрешить это противоречие будет нелегко. Ясно лишь, что появление молекулярной биотехнологии поставило множество серьезных проблем, в том числе и проблему путей развития науки.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Существует несколько причин для патентования изобретений. Владельцы патентов получают исключительные права на изобретение, благодаря которым они компенсируют усилия, затраченные ими на создание нового продукта, разработку нового способа или устройства. При этом научное сообщество получает детальную информацию об изобретении и не тратит время и усилия на создание того, что уже известно. Возможность получения прибыли от патента стимулирует компании и отдельных исследователей к разработке новых идей. Патенты способствуют инновациям и обеспечивают права изобретателей на придуманные ими технические решения. Чтобы патент был выдан, изобретение должно быть новым, неочевидным и полезным. Кроме того, оно не должно быть природным продуктом. Проблема патентования молекул ДНК весьма противоречива. Ведомство по патентам и товарным знакам США (РТО) отказало в выдаче патентов на частично секвенированные кДНК, поскольку в заявках отсутствовали конкретные данные о их практической пользе; отказано было и в выдаче патентов на гены, идентифицированные с помощью гибридизационных зондов, которые были синтезированы исходя из опубликованных данных по аминокислотной последовательности. Позже решение РТО было отменено в суде на основании того, что вырожденность генетического кода не позволяет однозначно определить нуклеотидную последовательность кДНК исходя из данных об известной аминокислотной последовательности соответствующего белка, а следовательно, условие неочевидности, необходимое для патентования такого рода изобретений, выполняется.

Ключевым в признании генетически модифицированных микроорганизмов охраноспособными стало судебное решение, касающееся рекомбинантных бактерий, созданных А. Чакрабартти. В 1980 г. Верховный суд США постановил, что на бактерии, полученные в результате генетических манипуляций, может быть выдан патент. Позднее патенты США были выданы на трансгенную мышь с повышенной частотой возникновения злокачественных опухолей и некоторые трансгенные растения. Однако патентование животных, полученных с помощью методов геной инженерии, разрешено не во всех странах.

С развитием молекулярной биотехнологии возник вопрос, следует ли разрешать частным компаниям патентовать организмы, полученные с помощью методов геной инженерии, и предоставлять им исключительные права на них. С одной стороны, без подобных прав собственности биотехнологические компании не будут иметь стимула к разработке и внедрению в рыночный оборот новых продуктов. С другой, есть мнение, что такого рода привилегии с моральной точки зрения неприемлемы, а патентование сдерживает научные исследования и инновации. И наконец, следует обратить внимание на то, что патентование влияет на пути развития фундаментальной науки.

## ЛИТЕРАТУРА

- Adler R.** 1984. Biotechnology as an intellectual property. *Science* 224: 357-363.
- Belcher M., A. G. Sheard.** 1993. Profiting from inventions in academia: American and British perspectives. *Ann. Clin. Biochem.* 30: 1—10.
- Bidey R. E.** 1991. Patenting animals in Europe. *Bio/Technology* 9: 619-622.
- Caskey C. T.** 1996. Gene patents—a time to balance access and incentives. *Trends Biotechnol.* **14**: 298-302.
- Chahine K. G.** 1997. Patenting DNA: just when you thought it was safe. *Nat. Biotechnol.* **15**: 586-587.
- Crespi R. S.** 1997. Biotechnology patents and morality. *Trends Biotechnol.* **15**: 123-129.
- Eckenswlller C., J. Morrow.** 1996. Why patent life forms? *Policy Options* 17: 11-15.



- Johnson E.** 1996. A benchside guide to patents and patenting. *Nat. Bioethnol.* 14: 288-291.
- Marshall E.** 1997. Companies rush to patent DNA. *Science* 275: 780-781.
- Poste G.** 1995. The case for genomic patenting, *Nature* 378: 534-536.
- Saliwanchik R. 1986. Légal protection for biotechnology, p. 389—401. In A. L. Demain and N. A. Solomon (éd.), *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Yablonsky M. D., W. J. Hone.** 1995. Patenting DNA sequences. *Bio/Technology* 13: 656—657.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Каковы необходимые условия патентоспособности изобретения?
2. Что такое патент на способ? Патент на продукт? Приведите примеры.
3. Какого рода сведения должны содержаться в заявке на патент?
4. Почему патент полезен исследователям, не являющимися его держателями?
5. Каковы цели патентования изобретений?
6. Обсудите проблемы патентования EST.
7. Обсудите решения РТО и Апелляционного суда федерального округа США по поводу патентоспособности генов, идентифицированных с помощью гибридизационных зондов, которые были сконструированы на основе опубликованных данных об аминокислотных последовательностях соответствующих белков.
8. Подготовьте аргументы для обеих сторон, участвующих в дебатах на тему: «Следует ли запрещать патентование многоклеточных организмов, полученных с помощью методов генной инженерии?»
9. Обсудите вопрос о том, как патентование изобретений может повлиять на пути развития фундаментальной науки.
10. Свяжитесь с контактным сетевым сайтом РТО (<http://patents.uspto.gov/>), используйте систему поиска Boolean для патентов на рекомбинантные ДНК (например, с помощью ключевых слов «recombinant» и «DNA») и установите сущность изобретений, защищенных пятью последними патентами.

# Словарь терминов

**Адаптер (Adaptor)** ]. Синтетический двухцепочечный олигонуклеотид с одним тупым концом и одним липким. После пришивания адаптера тупым концом к ДНК-мишени последнюю можно встраивать в подходящий вектор, используя приобретенный ею липкий конец. 2. Синтетический одноцепочечный олигонуклеотид, у которого после самогибридизации появляются липкие концы и внутренний сайт для рестрицирующей эндонуклеазы. Когда адаптер встраивают в клонирующий вектор, у последнего появляется новый сайт рестрикции.

**Аденин, А (Adenine)** Пуриновое основание, комплементарное тимину и урацилу. Одно из азотистых оснований, входящих в состав ДНК и РНК.

**Активатор (Activator)** 1. Вещество, стимулирующее транскрипцию специфического гена или оперона. 2. Белок, связывающийся с оператором и ускоряющий транскрипцию; используется также название «активаторный белок».

**Актин (Actin)** Белок мышечных волокон. Входит в состав актомиозина — основного сократительного мышечного белка.

**Аллель (Allele)** Одна из двух (или нескольких) альтернативных структурных форм гена.

**Аллостерическая регуляция (Allosteric regulation)** Регуляция активности фермента, осуществляемая эффекторной молекулой, которая связывается с участком в молекуле фермента, удаленным от активного центра.

**Альгинат (Alginate)** Полисахарид, синтезируемый различными водорослями и бактериями; состоит из остатков β-D-маннуроната и α-L-гулуроната.

**Альтернативным сплайсинг (Alternative splicing)** Соединение экзонов данного гена в разных комбинациях с образованием различающихся зрелых молекул мРНК,

**Аминоацил-тРНК (Aminoacyl-tRNA)** Молекула тРНК, к 3'-концу которой присоединена специфическая аминокислота.

**Аминоацильный сайт, А-сайт (Aminoacyl site)** Участок рибосомы, связывающий аминоксил-тРНК в процессе трансляции.

**Аминокислота (Amino acid)** Мономерная единица («строительный блок») белковых молекул.

**Ампликон (Amplicon)** Плазмидный вектор вируса простого герпеса типа 1.

**Анаэробные микроорганизмы (Anaerobes)** Микроорганизмы, растущие в отсутствие кислорода,

**Антибиотик (Antibiotic)** Вещество, синтезируемое одним микроорганизмом и оказывающее ингибирующее действие на другие микроорганизмы и раковые клетки.

**Антиген (Antigen)** Вещество, воспринимаемое организмом как чужеродное и вызывающее специфический иммунный ответ — выработку антител.

**Антикодон (Anticodon)** Триплет нуклеотидов в молекуле тРНК, комплементарный нуклеотидам специфического кодона в молекуле мРНК,

**Антипараллельная ориентация (Antiparallel orientation)** Противоположная направленность (5'→3' и 3'→5') цепей в двухцепочечных молекулах нуклеиновых кислот.

**«Антисмысловая» РНК (Antisense RNA)** РНК-последовательность, комплементарная какому-то участку или всей молекуле специфической мРНК.

**«Антисмысловая» цепь (Antisense chain)** 1. Транскрибируемая (кодирующая) цепь в молекуле хромосомной ДНК, 2. Одна из цепей в двухцепочечной молекуле ДНК, нуклеотидная последовательность которой комплементарна таковой у соответствующей мРНК.

**Антисыворотка** (Antisemit) Жидкая составляющая крови, содержащая антитела.

**Антитело** (Antibody) Белок (иммуноглобулин), синтезируемый И-лимфоцитами в ответ на попадание в организм различных антигенов и специфически с ними взаимодействующий.

**Антифризный** белок (Antifreeze protein) Богатый аланином белок, вырабатываемый в печени некоторых водных организмов и предотвращающий замерзание плазмы крови. Обнаружен также в клетках некоторых насекомых, растений и бактерий, где он регулирует образование кристаллов льда при низких температурах.

**Аптамер** (Aptamer) Синтетический полинуклеотид, связывающийся с белком, в норме не взаимодействующим с нуклеиновыми кислотами.

**Аттенуированная** (ослабленная) вакцина (Attenuated vaccine) Вакцина, приготовленная с использованием ослабленных тем или иным образом микроорганизмов.

**Аутологичные** клетки (Autologous cells) Клетки, взятые от данного организма, культивированные, возможно, генетически измененные и вновь введенные в организм-донор.

**Аутосома** (Autosome) Любая хромосома, не являющаяся половой. В соматических клетках человека присутствуют 22 пары аутосом и одна пара половых хромосом.

**Аутосомное наследование** (Autosomal inheritance) Наследование с полом наследование какого-либо признака.

**Ацилпереносящий** белок (Acyl carrier protein) Низкомолекулярный белок, компонент более крупного комплекса, участвующего в биосинтезе жирных кислот или поликетидов.

**Аэробные микроорганизмы** (Aerobes) Микроорганизмы, растущие только в присутствии кислорода.

**Arabidopsis thaliana** Растение с очень небольшим геномом, использующееся в качестве модельной системы для изучения процессов роста и развития.

**Бакмида** (Bacmid) Челночный вектор на основе генома AcMNPV, способный существовать в клетках *E. coli* и клетках насекомых.

**Бактериофаг** (фаг) (Bacteriophage) Вирус, инфицирующий бактерии.

**Бактериоцин** (Bacteriocin) Вещество, синтезируемое одним микроорганизмом и убивающее клетки другого микроорганизма.

**Баллистическая трансфекция** (Biolistics, Microprojectile bombardment) Введение ДНК в растительные и животные клетки или органеллы с помощью вольфрамовых или золотых шариков. ЛНК осаждают, покрывают ею шарики и «обстреливают» ими клетки.

**G-белки** (G proteins) Мембранные белки, активизирующиеся после взаимодействия с GTP. Участвуют в передаче сигнала от клеточных рецепторов к ферментам на внутренней поверхности мембран.

**Белки теплового шока** (Heat-shock proteins) Белки, синтезируемые в ответ на резкое повышение температуры.

**Белок одноклеточных опрелизмии**, БОО (Single-cell protein) Белковые продукты, синтезируемые монокультурой микроорганизмов и использующиеся в качестве пищевых добавок к рациону животных.

**Бетаин** (Betaine) Низкомолекулярное соединение, служащее донором метильной группы при биосинтезе метионина.

**Библиотека кДНК** (cDNA library) Коллекция клонов кДНК, синтезируемых in vitro на матрицах мРНК, происходящих из одной ткани или клеточной популяции.

**Бинарная векторная система** (Binary vector system) Двухплазмидная система *Agrobacterium*, предназначенная для переноса участка Т-ДНК, несущего клонированные гены, в растительные клетки. Гены вирулентности локализованы на одной плазмиде, а встроенный участок Т-ДНК — на другой.

**Бинарное деление** (Binary fission) Прямое, несвязанное с половым процессом деление прокариота, в котором клетки на примерно одинаковые по размерам дочерние клетки.

**Биоаккумуляция** (Bioaccumulation) Накопление какого-либо вещества (например, ДДТ) в организмах данной пищевой цепи.

**Биодеградация** (Biodegradation) Разрушение загрязняющих веществ микроорганизмами с окружающей средой, с помощью живых микроорганизмов.

**Биоконтроль** (Biocontrol) Процесс, в котором используются живые организмы для ограничения роста и развития патогенных микроорганизмов.

**Биомаркер** (Biomarker) Биологический признак, который позволяет судить о прогрессировании патологического процесса или об эффективности лечения.

**Биомасса** (Biomass) 1. Клеточная масса, образующаяся в результате жизнедеятельности живых организмов.

2. Органическое вещество, которое может использоваться как источник энергии или химических соединений.

**Биореактор, ферментер (Bioreactor)** Устройство, в котором протекают биохимические реакции при участии живых микроорганизмов, клеточных экстрактов или ферментов. Часто этот термин относится к сосуду, в котором растут микроорганизмы,

**Биитишное мечение (Riotin labeling)** 1. Присоединение молекулы биотина к молекуле другого вещества. 2. Включение биотинсодержащего нуклеотида в молекулу ДНК.

**Блоттинг (Blotting)** Перенос разделенных молекул из одной среды (например, геля) на твердый носитель (бумагу, нитроцеллюлозный фильтр).

**Праймер-опосредованная прогулка («блуждающая за-•трапка»)** (Primer walking) Один из методов в секвенировании протяженных сегментов ДНК (>1 т.п.н.) с использованием праймера (затравки), комплементарного концу уже известной последовательности. На основании данных, полученных на первом этапе, синтезируют новый праймер, перекрывающийся с концом уже секвенированного участка, и используют его для определения нуклеотидной последовательности следующего участка клонированной ДНК. Эту процедуру повторяют до тех пор, пока не секвенируют весь сегмент,

**Бокс Пригнова (Pritnow box)** Нуклеотидная последовательность у прокариот, расположенная за 10 нуклеотидов до сайта инициации транскрипции. Обычно состоит из 6 нуклеотидов: ТАТААТ,

**Бокс Хогнецца (Hogness box)** Нуклеотидная последовательность у эукариот, расположенная за 25 нуклеотидов до сайта инициации транскрипции. Обычно состоит из 8 нуклеотидов.

**Брешь, пробел (Gap)** Отсутствие одного или нескольких нуклеотидов в одной из цепей двуцепочечной ДНК.

**Быстрая амплификация концов кДНК, RASE (Rapid amplification of cDNA ends)** Получение двухцепочечных концевых участков кДНК, комплементарных 3'- или 5'-концам молекул специфических мРНК (3'RACE или 5'RACE соответственно).

**Вакцинация (Vaccination, preventive Immunization)** Введение в организм антигена с тем, чтобы индуцировать в нем выработку антител к возможному инфицирующему агенту.

**Вариабельные домены (Variable domains)** Участки полипептидных цепей антитела, имеющие неодинаковую аминокислотную последовательность у молекул разных антител. Отвечают за антигенную специфичность последних.

**Вектор (Vector)** Самореплицирующаяся молекула ДНК (например, бактериальная плазмида), используемая в генной инженерии для переноса генов от организма-донора в организм-реципиент, а также для клонирования нуклеотидных последовательностей,

**Вестерн-блоттинг (Western blotting)** Перенос белковых молекул, разделенных с помощью гель-электрофореза, на твердую подложку.

**Вирион (Virion)** Вирусная частица.

**Вирулентность (Virulence)** Характеристика патогенного микроорганизма.

**Вирус-помощник (Helper virus)** Вирулентный штамм вируса, в присутствии которого дефектный вирус может размножаться в клетке-хозяине.

**Внутренний сайт связывания рибосомы, IRES (Internal ribosomal entry site)** Нетранслируемая последовательность, расположенная после одного из кодирующих участков полииницированной мРНК, которая связывается с малой рибосомной субчастицей и образует иницирующий комплекс.

**Время генерация (Generation time)** Время, за которое в популяции одноклеточных организмов удваивается число клеток. Называется также временем удвоения.

**Вставка (Insert)** Сегмент ДНК, встроенный в клонирующий вектор.

**Вторичный метаболит (Secondary metabolite)** Вещество, не являющееся обязательным для роста или функционирования клетки, но синтезирующееся в стационарной фазе (обычно участвует в защите клеток или микроорганизмов от тех или иных воздействий).

**«Вырожденные» праймсеры (Degenerate primers)** Синтетические олигонуклеотиды, к одному из сайтов которых находятся разные основания

**гг-Гены (gà Genes)** Группа генов Тi-плазмиды, обеспечивающие перенос Т-ДНК в растительную клетку.

**Гамета (Gamete)** Репродуктивная гаплоидная клетка многоклеточного организма.

**Гаплоидный (Haploid)** Термин, характеризующий организм (клетку), у которого имеется один набор хромосом.

**Гаплотип** (Haplotype) Комбинация аллелей на одной хромосоме диплоидного организма.

**Ген** (Gene) Транскрибируемый участок хромосомы, кодирующий функциональный белок либо тРНК или рРНК.

Ген «самоубийства», «суицидальный» ген (Suicide gene) Ген, вызывающий при определенных условиях гибель собственной клетки.

**Генетический код** (Genetic code) Система записи генетической информации в виде последовательности нуклеотидов, в которой каждые три нуклеотида, составляющие кодон, кодируют одну аминокислоту. Состоит из 64 кодонов, кодирующих все 20 аминокислот и три терминирующих кодона.

**Генетический полиморфизм** (Genetic polymorphism) Наличие двух или более аллельных форм отдельных генов.

**Ген-кандидат** (Candidate gene) Структурный ген в геноме человека, мутация в котором лишь предположительно (до получения доказательств) является причиной конкретного наследственного заболевания.

**Ген-мишень** (Target gene) 1. Клонированный ген. 2. Ген, подвергаемый специфическому воздействию. 3. Ген, интересующий исследователя.

**Генная иммунизация** (Genetic immunization) Индукция у организма иммунного ответа без введения антигена, путем включения в клетки гена, кодирующего белок-антиген.

**Генная терапия ex vivo** (Ex vivo gene therapy) Введение гена (или генов) в изолированные клетки больного. После культивирования и трансформации клетки вводят в организм больного с помощью трансфузии, инфузии или инъекции. Эта процедура позволяет устранять генетические дефекты.

**Генная терапия in vivo** (In vivo gene therapy) Введение гена (генов) непосредственно в ткань или орган с целью устранения генетического нарушения.

**Генная терапия с использованием клеток зародышевой линии** (Germ line gene therapy) Введение гена (генов) в оплодотворенное яйцо или клетки эмбриона на ранней стадии. Чужеродный ген оказывается в ядрах всех клеток развивающегося организма, в том числе половых, и изменяет его фенотип.

**Генная терапия с использованием «антигисмысловых» последовательностей** (Antisense therapy) Лечение in vivo генетического заболевания путем блокирования синтеза

белка включением в геном нуклеотидной последовательности, комплементарной специфической мРНК.

**Генная терапия соматических клеток** (Somatic cell gene therapy) Введение гена в клетку, отличающуюся от нормальной, с целью коррекции генетического дефекта.

**Геном** (Genome) Совокупность генов гаплоидного набора хромосом данного организма.

**Геномная библиотека, банк (библиотека) генов** (Genome library) Набор клонированных фрагментов ДНК, в совокупности составляющих индивидуальный (групповой, видовой) геном. Если речь идет о крупном геноме (млекопитающие), то получают хромосомоспецифичные библиотеки.

**Генотип** (Genotype) Генетическая конструкция организма, набор всех ее аллелей.

**Генотипирование** (Gnotyping) Определение всех аллелей всех локусов данной хромосомы.

**Ген-регулятор** (Regulator gene, repressor gene) Ген, кодирующий белок-репрессор, который связывается с оператором и регулирует транскрипцию «своего» оперона.

**Ген-репортер** (Reporter gene) Ген, кодирующий легко выявляемый продукт. Такие гены используют, например, для того, чтобы убедиться, что данная генетическая конструкция успешно введена в клетку, орган или ткань.

**Гены «домашнего хозяйства»** (Housefold genes) Набор основных структурных генов, обеспечивающих жизнедеятельность клетки.

**Гетерозигота** (Hétérozygote) Организм, в геноме которого имеются одна или несколько пар различающихся аллелей.

**Гетерологичный зонд** (Heterologous probe) Сегмент ДНК одного организма, использующийся для скрининга библиотеки сходных ДНК другого организма.

**Гетеромерный белок** (Heteromeric protein) Белок, состоящий из двух и более разных полипептидных цепей (субъединиц).

**Гибридизация** (Hybridization) Отжиг двух полинуклеотидных цепей, часто из разных источников, с образованием ДНК/РНК- или ДНК/ДНК-гибридов, стабилизируемых водородными связями.

**Гибридизация ДНК** (DNA hybridization) Спаривание двух молекул ДНК, часто из разных источников, благодаря образованию водородных связей между комплементар-



**ными нуклеотидами.** Используется для выявления специфических **нуклеотидных** последовательностей в препарате ДНК.

**Гибридный белок, химерный белок (Fusion protein)** Продукт клонированных совместно двух или более кодирующих последовательностей из разных генов. Представляет собой одну полипептидную цепь.

**Гибридный ген (Hybrid gene, chimeric gene)** Ген, состоящий из частей двух или нескольких генов и **экспрессирующийся** как единое целое с образованием гибридного (химерного) белка.

**Гибридома (Hybridoma)** Гибридная клеточная линия, полученная при слиянии нормальных **антителообразующих** клеток (лимфоцитов) и **миеломных** клеток. Обладает способностью к неограниченному росту и синтезу **моноклональных** антител.

**3'-гидроксильная группа (3'-hydroxyl group)** **Гидроксильная** группа, **гя:зи.нная** с 3'-**агтомом** углерода сахарного остатка (рибозы или дезоксирибозы) концевой **нуклеотида** молекулы нуклеиновой кислоты.

**Гипервариабельный участок (Hyper-variable region)** Сайт вариабельной части тяжелой или легкой цепи молекулы иммуноглобулина, характеризующийся большей изменчивостью у антител разной специфичности по сравнению с другими ее сегментами - каркасными участками.

**Гликоширование ((glycosylation) Ковалентное присоединение сахарного остатка к белковой молекуле,**

**(М,3-глюканаза (β-1,3-glucanase)** Растительный фермент, синтезируемый клетками растений в ответ на проникновение в них патогенных грибов. **Гидролизует** определенные компоненты клеточной стенки последних. Синтезируется также некоторыми бактериями.

**Гомодимерный белок (Homodimeric protein)** Белок, состоящий из двух идентичных полипептидных цепей (**субъединиц**).

**Гомозигота по доминантному гену (Homozygous dominant)** Организм, у которого оба **аллеля** данного **локуса** доминантны.

**Гомозигота по рецессивному гену (Homozygous recessive)** Организм, у которого оба **аллеля** данного **локуса** рецессивны.

**Гомозиготность (Homozigosis)** Наличие идентичных аллелей в одном или нескольких **локусах**. Клетка или организм с такими аллелями называется гомозиготой.

**Гомологичные хромосомы (Homologous chromosomes)** Хромосомы, включающие идентичные наборы генов, одинаково расположенных друг относительно друга. Образуются в результате дупликации пар родительских хромосом.

**Гомологичные (Homologous)** Происходящие из одного источника или имеющие сходную структуру или эволюционное происхождение.

**Гомомерный белок (Homomeric protein)** Белок, состоящий из двух или более идентичных полипептидных цепей (**субъединиц**).

**Гомополимер (Homopolymer)** Полимер, **состоящий** из одинаковых мономерных единиц.

**Группа несовместимости (Incompatibility group)** Группа плазмид, **представители** которых могут сосуществовать в одной клетке.

**Группа совместимости (Compatibility group)** Группа плазмид, члены которой не способны **сосуществовать** в одной бактериальной клетке.

**Гуанин, G (Guanine)** **Пуриновое** основание, комплементарное цитозину. Одно из четырех азотистых оснований, входящих в состав ДНК и РНК,

**Гуморальный иммунный ответ (Humoral immune response)** Синтез антител В-клетками иммунной системы в ответ на присутствие в организме чужеродных антител.

**Двойная гетерозигота (Double heterozygote)** Организм, **гетерозиготный одновременно** по **двум** генным локусам.

**Двойной кроссинговер (Double crossover)** Кроссинговер, происходящий одновременно в двух точках пары гомологичных хромосом.

**Двухцистронный вектор (Dicistronic vector)** Клонированный вектор, предназначенный для экспрессии двух генов в одной клетке млекопитающих. Гены находятся под контролем одного промотора и сигнала **полигенирования**.

**Дегалогенирование (Degalogenation)** Отщепление атома галогена (хлора, иода, брома, фтора), обычно при биодegradации.

**Дезоксирибоза (Deoxyribose)** **Пятиуглеродный** моносахарид, входящий в состав ДНК.

**Дезоксирибозим (Deoxyribozyme)** Молекула ДНК, обладающая каталитической активностью.

**Дезоксирибонуклеаза I, ДНКаз I (Deoxyribonuclease I, DNase I)** Фермент, расщепляющий **двухцепочечную**



ДНК. Используется для очистки препаратов РНК и бесклеточных экстрактов.

Де'оксирибси [ук, шиповая кислота, ЛИК (Deoxyribonucleic acid, DNA) Полимер, состоящий из дезоксирибонуклеотидов; видоспецифичный носитель генетической информации.

Деления (Deletion) Выпадение участка хромосомы из ее внутренней области.

Денатурация (Denaturation) 1. Расхождение цепей двух цепочечной молекулы ДНК или РНК. 2. Нарушение нативной конформации биологических макромолекул в результате разрушения нековалентных (водородных) связей.

Дерепрессия (Derepression) Индукция транскрипции гена в результате подавления функций репрессора — блокирования его связывания с промотором.

Диазотроф (Diazotroph) Организм, способный фиксировать азот.

Диаминопимелиновая кислота (Diaminopimelic acid) Непосредственный предшественник L-лизина у бактерий и растений, один из компонентов клеточной стенки у некоторых бактерий.

Дигидрофолатредуктаза (Dihydrofolatreductase) Фермент, катализирующий образование тетрагидрофолиевой кислоты.

Дидезоксинуклеотид, ddNTP (Dideoxynucleotide) Полученный искусственным путем нуклеозидтрифосфат, лишенный 2'- и 3'-гидроксильных групп при углеродных атомах сахарного кольца.

Дикий тип (Wild type) Наиболее часто встречающийся в природной популяции фенотип с признаками, детерминируемыми «нормальными» (немутантными) аллелями.

Диплоид (Diploid) Организм, клетки которого содержат два гомологичных набора хромосом.

Дисульфидная связь (Disulphide bond) Ковалентная связь между двумя атомами серы, входящими в молекулы цистеина. Стабилизирует третичную структуру полипептидных цепей.

Дитиотрейтол (Dithiothreitol) Низкомолекулярный тиолсодержащий восстанавливающий агент. Добавляется в буферные растворы в низкой концентрации для предотвращения окисления сульфгидрильных групп в белках. В высоких концентрациях используется для восстановления дисульфидных связей.

Длинные концевые повторы, LTR (Long terminal repeats) Прямые повторяющиеся последовательности на концах ДНК-копии генома ретровирусов.

ДНК-зонд (DNA probe) Фрагмент ДНК, меченный тем или иным образом и используемый для гибридизации со специфическим участком в молекуле ДНК. Позволяет идентифицировать комплементарные ему нуклеотидные последовательности.

ДНЕ-лигаза (DNAligase) Фермент, катализирующий образование фосфодиэфирной связи между 3'-гидроксильной группой и 5'-фосфатом соседних нуклеотидов в месте одноцепочечного разрыва молекулы ДНК.

ДНК-маркирующий сайт, STS (Sequence tagged site) Уникальный для данного локуса олигонуклеотид, который может использоваться для его идентификации методом ПЦР.

ДНК-полимераза (DNA polymerase) Фермент, катализирующий синтез полинуклеотидной цепи из отдельных нуклеотидов с использованием другой цепи в качестве матрицы и ДНК-затравки со свободной 3'-О Н-группой.

ДНК-полимераза Taq (Taq DNA polymerase) Термостабильная ДНК полимеразы, (сохраняет активность при 95 °C) бактерии *Thermus aquafiscus*. Часто применяется в методе ПЦР.

Додецилсульфат натрия (Sodium dodecyl sulfate) Анионный детергент, используемый для денатурации белков.

Домен (Domain) Участок полипептидной цепи, выполняющий определенную функцию (например, цитоплазматический домен, трансмембранный домен и т.д.).

Доминантный ген (Dominant gene) Ген, проявляющийся в фенотипе независимо от присутствия в геноме другого аллеля этого гена.

Доминирование, доминантность (Dominancy) Участие только одного аллеля в определении признака у гетерозиготной особи.

Емкость вектора (Vector capacity) Максимальный размер участка ДНК, который может быть клонирован в данном векторе.

Енолаза (Enolase) Фермент, катализирующий превращение 2-фосфоглицерата в фосфоенол пируват.

Енолредуктаза (Enolreductase) Фермент, участвующий в синтезе поликетидных антибиотиков.

Животное-основатель (Founder animal) Организм, несущий чужеродный ген в клетках зародышевой линии, который при спаривании дает начало чистой линии трансгенных организмов.

Заместительная терапия (Replacement therapy) Введение в организм метаболитов, кофакторов, гормонов, восполняющих их дефицит, обусловленный генетическим дефектом.

Зонд (Probe) 1. Соединение, меченное тем или иным способом и используемое для выявления родственных биохимических молекул в сложном образце. 2. Олигонуклеотид, используемый для выявления комплементарных последовательностей с помощью гибридизации.

11  $\beta$ -пропионил- $\beta$ -О-тиогалактопиранозид, ИППГ (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside) Индуктор /ос-(лактозного) оперона, В технологии рекомбинантных ДНК используется для индукции клонированных генов, находящихся под контролем системы / $\hat{u}c$ -репрессор— $\hat{f}oc$ -промотор.

Иммунотерапия (Immunotherapy procedure) Использование антитела или химерного белка, содержащего сайт связывания антитела, для лечения больного или облегчения его состояния.

Иммунный ответ (Immune response) Совокупность физиологических процессов в организме, индуцируемых при попадании в него чужеродных антигенов,

Иммуоаффинная хроматография (Immunoaffinity chromatography) Метод очистки, при котором фиксированное на матрице антитело связывает специфический белок, присутствующий в сложной смеси других белков.

Иммунологический анализ (Immunology assay) Метод, основанный на способности антитела узнавать специфический компонент в биологическом образце.

Иммунологический скрининг (Screening by immunological assay) Скрининг геномной библиотеки, основанный на выявлении продукта гена-мишени иммунологическими методами. Проводится в отсутствие подходящего ДНК-зонда.

Иммуносупрессия (Immunosuppression) Потеря способности иммунной системы организма к иммунному ответу на тот или иной антиген.

Иммунотоксин (Immunotoxin) Химерный белок, состоящий из двух доменов, один из которых обладает свойствами антитела, а другой — токсина. Первый домен

обеспечивает связывание химерного белка со специфической молекулой или клеткой, а второй инактивирует молекулу-мишень или убивает клетку,

Ингибирование конечным продуктом (End-product inhibition) Ингибирование фермента метаболитом - конечным продуктом метаболического пути,

Индолил-3-уксусная кислота, ИУК (Indole-3-acetic acid) Растительный гормон, относящийся к классу ауксинов, стимулирующий рост растений.

Индуктор (Inducer, Inductor) Небольшая молекула, связывающаяся с регуляторным белком-репрессором, что приводит к депрессии соответствующих генов.

Индукция (Induction) Депрессия гена или группы генов под действием индуктора,

Инициация (Initiation) Начало синтеза биополимера

Иницирующий кодон (Initiation codon) Кодон AUG в составе мРНК, кодирующий метионин (N-формилметионин у прокариот), с которого начинается (инициируется) синтез полипептидных цепей. Другое название — сигнал инициации трансляции.

Иницирующий комплекс (Initiation complex) Структура, необходимая для инициации синтеза полипептидной цепи рибосомами. Состоит из малой (30S) субчастицы рибосомы, иницирующих факторов, формилметиониновой тРНК, GTP и транслируемой мРНК,

Инсектицид (Insecticide) Вещество или живой организм, убивающие насекомых.

Интеграция (Integration) Встраивание чужеродной ДНК (обычно с помощью гомологичной рекомбинации) в хромосому хозяйской клетки.

Интегрирующий вектор (Integrating vector) Вектор, специально сконструированный для того, чтобы с его помощью можно было встраивать (интегрировать) клонированную ДНК в геном клетки-хозяина,

Интерлейкин-2 (Interleukin-2) Лимфокин, секретируемый некоторыми Т-лимфоцитами и стимулирующий пролиферацию Т-клеток.

Нитрон (Nitron) Транскрибируемый участок гена, не содержащий кодонов и вырезаемый из первичного транскрипта в ходе процессинга с образованием функциональной РНК.

Ионный канал (Ion channel) Трансмембранный белок, облегчающий транспорт определенных ионов.

Исключение (Excision) Вырезание сегмента ДНК из хромосомы или клонирующего вектора, осуществляемое *in vivo* или *in vitro* с помощью специфического фермента.

Искусственная бактериальная хромосома, ВАС (Bacterial artificial chromosome) Векторная система на основе F-плазмиды *E. coli*, используемая для клонирования длинных (100—300 т.п.н.) последовательностей.

Искусственная дрожжевая хромосома, YAC (Yeast artificial chromosome) Рекомбинантная ДНК, состоящая из дрожжей плазмиды и интегрированных в нее центромерных и теломерных областей хромосом дрожжей и маркерных генов и содержащая несколько сайтов инициации репликации,

Искусственная хромосома PI (PI artificial chromosome) Векторная система на основе фага Pi, используемая для введения в клетки *E. coli* вектора с крупной вставкой (100—300 т.п.н.) с помощью электропорации.

Искусственная хромосома человека, НАС (Human artificial chromosome) Хромосома, полученная объединением теломеры, центромеры и участков геномной ДНК человека.

Кандидатное картирование (Candidate gene cloning) Стратегия идентификации гена конкретного заболевания, основанная на данных о возможном продукте данного гена,

Капсид (Capsid) Белковая оболочка вирусной частицы,

Картирование (Gene mapping) Определение положения данного гена на хромосоме относительно других генов.

Кассета (Cassette) Группа тандемных тесно сцепленных, функционально связанных локусов. Пример - кассетная модель половых типов у дрожжей.

$\beta$ -Кеторедуктаза ( $\beta$ -Ketoreductase) Фермент, участвующий в синтезе поликетидных антибиотиков.

Кетосинтаза (Ketosynthase) Низкомолекулярный фермент, один из компонентов комплекса, участвующего в синтезе поликетидов.

В-клетки (B cells) Лимфоциты, продуцирующие антитела и происходящие из клеток костного мозга.

Клетки зародышевой линии (Germ line cells) Клетки, постепенно превращающиеся в гаметы (ст. первичных половых клеток до собственно гамет).

Клеточная линия (Cell line) Группа клеток, поддерживаемая в культуре путем пересевов.

Клеточно-оосредованный (клеточный) иммунитет (Cell-mediated immune response) Иммунные реакции, инициируемые клетками, а не антигенами или другими гуморальными факторами.

Клон (Clone) Популяция клеток или молекул, идентичных одной родоначально и клетке и/или молекуле.

Клонирование (Cloning) Совокупность процедур, использующихся для получения клонов. Клонирование многоклеточных организмов, например, включает пересадку ядер соматических клеток в оплодотворенное яйцо с удаленным пронуклеусом.

Клонирование генов (Gene cloning) Система методов, использующаяся для получения клонированных ДНК: выделение нужного гена из какого-либо организма, встраивание его в плазмиду (вектор), введение в клетку организма-хозяина, многократная репликация.

Клонирующий вектор (Cloning vector) Молекула ДНК (плазмидная или вирусная ДНК), предназначенная для клонирования ДНК-мишени.

Кодон (Codon) Три соседних нуклеотида, кодирующих определенную аминокислоту. Всего существует 64 сочетания нуклеотидов в кодонах; 61 из них кодируют 20 аминокислот, 3 являются нонсенс-кодонами.

Контративная векторная система (Cointegrative vector system) Двухплазмидная система, использующаяся для переноса клонированных генов в растительные клетки. Клонирующий вектор несет участок Т-ДНК, содержащий клонированный ген. После введения в клетку *Agrobacterium* он подвергается гомологичной рекомбинации с резидентной «разоруженной» (неонкогенной) Ti-плазмидой с образованием одной плазмиды, несущей генетическую информацию, необходимую для переноса генетически измененной области Т-ДНК в растительную клетку.

Комбинаторная библиотека (Combinatorial library) Библиотека, полученная встраиванием в вектор на основе фага  $\lambda$  КДНК легкой и тяжелой цепей различных антигенов — по одной комбинации в вектор.

Компетентность (Competence) Способность бактериальных клеток воспринимать трансформирующую ДНК (обычно плазмиду).

Комплемент (Complement) Белковый комплекс сыворотки крови, один из составляющих врожденного иммунитета. Принимает участие в регуляции воспаления.

тельных процессов, активации фагоцитоза и литического действия на клеточные мембраны. Активируется взаимодействием с иммунным комплексом.

Комплементарная ДНК, кДНК (Complementary DNA) Молекула ДНК, синтезированная на РНК-матрице с участием РНК-зависимой ДНК-полимеразы (обратной транскриптазы).

**Комплементарные нуклеотидные последовательности** (Complementary base sequences) **Полинуклеотидные** последовательности, которые взаимодействуют между собой в соответствии с правилами спаривания оснований: аденин (А) образует пару с тимином (Т) [или урацилом (U) в РНК], гуанин (G) - с цитозином (C).

Комплементарный гомополимерный «хвост» (Homopolymeric tail) Гомополимер из дезоксирибонуклеозидмонофосфатов, присоединяемый к 3'-ОН-концам обеих цепей фрагмента ДНК с тупыми концами. Создание комплементарных «хвостов» [например, poly(A) во встраиваемом фрагменте ДНК и poly(T) в векторе] позволяет клонировать фрагмент в составе рекомбинантной плазмиды.

Комплементация (Complementation) Восстановление фенотипа дикого типа (или близкого к нему фенотипа) при объединении в одной клетке двух ДНК с двумя рецессивными мутациями, находящимися в транс-конфигурации,

**Конкатемерные молекулы** (Concatemeric molecules) Длинные молекулы ДНК, состоящие из нескольких tandemно повторяющихся единиц. В такой форме находится геном некоторых фагов во время репликации.

Константа Михаэлиса  $A_m$  (Michaelis constant,  $A_m$ ) Кинетический параметр ферментативной реакции, численно равный концентрации субстрата, при которой скорость реакции составляет половину максимальной. Характеризует сродство фермента к субстрату. Чем ниже  $K_m$ , тем прочнее связывание между субстратом и ферментом.

Константный домен (Constant domain) Неизменная для данного класса иммуноглобулинов часть пол и пептидной цепи (легкой или тяжелой).

Конститутивный синтез (Constitutive synthesis) Постоянно происходящий в клетке или целом организме синтез РНК или какого-либо белка.

**Континг** (Contig) Непрерывный набор клонов, охватывающих данную область хромосомы или всю хромосому.

**Контрансфекция** (Contransfection) Введение в одну эукариотическую клетку двух разных молекул ДНК, в случае системы экспрессии на основе бакуловирусов — процедура одновременного введения бакуловируса и вектора в клетки насекомых в культуре.

Конформационный полиморфизм одноцепочечной ДНК, SSCP (Single-strand conformational polymorphism) Различия в конформации одноцепочечных ДНК, отличающихся одна от другой всего одним нуклеотидом. Анализируемые ДНК подвергают денатурации. Денатурированные цепи принимают разную конформацию и при гель-электрофорезе мигрируют с разной скоростью.

Копью гати **иные плазмиды** (Conjugative plasmids) Плазмиды, способные передаваться от одной клетки другой во время конъюгации.

Конъюгация (Conjugation) Форма полового процесса. У бактерий — односторонний перенос ДНК из одной контактирующей клетки в другую.

**Корспрессор** (Corepressor) Небольшая молекула, связывающаяся и с неактивным репрессором (апрессором) с образованием комплекса, присоединяющегося к оператору и блокирующего транскрипцию.

**Корончатый галл** (Oown gall) Опухоль растений, образование которой вызывают бактерии рода *Agrobacterium*,

Короткий концевой повтор, STR (Short tandem repeat) Концевая нуклеотидная последовательность, состоящая из ди-, три- или тетра-нуклеотидных повторяющихся элементов,

**Косегрегация** (Cosegregation) Феномен, состоящий в том, что два признака наследуются совместно, т.е. их гены при кроссинговере не разделяются,

**Космида** (Cosmid) Вектор, объединяющий свойства плазмидного вектора и вектора на основе фага  $\lambda$ . Имеет cos-сайты.

**Косупрессия** (Cosuppression) Подавление экспрессии специфического растительного гена при трансформации растения дополнительной копией этого гена, включенной в «смысловую» ориентации.

Кофактор (Cofactor) Низкомолекулярное вещество, необходимое для протекания определенной ферментативной реакции.

**Коферментация** (Cofermentation) Одновременный рост двух микроорганизмов в одном биореакторе.

**Кроссинговер** (Crossing-over) Взаимный обмен участками гомологичных хромосом, основанный на разрыве-соединении хроматид и приводящий к новой комбинации аллелей. Называется также рекомбинацией.

**Ксенобиотик** (Xenobiotic) Соединение, полученное искусственным путем, а не синтезированное живым организмом.

**Ксилема** (Xylose) Пятиуглеродный сахар, основной компонент гемиецеллюлозы.

**Культура** (Culture) Популяция клеток или микроорганизмов, выращиваемых в контролируемых условиях *in vitro*.

**Культуральная среда** (Culture medium) Твердая или жидкая среда, используемая для выращивания микроорганизмов *in vitro*.

**«Кэп»** (Cap) Метилированный гуанозин на 5'-конце многих мРНК эукариот.

**$k_t$** , **Константа** скорости ферментативной реакции. Чем выше эта величина, тем быстрее субстрат превращается в продукт.

**$k_{cat}/K_m$**  Каталитическая эффективность ферментативной реакции. Чем она выше, тем быстрее и эффективнее субстрат превращается в продукт.

**«Левый» элемент оперона** (Upstream) Условное название участка оперона, расположенного перед сайтом инициации транскрипции, в направлении 5' от него. Обычно первое транскрибируемое основание оперона обозначается +1, а все «левые» элементы — цифрами со знаком «—»,

**Лигирование** (Ligation) Соединение двух молекул ДНК с помощью фосфод и Мирных связей. *In vitro* катализируется ферментом ДНК-лигазой фага T4.

**Лигирование олигонуклеотидных зондов**, **ЛОЗ** (Oligonucleotide ligation assay) Метод выявления однонуклеотидных замен в гене-мишени с помощью коротких олигонуклеотидов, комплементарных противоположным цепям тестируемого отрезка ДНК. Если замена отсутствует, то оба олигонуклеотида полностью гибридизуются с ДНК, и после добавления в реакционную смесь ДНК-лигазы происходит их сшивание (лигирование). В противном случае сшивание оказывается невозможным.

**Лигноцеллюлоза** (Lignocellulose) Комплекс лигнина, гемицеллюлозы и целлюлозы, составляющий структурный каркас клеточной стенки растений.

**Лидерная последовательность** (Leader sequence) Нетранслируемая последовательность мРНК, расположенная между 5'-концом и иницирующим кодоном AUG.

**Лизис** (Lysis) Разрушение клеточных стенок под действием ферментов, содержащихся в лизосомах, или других агентов.

**Лизогенная** (Lysogeny) Интеграция генома бактериофага в геном клетки-хозяина. В результате индукции вирусная ДНК может выщепляться с образованием зрелых фаговых частиц.

**Линкер** (Linker) Синтетический олигонуклеотид, содержащий сайт рестрикции. Используется для соединения векторной и клонируемой ДНК, к концам которой по методу сшивания тупых концов присоединены линкеры.

**Липаза** (Lipase) Фермент, расщепляющий липиды.

**Липкие концы** (Cohesive ends) Взаимно комплементарные одноцепочечные участки ДНК, выступающие по концам двухцепочечной молекулы; образуются в результате ступенчатых разрезов двухцепочечных ДНК.

**Липополисахарид** (Lipopolysaccharide) Соединение, содержащее липид, связанный с полисахаридом. Один из компонентов клеточной стенки бактерий.

**Липосома** (Liposome) Пузырек, образуемый одно- или двухслойной мембраной, состоящей из липидных молекул. Гидрофобная часть этих молекул обращена внутрь пузырька, гидрофильная — наружу. Внутри пузырька могут находиться нуклеиновые кислоты, лекарственные вещества и т.д., адресно доставляемые липосомой.

**Литический цикл** (Lytic cycle) Размножение вируса в клетке-хозяине, оканчивающееся лизисом клетки.

**Локус** (Locus) Место на хромосоме, где находится специфический ген.

**Макромолекула** (Macromolecule) Полимер с молекулярной массой от нескольких тысяч до сотен млн. дальтон (белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды и т.д.).

**Макрофаг** (Macrophage) Крупный лейкоцит, обладающий способностью к фагоцитозу.

**Маркерные экспрессируемые последовательности**, **EST** (Expressed sequence tag) Короткие маркерные последовательности, характерные для каждого экспрессируемого гена человека. Позволяют изучать размеры, разнообразие и транскрипционную активность экспрессирующихся генов человека.



**Маркерный ген (Marker gene)** Ген с известной хромосомной локализацией, имеющий четкое фенотипическое проявление (устойчивость к антибиотику, ферментативная активность и т.д.).

**Маркерный пептид (Marker peptide)** Участок гибридной белковой молекулы, облегчающий идентификацию или очистку белка.

**Матричная РНК, мРНК (Messenger RNA)** Молекула РНК, в которой заключена информация об аминокислотной последовательности определенной белковой молекулы.

**Матричная цепь (Template strand)** Цепь ДНК или другой полинуклеотид, использующийся ДНК-полимеразой в качестве матрицы для синтеза комплементарной цепи,

**Мезофильные микроорганизмы (Mesophile)** Организмы, способные расти при температурах от 20 до 50 °С; оптимальная температура роста 37 °С.

**Меристема (Meristematic tissue)** Ткань растений, обладающая способностью к активному делению, У молодых растений обычно находится у кончиков корней и побегов,

**Метаболизм (Metabolism)** Совокупность физических и химических процессов, протекающих в организме и обеспечивающих его существование. Продукты метаболизма называются метаболитами.

**Метаболическая перегрузка (Metabolic load)** Нарушение метаболизма организма-хозяина в результате введения в его геном и экспрессии чужеродной ДНК,

**Метилирование (Methylation)** Присоединение к макромолекуле метильной группы. Например, при метилировании ДНК происходит присоединение такой группы к специфическим остаткам цитозина, а иногда аденина.

**Метка (Label)** Радиоактивный изотоп или идентифицируемый биохимическими либо иммунологическими методами лиганд (например, флуорофор), связывающийся с макромолекулой. Позволяет обнаружить меченое вещество в образце.

**Метод отпечатков (реplik) (Replica plating)** Перенос колоний микроорганизмов с одной чашки Петри на другую с помощью бархатной «печатки» с полным сохранением взаимного расположения колоний.

**Метод случайных лраймеров (Random primer method)** Способ получения меченых ДНК-зондов, основанный

на применении синтетических олигонуклеотидов, содержащих все возможные комбинации из шести нуклеотидов, и на их гибридизации с денатурированной ДНК-мишенью, Олигонуклеотиды, комплементарные последней, спариваются с ней, В реакционную смесь добавляют все четыре дезоксирибонуклеотида (причем один из них меченый) и фермент, катализирующий синтез фрагментов ДНК с использованием цепей ДНК-мишени в качестве матрицы, а гибридизовавшихся фрагментов — в качестве затравки,

**Микроинъекция (Microinjection)** Введение в изолированную эукариотическую клетку ДНК или других молекул с помощью тонкой иглы.

**Мини-сателлитная ДНК человека (Human minisatellite DNA)** Некодирующая ДНК человека, обычно состоящая, содержащая tandemные повторы коротких (длиной 9—40 п.н.) сегментов.

**Миссенс-мутация (Missense mutation)** Мутация, в результате которой кодон, кодирующий какую-либо аминокислоту, изменяется с образованием кодона, кодирующего другую аминокислоту,

**Мицелий (Mycelium)** Вегетативное тело гриба, состоящее из тонких ветвящихся нитей.

**Мишень (Target)** В самом широком смысле — биологический объект (ткань, молекула, клетка, микроорганизм), которая интересует исследователя.

**Мобилизация (Mobilization)** Передача от одной бактериальной клетки другой хромосомных генов либо неконъюгативных плазмид с участием конъюгативных плазмид.

**Мобильный генетический элемент (Transposable element)** Участок ДНК, способный изменить свое положение в геноме. Среди таких элементов различают IS-элементы и транспозоны.

**Молекулярная диагностика (Molecular diagnostic)** Включение молекулярно-биологическими методами патогенного микроорганизма, специфического вещества или измененной нуклеотидной последовательности, ответственных за то или иное заболевание.

**Моноклональные антитела (Monoclonal antibodies)** Однотипные антитела, строго специфичные в отношении одного эпитопа (антигенной детерминанты). Синтезируются гибридами — клеточными гибридами, полученными при слиянии нормальных антителообразующих клеток с миеломной опухолевой клеткой, способной к неограниченному росту. Некоторые мие-



ломные клетки синтезируют **моноклональные** тела **самостоятельно**.

**Мульч** и **ткуснан** генетическая карта, карта **тцен** **лен** **им** (Multipoint map, **multilocus linkage** map) Схема **изаимно**-го расположения **локусов** на хромосомах данного организма.

Мутагенез (**Mutagenesis**) Искусственное введение мутаций с помощью физических или химических агентов.

Мутант (**Mutant**) Организм, измененный в результате мутации; как правило, отличается от исходной формы (дикого типа).

Мутация (**Mutation**) Спонтанное или индуцированное **изменение структуры гена**.

Мутация со сдвигом рамки (**Fnunes**shift mutation) Мутация, связанная с появлением лишнего или с потерей одного или нескольких (в числе, не кратном трем) **нуклеотидов**. Приводит к нарушению **триплетного** кода и синтезу совершенно другого белка (если только синтез вообще не блокируется).

Нарушение комплемента **риости** (Mismatch, **mis pa** ring) Наличие в **двухцепочечной** молекуле **ДНК** одной или нескольких пар некомплементарных оснований.

Негативная регуляция (**Negative control**) Тип регуляции, при котором транскрипция гена подавляется **регуляторным** белком (репрессором); соответственно при инактивации белка-регулятора структурные гены остаются в активном состоянии.

Независимое распределение **генов** (**Independent assortment**) Распределение генов, локализованных на разных хромосомах, по гаплоидным гаметам с образованием всех возможных комбинаций генов. Лежит в основе **закона Менделя** о независимом распределении признаков.

Неметаболизир<sup>у</sup>ющие индукторы (**Gratuitous inducers**) Вещества, индуцирующие синтез **индуцибельных** ферментов, но не являющиеся для них субстратами, а потому остающиеся в исходном виде.

**Неомицин**фосфотрансфераза (**TSeuiiycinphnsphntransfcrase**) Фермент, **инактивирующий** антибиотики неомицин и **канамицин**. Часто используется как селективный маркер для трансгенных растений.

Неполная **пенетрантность** (**Incomplete penetrance**) Частичное проявление конкретного **аллеля** в группе родственных организмов. Характерна для большинства **мутантных аллелей**.

Непрерывная ферментация (**Continuous fermentation**) Культивирование микроорганизмов при непрерывном добавлении в биореактор среды и выведении такого же объема суспензии.

**Нозерн-блоттинг** (**Nothern Hotting**) Перенос молекул РНК, подвергнутых **электроферезу**, с геля на твердую подложку {**нитроцеллюлозный** или **найлоновый** фильтр} с последующей **ДНК—РНК-гибридизацией**,

«Нокаут» (**Knockout**) Направленное разрушение гена с помощью гомологичной рекомбинации.

**Нуклеаза SI** (**SI nudease**) Фермент, специфически деградирующий **одноцепочечную ДНК**,

**Нуклеозид** (**Nucteoside**) **Пуриновое** или **пиримидиновое** азотистое основание, ковалентно связанное с **пятиуглеродным** сахаром (пентозой). Если сахаром является рибоза, то мы имеем дело с **рибонуклеозидом**, а если **дезоксирибоза**, то с **дезоксирибонуклеозидом**.

**Нуклеотид** (**Nudeotide**) **Нуклеозид**, к которому присоединена одна или более фосфатных групп; присоединение происходит по **5'-углеродному** атому сахарного кольца. **Нуклеозиды**, связанные с **рибозой**, называются **рибонуклеозидмонофосфатами** (**rNMP**), **рибонуклеозиддифосфатами** (**rNDP**) или **рибонуклеозидтрифосфатами** (**rNTP**). Для нуклеозидов, связанных с **дезоксирибозой**, соответствующие названия таковы: **дезоксирибонуклеозидмоно-**, **ди-** и **три фосфаты** (**dNMP, dNDP, dNTP**).

**Н-конец** (**N terminus**) Первая аминокислота (или несколько аминокислот) в белковой молекуле.

Обратная **транскриптаза** (**Reverse transcriptase**) РНК-зависимая **ДНК-полимераза**, использующая молекулу РНК в качестве матрицы для синтеза комплементарной цепи ДНК.

Обратная транскрипция—**и** **нравная ценная** реакция (**Reverse Ira r se ri ptin n—pol y me rase chain reaction**) Способ получения в **большом** количестве **кДНК**, **состоящий** из двух этапов. Вначале *in vitro* синтезируют **кДНК**, используя обратную **транскриптазу**, **мРНК** в качестве матрицы и **oligo(dT)** в качестве праймера. Затем **кДНК** **амплифицируют** с помощью полимеразной **цепной** реакции (**ПЦР**), используя два праймера: один комплементарен участку первой цепи **кДНК**, а второй — другой цепи, комплементарной первой,

**Одноцепочечный** разрыв (**Nick**) Разрыв **фосфод** и **эфирной** связи между соседними **нуклеотидами** в одной **цепи ДНК**.

Окрашивание по Грану (Gram stain) Метод окрашивания микробиологических препаратов, позволяющий идентифицировать две группы бактерий: грамположительные и грамотрицательные. Основан на различии биохимического состава мембран бактериальных клеток.

Олигонуклеотид, олигомер (Oligonucleotide) Короткий (6—10 нуклеотидов) сегмент одноцепочечной ДНК. Обычно получают химическим путем.

Онкоген (Oncogene) Ген, экспрессия которого приводит к неконтролируемой пролиферации (трансформации) клеток.

Оператор (Operator) Участок ДНК, непосредственно примыкающий к структурному гену и регулирующий его транскрипцию при участии репрессора или активатора,

Оперон (Operon) Участок ДНК, содержащий несколько структурных генов, транскрибируемых с образованием одной полицистронной мРНК.

Опнин (Opine) Продукт конденсации аминокислоты с кетокислотой и сахаром.

Оптимизация кодонов (Codon optimization) Модификация кодонов данного гена без изменения аминокислотной последовательности кодируемого им белка, направленная на то чтобы кодоны эффективно считывались хозяйским организмом,

Отжиг (Annealing) Процесс образования двухцепочечных молекул (ДНК—ДНК или ДНК—РНК) из одиночных полинуклеотидных комплементарных цепей.

Открытая рамка считывания (Open reading frame) Последовательность нуклеотидов, не содержащая терминирующих кодонов; кодирует полипептид или белок.

«Отпечаток пальцев» (DNA fingerprint) Набор рестрикционных фрагментов ДНК, характерный для данного индивидуума. Для получения «отпечатка» используют либо гель-электрофорез как таковой, либо в сочетании с ПЦР-амплификацией.

Отталкивание (Repulsion) Конфигурация, при которой два мутантных неаллельных гена находятся на разных хромосомах. Аналогично транс-конфигурации. См. также Сопряжение.

Пакующая клеточная линия (Packaging cell line) Клеточная линия, созданная для продуцирования вирусных частиц, не содержащих инфекционной нуклеиновой кислоты.

Палиндром (Palindrome) Участок двух цепочечной молекулы ДНК, обе цепи которого обладают одинаковой нуклеотидной последовательностью при прочтении от 5'- к 3'- концу. Такие участки часто распознаются рестрицирующими эндонуклеазами типа II,

Параспоровый кристалл (Paraspore crystal) Плотно упакованные молекулы токсина, синтезируемые *Bacillus thuringiensis* при образовании спор.

Пассивный иммунитет (Passive immunity) Форма иммунитета, возникающая при введении в организм сыворотки, содержащей антитела, выработанные другим организмом в результате активной иммунизации. Наблюдается также у новорожденных,

Патогенез-зависимый промотор (Pathogenesis-related promoter) Промотор растительных генов, активизируемый при инфицировании растения патогенами.

Пенетрантность (Penetrance) Частота проявления данного аллеля в группе родственных организмов. При полной пенетрантности наблюдается проявление аллеля у всех членов выборки.

Пептид (Peptide) Короткая цепочка аминокислот, соединенных пептидными связями,

Пептидил-тКК (Peptidyl-tRNA) Молекула тРНК с присоединенной к ней растущей полипептидной цепью.

Пептидная вакцина (Peptide vaccine) Короткая цепочка из аминокислот, индуцирующая образование антител к специфическому инфекционному агенту,

Пептидная связь (Peptide bond) Ковалентная связь между свободной карбоксильной группой при α-углеродном атоме одной аминокислоты и свободной карбоксильной группой при таком же атоме соседней аминокислоты в полипептидной цепи.

Первичная культура (Primary culture) Культура клеток или тканей, взятых непосредственно от организма.

Первичный транскрипт (Primary transcript) Молекула РНК, транскрибированная с нуклеотидной структурного гена и не подвергшаяся процессингу (т.е. содержащая все экзоны и интроны).

Первое антитело (Primary antibody) Антитело, связывающееся с молекулой-мишенью при проведении иммунологического анализа (например, с помощью метода ELISA).

Периодическая ферментация (Batch fermentation) Культивирование микроорганизмов в течение ограничен-

ного интервала времени. Свежую среду инокулируют посевным материалом и проводят культивирование в непрерывном режиме, не добавляя новых порций среды и не удаляя продуктов, пока процесс не завершится сам собой.

Периодическая ферментация с добавлением субстрата (Fed-Batch fermentation) Культивирование микроорганизмов в течение ограниченного интервала времени с периодическим добавлением субстрата и сбором продукта только по завершении процесса,

Периплазматическое пространство (Periplasmic space) Пространство между плазматической мембраной бактериальной клетки и наружной мембраной или клеточной стенкой,

Пиримидины (Pyrimidines) Один из двух типов азотистых оснований, входящих в состав нуклеиновых кислот, к пиримидинам относятся тимин, цитгаин и урацил. Второй тип оснований — пурины; к ним относятся аденин и гуанин.

Пироген (Pyrogen) Вещество, продуцируемое бактериями и вызывающее повышение температуры у человека.

Плазмида (Plasmid) Внехромосомный генетический элемент, способный к длительному автономному существованию и репликации. Обычно это двухцепочечная кольцевая ДНК длиной 1—200 т.п.н.

Плазмид-помощник (Helper plasmid) Плазмида, выполняющая функции другой плазмиды в той же клетке. Некоторые плазмиды-помощники способствуют переносу неконъюгативных плазмид из донорной клетки в реципиентную.

2 мкм-плазмида (2  $\mu$ m plasmid) Существовавшая в природных условиях двухцепочечная кольцевая плазмида длиной 6318 п.н., обнаруженная в ядре *Saccharomyces cerevisiae*. На ее основе получены многие плазмидные векторы для дрожжевых клеток.

Плазмидная несовместимость (Plasmid incompatibility) Механизм регуляции числа копий плазмид одного типа в бактериальной клетке. Обеспечивает невозможность внутриклеточного сосуществования плазмид, принадлежащих к одной группе совместимости.

Плазмидовирус (Plasmid virus) Генетическая конструкция, которая содержит ретровирусные гены, находящиеся под контролем 5'-LTR-промотора, а также «терапевтический» ген и ген *env*, управляемые цитомегаловирусным промотором.

Пластид (Hastid) Органелла растительных клеток (например, хлоропласт). Многие пластиды имеют собственный геном.

Подвид (Subspecies) Группа в пределах вида, обладающая признаками, не характерными для остальной части членов популяции данного вида.

Позитивная регуляция (Positive control) Тип регуляции, при котором регулируемый ген транскрибируется только в присутствии белка-активатора.

Позитивно-негативный отбор (Positive-negative selection) Методика, при которой одновременно происходит отбор клеток, несущих вставку в специфическом хромосомном сайте (позитивный отбор), и «отбраковка» клеток, несущих вставку в другом, неспецифическом сайте.

Позитивный отбор (Positive selection) Отбор клеток по наличию в них маркерного гена, благоприятствующего росту на селективной среде (например, среде с антибиотиком).

Позиционное картирование (Positional gene cloning) Одна из стратегий идентификации гена заболевания в отсутствие данных о продукте этого гена и каких-либо генов-кандидатов. В подобных случаях сначала определяют хромосомную локализацию (позицию) гена. Затем получают геномные клоны, охватывающие картированный сайт (используя соответствующие маркеры), идентифицируют и анализируют присутствующие в них экзоны. Используя целый ряд методов (идентификация GC-островков, улавливание экзонов, секвенирование, компьютерный анализ и т.д.), определяют, какой именно ген ответствен за данное заболевание.

Позиционно-кандидатное картирование (Positional-candidate gene cloning) Одна из стратегий идентификации гена заболевания, когда данные о продукте этого гена отсутствуют, но ген картирован в том же хромосомном районе, что и уже идентифицированные гены и EST. Сначала анализируют современные генетические и транскрипционные карты, с тем чтобы выявить кодирующие последовательности (гены, внутригенные EST), находящиеся в этом районе, затем с помощью мутационного анализа или какими-либо другими методами выявляют экзоны, связанные с данным заболеванием.

Полиадеинирование (Polyadenylation) Ферментативное присоединение остатков аденина к 3'-концу молекулы эукариотической мРНК. Этот богатый аденином 3'-конец называется poly(A)-хвостом.

Поливалентная вакцина (Multivalent vaccine) Вакцина, дающая иммунный ответ на несколько инфекционных агентов или на разные **эпитопы** одной молекулы.

Поликетидсинтаза (Polyketide synthase) Фермент, участвующий в биосинтезе поликетидных антибиотиков.

Поликетидные антибиотики (Polyketide antibiotics) Класс антибиотиков, которые образуются в результате последовательной ферментативной конденсации карбоновых кислот (ацетата, пропионата и т.д.).

Полилинкер (Polylinker) Короткий участок ДНК, содержащий несколько уникальных сайтов узнавания для **эндонуклеаз**; в эти сайты встраивают чужеродную ДНК (осуществляют клонирование).

Молимеразная цепная реакция, ПЦР (Polymerase chain reaction) Метод амплификации специфического ее г-мента ДНК с помощью термостабильной ДНК-полимеразы с использованием олигонуклеотидных ДНК-зондов, комплементарных последовательностям противоположных цепей ДНК, фланкирующим амплифицируемый сегмент. Процесс состоит из серии циклически повторяющихся реакций: денатурации ДНК, отжига зондов, синтеза ДНК,

Полиморфизм длины рестриктаз (ионных фрагментов, ПДРФ) (Restriction fragment length polymorphism; KFLP) Вариативность длины фрагментов ДНК, образующихся при ее расщеплении рестриктазами. Обусловлена мутационным изменением сайтов рестрикции или появлением новых сайтов. Обнаруживается при разделении фрагментов с помощью **гель-электрофореза**.

Полиморфизм коротких tandemных повторов, STRP (Short tandem repeat polymorphism) Вариативность блоков из tandemных ди-, три- или **тетрануклеотидных** повторяющихся элементов по числу этих элементов при частоте встречаемости блоков в большой популяции не менее 1%. STRP-локусы выявляют с помощью **гель-электрофореза** после проведения ПЦР с использованием **праймеров**, комплементарных уникальным последовательностям, фланкирующим данный **локус**.

Полиморфный сайт (Polymorphic site) Участок хромосомы, представленный в популяции более чем одним вариантом и встречающийся с частотой не менее 1%.

Полинуклеотид (Polynucleotide) Линейный полимер, состоящий из 20 и более **нуклеотидов**, соединенных друг с другом **фосфодиэфирными** связями. Полинуклеотидами являются, например, молекулы ДНК и РНК.

Полипептид (Polypeptide) Линейный полимер, состоящий из аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями. Полипептидом является, например, белковая молекула.

Полицистронная мРНК (Multigene RNA, polysitronic message) Молекула **мРНК**, кодирующая более одного белка. Образуется при транскрипции двух или более соседних генов, входящих в состав одного **оперона**.

Полиэдрин (Folybedrin) Белок капсида бакуловирусов; накапливается в больших количествах в ядрах пораженных клеток насекомых.

Полное сцепление (Complete linkage) Совместное наследование двух или более соседних генных **шжусин** и хромосоме. Проявляется отсутствием рекомбинаций между ними и стабильным попаданием в одну гамету при митозе.

Посттрансляционные модификации (Posttranslational modifications) Изменение структуры белковых молекул после завершения их синтеза рибосомами. К таким модификациям относятся: **фосфорилирование**, **гликозилирование**, окисление **цистеина**, отщепление сигнальных последовательностей и т.д.

«Правый» элемент оперона (Downstream) Условное название участка, расположенного после сайта инициации транскрипции, в направлении 3' от него.

Праймер (Primer) Короткий олигонуклеотид, который **гибридуется** с матрицей и служит затравкой при ее копировании.

Предыдущий ген (Immediate-early gene) Фаговый ген, транскрибируемый сразу же после заражения клеток. Его продукт необходим для транскрипции других генов бактериофага — так называемых **задержанноранних** и поздних,

«Прогулка по хромосоме» (Chromosome walking) Метод идентификации **нуклеотидных** последовательностей, фланкирующих известные гены, для которых имеются **олигонуклеотидные** зонды. Фланкирующие последовательности используются затем в качестве зондов для идентификации прилегающих к ним последовательностей, и т.д.

Проект «Геном человека» (Human Genome Project) Международная программа, целью которой является построение генетической и физической карт генома человека и определение полной **нуклеотидной** последовательности ДНК.

**Прокариоты (Procaryotes)** Организмы, у которых нет ограниченных мембранами ядра и оргanelл. К прокариотам относятся все бактерии.

**Промотор (Promoter)** Участок молекулы ДНК, с которым связывается РНК-полимераза, что сопровождается инициацией транскрипции соответствующих генов. Обычно находится перед 5'-концом регулируемого гена.

**Протеиназы, протеолитические ферменты (Protease)** Ферменты, расщепляющие пептидные связи в белковых молекулах.

**Протеолиз (Proteolysis)** Ферментативное расщепление белков.

**Протопласт (Protoplast)** Бактериальная, дрожжевая или растительная клетка, стенка которой разрушена ферментативным или химическим путем.

**Профаг (Prophage)** ДНКбактериофага, интегрированная в геном бактериальной клетки-хозяина и реплицирующаяся вместе с ней.

**Процессинг (Processing)** Совокупность процессов образования зрелых молекул РНК и белков в клетке. Включает ряд последовательных расщеплений молекулы-предшественника эндонуклеазой или протеиназами.

**Прочитывание терминатора, сквозное прочитывание (Readthrough)** «Проскакивание» транскрипции через специфический терминатор. Аналогичный термин используется и в отношении трансляции.

**«Прыжки по хромосоме» (Chromosome jumping)** Один из вариантов метода «прогулки по хромосоме», характеризующийся тем, что в результате мутации маркерный ген, использующийся для скрининга, перемещается (прыгает), что позволяет выявить новые сцепленные с ним гены.

**Психрифилы (Psychrophile)** Микроорганизмы, способные расти при температуре 0—5 °С.

**Пурины (Purine)** Один из двух типов азотистых осн и пани и, входящих в состав нуклеиновых кислот; к пуринам относятся аденин и гуанин. Второй тип оснований — пиримидины; к ним относятся тимин, урацил и цитозин.

**Psaidommas** широко распространенная грамотрицательная бактерия. Многие ее виды, обитающие в почве, продуцируют пигмент, флуоресцирующий в УФ-свете.

**Рамка считывания (Reading frame)** Один из трех возможных способов считывания нуклеотидной последо-

вательности в виде триплетов. Открытая рамка считывания не содержит терминирующих колонов и может транслироваться в белок.

**Расстояние на генетической карте (Map distance)** Расстояние между двумя генами, определяемое по частоте рекомбинаций на анализируемом участке. За единицу картирования принимают расстояние между генами, вероятность рекомбинации между которыми равна 1% (одной сантиморганиде).

**Реактор с механическим перемешиванием (Stirred tank fermenter)** Биореактор, в котором для равномерного распределения газа по всему объему используются мешалки.

**Регуляторный белок (Regulatory protein)** Белок, «включающий» или «выключающий» транскрипцию.

**Рекомбинантная ДНК (KecotblanlB1чA)** Молекула ДНК, полученная объединением in vitro разнородных, вместе нигде в природу не существующих, фрагментов ДНК.

**Рекомбинантная плазмида (Recombinant plasmid)** Плазмида, измененная методами генной инженерии. Состоит из участков разных плазмид либо содержит сегменты ДНК других организмов.

**Рекомбинантный белок (Recombinant protein)** Белок, кодируемый клонированной рекомбинантной ДНК.

**Ренатурация (Renaturation)** Воссоединение цепей нативной ДНК, разошедшихся при денатурации.

**Репликативная форма, РФ (Replfcative form)** Промежуточная форма двухцепочечной вирусной нуклеиновой кислоты, служащая матрицей для синтеза ДНК и РНК. Представляет собой релаксированное (открытое) кольцо.

**Репликация (Replication, reduplication)** Процесс самовоспроизведения (синтеза) ДНК.

**Репликация по типу катящегося кольца (Rolling circle model)** Процесс репликации кольцевых молекул ДНК с образованием конкатемерной дуплексной ДНК (ДНК, состоящей из нескольких tandemно повторяющихся единиц генома).

**Репрессия (Repression)** Один из двух альтернативных (наряду с индукцией) механизмов регуляции генов. Состоит в подавлении транскрипции или трансляции путем связывания белка-репрессора с оператором.

**Репрессор (Repressor)** Белок, связывающийся с оператором или промотором данного гена и блокирующий связывание с этими элементами РНК-полимеразы.



**Рестриктаза**, **рестрицирующая эндонуклеаза** (Restriction endonuclease) Бактериальный фермент, расщепляющий **двухцепочечную** молекулу ДНК в специфических сайтах.

**Рестрикционная карта** (Restriction map) Диаграмма расположения на молекуле ДНК сайтов узнавания **рестриктазами**.

**Ретровирусы** (Retroviruses) Группа РНК-содержащих вирусов, содержащих обратную **транскриптазу**; синтезированная на РНК-матрице **двухцепочечная** ДНК может **встраиваться** в хромосому **инфицированной** этим вирусом клетки.

**Рецессивный аллель (ген)** [Recessive allele (gene)] Аллель, кодирующий признак, который проявляется только у особей, несущих этот аллель в гомозиготном состоянии.

**Рибоза** (ribose) **Пятиуглеродный** моносахарид. Входит в состав РНК.

**Рибозим** (Ribozyme) Молекула РНК, обладающая ферментативной активностью.

**Рибонуклеиновая кислота, РНК** (Ribonucleic acid, RNA) Нуклеиновая кислота, состоящая из **рибонуклеотидов**, у которых сахаром является рибоза, а одним из **пиримидинов** — **урацил** (вместо тимина),

**Рибосома** (Ribosome) Клеточная органелла, **рибонуклеопротеидная** частица, при участии которой осуществляется синтез белка (трансляция). Состоит из двух субчастиц, большой и малой.

**Рибосомная РНК, рРНК** (Ribosomal RNA, rRNA) РНК, **входящая в состав рибосом**.

**Гибулозо 1,5 бисфосфат-карбоксилаза** (RuBisCo bisphosphate carboxylase) Наиболее распространенный фермент, присутствующий в тканях всех зеленых растений и ответственный за связывание диоксида углерода на начальном этапе фотосинтеза.

**Ризосфера** (Rhizosphere) Слой почвы, непосредственно примыкающий к корням растений и характеризующийся повышенным содержанием микроорганизмов.

**РНК-полимераза** (RNA polymerase, RNA synthetase) Фермент, осуществляющий синтез РНК из **рибонуклеозидтрифосфатов**. Матрицей может служить ДНК или РНК, соответствующие **РНК-полимеразы** называют ДНК- или РНК-зависимыми.

**Рес А** Бактериальный белок, участвующий в рекомбинации и репарации ДНК,

**Rhizobium** Вездесущие бактерии, обитающие в корнях растений или в примыкающем к ним слое почвы.

**Сайт встраивания (клонирования)** (Cloning site) Специфический участок векторной молекулы, к который встраивают фрагмент чужеродной ДНК. Очень часто это уникальный сайт рестрикции.

**Сайт рестрикции** (Restriction site) **Нуклеотидная** последовательность в молекуле ДНК, узнаваемая **рестриктазой**. Обычно представляет собой короткий палиндром.

**Сайт-специфический мутагенез** (Site-specific mutagenesis) Внесение in vitro мутации в конкретный сайт клонированной последовательности. Позволяет идентифицировать функциональные участки в молекулах белков и получать белки с заранее заданными свойствами. Иногда называется **олигонуклеотид-направленным мутагенезом**.

**Самореплицирующийся элемент** (Self-replicating element) В нехромосомная молекула нуклеиновой кислоты, способная к независимой от хромосомной ДНК (автономной) репликации. Примером такого элемента служит **плазмида**,

**Сантиморганида, сМ** (Centimorgan) Единица измерения **расстояния** на генетической карте. 1 сМ соответствует расстоянию между генами, **рекомбинация** между которыми происходит с частотой 1%. Для хромосом человека 1 сМ равна примерно  $10^6$  п.н. Эта единица была введена Т.Морганом, когда он проводил эксперименты по изучению генетического сцепления у *Drosophila*.

**Саузери-блоттинг** (Southern blotting) Обнаружение специфических **нуклеотидных** последовательностей путем переноса денатурированных молекул ДНК, подвергнутых **электрофорезу**, с **агарозного** геля на **нитроцеллюлозный** или **наилонный** фильтр за счет капиллярного **эффекта** и **гибридизации** с меченым зондом, комплементарным искомым последовательности.

**Секвенирующий гель** (Sequencing gel) Длинная пластина **полиакриламидного** геля, позволяющая проводить **электрофоретическое** разделение олиго- и **полинуклеотидов**, различающихся подлинне всего на 1 **нуклеотид**.

**Секреция** (Secretion) Выведение веществ из клетки во внешнюю среду.

**Селекция** (Selection) **и**, Наука о методах создания новых сортов культурных растений и пород животных.



2. **Отбор** нужных организмов (клеток) в смешанной популяции.

**СЕРН** {Centre d'Etude de Polymorphisme Humain}

Центр по изучению полиморфизма у человека, находящийся в Париже. Располагает базой данных по генетической и молекулярно-генетической изменчивости популяций человека из большинства регионов земного шара.

**Серстип** (Serotype) Антигенная характеристика клетки (бактерии, клетки крови и т.д.), установленная на основе ее взаимодействия с антителами.

**Сибсы** (Sibses) Прямые потомки одних и тех же родителей (братья и/или сестры).

**Сигма-фактор** (Sigma factor) Бактериальный белок, обеспечивающий узнавание ДНК-полимеразой ее участка связывания в молекуле ДНК и инициацию транскрипции.

**Сигнал полиадетитрования** (Polyadenylation signal) Нуклеотидная последовательность, ответственная за окончание транскрипции и детерминирующая ферментативное присоединение остатков аденина к 3'-концу молекулы мРНК.

**Сигнальная последовательность** (Signal region, initiator element) Нуклеотидная последовательность в гене, служащая местом связывания белка (фактора транскрипции), который регулирует транскрипцию.

**Сигнальный пептид**, **сигнальная последовательность**, **лидерный пептид** (Signal peptide) N-концевой участок белковой молекулы длиной 15—30 аминокислот, обеспечивающий секрецию белка (перенос через мембрану). После секреции этот участок отщепляется от белковой молекулы.

**Сидерофор** (Siderophore) Низкомолекулярное вещество, эффективно связывающее железо. Синтезируется многими почвенными микроорганизмами, обеспечивая их железом, которое затем поставляется растениям, находящимся с этими микроорганизмами в симбиотических отношениях.

**Симбиоз** (Symbiosis) Сосуществование разных организмов, при котором каждое из них выполняет свои функции, в некоторых случаях взаимовыгодно.

**Синдром** (Syndrome) Совокупность ряда симптомов (признаков), характерных для данного заболевания.

**Система комплемента** (Complement cascade) Серия последовательных процессов активации комплемента

(сложного белкового комплекса сыворотки крови) и ферментативных реакций, запускаемая в ответ на образование комплекса антиген—антитело.

**Скрещивание** (Gross, crossing, mating) Однократное скрещивание генетически различающихся организмов.

**Скрининг** (Screening) Метод (или комплекс методов) идентификации единичного объекта (особи в популяции, клетки с искомыми свойствами, участка нуклеотидной последовательности и т.д.) путем перебора большого числа объектов.

**Соматическая клетка** (Somatic cell) Любая неполовая клетка многоклеточного организма.

**Сопряжение** (Coupling) Конфигурация, при которой две доминантные или две рецессивные формы двух разных генов находятся на одной хромосоме. Аналогично цис-конфигурации. См. также Оттачивание.

**Сплайсинг** (Splicing) Вырезание из предшественника мРНК интронов и ковалентное соединение экзонов с образованием зрелых молекул мРНК.

**Стационарное состояние** (Steady state) Состояние непрерывного процесса ферментации, при котором число клеток, удаляемых из ферментера и поступающих в него, одинаково.

**Стволовые клетки** (Stem cells) Митотически активные стволовые клетки, в результате деления которых происходит замещение погибших клеток в многоклеточном организме.

**Структурный ген** (Structural gene) Ген, кодирующий какой-либо белок.

**Ступенчатый разрыв** (Staggered cut) Разрезание двуцепочечной ДНК, при котором разрывы в комплементарных цепях располагаются не строго один напротив другого, а немного смещены.

**Субклонирование** (Subcloning) Перенос части уже клонированной молекулы ДНК в другой клонирующий вектор.

**Субстрат** (Substrate) Вещество, превращение которого катализируется специфическим ферментом.

**Субтиллизин** (Subtilisin) Протеолитический фермент, синтезируемый клетками *Bacillus subtilis*.

**Субъединичная вакцина** (Subunit vaccine) Вакцина, содержащая лишь отдельные компоненты патогенного микроорганизма.

Супрессия (**Supression**) Восстановление утраченной генетической функции, обусловленное подавлением эффекта одной мутации под действием второй.

Сцепление (**Linkage**) Взаимосвязанная передача от клетки к клетке генов, локализованных на одной хромосоме.

CG-островки, **HTF-островки** (CpG islands, HpaII tiny fragments) CG-богатые последовательности размером до нескольких сотен пар; фланкируют с 5'-конца многие транскрибируемые гены позвоночных и содержат сайты рестрикции для *HpaII*.

Cos-сайты (**Cos-sites**) Нуклеотидные последовательности на концах генома фага  $\lambda$ , необходимые для упаковки ДНК в фаговые частицы.

Тандемный повтор (**Tandem array**) Нуклеотидная последовательность, состоящая из нескольких одинаковых элементов, соединенных «голова-к-хвосту».

ТАТА-бокс (**TATA box**) Участок, располагающийся в промоторной области генов эукариот за 25 нуклеотидов до сайта инициации транскрипции, с которым связывается РНК-полимераза. Другое название — бокс Хогнеса. Аналогом у прокариот служит бокс Прибнова.

Т-ДНК (**T-DNA**) Фрагмент Ti-плазмиды, который встраивается в ядерную ДНК клетки-хозяина и стабильно наследуется ею. Вызывает образование опухоли у растений (корончатого галла).

Тельца включения (**Inclusion bodies**) Мелкие частицы из кристаллизовавшегося белка, образующегося в избыточном количестве в бактериальной клетке при заражении ее вирусом или при встраивании вирусного генома в ДНК клетки-хозяина. Их наличие свидетельствует о патологических изменениях в клетке.

Температура плавления,  $T_m$  (**Melting temperature**) Температура, при которой происходит разрыв половины водородных связей в полинуклеотидном дуплексе.

Терминальная трансфераза (**Terminal transferase**, **deoxynucleotidyl transferase**) Фермент, катализирующий присоединение к 3'-концу молекулы ДНК дезоксирибонуклеозидмонофосфатов. Используется для клонирования кДНК при участии комплементарных гомо поли и мерных «хвостов» [poly (A) — poly (T)].

Терминация (**Termination**) Остановка синтеза макромолекулы.

Терминирующий кодон (**Terminating codon**) Кодон, определяющий окончание (терминацию) синтеза полинуклеотидной цепи. Обычно это кодоны UAA, UAG и UGA,

Термофильный (**Thermophilic**) Характеризует теплолюбивые организмы, обычно растущие при температуре выше 50 °C. Некоторые термофильные организмы могут расти при температуре от 90 до 100°C.

Тимидилатсинтаза (**Thymidylate synthase**) Фермент, катализирующий метилирование урацила с превращением его в тимин.

Тимин, Т (**Thymine**) Пиримидиновое основание; одно из четырех азотистых оснований, входящих в состав ДНК.

Тканевый активатор плазминогена (**Tissue plasminogen activator**) Белок, участвующий в разрушении сгустков крови,

Т-клетки (**T cells**) Лимфоциты, играющие ключевую роль в иммунном ответе.

Т<sub>h</sub>-лимфоциты, Т-хеллеры (**T<sub>h</sub>-lymphocytes, helper cells**) Т-лимфоциты, играющие основную роль в узнавании чужеродного антигена.

Трансгенный организм (**Transgenic organism**) Организм, геном которого содержит чужеродный генетический материал, включенный методами генной инженерии.

Трансгению (**Transgenesis**) Введение чужеродного гена в растительную или животную клетку и его передача в ряду поколений,

Трансдукция (**Transduction**) Перенос генетического материала из одной бактериальной клетки в другую с помощью бактериофага.

Транскрипт (**Transcript**) Молекула РНК, синтезированная на специфической ДНК как на матрице.

Транскрипционное картирование (**Transcription mapping**) «Привязка» индивидуальных транскриптов (клином кДНК или экспрессированных последовательностей-мишеней) к хромосомным районам с помощью метода флуоресцентной гибридизации in situ, ИЦР и т.д.

Транскрипция (**Transcription**) Процесс синтеза РНК, катализируемый РНК-полимеразой, в котором в качестве матрицы используется одна из цепей ДНК.

Транслокация (**Translocation**) 1. Хромосомная перестройка, заключающаяся в переносе участка хромосомы в новое положение на той же или на другой хромосоме или в переносе целой хромосомы на другую хромосому. 2. Перемещение молекулы мРНК во время трансляции на один кодон.

Трансляция (Translation) Синтез полипептидной цепи рибосомой с использованием в качестве матрицы мРНК.

Трансляция in vitro (In vitro translation) Синтез белков, который осуществляется либо на очищенной ДНК с использованием бактериальных экстрактов, либо на мРНК с использованием экстрактов зародышей пшеницы или ретикулоцитов кролика. Экстракты содержат рибосомы, тРНК и белковые факторы; в реакционную смесь добавляют также АТР, GTP и аминокислоты.

Транспозаза (Transposase\*) Фермент, участвующий в транспозиции (перемещении из одного сайта в другой) некоторых мобильных генетических элементов.

Транспозиция (Transposition) Перемещение мобильного генетического элемента из одного локуса в другой.

Транспозоны (Transposons) Мобильные генетические элементы, несущие структурные гены, которые детерминируют функции, не связанные с самим процессом перемещения (например, гены устойчивости к антибиотикам).

Транспортная РНК, тРНК (Transfer RNA) Молекула РНК, выступающая в роли адаптера при специфическом переносе аминокислот к растущей полипептидной цепи в процессе трансляции.

Трансфекция (Transfection) Искусственное введение в эукариотические клетки изолированных молекул ДНК.

Трансформация (Transformation) 1. Перенос генетической информации в бактериальные клетки с участием плазмид или без них, но всегда — без участия вирусов; часто приводит к изменению фенотипа реципиентной клетки. 2. Превращение нормальных клеток животных в опухолевые.

Трихлоруксусная кислота, ТХУ (Trichloroacetic acid) Органическое соединение, часто используемое для осаждения белков и нуклеиновых кислот.

Тупой конец (Blunt end) Конец двухцепочечной молекулы ДНК, у которого не выступает ни одна из цепей.

Тi-плазмида (Ti plasmid) Плазмида почвенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens*, Т-участок которой способен включаться в их ядерную ДНК, что приводит к образованию опухолей.

Ту-элемент (Ty element) Мобильный генетический элемент дрожжей (от англ. Transposon of yeast).

Улавливание экзона (Exon trapping) Метод идентификации и клонирования экзонов из геномных клонов. Фрагменты геномной ДНК (1-6 т.п.н.) встраивают в полилинкер вектора, расположенный внутри интрона, фланкированного двумя мезонами. Полученным искусственным геном (экзон 1-интрон-экзон 2) трансфицируют клетки *E.coli*, в которых происходит его транскрипция и сплайсинг мРНК. Если в интроне присутствует экзон, то зрелая мРНК будет иметь большую длину, чем ожидалось. мРНК можно подвергнуть обратной транскрипции, провести ПЦР и выделить экзон.

Урацил, U (Uracil) Пиримидиновое основание; одно из четырех азотистых оснований, входящих в состав РНК.

Устойчивые клеточные линии (Established cell lines) Культуры клеток, способные к неограниченному росту in vitro. Получаются из перевиваемых клеточных культур, часть клеток которых приобретают селективные преимущества и обладают повышенной скоростью роста.

Участки, определяющие комплементарность, CDR (Complementary-determining regions) Гипервариабельные области вариабельных участков легкой и тяжелой цепей антитела, образующие антигенные сайты связывающие центры молекулы антитела.

Фактор транскрипции (Transcription factor) Белок, помогающий РНК-полимеразе пройти все этапы транскрипции и обеспечивающий избирательность этого процесса.

Фенилкетонурия (Phenylketonuria) Наследственное заболевание, характеризующееся нарушением миелинизации нервных волокон, снижением количества меланинов, судорогами, умственной отсталостью и т.д. Обусловлено нарушением обмена фенилаланина на вследствие дефицита фенилаланин-гидроксилазы. Наследуется по аутосомно-рецессивному типу.

Фенотип (Phenotype) Совокупность всех признаков особи, формирующаяся в процессе взаимодействия ее генотипа и внешней среды.

Феночно-имическое смешивание (Phenotypic mixing, pseudotyping) Процесс упаковки генетического материала одного штамма вируса в белковый капсид другого при смешанной инфекции.

Ферментация (Fermentation) В промышленной микробиологии — крупномасштабное культивирование микроорганизмов в специальных емкостях (ферментерах, биореакторах).

Ферментный **иммуносорбентный анализ**, E LIS A (Enzyme-linked Immunosorbent assay) Метод обнаружения специфических молекул в образце. Образец фиксируют на твердой подложке и добавляют антитело, специфичное к маркерной молекуле (первое антитело). Несвязавшиеся молекулы первого антитела смывают и добавляют второе антитело, специфически связывающееся с первым. Ко второму антителу присоединен фермент, превращающий неокрашенный субстрат в окрашенный продукт. Добавляют неокрашенный субстрат и проводят количественное определение окрашенного продукта.

**Ферредоксин** (Ferredoxin) Железосерный белок, переносчик электронов.

**Фертильность** (Fertility) Способность организмов принести жизнеспособное потомство.

**Физическая карта** (Physical map) Расположение генов на хромосоме, установленное с помощью различных методов (электронная микроскопия, секвенирование, рестрикционное картирование). Расстояние на такой карте измеряется в числе пар нуклеотидов.

**Фиксация азота** (Nitrogen fixation) Превращение атмосферного азота в аммиак. Катализируется ферментом нитрогеназой, обнаруженным только у прокариот,

**Фитогормон** (Phytohormone) Вещество, стимулирующее рост растений или другие процессы. Примеры: ауксин, цитокинин, этилен и т.д.

**Фитопатогены** (Phytopathogen) Организмы (грибы, бактерии, вирусы), вызывающие заболевания у растений.

**Флавоноиды** (Flavonoids) Фенольные соединения, синтезируемые растениями. Их структурную основу составляют два ароматических кольца, соединенных трехуглеродным мостиком. Отвечают за пигментацию растений, защищают их от грибов и насекомых.

**Флуоресцеин** (Fluorescein) Флуоресцирующий краситель, часто использующийся в качестве метки для антител. Позволяет визуализировать антитела после их связывания с антигеном.

**Флуорофор** (Fluorophore) Химическая группа, ответственная за флуоресценцию данного соединения,

**Фосфодиэфирная связь** (Phosphodiester bond) Связь между фосфатными группами при 3'- и 5'-углеродных атомах соседних нуклеотидов одной полинуклеотидной цепи.

**Фотосинтез** (Photosynthesis) Процесс превращения клетками высших растений энергии видимого света в энергию химических связей, сопровождаемый образованием органических соединений и кислорода из диоксида углерода и воды.

**Фрагмент Климова** (Kk-miv fragment) Более крупный из двух фрагментов ДНК-полимеразы I *E.coli*, образующийся при ее протеолитическом расщеплении. Сохраняет полимеразную активность в направлении 5'→3' и экзонуклеазную - в направлении 3'→5'. Используется, в частности, при секвенировании ДНК.

**Фрагментация ДНК** (Shearing) Разрыв молекул ДНК под действием гидродинамических сил (например, при пропускании раствора ДНК через иглу шприца). Гидродинамические силы в растворе возникают в результате скольжения одного слоя жидкости относительно другого.

**Функциональное картирование** (Functional cloning) Идентификация гена исходя из известной аминокислотной последовательности его продукта.

**Футпринтинг** (Footprinting) Метод идентификации участков ДНК, специфически связывающихся с белками. В его основе лежит защита ДНК в местах контакта с белком от эндонуклеазного расщепления.

**Хемилюминесценция** (Chemiluminescence) Испускание света в ходе химической реакции.

**Химера** (Chimera) Организм, включающий клетки, •1к;ши и органы ратных органичен.

**Хитиназа** (Chitinase) Фермент, синтезируемый растениями при заражении патогенными грибами; гидролизует хитин клеточной стенки грибов. Хитиназу синтезируют и некоторые бактерии.

**Холофермент** (Holoenzyme) Молекула фермента, включающая все необходимые для функционирования субъединицы и кофакторы.

**Хромогенный субстрат** (Chromogenic substrate) Вещество, приобретающее определенную окраску после расщепления специфическим ферментом.

**Хромосома** {Chromosome) Структура, основу которой составляет конденсированная молекула ДНК; носитель генетической информации. Способна к воспроизведению с сохранением структурно-функциональной индивидуальности в ряду поколений. У эукариот находится в ядре клетки, у прокариот — непосредственно в цитоплазме.

**Хромосомный сайт интеграции** (Chromosomal integration site) Место в хромосоме, куда может встроиться чужеродная ДНК, часто без всяких последствий для организма-хозяина.

**Х-сцепленный ген** (X linked) Ген, локализованный исключительно на X-хромосоме.

**Целлюлоза** (Cellulose) Высокомолекулярный линейный полисахарид, состоящий из остатков β-D-глюкозы, соединенных (1,4)-связями. Участвует в образовании структурного скелета растительных клеток.

**Целлюлосома** (Cellulosome) Многокомпонентный белковый агрегат, присутствующий в клетках некоторых целлюлолитических микроорганизмов и содержащий все ферменты, обеспечивающие полное расщепление целлюлозы.

**Центрифуги** рн ванне в градиенте плотности сахарозы (Sucrose density gradient centrifugation) Метод разделения макромолекул по форме и размеру, основанный на различии их коэффициентов седиментации.

**Циклический АМР, сАМР** (Cyclic AMP) Циклический аденозинмонофосфат, соединение, участвующее во многих регуляторных процессах.

«Цинковые пальцы» (Zinc fingers) ДНК-связывающие домены, которые включают по два цистеиновых остатка и один гистидиновый. Эти аминокислоты взаимодействуют с ионом цинка, а участок полипептидной цепи между ними образует петлю в форме «пальца».

**Цистрон** (Cistron) Генетическая единица, эквивалентная гену и кодирующая отдельный белок.

**Цитозин**, С (Cytosine) Одно из четырех азотистых оснований, входящее в состав ДНК и РНК.

**Цитокинины** (Cytokinins) Растительные гормоны, индуцирующие деление клеток.

**Частота аллеля** (Allelic frequency) Отношение встречаемости одного из аллелей данного локуса к сумме встречаемостей всех аллелей у достаточно большого числа индивидуумов в данной популяции.

**Частота использования кодона** (Codon usage) Средняя частота использования кодона данным организмом, полученная для большой выборки структурных генов.

**Частота рекомбинации**, рекомбинационный индекс (Recombination frequency, recombination index) Число рекомбинантов (или рекомбинантных хромосом) по отношению к общему числу потомков (или хромосом).

**Частота трансформации** (Transformation frequency) Доля клеток в клеточной популяции, получивших чужеродную ДНК; выражается числом трансформантов к общему числу клеток.

**Челночный вектор** (Shuttle vector) Плазмидная ДНК, способная реплицироваться в клетках двух разных типов (например, в *E. coli* и клетках дрожжей).

**Шанна—Дальгарно** последовательность, сайт связывания рибосомы (Shine—Dalgarno sequence, ribosome-binding site) Нуклеотидная последовательность на 5'-конце мРНК (обычно AGGAGG), спаривающаяся с комплементарной последовательностью РНК-компонента (рРНК) малой субчастицы рибосомы.

**Штамм** (Strain) Культура генетически однородных микроорганизмов.

**Экзогенная ДНК** (Exogenous DNA) ДНК, выделенная из организма-донора и встроенная в вектор или хромосомную ДНК организма-хозяина. Называется также чужеродной (Foreign) и гетерологичной (Heterologous) ДНК.

**Экзон** (Exon) Участок гена, входящий в состав первичного транскрипта, который остается в нем после процессинга (вырезания интронов). Вместе с другими экзонами образует зрелую мРНК.

**Экзонуклеаза III** (Exonuclease III) Экзонуклеаза *E. coli*, отщепляющая нуклеотиды с 3'-концов двухцепочечной ДНК.

**Экзополисахарид** (Exopolysaccharide) Высокополимерное соединение, состоящее из остатков сахаров и секретируемое в окружающую среду некоторыми микроорганизмами.

**Экспрессивность** (Expressivity) Степень фенотипического выражения наследственного признака, кодируемого данным аллелем. Различают постоянную экспрессивность (в отсутствие изменчивости признака) и переменную.

**Экспрессирующий вектор** (Expressing vector) Плазмидный вектор, сконструированный таким образом, чтобы клонированный ген экспрессировался только в определенной фазе клеточного цикла и только в течение определенного времени. Для этого в плазмиду встраивают сильный регулируемый промотор.

**Экспрессия** (Expression) Транскрипция и трансляция гена.

**Электропорация** (Electroporation) Образование пор в клеточных мембранах под действием электрического тока. Через эти поры в клетки проникает чужеродная ДНК.



**Электрофорез (Electrophoresis)** Метод разделения заряженных молекул (ДНК, РНК или белков), основанный на разной скорости их перемещении в электрическом поле.

**Элонгация (Klongation)** Последовательное присоединение мономеров к полимерной цепи.

**Эмбриональные стволовые клетки, ES-клетки (Embryonic stem cells)** Клетки из эмбрионов на стадии бластоцисты, способные к дифференцировке в любые типы клеток, в том числе и в клетки зародышевой линии, при введении в другой эмбрион на стадии бластоцисты.

**Эндонуклеаза (Endonuclease)** Фермент, гидролизующий внутренние фосфодиэфирные связи и расщепляющий молекулы ДНК и РНК. Эндонуклеазы участвуют в рекомбинации, репарации и рестрикции; в последнем случае называются рестриктазами (рестрицирующими эндонуклеазами).

**Эндотоксин (Endotoxin)** Токсин, не выделяемый клеткой в окружающую среду, а входящий в состав клеточной стенки; многие эндотоксины вырабатываются грамотрицательными бактериями и вызывают воспаление.

**Энтеротоксин (Enterotoxin)** Бактериальный белок, который, попадая в кишечник, вызывает диарею.

**Энхансер (Enhancer)** Специфический участок ДНК, многократно увеличивающий уровень транскрипции генов, расположенных на той же молекуле ДНК.

**Эпитоп, антигенная детерминанта (Epitope, antigenk determinant)** Часть молекулы антигена, взаимодействующая с антигеном связывающим центром антител или Т-клеточного рецептора.

**Эрлифтный биореактор (Airlift fermenter)** Цилиндрический биореактор, в котором перемешивание осуществляется потоком газа, подаваемого снизу.

**Этилен (Ethylene)** Газ, действующий как растительный гормон. Способствует созреванию плодов, сохранению цветков, прорастанию семян, образованию корней; участвует в ответе растения на стрессовые воздействия.

**Эукариоты (Eukaryotes)** Организмы, у которых: 1) имеется ядро, где содержатся хромосомы; 2) в цитоплазме присутствуют различные органеллы — митохондрии, хлоропласты и т.д. К эукариотам относятся животные, растения, грибы, некоторые водоросли,

«Эффект свидетеля» (Bystander effect) Уничтожение немодифицированных опухолевых клеток цитотоксичным продуктом, синтезируемым соседними генетически трансформированными клетками.

**Эффективность трансформации (Transformation efficiency)** Число клеток, получивших чужеродную ДНК, отнесенное к количеству трансформирующей ДНК. Выражается числом трансформантов на 1 мкг ДНК.

**Эффектор (Effector)** Небольшая молекула, связывающаяся с репрессором или ферментом и приводящая к их ингибированию или активации.

**Эффекторные клетки (Effector cells)** Клетки иммунной системы, разрушающие антигены.

**Ядерное клонирование (Nuclear cloning)** Получение живого организма из безъядерной яйцеклетки с вживленным диплоидным соматическим ядром.



# Предметный указатель<sup>1)</sup>

Авидин 190, 191р  
Авторские разработки 533  
Атропин 376, 376р  
Агроцин 323  
Адаптеры 86, 86р  
— синтетические  
ориентирован-  
ные 118  
- Яо1иН1-Лта1 86, 86р  
Адгезивный белок, синтез  
268-270, 269р  
Аденин 29-30р, 30  
Аденовирусы 242  
— векторные системы 494—  
498,  
495р  
Аденозиндезаминаза 484т, 485,  
486т, 489-491  
Адренокортикотропный гормон  
201т  
Активатор 42, 44—45  
- плазминогена 213—214, 214р  
— тканевого плазминогена  
(tPA)  
174, 175т, 205-20&Г, 536-537  
Актиномидеты, продуцирование ан-  
тибиотиков 261-262, 263-264р  
Актиноридин 259-260, 261т,  
262-264  
Алании, применение 256т  
Аллели 442  
Альгинат-лиаза 209-211, 210р  
оxАмилаза 69, 124, 125т, 168т,  
288, 290  
— из *B. stearothermophilus* 290  
*Lactobacillus amylovorus* 294  
— производство с помощью  
*Bacillus subtilis* 290  
β-Амилаза 288

Амилоза 286, 287р  
Амилоид 430  
Амилопектин 268, 287р  
Аминоацилаза 168т  
Аминоацил-тРНК, истощение пула  
127  
Аминокислоты, добавление в  
корм скоту 203  
— обозначения одно- и  
трехбук-  
венные 34, 34т  
— получение в  
промышленных  
масштабах 255-257  
— применение в различных  
отрас-  
лях промышленности 255,  
256т  
— структура 34, 34р  
7-аминоцефалоспоровая кисло-  
та (7ACA) 265, 266р  
1-аминоциклопропан-1-карбокси-  
латдезаминаза 326—327,  
327р  
1-аминоциклопропан-1-карбоно-  
вая кислота (АЦК) 405-406,  
405р  
Ангиопластика, уменьшение час-  
тоты повторных стенозов 507  
Анемия Фанкони 486т  
Антагонист рецептора интерлей-  
ки на- 1 486т  
Антибиотики, выделение из  
*Streptomyces* 257—258  
— изохроманхиновые  
259, 261т,  
262р  
— клонирование генов их  
биосин-  
теза 259, 260р  
— новые, синтез 259, 261т,  
262р

- поликетидные 260—263,  
263-264р  
— выделение из актиномицетов  
261-263, 263-264р  
— синтез 261, 263р  
— промышленное  
производство  
257-265, 266р  
— синтез бактериями для подавле-  
ния фитопатогенов 322—323,  
323т  
- у *Pseudomonas cepacia* 323  
Антигемофильный фактор 206т  
«Антигенный» олигонуклеотид  
504  
Антикодон 38, 38р  
«Антисмысловая» РНК 396-398  
----синтез in vivo 504-506  
«Антисмысловые» олигонуклеоти-  
ды 504, 506-508  
— введение их в липосомы  
506-507  
- как лекарственные средства  
506-508, 507р  
— лечение вирусных инфекций  
и малярии 507  
— устойчивые к нуклеазам 506,  
507р  
Антитела, антигенсвязывающий  
сайт 211  
— вариабельные области 211  
— комплементарность к антигену  
211, 215-217, 216р, 218р  
— константные области  
211, 429,  
430р  
- легкицепи 211, 212р, 429, 430р  
— моноклональные 200—  
221, 221р

<sup>1)</sup> Буквы **т** и **р** означают, что термин встречается соответственно в таблице и на рисунке

- мышцы и человека 215—218, 216-218р
- производство с помощью *E. coli* 218-222, 219-221р
- связывание с антигенами 211
- синтез в трансгенных растениях 412
- структура и функции 211, 212р
- тяжелые цепи 211, 212р, 429, 44р
- Fab-фрагмент 211, 212р
- Fc-фрагмент 211
- Fv-фрагмент 211
- химерные (гибридные) 215-218, 216-218р
- шарнирные домены 429, 430р
- Антитрипсин 205т, 435т, 484т
- Антитромбиновый аптамер 508
- Антифризные белки 325—326
- Антоцианины, биосинтез в растениях 406, 407р
- Антранилат 277р
- Антранилатсинтаза 256—257, 257р
- Антрацен 277р
- Апотирозиназа 268
- Аптамер 508
- антиромбиновый 508
- Арабиногалактаны 295
- Аргинин, применение 257т
- Арилоксифеноксипропионаты 401т
- Ароматические соединения, деградация микроорганизмами 277-278р
- Артрит 486т
- Асиломарская конференция 526
- Л-аскорбиновая кислота, синтез 250-252, 251-253р, 265
- Аспарагин 170, 170т
- Аспарагиновая кислота, применение 256т
- Аишртокиназа 408, 409р
- Ауксины 326-327, 327р, 375р, 376
- Аутосомно-доминантный тип наследования 442, 443р
- Аутосомно-рецессивный тип наследования 442, 443р
- Аффинная метка 149
- хроматография на никель-агарозе 149
- Ацетальдегид 280р
- Ацетил-CoA 179р
- Ацетолактатсинтаза 129р, 130, 382т
- Ацетосирингон 374, 374р
- АЦК-дезаминаза 406
- Бакмиды 147-149, 148р
- Бактериальная искусственная хромосома (BAC) 76
- Бактерии, вакцины против них 242
- выращивание в анаэробных условиях 26
- аэробных условиях 26
- грамотрицательные 111, 111т
- как системы доставки антигенов 242-243
- конъюгация 77
- мутантные, появление новых генотипов в смешанной культуре PL 26
- потребность в кислороде 26—27
- разрушение клеточных стенок 365-366
- регуляция транскрипции 41-45, 43-44р
- рубца, синтез белков 302
- создание штаммов с новыми свойствами 281-285, 283р
- стимулирующие рост растений 306-328
- опосредованная стимуляция 306
- температура культивирования 25
- Бактериофаг fd 219
- M13 91-93, 93р
- ген белка рШ 116
- использование при мутагенезе 159-163, 160-Шр
- создание комбинаторных библиотек 219, 221р
- PI 76, 462, 464р
- T4, ДНК-лигаза 360-361, 361р
- синтез лизоцима в картофеле 402
- T7, промотор гена 10 107-108
- λ. вектор 218-220, 220р
- ДНК, области L и R 73р, 74
- жизненный цикл 71-74
- космиды 74-76, 74р
- лизогения 72
- литический путь развития 71-72, 72р
- промотор рL 107-108, ПО
- скрининг библиотек 74
- Бактериоцин 126
- Бакуловирусы, введение в них чужеродных генов 343, 343т, 344р
- гомологичная рекомбинация между ДНК разных вирусов 342-343
- как инструмент биоконтроля 342-345, 342т
- линеаризация генома
- AcMN PV 145
- получение рекомбинантных белков 144—146, 144р
- структура 342
- транспортный вектор 144, 144р
- устойчивость к ним насекомых 342-343
- цикл развития 143—144
- экспрессирующие системы с использованием культур клеток насекомых 143-149
- Банк семей 459-460, 459р
- Барботажные колонны 357, 357р, 358-359
- Бацилла *Калимета—Герена* (BCG) 231
- Белки антифризные 325-326
- в клетках эукариот, образование дисульфидных связей 135, 140, 168-170
- гель-электрофорез 54
- гликозилирование 135
- запасные 408, 409р
- конформация 33-34
- масляных телец 413, 414р
- модификация аминокислот 135
- посттрансляционная 40, 135-136, 269, 269р
- у эукариот 27
- образование дисульфидных связей 135, 140
- очистка 114-115, 114т, 115р, 149
- получение с помощью эукариотических систем 135
- промышленный синтез при участии рекомбинантных микроорганизмов 349—368
- протеолитическое расщепление предшественников 135
- радиоавтография 65
- растворимость 114—115, 116р
- рекомбинантные, синтез в системе на основе бакуловирусов 145р

- секреция 126-127, 139
- **синтез** 29
- в **прокариотических** клетках **105-130, 108-109**
- служащие центрами образования
- ния кристаллов льда 325—326
- **солюбилизация** 367
- стабилизация 121-122, 121т, 16S
- «суицидальные» 62
- **сульфатирование** 135
- **термостабильность** 168—171
- **устойчивость к протеолитическому** расщеплению 170
- химерные 112—117
- **расщепление** 112, 113р
- «цинковые пальцы» 174, 191р
- чужеродные 112
- в семенах растений 413, 413р
- Белковые продукты, **получение** в больших количествах 108-111, 109т, 109р
- факторы инициации 38—39
- терм и нации 40
- Белок — активатор катаболизма (CAP) 107, 107р
- инициации транскрипции 312
- **мульти мерный** 151
- **наружной мембраны А** 116
- **-F** 116
- одноклеточных организмов
- (БОО) 301-303, 301т
- предшественник амилоида
- (APP) 431-432, 432р
- АВ (амилоид β, β-белок) 430
- **AGβgal**, промышленный синтез 362-363, 363р
- **CD4** 435т
- **NifA** 312-313
- **XylS** 282-283, 283-285р
- Бензол 277р
- Бетаин, накопление в растениях 404, 404р
- Бетаинал ьдегил-дегидрогеназа 404
- Библиотека ВАС 462—464р
- **РАС** 462, 464р
- **УАС** 462, 464р
- Биодеградация 275—303
- Биодеградируемые** пластмассы 270, 412
- Биоконтроль патогенных микроорганизмов 320-326, 323т
- Биомасса, утилизация 275—303
- Биополимеры 266-272, 412-413
- Биореакторы 110, 349-368
- контроль
- пенообразования 358
- концентрации
- растворенного кислорода 354
- перемешивания культуральной среды 355—356
- температуры 355—356, 35S
- рН в культуральной среде 355
- **концентрация растворенного** кислорода 354—356
- оптимизация культуральной среды 356
- **получение рекомбинантных E.coli** 255, 255р
- размеры, их ограничения 258
- с разбрызгивателями 358
- системы, предотвращающие утечку живых **рекомбинантных организмов** 356
- **стерилизация** 358
- Биотехнологическая** индустрия 20
- компания Genentech 15, 536
- Биотехнологический процесс, основные этапы 16, 17р, 366-367
- Биотин, нерадиоактивное мечение ДНК** 67
- Биотрансформация 17, 17р
- Бифенилдиоксигеназа 285, 286т
- Бластинидин S**—дезаминаза 382т
- Блок pod** 319
- Боковая цепь (R-группа) 34
- Боковой амиотрофический склероз 486т, 492-493
- Бокс САТ 46, 46р
- GC 46, 46р
- **-ТАТА** 42, 46, 46р
- Болезнь *Альцгеймера* 430—432
- **-ген** ApoE4 431
- *Гоше* 484т, 485
- *Крона* 507
- *Чагаса* 189-190
- Бомбардировка микрочастицами, введение ДНК в клетки растений 380-381, 380-381Т
- Бромелаин 168т
- Бромоксинил** 400—401, 401т
- Бром окс е инилнитрилаза** 382т
- Бычий лизоцим С2** 142-143, 143р
- Вакцина против *Rickettsia rickettsii* 242
- Вакцинация** лип со сниженным иммунным статусом 241
- Вакцины 227-243
- **аттенуированные** 234—239
- векторные 238—243
- бактерии как системы доставки антигенов 242—243
- ген *vp37* 240, 240р
- **противобактериальные** 242
- **противовирусные** 238—243, 329р, 242р
- **коинтегративные** 379, 379р
- на основе **Ti-плазмиды** 377-379, 379р
- генная иммунизация 233—236, 234р
- нового поколения 228
- пептидные 231-233, 232р, 233
- **прети вогерпетические** 230, 230р, 241
- **противолейшманиозные** 237-239, 238р
- **противосальмонеллезные** 236-237
- **противотуберкулезные** 231
- **противохолерные** 235—236, 243
- инактивации холерного вибриона 235-236, 237р
- **противоящурные** 230—233, 235
- разрабатываемые в настоящее время 229т
- **субъединичные** 228—236
- Валин, применение** 256т
- Векторы дицистронные** 153, 154р
- для клонирования крупных фрагментов ДНК 71-76
- структурных генов **эукариот** 70-71
- **клонлирующие** 54—65
- на основе **аденоассоциированных** вирусов 496, 496р
- **бактериофагах** 71—74, 72-74р
- **бакуловирусов** {бакмвды) 146-149, 148р
- **мышинных ретровирусов** 488-489, 488р, 490р. 491-494
- **промотор-направленные** 383
- **ретровирусные** 419, 420р, 488, 490р, 491-492

- **экспрессирующие** 108,135—136, 149-154
- Вестерн-блоттинг** 65
- Вигна китайская**, ингибитор трипсина 393,393р
- Вино**, усовершенствование производства 300-301
- Вирус ветряной оспы** 242
- гепатита В, экспрессия **поверх-**ностного антигена 141—143, 141-142р
- иммунодефицита человека (ВИЧ) 222-223, 222р
- коровьей оспы (ВКО), **исполь-**зование для создания вакцин 238-242
- множественного ядерного **поли-**эдра *Autographa californica* (AcMNPV) 144-145
- мозаики огурца, белковая **обо-**лочка 396-38, 397р
- цветной капусты, 358-**про-**мо-тор 384,384т
- простого герпеса (HSV) 230,230р
- ген **тимидинкина**зы 428, 486т, 503
- типа!** 230, 230р, 241, 496-501,499-500р
- табачной мозаики, Ω-последовательность 384
- **феноти**пическое смешивание 494
- SV40 140, 150
- Вирусные системы доставки генов** 493-501
- Вирусы**, белковая **обо**лочка 396-398, 396т, 397р
- животных, строение 230р
- Внутренний сайт связывания рибосом (IRES)** 153,154р
- Водород, метаболизм** 313—315, 314р, 314т
- **ассими**ляция бактериями 314-316, 315-316т
- β-Галактозидаза 121,121р, 382т
- Галактоманнаны** 295
- Галогенированные ароматические соединения** 276
- Ганцикловир** 503, 504р
- Гаплотип** 453
- Гаплотипирование семей** 453-454
- Гексагистидин** 149
- Гель-электрофорез** 54
- в агарозном геле 54
- полиакриламидном геле (ПААГ) 54
- маркеры с известными молекулярными массами 54
- Гемицеллюлоза**, структура 295
- Гемоглобин** 205т
- А, получение в системе *Hanxnuia polymorpha* 142
- человека, получение с помощью трансгенных свиней 435—436
- Гемофилия** 4К3-4К6, 496
- А 484т
- В 486т
- Ген бактериоцина** 126
- белка **III** бактериофага M13 116
- интерлейкина-2 241
- «суицидальный» («самоубийства») 62,503
- ptsG 129
- tpoD 323т
- vp37 240,240р
- xylS 282-283, 283-285Р
- Генетика человека**, социальные проблемы 478-479
- Генетическая гетерогенность** 442
- информация, право на **конфи-**денциальность 479
- расшифровка 33—38
- Генетически модифицированные организмы**, контролируемое высвобождение в окружающую среду 523—526
- патентование 533—541
- Генетические заболевания** 189, 195-201
- картирование локуса в хромосоме 456-459, 457р, 457т
- локализация гена на карте сцепления 460
- судороги новорожденных (BFNC) 456-459,457р, 457т
- тип наследования 442—444, 443р
- карты 444
- хромосом человека, генетический полиморфизм 450—453, 451т
- Генетический код** 40,4)т
- Генетическое консультирование** 478-479
- сцепление 444—451, 444—445р
- — у человека 446—448,447р
- **тести**рование 479
- Генная иммунотерапия** 503, 504р
- инженерия белков 158—159, 168-175, 169т, 171р, 173т, 174р, 175т
- опасность попадания модифицированных организмов в окружающую среду 517
- растений 373, 374
- применение 389—413
- терапия** 483—511
- вирусные системы доставки генов 493-501, 495-500р
- генное «ружье» 501
- клинические **испы**тания 486,486т
- коррекция генетических дефектов с помощью **олигонуклеотидов** 509-510, 509р
- невирусные системы доставки генов 498-503, 502р
- с использованием соматических клеток 485-487,526-529
- этические и социальные проблемы 527-530
- ex vivo 487-493, 487-491р
- in vivo 493,493р
- экспрессия, оптимизация 208, 209т
- Геном человека** 31т, 444, 446-451,467-468, 469р
- проект 477-479
- **физическое карти**рование 462-468,464-466р
- этические проблемы 478—479
- Геномная библиотека**, скрининг с помощью гибридизации 62, 63р, 64-70, 64р, 66р, 68р
- дактилоскопия, применение при установлении отцовства 193, 193р
- Геномные клоны**, идентификация методом «прогулки по хромосоме» 470,472р
- «прыжков» по хромосоме 470,470р
- Генотерапевтический препарат** р53 486т
- Ген-репортер** 105, 106р, 381-382, **Ше**
- Генспецифичный праймер (GSP)** 9У :02

- Гены 443-444  
 - азотфиксации {«Гены»} 310, **311**  
 — гидрогеназ 314-316, 316т  
 - независимое распределение 444,444р  
 - однонаправленное тандемное расположение 117—120, 118-119р  
 - патентование ДНК-последовательностей 537-539  
 - ретровирусные *env* 493-494  
 — синтез с помощью ПЦР 102, 100-101р  
 — случайная ориентация 117, 118р  
 - структурные 29, 35-36, 36р  
 — устойчивости к антибиотикам 128  
 — экспрессия в крупномасштабных системах 109—111, ПОр  
 - эукариотических системах 135-155  
 -m/ 310-313, 310р, 311-312р  
 -nod 316-320, 317р, 318т  
 - генетическая комплементация 310  
 Гепатит В, коровый белок (HbcAg) 232  
 Гербиолин 323  
 Гербициды 400-401, 460р  
 Гетерологичный зонд 67  
 Гибридизации дифференциальной метод 298-300,299р  
 Гибридизация ДНК 64р, 65  
 — диагностика 188—190  
 -зонды 65-67,188-194, 191-192р  
 - для скрининга геномных библиотек 67,68р  
 Гибридные антитела человека и мыши 215-218, 216-218р  
 -клетки 185, 187р, 460-462, 461т  
 Гибридов отбор 472-473,473р  
 Гидрогеназа 313—316, 314т  
 -гены 314-316, 316т  
 - генетическая комплементация 315  
 Гидроксинацетосирингон 374, 374р  
 Гидромицинофототрансфераза 382т  
 Гипераммониемия 484т  
 Гиперхолестеролемия 484т, 486т, 491  
 Гирудин 140  
 Гистидин, применение 256т  
 Гликозилирование белков 135  
 Глиобластома 486т  
 Глиома 5U6  
 Глифосфат 400,401т  
 Глицин, применение 256т  
 В-Глобин 146,485т  
 — человека 426  
 Глутамин, применение 256т  
 Глутаминовая кислота 255, 256т  
 Глутаминсинтетаза 150  
 Р-1,3-глюканаза 323,325,366,402  
 р-1,6-глюканаза 366  
 Глюкоамилаза 168т, 288-291, 288р  
 В-Глюкозидаза 69,297р, 298, 300  
 Глюкозоизомераза 168т, 291-292, 292т  
 - производство с помощью *£. сой* 291, 292т  
 -*B. brevis* 291,292т  
 - расщепление крахмала 288, 288р  
 Глюкозооксидаза 168т  
 Глюкозофототрансферазная система 129  
 Глнжощереброзидаза 266т, 484т  
 В-Глюкуронидаза 382, 382т  
 Глюкофизинат 401т  
 Гормон роста 205,206т, 439  
 -бычий 435,521-522  
 - человека (ГРЧ) 208,208р  
 - ювенильный личинок насекомых 343-344  
 Гормоны 47, 306, 436  
 Горох, синтез ингибитора α-амилазы 394,395р  
 Гранатицин 259-260, 261т, 262р  
 Гранулоитарный колониестимулирующий фактор 486т  
 Грибы 365,301-403  
 Гризеузин 263-264р  
 Группы крови системы АВО 448-451,448-449р, 450т  
 Гуанин 29, 29-30р  
 Гусеница листовертки-почкоедателя 335  
 Дегалогенирование 276  
 Дезоксирибоза 29-30,29-30р  
 Дезоксирибонуклеотиды 32, 32р  
 Дестрипирование 82, ЯЗр  
 2,4-диинсти;флогглюоцинал 323  
 Дигидрогранатицин 260, 261т, 262р  
 Дигидрогранатицин 259, 262р  
 Дигидрофлавонол-4-редуктаза 406  
 Дигидрофолатредуктаза (DHFR) 150,151р,382т  
 Дигидрофолатредуктаза—тимидилатсинтаза 238  
 Дидеоксинуклеотиды 89-90,90р  
 Диметокситретиловая группа (ДМТ) 81,82-83р  
 Динуклеотидные повторы 454-456, 454р  
 Дистрофии 485т  
 Дисульфидизомераза 140  
 Диуретический гормон 343т  
 3,5-дихлорбензоат 276т  
 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота 276т, 401т  
 Дмцистронные векторы 153, 154р  
 ДНК, антипараллельные цепи 31  
 — в прокариотической клетке 24-25,25р  
 — эукариотической клетке 24-25, 25р  
 — введение в клетки с помощью бомбардировки микрочастицами 380-381, 380-381т  
 — микроинъекций 420-422, 420-421р, 428  
 — с помощью фага M13 91-93,93р  
 —гель-электрофорез 54  
 —генная иммунизация 233—236, 234р  
 — двойная спираль 30—31, 30-31р, 45  
 — интеграция в хромосому хозяина 123-126, 124-125р  
 — метилирование 248—249  
 -однопочечная 92-93,93р  
 —основания азотистые 29  
 —радиоавтография 65  
 —рекомбинантные, контроль экспериментов 518—519  
 ----технология 50-78  
 -репликация 29,32-33,32-33р, 498,499р



- секвенирование 88-93
  - с помощью фага M13 91—93, 93р
- синтез с помощью ПЦР 94
- структура 29-33, 29-33р, 45
- химический синтез 80—88, 81-84р, 87р, 89
- Т-ДНК 374р, 376-377, 383
- ДНКза! 206т, 209
- ДНК-гибридизация 64р, 65, 66р, 68р, 187-195
- ДНК-диагностика 187-195
- ДНК-зонды 64-68, 64р, 66р, 68р, 187-189
- гетерологичные 67
- меченые 65, 66р, 190, 191р
- «молекулярный маяк» 191-192р
- нерадиоактивные методы детекции 190-194, 191-192р
- ДНК-лигаза 55, 57р, 61, 360-362
- ДНК-маркирующий сайт (STS) 461, 462-463, 464р
- ДНК-полимераза 27, 33, 32-33р, 94
- I 87, 88р
- T4 463, 465р
- Taq 94, 98
- ДНК-последовательности, патентование 437-539
- ДНК-синтезаторы 80, 85
- ДНК-фрагменты, патентование 537
- Доклинические испытания 486
- Дрожжевые системы экспрессии 140-143
  - хромосомы искусственные (YAC) 27, 137
- Дрожжи, протопласты 136
  - разрушение клеточной стенки 365
- трансформация 136
  - электропорация 136
- Дыня мускусная 406
- dUTP-пирофосфатаза 160
- Единица картирования 446
- 5-енол-пирувилкинимат-3-фосфатсинтаза 382т, 400
- Железо, сидерофоры 321-323
- Животные клетки, трансфекция 136
  - трансгенные, патентование 537
- Жирные кислоты 409, 41 От
- Заменители сахара 411
- Запасные белки 408, 409р
- Зонд гетерологичный 67
  - получение методом химического синтеза 67
- Зонды для скрининга геномных библиотек 67, 68р
- Изолейцин, применение 256т
- Изопенициллин N—синтептаза 259, 260р
- Изопентенилтрансфераза 375р, 376
- Имидазолиноны 401т
- Иммунизация 233-236, 234р, 434-435
  - in vivo 434—435
- Иммуноадгезин CD4 223
- Иммуноаффинная хроматография 114, 115р
- Иммунодиагностика 182—183, 183р
- Иммунологический скрининг 67, 69р
- Иммуносупрессоры 212
- Инвертаза 168т
- Ингибитор  $\alpha$ -амилазы обычной фасоли 394, 395р
  - сериновой протеиназы 394
  - трипсина вигны китайской 393, 393р
- Ингибиторы комплемента 436
  - протеиназ 393, 402
- Индиго, синтез 252-255, 254-255р
- Индолил-3-ацетамидгидролаза 375р, 376
- Индолил-3-уксусная кислота (ИУК) 326-327, 327р
- Инициаторная РНК 38, 38р
- Инициации комплекс 38р
- Инкапсулированные рекомбинантные клетки 492
- Инсектициды 331-345, 338т
- Инсулин 205-206Т
- Инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF-I) 205т, 367, 435, 504, 506
- Интеллектуальная собственность, права 533
- Интерлейкин-1, рецептор 205т
- Интерлейкин-2 114, 115р, 126, 206т, 435т, 486т
- ген 343
- Интерлейкин-3 208, 209т
- Интерлейкины 205т
- Интерферон 215
  - как лекарственный препарат 205-206Т
  - секреция 127
  - уровень экспрессии гена 118
- а 207
- Эк<sup>2</sup><\*т
- γ 206т
- і,о 206т
- Интерфероны 170, 171р, 204-207, 206т
  - гибридные 207-208, 207р
- Интрон 36, 37р, 150
- Искусственная хромосома человека (НАС) 501
- Искусственные дрожжевые хромосомы (YAC) 27, 137
- несущие гены антител человека 429
- Кальцитонин 205т
- Камфара, деградация микроорганизмами 276т, 281р, 289
- Кандидатное картирование 469, 469р
- Канола 408-411, 409р, 410т
- Карта сцепления 444
- Картирование генов 444—446, 444 445р
  - кандидатное 469, 469р
  - мультилокусное хромосом человека 459-462, 461т
  - позиционное 469—477, 470-475р
  - позицией но-кандидатное 476-477, 477р
  - с использованием радиационных гибридов 460—462, 461т
  - сайтов рестрикции 55, 55р
  - транскрипционное, клопы кДНК 465-468, 477р
  - функциональное 468-470, 468р
  - X-хромосомы человека 446-448, 447р
- Картофель, ккеление гена ингибитора II протеиназы в растения риса 393-394, 394р



- защита от насекомых-  
вредите-  
лей с помощью токсина  
*Bacillus thuringiensis* 392
- поражение бактерией  
*Erwinia*  
*carotovora* 402
- синтез лизоцима  
бактериофага  
Т4 402
- Карцинома предстательной железы  
506
- Каталаза 168т
- Катехол 277р, 279-280р
- Катехол-2, 3-диоксигеназа  
282-283, 285р
- Каучук, микробиологический  
синтез 270
- 2-кето-Б-гулоновая кислота (2-  
KLГ) 250-252, 251-253р, 265
- Кислород растворенный 127
- Клетки животные, трансфекция  
136
- инкапсулированные  
рекомби-  
нальные 492
- компетентные 76
- миеломные 185
- млекопитающих, культивирова-  
ние 27-28
- трансфицированные 150
- экспрессирующие векторы  
149-154, 150-151Р
- системы 151—154,  
152-154р
- насекомых, выделение  
рекомби-  
нантного белка 149
- разрушение при  
крупномас-  
штабном производстве белков  
365-367
- G-418 150
- Клеточные линии 28,63
- устойчивые 28
- стенки грибов,  
разрушение 365
- дрожжевых клеток, разруше-  
ние 365
- прокариот 24-25, 25р
- эукариот 24—25, 25р
- Клещевой токсин 343т
- Клинические испытания 486
- Клонирование генов 123—126,  
124-125р
- заболеваний человека  
467-478
- с помощью переноса ядра  
426,  
427р
- человека 529-530
- Клонированные гены, экспрессия  
у прокариот 105—130
- Клонирование векторы 54—65
- Клонированный вектор системы  
слияния ПЗр
- Клубеньки, образование 306,  
316-320
- Кодоны 40—41
- частота использования  
41,41т,  
121,129
- Коза трансгенная 435—436
- Комитет по рекомбинантным нук-  
леиновым кислотам 526
- Коммерческие секреты 533
- Компетентные клетки 76
- Комплементарная ДНК (кДНК)  
70, 71р
- библиотека 70
- выделение интерферона  
204-207, 206т
- целлюлазных генов  
298-300, 299р
- Комплементарность азотистых  
оснований нуклеиновых кис-  
лот 29-30, 29-30р, 32,  
32-33р, 45
- Компьютерная программа GRAIL  
476
- Консультативный комитет Нацио-  
нальных институтов здравоох-  
ранения США по рекомби-  
нантным ДНК (NIH-RAC)  
518-519, 523-524, 528
- Континги 444, 462-467, 464р
- на основе космидных, Р1  
- и λ-  
библиотек 463-467, 465р
- YAC-, BAC- и PAC-библио-  
тск 462-463, 464р
- Контроль :ia производством и по-  
треблением пищевых продук-  
тов и пищевых добавок  
519-522
- применения  
биотехнологи-  
ческих методов 517—531
- социальные и этические  
аспекты 517—531
- Конформационный полиморфизм  
одноцепочечной ДНК (SSCP)  
467-268, 468р
- Конъюгация бактериальных кле-  
ток 77
- Корепрессор 44, 44р
- Корм для скота 408
- Корни растений, защита от насе-  
комых с помощью трансген-  
ных бактерий 340
- Корончатый галл 323, 373-376,  
374р, 383
- Космиды 74-76, 74р, 319
- pLAFR1 322
- pLFR-5 74, 76
- Костный мозг 489, 490р
- Кофакторы металлические  
172-174, 173т
- Крахмал 287-294, 287-288р
- Кровь, заменитель 436
- пуповинная 491
- Крупномасштабное производство  
белков, разрушение клеток  
365-367
- Крупномасштабные системы фер-  
ментации 359—363
- Крупный рогатый скот, перенос  
ядер эмбриональных клеток  
426
- трансгенный 433—435, 434р
- Ксантановая слизь 266—268,  
267р, 267т
- Ксенобиотики, деградация с по-  
мощью микроорганизмов  
275-276, 276т, 277-280р
- Ксиланазы 169-170
- Ксиланы 295
- Ксилон 276т, 281р
- Ксилороксидаза 254
- Кукуруза 406
- Культивирование клеток растений  
28
- микроорганизмов  
совместное  
250, 252р
- E. COK 24-25
- Культуры с высокой плотностью  
356-357
- эукариотических клеток  
27—28
- Кэппирование 82, 84р
- Лактаза 168т
- Лактоферрин 435т
- Леггемоглобин 308
- Лейцин, применение 256т
- Лекарственные препараты, выде-  
ление кДНК интерферонов  
204-207, 206т
- интерфероны, получаемые  
методом генной инженерии  
207-208, 207р

- оптимизация генной экспрес-  
сии 208, 209т
- получение гормона роста че-  
ловека методом генной инже-  
нерии 208, 208р
- средства в неактивной  
форме 213, 213р
- микробиологическое произ-  
водство 204-224, 205т
- на основе нуклеиновых **кисл**ст  
504, 508-509
- получение с помощью моно-  
**клональных** антител  
204-205, 210-218
- против ВИЧ 222-223, 222р
- Лигнин, структура 294—296, 296р
- Лигноцеллюлоза 294-298, 296р
- Лигноцеллюлозный материал  
294, 294т
- бытовые отходы 294
- растительные отходы 294
- Лизин 256т, 408, 409р
- Лизогения 72
- Лизоцим 142-143, 143р, 168-169,  
169т, 365, 403
- Лимфотоксин 205т
- В-лимфоциты, продукция специ-  
фических антител 214
- Линкеры 85-86, 86р
- EcoE**Л 86, 86р
- Липаза 168т, 323
- Лшюлевая кислота 409, 410т
- Линоленовая кислота 409, 410г
- Липиды 408-411
- Липоплекс 501
- Липосомы 380т, 501
- Личинки комаров, использование  
против них микробных инсек-  
тицидов 340—341
- насекомых, ювенильный  
гормон 343-344
- Лод-балл (LOD) 447-450, 456
- Лосось трансгенный 438—439
- Л юцифераза бактериальная 382т
- светляка 382, 382т
- Малярия 188, 507
- Манназа 366
- Маннаны 295
- Маркерный пептид Flag 114
- Масло растительное 408—411
- Матричная РНК (мРНК) 29,  
35-36
- Медермидин 260, 26)т, 262р
- Медерродин 260, 261т, 262р
- Меланин 267-268
- Меланома 486т
- Метаболиты вторичные 352
- Металлотионеин II 382т
- Метилвиологен 404
- Метил-а-глюкозид 129
- Метилование ДНК 248-249
- Метионин, применение 256т
- Метионинсульфоксимин (МС К)  
150
- Метод дифференциальной гибри-  
дизации 298-300, 299р
- лигирования  
алигонуклеотидных  
зондов (ЛОЗ) 196-197
- микроинъекций ДНК  
420-422, 420-421р, 428
- на основе полиморфных  
ДНК-  
маркеров для амплификации  
случайных фрагментов (**DNA-**  
**RAPD**) 194-195, 194р
- полимеразной цепной  
реакции (ПЦР) 96
- ПЦР/ЛОЗ 196-201, 197р
- секвенирования ДНК 89—98
- случайных праймеров 65, 66р
- RACE** 98-102, 98-99р
- Метстрексат (MTX) 150
- Миеломные клетки 185
- Микроинъекции в генной инже-  
нерии растений 380т
- Микроорганизмы, деградирующие  
ксенобиотики 275—276, 276т,  
277-280р
- паразитические,  
идентифика-  
ция 181-182, 181т
- применяемые в сельском  
хозяй-  
стве 307-308, 314
- рост в условиях  
недостатка кис-  
лорода 122-123
- способные утилизировать  
не-  
сколько соединений 289
- фитопатогенные 306
- штаммы с дефицитом протеиназ  
122
- Микрохромосомы 501
- Минеральные вещества, поглоще-  
ние растениями 326
- Мини-сателлитные ДНК, геномная  
дактилоскопия 192—193
- Министерство сельского хозяйст-  
ва США 523-525
- Митохондрии, введение чужерод-  
ного белка 383
- Млекопитающие, культивирова-  
ние клеток 27-28
- Мобильные элементы (**DS-эле-**  
**менты**) 386, 386р
- Молекулярная биотехнология  
16-23, 19р
- биологические системы  
24-28, 27т
- история развития 15—19
- коммерциализация 19—  
20
- социальные аспекты 20—22
- генетика человека 442—481
- диагностика 181—218
- генетических заболеваний  
190.195-201
- метод ПЦР/ЛОЗ  
196-201, 197р
- методы иммунодиагностики  
182-183, 183р
- моноклональные антитела  
184-188
- мутации в разных сайтах  
од-  
ного гена 199-201, 200р
- чувствительность тестов 182
- Молоко без лактозы 434
- белковый состав у коров  
и овец  
419т
- содержание бычьего  
гормона  
роста 522
- трансгенных животных 419,  
432-433
- Молочная железа как «биореак-  
тор» 432-436, 435т
- Монеллин 411—412
- Моноклональные антитела  
184-188
- в диагностике заболеваний  
185-187, 187р
- идентификация гибридных  
кле-  
точных линий 185-187, 187р
- как терапевтические средства  
204-205, 210-218
- мышь ОКТЗ 212
- образование и отбор гибридных  
клеток 185-187
- профилактика отторжения  
трансплантированных органов  
212
- связывание с терапевтически-  
ми средствами 212—213,  
213-214р

- человека 214-215, 428-430
- Монослой клеточный 28
- Муковисцидоз 209-211, 432, 484т, 486т, 494, 501
- Мультилокусное картирование хромосом человека 459—462, 461т
- Мультимерные белки 151
- Мутагенез 159-163, 160-161р
  - с использованием плазмидной ДНК 162р, 163
  - ПЦР-амплификации 163-164р
  - случайный 163-168, 165-167р
  - Мутанты ые штаммы 17-19
  - Мутации 483
    - выявление в генах человека 467-468, 468р
    - коррекция с помощью химерных олигонуклеотидов 509-510, 509р
  - Мышечная дистрофия Дюшенна 485т
  - Мыши *seid* 215
  - Мышь, ген родопсина 425, 426р
    - трансгенная 419—430
    - введение ДНК микроинъекцией 420-422, 420-421р, 421т
    - идентификация 421
    - как модельная система 430
    - несущая ген пресенилина 1 432
    - патентование 538—539
      - перенос генов с помощью искусственного дрожжевого хромосом 428-430
      - получение с помощью искусственных дрожжевых хромосом 425
        - ретровирусных векторов " Ор
          - эмбриональных стволовых клеток 422—426, 423-425р
          - применение 430—433
          - синтез CFTR-белка 433, 433р
    - трансформация эмбрионов 428
  - Направленный мутагенез, методика 158-168
  - Насекомые, устойчивость к бакуловирусам 342-343
    - устойчивые к токсину *Bacillus thuringiensis* 334-335, 339, 392-393
    - ювенильный гормон личинок 343-344
  - Наследственные заболевания, клонирование генов человека 467-478, 468-477р
    - лечение с помощью генной терапии соматических клеток 485-487, 526-529
    - накопление дефектных генов в будущих поколениях 528
    - терапия 483-485, 484-485т
    - трансплантация костного мозга 489, 490р
  - Наследственный онихоартроз 448-450, 448-449р, 450т
  - Научные разработки, патентование 540-541, 540р
  - Нафталин, деградация микроорганизмами 276т, 277р, 281р, 289
  - Национальные институты здравоохранения США (NIH), регламентация экспериментов с рекомбинантными ДНК 518-519
  - Невирусные системы доставки генов 498-503, 502р
  - Неврологические заболевания 4%
  - Независимое распределение генов 444, 444р
  - Нейротропный фактор, вырабатываемый к мозге 205т
  - Неомици и 11фосфотрансфераза 382т
  - Неполное сцепление 445, 445р
  - Непрерывная культура 350, 351р, 353-355
  - Нитрилаза 401, 401т
  - Нитрогеназа 308—313
    - вспомогательные белки 309
    - железомолибденовый кофактор 308, 309р
    - компоненты 308-310, 309р
    - определение активности 308-309, 309р
  - Нозерн-блоттинг 65
  - Нопаин 376, 376р
  - Нопаинсинтаза 382т
  - Нуклеаза FokI 174, 174т
  - SI 70, 71р
  - Нуклеиновые кислоты, лекарственные средства на их основе 508-509
  - Нуклеотиды 29, 29р
  - Обезьяна, культура клеток почки 146
  - Обратная транскриптаза 70, 71р
  - Овца трансгенная 426, 427р, 435-436, 530
  - Однонаправленное тандемное расположение генов 117—121, 118-119р
  - Оксидаза D-аминокислот *Fusarium solani* 265
  - Октан 281р, 289
  - Октопин 376, 376р
  - Октопинсинтаза 382т, 383
  - Олеиновая кислота 409, 410т
  - Олезины 413, 413р
  - Олигонуклеотид антигенный 504
    - «антисмысловый» 504, 506—508
  - Олигонуклеотид-направленны и мутагенез с использованием ДНК фага M13 159-163, 160-161р, 165
    - плазмидной ДНК 162р, 163
  - Олигонуклеотидные линкеры, несущие сайты для протеиназ 112
    - праймеры 163—168, 165—166р
  - Олигонуклеотиды, используемые в качестве праймеров 86
    - однопочечные 86
    - получение линкеров 85, 86р
    - сборка гена 86—88, 87р
    - синтетические 189
    - химерные 509-510, 509р
    - химический синтез 80—88
  - Онкомышь 538—539
  - Оомицин 323
  - Оператор 42, 43р
  - Оперон 42, 43р
  - jeY/iLFiasMiinbipWWO 282. 283-285р
  - Опины 376, 376р
  - Оптимизация генной экспрессии 208, 209т
    - кодонов 86, 121
  - Органеллы 24-25, 25р
  - Орнитинтранскарбамилаза 484т

- Осахаривание низкомолекулярных полисахаридов 288,288р, 290
- Осмопротекторы 404
- Островки CpG 472
- Отбор гибридов 472—473,473р
- Отторжение органов 436
- Пакующая клеточная линия 489, 489р, 491-492
- Пальмитиновая кислота 409,410т
- Пал айн 168г
- Паразитические микроорганизмы, идентификация 181—182, 181т
- Параспиральный кристалл 332-333, 333р, 334, 336, 338
- Пары комплементарных оснований, образование 30—32, 30р, 32-33р, 45
- Патентная палата жалоб 535
- Патентование 280,289
- в различных странах 533—534, 536-537
- генетически модифицированных микроорганизмов 533-541
- ДНК-последовательностей 537-539
- и патентные законы, унификация 533-534,538
- изобретений, общие вопросы 534
- многоклеточных организмов 539
- трансгенных животных 534
- Патенты 533-541
- на продукты 535—536, 535т
- способы 535-536, 535т
- основные категории 535—536, 535т
- система выдачи 534—535
- Патогенез-зависимые промоторы 383
- Патогенез-связанные белки 402
- Пектиназа 168т
- Пенетрантность неполная 442
- Пенициллин 259,260р
- Пептидная связь 34, 34р, 39
- Пептидные вакцины 231-233, 232р
- антигенные детерминанты 232
- Пептидогликан-связанный липо-протеин (PAL) 116
- Первичные клеточные культуры 28
- Периодическая культура 351,351р, 353-354,356, 363, 363т
- Петунья 406
- Пиолотеорин 323
- Пирролнитрин 323
- Пируват 280р
- Пищевая ценность растений 407-411
- Пищевые добавки 519—523
- Плазмида CAM 276, 279
- NAN 276,279
- NAN7 252
- OCT 276,279
- pAgK84 323,324р
- pAVIO 111-112, 112р
- pBGC619 268р
- pHGC620.3 268р
- pBR322 58, 58р, 60, 284-285р
- гены устойчивости к агабиотикам 58
- pCP3 109,109т, 109р
- pET-векторов 108
- pШЗО3 259-260, 262р
- pKN402 109,109т
- pPLc2833 108,109т
- PRK290 111
- pVBHO 290
- pVC!9 60-62, 60р
- pWWO 282-285, 283р
- SAL 281
- Ti 374-376, 374р
- гены вирулентности (v//·) 373, 374f
- получение трансгенных растений томата 391
- регенерация нормальных растений 383
- синтез опинов 376—377,376р
- ауксина и цитокининов 375р, 376-377
- трансформация растений 373-377, 374-376р
- XYL 276,279
- Плазмиды 56—65
- биодegradация 276—282, 281р
- группы несовместимости 57
- двухплазмидная система 110,110р
- использование энергетических ресурсов клетки 123, 127-130, 128т
- как клонирующие векторы 57
- кодирующие ферменты процессов биодegradации 289
- конструирование 323, 324р
- конъюгати is ные свойства 77
- малокопийные 57,117,123.128
- 2 мкм 136
- многокопийные 57, 123
- мутагенез 162р, 163
- нестабильность 108
- получение 21
- размеры 57
- с узким спектром хозяев 57
- широким спектром хозяев 57
- сайт инициации репликации 57
- скрининг клеток, содержащих ДНК-мишень 60
- трансформация клетки-хозяина 58-60
- числокопий 57, 108, 113т, 117, 127, 128г
- утрата клетками 123,127
- *PSedomones* 276т
- Плазмовирус 493—494
- Пластмассы биодegradируемые 270,412
- Плоды, изменение вкусовых качеств 410-412
- созревание 405—406
- Плоскоклеточный рак головы и шеи 486г
- Повторы СА 454-455,454р
- Позитивно-негативная селекция 422,424р
- Позиционное картирование 469-477,470-475р
- Позиционно-кандидатное картирование 476—477,477р
- 11олип1лактуроназа 405
- Поликстидные антибиотики 260-263, 263-264Р
- Поликетидсинтаза 261—263, 263-264Р
- Поликлональные антитела 184
- Полимераза каучука 270
- Полимеразная цепная реакция (ПЦР) 27,88,94-103, 95-97р
- длинные матрицы 95—%, 95р
- использование флуоресцентной метки 190-191,192р
- короткие матрицы 96

- стадия денатурации 94
- Полимеры, производство с помощью трансгенных растений 412-413
- I (олионпрфшм длины респрикционных фрагментов (11ДРФ) 451-456, 452-453Р, 458
- **информационный**
- одноцепочечной ДНК (55СР) 467-468, 468р
- **коротких тангенных** повторов 454-456, 454-455р
- Полиовирус 242**
- Полипироксинапканаты, микробиологический синтез** 270-272, 272р
- Полифенолоксидаза 410—411, 411р
- Полиэдрин 143, 342
- Праймер генспецифичный (GSP) 49
- Пре-про-сс-фактор 139**
- Пресенилины 432**
- Прокариоты в молекулярной биотехнологии 24—25
- выделение прокариотических целлюлазных генов 296—300, 297р
- клеточные стенки 24—25, 25р
- репликация 33
- создание геномной библиотеки 62-63
- структурные особенности 24-25, 25р
- транскрипция 35, 35р, 41—45, 43-44р
- трансляция 38, 38р
- трансформация 76—77
- экспрессия клонированных генов 105-130
- электропорация 76—77
- Пролекарство 502-504, 504р**
- Пролин 256т**
- Промотор 43р, 46
- гена полиэдрина 144—146
- мутации, влияющие на его силу 120
- сила 120
- функция 35
- lac 105-108, 107р, 111, 111т
- OCUV5 108, 120
- tiirBE, coli 243
- Mm 111, 111т
- P<sub>m</sub> 282-283, 283-285Р
- SI 111, 111т
- tac 107, 108, 111, 111т, 120, 285
- Промотор-направленные векторы 383
- Промоторы, идентификация 105, 106р
- патогенез-зависимые 383
- растительные 382-385, 384т, 404
- регулируемые 105-108
- *Saccharomyces cerevisiae* 136
- ap 107т, 108, 110, ПОр, 120
- Промышленное производство микроорганизмов, повышение эффективности ферментации 354-357
- принципы выращивания бактериальных культур 350-356, 351р
- сбор клеток 363-365, 364р
- Промышленный биотехнологический процесс 17, 17р
- Протеиназы 168т
- биоконтроль болезней, вызывает мых фитогенными грибами 323-325
- хозяйской клетки 112
- Протеолитическое расщепление 122, 170**
- Протокафеохат 278-280р**
- Протоксин Bacillus thuringiensis 333р, 334-336**
- Протопласты 136, 256, 258р
- Профаг 72
- Прутин 301**
- Псевдобактерин 322, 322р
- Психрофилы 25, 281, 282т
- Птицы трансгенные 436—438, 437р
- Polу{A}-хвост 70
- Polу(3-гидроксимасляная кислота) 270, 413
- Рад 460
- Радиационные гибриды, панель (РГ-панель) 461-462
- Радиоавтография 65
- Разрушение клеток быстрым многократным замораживанием/оттаиванием 366
- гомогенизацией под давлением 366
- обработкой детергентами 365
- органическими растворителями 365
- ультразвуком 366
- щелочью 365
- с помощью осмотического шока 366
- устройства Mfcritfluidizer 366
- ферментов 365—366
- шаровой мельницы 366
- соударением 366
- Рак 486т, 503, 504р
- молочной железы 486т
- почки **486т**
- толстой и прямой кишки 486т, 503
- **яичников 486т**
- Растения, введение ДНК в клетки 380-381, 380-381т
- векторные системы на основе Ti-плазмиды 377-379, 379р
- генная инженерия 373-413
- защита от насекомых-вредителей 390, 390т
- повреждений рекомбинантными штаммами микроорганизмов 323-325, 323т
- изменение вкуса и внешнего вида плодов 410-412, 411р
- использование векторов на основе вирусов 380т
- **как биореакторы 412—413**
- окислительный стресс 403-404, 404р
- пищевая ценность 407—411
- поглощение минеральных веществ 326
- применение репортерных генов при трансформации 381-382, 382т
- производство антител 412
- промоторы, функционирующие лишь на определенной стадии развития 384
- противостоящие неблагоприятным воздействиям 403—406
- старению 403—406
- синтез хитиназы 402, 402р
- содержание аминокислот 408, 409р
- липидов 408-411
- стимуляция роста микроорганизмами 306



----- свобод ножи **вупи м** и бактериями 326-327, 327р  
 — транс **гены** безмаркерные 386-387, 386р  
 --- введение гена **холестеролоксидазы** 395  
 — несущие ген **токсина** *Ba<sub>duus</sub> ihunnguMsis* 334, 389-393, 390т, 525  
 — патентование 539  
 — полевые испытания 524—525  
 — трансформация **T<sub>+</sub>-плазминой** 373-377, 374-376р  
 — устойчивые к бактериям 401-403  
 - вирусам 395-400, 398-399Р  
 - гербицидам 400-402, 401т  
 — **глифосфату** 400, 401т  
 - грибам 401-403  
 — засухе и засолению 404, 404р  
 ----- насекомым-вредителям 389-396  
 — **фитогормоны** 306, 326  
 — экспрессия вирусных **генов**, кодирующих белки оболочки 396, 396т  
 - чужеродных **генов** 382-386, 384-385Т  
 — **электропорация** 380т  
 Растительное масло 408—411  
 Растительные клетки, введение в геном/(//)-генов 313  
 — культуры, метод ДНК-отпечатков 194, 194р  
 - промоторы 382-385, 384т, 404  
 Реакторы с механическим перемешиванием 357-358, 357р, 362-363, 362р  
 - **эрлифтные** 357, 357р, 358-360  
 Регуляторные элементы 46—47  
 2,5-ОКО-редуктаза 250-252, 252-253р  
 Релаксин 205т  
 Реннет 168т  
 Репликация ДНК 29, 32-33, 32-33р, 498, 499р  
 ---- по типу «катящегося кольца» 498, 499р  
 Репрессор 42—43, 43-44р, 107-108  
 - *cl* 108  
 - *lac* 107р, 108

Рестрицирующие эндонуклеазы 50-56  
 — гидролиз полинуклеотидных цепей с образованием липких концов 52р, 53  
 - клонирование генов 53  
 — образование липких концов под действием *EcoKI* 52р, 53  
 - определение рестрикционных сайтов 53, 53р, 61, 173-174  
 - расщепление ДНК с образованием липких концов 61  
 - сайты узнавания 53  
 - системы самозащиты от них у микроорганизмов 248  
 - типа II 50, 53  
 - *AvaI* 117-118, 119р  
 - *BamH* 53т, 54-55, 55р  
 - *E. coli* 50-53  
 - *EcoRI* 53-55, 53р, 55р, 61р  
 - *HaeIII* 53т  
 - *HinIII* 52р  
 - *HindIII* 58, 60  
 - *HpaI* 48, 53, 53т  
 - *AtoI* 53т  
 - *ftrt* 53р, 248, 249р  
 - *PvuII* 53р  
 - *Sau3A* 53т  
 Ретровирусные векторы 419, 420р  
 - гены *env* 493-494  
 Ретровирусы 488, 488р, 491-493  
 — жизненный цикл 488-489  
 - хелпер-независимые 492  
 Рецептор интерлейкина-1 205т  
 — липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) 484т, 486т, 491  
 Рибоза 30, 30р  
 Рибозимы 504, 508-509, 508р  
 — как лекарственные средства 508-509, 508р  
 Рибосомная РНК (рРНК) 35, 37  
 Рибосомы 38-42, 38-42р  
 - сайт связывания 119р, 120  
 - субъединицы 38  
 Рис, защита от насекомых-вредителей с помощью генов картофеля 393-394, 394р  
 РНК «антисмысловая» 396-398  
 — синтез *in vivo* 504, 505р  
 - вторичная структура 35, 35р  
 - гель-электрофорез 54  
 — радиоавтография 65  
 - «смысловая» (мРНК) 396-398

— структура 34  
 - типы 35  
 РНКазы 70, 71р  
 РНК-полимераза 36-36, 36р, 105-107  
 - II 46, 46р  
 мРНК и транскрипция 29, 35-38, 35-36р, 40-47, 43-46р  
 - трансляция 38-42, 38-42р, 119р, 120-121  
 - вторичная структура 119р, 120  
 - отделение от рРНК и тРНК 70  
 — сайт связывания рибосомы 119р, 120  
 — сплайсинг 36, 37р  
 — эукариотическая 70, 71р  
 Родамин 191, 198  
 Родословные, анализ 442, 443р  
 Рост клеток, накопление ацетата в среде 129  
 - микроорганизмов 128, 128г, 350-355, 351р  
 Рыбы трансгенные 438-439  
 Сайт интеграции 123-126, 124-125Р  
 Салат, синтез **монеллина** 411-412  
 Салицилат, деградация микроорганизмами 276т, 277р, 289  
 Сантиморгакида 446  
 Сантирэй 462  
 Саузерн-блоттинг 65, 472-473  
 Сахара, промышленное производство 287-294  
 Сбор клеток, фильтрация через мембрану 364-365, 364р  
 Свиная трансгенная 435-436  
 Связывание антиген—антитело 211  
 Секвенирование ДНК, **дидезокси-нуклеотидный** метод 89—91, 90-92р  
 — праймер-опосредованная прогулка («блуждающая, затравка») 93-96, 94р  
 Секреция белков 139  
 Селективные маркерные гены 150, 151р  
 Сельскохозяйственные культуры 407-411  
 Семена, аккумуляция чужеродных белков 413, 413р



**Серии 356т**

**Серповидно-клеточная анемия** 195, 196р, 485т

— скрининг для выявления носителей гена 195, 196р

**Сигма-фактор** 107, 336

**Сигнал-ные последовательности** 35

**Сигнальный пептид** 126—127, 140

**Сигналы-терминации транскрипции** 384

**Сидерофоры** 306, 326

— биоконтроль патогенных мик-

роорганизмов 321—323

— структура 322р

— у *Pseudomonas putida* 322

**Силос, получение** 294, 295р

**Синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД)**

222-223, 222р

— вакцинация лиц со сниженным иммунным статусом 241

— эозинофилии—миалгии (СЭМ)

521

**Синтаза дигидропикколиновой кислоты** 408, 409р

**Синтез генов** 86-89, 87р

--- ДНК, фоофрамидитный метод 80-85, 81-84р

— эффективность присоединения нуклеотидов 85, 85т, 86

**Сироп кукурузный с высоким содержанием фруктозы** 288

**Система двухплазмидная** 110, ИОР

— комплемента 211

— слияния, клонирующий вектор 113р

**Системы ДНК-диагностики** 187-195

— экспрессирующих дрожжевых

векторов 137-138, 138р

**Скрининг библиотек** 62—70, 64р, 69р

---- кДНК, специальные системы слияния 115-117, 117р

— на основе фага λ 74

- клеток, несущих гибридную плазмиду со вставкой 60

**Случайный мутагенез** 163-168, 165-167р

— с использованием аналогов нуклеотидов 166, 167р

**Смешанные культуры** 26

«Смысловая» РНК(мРНК) 496-3%

- супрессия (косупрессия) 406

**Созревание плодов** 405-406

- инициация экспрессии генов этиленом 405

**Солубилизация белков** 367

**Соматические клетки, лечение наследственных заболеваний**

485-487, 526-529

**О>мэтолиберин** 205т

**Соматомедин С** 2С5т

**Соматотропин** 206т

**Сорбитолдегидрогеназа** 251р

**Соя** 307-308, 408, 409р

**Сплайсинг** 36-37

- альтернативный 37р

**Среда ГАТ (гипоксантин, аминок-терин, тимин)** 185

**Старт-кодон** 38р, 120-121, 119р

**Стволовые клетки тоги потешные** 489

— эмбриональные 422-426, 423-425р

**Стеаратдесатураза Brassica** 410-411

**Стеариновая кислота** 410, 41 От

**Столбнячный токсин** 243

**Стоп-кодон** 40-42, 42р

**Стрептавидин** 129, 190, 191р

**Стрептомицинофосфотрансфераза** 382т

**Структурные гены** 29, 35—36, 36р

**Субтилизин** 172-174, 173т

**Субъединичные вакцины**

228-236

«Суицидальный» белок 62

— ген (ген «самоубийства») 62

**Сукцинат** 279р

**Сульфидрильные группы** 170, 171р

**Сульфониуреазы** 401т

**Супербацилла** 276, 289

**Супероксид-дисмутаза** 138—139, 139р, 404, 404р

**Сцепление неполное** 445, 445р

- полное 445, 445р

**Х-сцепленный тип наследования** 442, 443р

**Сыворотка как побочный продукт** 266-268, 257т, 300-303

**Сывороточный альбумин** 205т

**Сыры, производство** 520

**Сырье, исходная обработка как первый этап биотехнологического процесса** 17, 17р

**Сычужный фермент** 520

**Табак, синтез супероксид-дисмута-тазы** 404

- трансгенные растения 404

**β-Талассемия** 200, 510

**Тандемные повторы генов** 117, 118р

**Теломераза** 33

**Теломеры** 501

**Тельца включения** 114, 367

**Терапевтические средства, доставка к месту их действия** 212

---- связывание с моноклональными антителами 212-213, 213-214р

**Терапия генная** 483—511

**Термофилы** 25-27, 168

**Тетраценомицин** 263-264р

**Технология рекомбинантных ДНК** 15-16, 50-78

- распознавание реципиентах клеток ДНК-мишенью 56, 60

----- схема эксперимента 50, 51р

— сшивание липких концов

ДНК-лигазой Т4 55

— фрагментация ДНК рестрицирующими ферментами 53-55

— экспрессия клонированных генов 105-130, 135-155

**Тимидинкиназа** 428, 486т, 503-504

**Тимин** 29-30, 29-30р

**Типы наследования** 442-444, 443р

**Тиреотропный гормон** 205т

**Тирозил-тРНК-синтетаза**

171-172, 172т

**Тирозин** 256т, 269, 369р

**Тирозиназа** 268, 268р

**Товарные знаки** 533

**Токсин Bacillus thuringiensis, введение гена протоксина в хлоропластную ДНК** 392

— видоспецифичность 337-339, 338т

- использование **против** водных насекомых 340-341  
 — получение с помощью **циа-**но**бактерий** 340  
 ----- **применение** 333-334  
 — репликация гена в *E. coli* 337-338  
 --свойства 332, 332т  
 - клещевой 343т  
 - оспы 343, 343т  
 - скорпиона 343, 343т, 344, 344р  
 - столбнячный 243  
 Токсичные отходы, утилизация 275-276, 276т, 277-280р  
 Толуол 276т, 277р  
 Толуолдиоксигеназа 285, 286р  
 Томаты генетически трансформированные 405  
 - защита от насекомых-вредителей с помощью *Bacillus thuringiensis* 390т, 391-392, 391р, 391т  
 Точка **инициации** репликации (*on*) 33, 57, 136, 501  
 Трансгенные животные 418—439  
 ---- полевые испытания 525  
 — мыши, получение **иммуноглобули-**нов человека 215-216, 428-430  
 -птицы 436-438, 437р  
 - растения безмаркерные 386-387, 386р  
 - рыбы 438-439, 525  
 - цыплята 436-438, 437р  
 Трансгеноз 418  
 - крупного рогатого скота 433-434  
 Трансзеатин 376  
 Транскрипционное картирование, клоны **кДНК** 465-468, 477р  
 Транскрипция 29, 35-37, 35-36р  
 - инициация 35, 36р  
 - регуляция 41—47, 43—46р  
 - терминация 35, 36р  
 --- сигналы 384  
 Трансляция 29, 38-41, 38—42р  
 - инициация 38-39, 38-39р, 118-121  
 -ошибки 128  
 - терминация 38—42, 42р  
 —у прокариот 38, 38р  
 - эукариот 38, 39р  
 —экспрессирующие векторы 118-121, 119р, 121р  
 —элонгация 39-40, 40р  
 —эффективность 118-121, 119р  
 Трансмембранный белок, нарушения в котором приводит к мукосцидозу 432-433, 433р, 435т, 484т, 486т, 494, 501  
 Трансплантация органов 212, 436  
 — профилактика отторжения 212  
 Транспозон 111-112, 112р  
 Транспортная РНК (тРНК) 35, 37, 39-42р, 41  
 - инициаторная 38, 39р  
 Трансрибозилзеатин 376  
 Трансфекция 136, 150  
 Трансформация дрожжей 136  
 - прокариот 76—77  
 — обработка ледяным раствором  $\text{CaCl}_2$  76  
 - растений **Тi-плазмидой** 373-377, 374-376р  
 - хлоропластов 384-386, 385р  
 - эмбрионов мыши 428  
 - *Bacillus subtilis* 124-126, 125т, 125р  
 — *Corynebacterium glutamicum* 256  
 - *E. coli* 58-60, 76  
 - *Streptomyces* 257-258, 258р  
 Трансформированные клетки 50  
 Треонин 256т  
 Треонидегидратаза 382т  
 Триазины 401т  
 Триозофосфат-изомераза 170, 170т  
 Триптофан 252-255, 254р  
 - получение из *Corynebacterium glutamicum* 256-257, 256-257р  
 - применение 256т, 520  
 Триптофан - 2-моноокси геназа 375р, 376  
 Трихлорфеноксиуксусная кислота 401т  
 Трихлорэтилен 283, 285-286  
 Тромболитические препараты 213-214, 214р  
 Туберкулез 231  
 Тыква желтая яйцевидная 398, 398-399р  
 Тяжелый комбинированный иммунодефицит (SCID) 485, 484-485т, 491  
 Т-хелперы 222-223, 222р  
 Удельная скорость роста микроорганизмов 351-353  
 Удобрения бактериальные 307  
 — синтетические 307  
 Улавливание экзонов, метод 474-476, 474-475р  
 Ундецилпродигиозин 259, 259р  
 Управление по контролю за качеством пищевых продуктов, медикаментов и косметических средств США (FDA) 519-520, 528  
 Урацил 34  
 Урацил-М-гликозилаза 161, 161р  
 Урогастрон 205т  
 Урокиназа 205т, 435т  
 Утилизация биомассы 275—303  
 - токсичных отходов 275-276, 276т, 277-280р  
 Фагмида 116  
 Фаза отталкивания 446  
 - сцепления 446  
 Фазеолин 408  
 Фактор, активирующий макрофаги 205т  
 - некроза опухоли 205т, 486т  
 - освобождения (терминации) 40  
 - роста В-лимфоцитов 205  
 —из тромбоцитов 205т  
 - нервной ткани 205т  
 —эпидермиса 205т  
 - типа I множественной устойчивости к лекарственным препаратам 486т  
 - VIII системы свертывания крови 205т, 484т  
 - IX системы свертывания крови 205т, 435т, 486т, 4%  
 —Ха системы свертывания крови 112, 113р  
 -NodRin-1 320, 320р  
 -NRSF 47  
 - $\sigma^{70}$  323  
 Факторы, стимулирующие образование колоний 205т  
 -транскрипции 46-47  
 Фармацевтические компании, участие в развитии молекулярной биотехнологии 20, 204-232  
 - препараты, получение из молока трансгенных животных 419

- Фарминг** 419  
 Фасоль, ген **фазеолина** 408  
 — синтез **ингибитора α-амилазы** 394  
**Феназин** 323  
**Фенантрин** 277р  
**Фенилаланин** 256т  
 Фенилаланин**гидроксилаза** 484т  
**Фенилкетонурия** 483, **484—485т**  
 Фе **н** **пк** **с** и **карбо** новые кислоты 401т  
 Фенол 277р  
**Фенотип** 442  
**Фенотипическое** смешивание 494  
 Фермент, обуславливающий ус-  
 тойчивость **к** **блеомицину** 382т  
**Ферментация** (культивирование) 17, **17р**, **250**, **252р**, **294**, **295р**  
 — крупномасштабные системы 359-362, 361 р  
 — промышленная как многоступенчатый процесс 349—351, 350р  
 Ферментный иммуно**сорбентный** анализ (ELISA) 182-184, 183р  
 Ферменты 168т, 323-325  
 — активатор тканевого **плазмино-** **гена** 174, **175т**  
 — изменение **специфичности** 173-174, 174-175Т  
 — как лекарственные препараты 209-211, **210р**  
 — повышение **стабильности** 174-175, 175т  
 — ферментативной **активности** 171-172, **172т**  
 — потребность в **металлических кофакторах** 172-174, 173т  
**Фибриноген** 213, 214р  
**Физические** карты 444  
**Физическое** картирование генома человека 462—468, 464-466р  
 Фиксация азота 306-308, **308т**, 313, **326**  
**Фильтрация** с параллельным потоком клеточной суспензии 364р, 365  
**Фитогормоны** 306, 326  
**Фитолакка** американская, синтез трех противовирусных белков 400  
 Фицин 168т  
**Флавоноиды** 318—319  
**Флуоресцеин** 191, 198  
**Формилметионин** 38, 38р  
**Фосфинотрицинацетилтрансфераза** 382т  
**Фосфиттриэфирная** связь 82, 84р  
**Фосфодиэфирная** связь 30, 30р  
**Фосфорамидит** 82, **82р**  
**Фосфорорганические соединения** 331  
 Фрагмент **Кленоеа** 67, 70, 71р  
 Фрагменты ДНК, удлинение концов 463-464, 465р  
 Френолицин 263—264р  
 Фруктоза, повышение эффективности производства 289—292, 291-292Т  
 — промышленное производство из крахмала 287-289, 288р  
 Функциональное картирование 468-470, **468р**  
**Fv-иммунотоксин** 221, **221р**  
 Халконсинтазы 406—407, **407р**  
 Химерные антитела 216—218, **216р**, **218р**  
**-белки** 112-117  
 — включение в поверхностные структуры 115-117, 117р  
 --- использование в качестве вакцин 117  
 — очистка 114т, **115р**  
 — повышение **эффективности секреции** 126  
 — получение антител 113—114, 114т  
 — применение 113—115, **ПЗр**, 114т  
 — растворимость 114, 115, 116р  
 — содержащие **тиоредоксин** 114-115, 116р  
 — удаление лишних аминокислотных последовательностей 112, **ПЗр**  
 — олигонуклеотиды 509—510, 509р  
 Химерный белок CD4—экзотоксин A *Pseudomonas* 223, 223р  
 — **трехкомпонентный** 113, **ПЗр**  
**Химозин** 520  
**Хитиназа** 323-325, **366**  
 — ген *Serratia ntarcescens* 325  
 Хлопок, защита от насекомых-вредителей с помощью *B. tfiuringinfixis* 190т  
**Хлорам** фе **н** и **колапстил** трансфераза 382т  
**3-хлорбензоат**, деградация микроорганизмами 276т  
**Хлоропласты**, введение чужеродного белка 383  
 — чужеродных генов в **хлоропластную** ДНК 384-386, 385р  
 — повышение **уровня экспрессии гена протоксина** 392  
 — трансформация 384—386, 385р  
 — экспрессия генов в трансгенных растениях 404  
**Хлорорганические** соединения 331  
 Холера, векторная вакцина 243  
**Холестеролоксидаза** 394—395  
 Холиндегидрогеназа 404  
**Холинмонооксигеназа** 404  
**Хорея Гентингтона** 493  
**Хорионический гонадотропин** 205т  
 Хризантемы 406—407  
 Хромосома человека искусственная (НАС) 501  
**х** 446-448, 447р  
 Хромосомы искусственные дрожжевые (YAC) 428-430, 430р  
 — человека, мульти**локусное** картирование 459—462, **461т**  
**Цветки**, изменение окраски 406-407, **407р**  
**Цветы**, сохранение при транспортировке 404  
**Целлюбиогидролаза** 297, 297р  
**Целлюлазы** 300-301, 405  
 — гены, выделение 296—302, 297р, 299р  
 Целлюлоза 294-298, **296р**  
 -утилизация 294-302, 297р, 299р  
 — ферментативное расщепление 296-298, **297р**  
 Целлюлозные отходы как источник белка одноклеточных организмов 301  
 ----- этанола 300  
**Целлюлосомы** 297

- Центрифугирование высокоскоростное, использование для сбора клеток 363—364
- Центромера 501
- Цефалоспорин 26 Op
- Цефалоспори наци лаза 265
- Цианамид 401т
- Циклический АМР (сАМР) 107р, 108
- Циклогексационы 401т
- Цил парный нейротрофический фактор (CNTF) человека 486т, 492
- Цистеин 256т
- Цитозин 29-30, 29-3Op
- Цитокинины 375р, 376
- Цыплята трансгенные 436—438, 437р
- Частота аллелей 450—453, 451т
- Челночные векторы 62, 136, 147, 148р
- Шайна—Драйзарно* последовательность 38
- Штамм-продуцент, усовершенствование 17, 255
- Экзоглюканаза 297-299, 297р, 300
- Эксонуклеаза III 166
- Экзоны 36, 37р, 472-476, 473-475P
- улавливание 474—476, 474-47 5р
- Экзотоксин А 223, 223р
- Экзотоксины 223
- Экспрессивность варьирующая 442
- Экспрессируемый STS (eSTS) 465, 466р, 537
- Экспрессирующие векторы 107
- для работы с клетками млекопитающих 149—154, 150-151P
- на основе бакуловирусов 144-145, 145р, 156т
- трансляция 118-121, 119р, 121р
- эукариотические 135-136, 136р
- *S. cerevisiae* 136-137
- системы с использованием культур клеток насекомых 143-149
- Экспрессия генов 105
- в граммотрицательных бактериях 111
- крупномасштабных системах 109-111, 11Op
- при участии сильных регулируемых промоторов 105-112
- оптимизация 208, 209т
- чужеродных генов в растениях 382-386
- Электропорация 76-77, 136, 380т
- Элементы Ds 386, 386р
- Эмфизема 484т
- Эндоглюканаза 69, 297-298, 297р, 300
- Унши у ксау *FokI* 174
- Эндонуклеазы рестрикции, крупномасштабное производство 247-249, 249р
- Эндорфины 205т
- Энергетические ресурсы клетки, их расходование 123, 127-130, 128т
- Энкефалин 205т
- Энтеротоксин холерный 235-236, 237р
- Энхансерная последовательность 46, 384
- Эписомные векторы 137
- Эритромицин 261, 263р
- Эритропоэтин 206т, 537
- Эрлифгаые реакторы 357, 357р, 358-360
- Эстераза 343
- Этанол, повышение эффективности производства 289-292, 291-292Т
- получение с помощью целлюлазных генов 300
- *Z. mobilis* 292-294, 292т, 293р
- промышленное производство 287-289, 288р
- 4-этилбензоат 282-283, 284-285р
- Этилен, растительный гормон 326-327, 327р
- синтез в растениях 405—406, 405р
- 1-Г-этилен-бис[триптофан] (ЭБТ) 521
- Эукариотические экспрессирующие векторы 136, 136р
- Эукариотический селективный маркерный ген 135, 382т
- Эукариоты, выделение целлюлазных генов 298-300, 299р
- использование в молекулярной биотехнологии 24
- клеточные стенки 24-25, 25р
- клонирование структурных генов 70-71
- культуры клеток 27-28
- модификация белков 27
- репликация 33—34
- структурные особенности клеток 24-25, 25р
- транскрипция 35-36, 36р, 45-47, 46р
- трансляция 38-39, 39р
- экспрессирующие векторы 135-155
- «Эффект свидетеля» 503
- Эффектор 42, 43-44р
- Ювенильный гормон личинок 343-344, 392т
- Яйцо как источник белковых продуктов 438

# Указатель латинских названий

- Acetobacter suboxydans* 251p  
*Acremonium chrysogenum* 27т, 265, 266p  
*Agrobacterium radiobacter* 323, 324p  
 - *umefadens* 62, 373-379, 379p  
*Akiligenes* 11  
*-eulrophus* 270-272, 271p  
*Arabidopsis thaliana* 413  
*Aspergillus awamori* 290  
*nidulans* 127  
*-niger* 289-290  
*Asticaulis excentricus* 340  
*Autographia californica* 144, 144-145p, 344  
*Azotobacter chroococcum* 307
- Bacillus amyloliquefaciens* 124, 172, 173т, 288-290  
*-cereus* 27т, 291, 292т  
 — *circulans* 169  
*-licheniformis* 208, 209т  
*-megaterium* 307  
*-sterothermophilus* 171-172, 172т, 290  
*-subtilis* 62, 124-125, 125т, 125п, 210, 210п, 290  
*-thuringiensis* 27т, 332-342, 334п, 343т, 335п, 337п, 338т, 341п, 389-393, 390т, 525  
*Bradyrhizobium* 307, 308т, 314-315, 315т, 320  
*Brassica* 410  
*Brevibacterium* 255-256
- Camphyllobacter hyoinfestialis* 189  
*Candida lipolytica* 301т  
*Caulodactercrescentus* 340
- Cellulomonas fimi* 300  
*Chaetomium catenulatum* 301т  
*Clavibacter xyli* 342  
*Clostridium thermosulfatigenes* 291, 292т  
*Corynebacterium diphtheriae* 211  
*-glutamicum* 27, 27т, 123, 250, 252п, 255-257, 256т, 257п
- Enierodaciereglotherans* 325  
 - *cloacae* 111  
*Erwinia carotovora* 402  
*-herbicola* 27т, 251-253п  
*Escherichia coli* 24-27, 27п, 41, 50, 53, 58, 76-77, 105, 115-116, 122-123, 126-127, 146-147, 148п, 160-162, 161п, 189, 215, 218-221, 219-221п, 247-249, 249п, 254-255, 254-255п, 267-268, 268п, 271, 271п, 285-286, 286п, 291, 292т, 338, 355-356, 360-363, 361п, 367, 379, 379п, 400, 520, 522
- Flavobacterium okeanokottae* 174  
*Fusarium solani* 265
- Haemophilus influenzae* 53  
*Hansenula polymorpha* 27, 141—142  
*Heterothrix virescens* 343
- Klebsiella pneumoniae* 401, 401п  
*-pneumoniae* 111, 310, 310т, 312, 312п  
*Kluyveromyces fragilis* 301т  
 - *lactis* 27, 140
- Lactobacillus amylovorus* 294, 295п  
 - *planarum* 294, 295п  
*Legionella pneumophila* 189  
*Leptosphaeria maculans* 195  
*Leisthema major* 237-238, 238п
- Methylophilus methylotrophus* 301-302, 301т  
*Myiobesidius* 268, 269п
- Penicillium chrysogenum* 259, 260п  
*Pichia pastoris* 27, 141-142, 142-143п  
*Providencia stuartii* 248, 249п  
*Pseudomonas* 27т, 223, 223п, 252, 254-255п, 275-276, 276т, 282-286, 283п, 286т  
*-aeruginosa* 116  
*-cepacia* 323  
*-diminuta* 265  
*-fluorescent* 111, 322, 322п, 323т, 340, 341п  
*-putida* 281, 282т, 322, 322п  
*-stutzeri* 111  
*-syringae* 325, 523  
*Pythium ultimum* 323, 323т
- Rhizobium* 27т, 307-308, 308т, 314-315, 315-316т, 316-320, 318  
 - *leguminosarum* 315, 316т  
*-meliloti* 313, 316-320, 317п, 325  
*Rhizoctonia solani* 323, 325  
*Rickettsia rickettsii* 242
- Saccharomyces cerevisiae* 27, 236-240, 139п, 170, 170т, 290, 301, 477

*disiaticus* 27  
*Saccharopolyspora erythrae* 261  
*Salmonella* 236,243  
— *typhi* 189  
*Schizosaccharomyces pombe* 27, 141, 143  
*Semisia marcescens* 111, 325  
*Shigella flexneri* 2M  
*Spirulina maxima* 301т  
*Streptomyces* 27т, 257-258,258р, 260, 261т, 262р, 263, 26Ер

- *antibioticus* 268  
- *coelicolor* 259  
- *Kvidans* 123  
*Synechococcus* 340  
*Synechocystis* 340  
  
*Thermus thermophilus* 291, 292т  
*Trichoderma harzianum* 325  
-/*resd* 27т, 300  
*Trypanosoma cruzi* f 89-190

*Vitreoscilla* 122-130,264,355-356

*Xanthomonas campestris* 27т, 266—267, 267р, 267т  
-*maltophilia* 123

*Yarrowia lipolytica* 27,141

*Zymomonas mobilis* 27т, 292-294, 292т, 300, 393р



# Оглавление

|                                     |   |
|-------------------------------------|---|
| От редактора перевода .....         | 5 |
| Предисловие .....                   | 7 |
| Предисловие к первому изданию ..... | 9 |

## ЧАСТИ

|   |    |
|---|----|
| ОСНОВЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ ..... | 13 |
|---|----|

|   |    |
|---|----|
| Глава 1. Молекулярно-биотехнологическая революция ..... | 15 |
| Технология рекомбинантных ДНК .....                     | 15 |
| Возникновение молекулярной биотехнологии .....          | 16 |
| Коммерциализация молекулярной биотехнологии .....       | 19 |
| Надежды и опасения .....                                | 20 |
| Заключение .....  | 22 |
| Литература .....  | 23 |
| Контрольные вопросы .....                               | 23 |

|   |    |
|---|----|
| Глава 2. Биологические системы, используемые в молекулярной биотехнологии ..... | 24 |
| Прокариоты и эукариоты .....  | 24 |
| <i>Escherichia coli</i> .....   | 24 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....   | 27 |
| Культуры эукариотических клеток .....   | 27 |
| Заключение .....  | 28 |
| Литература .....  | 28 |
| Контрольные вопросы .....   | 28 |

|   |    |
|---|----|
| Глава 3. ДНК, РНК и синтез белка .....  | 29 |
| Структура ДНК .....                     | 29 |
| Репликация .....                        | 32 |
| Расшифровка генетической информации:    |    |
| РНК и белок .....                       | 33 |
| Трансляция .....                        | 38 |
| Регуляция транскрипции у бактерий ..... | 41 |
| Регуляция транскрипции у эукариот ..... | 45 |
| Заключение .....                        | 47 |
| Литература .....                        | 49 |
| Конфольные вопросы .....                | 49 |

|  |    |
|--|----|
| Глава 4. Технология рекомбинантных ДНК ..... | 50 |
| Рестрицирующие эндонуклеазы .....            | 50 |
| Плазмидные векторы .....                     | 56 |
| Плазмидный вектор pBR322 .....               | 58 |
| Трансформация и отбор .....                  | 58 |

|   |    |
|---|----|
| Другие плазмидные векторы .....                                       | 60 |
| Создание и скрининг библиотек .....                                   | 62 |
| Создание геномной библиотеки .....                                    | 62 |
| Скрининг с помощью гибридизации .....                                 | 64 |
| Иммунологический скрининг .....                                       | 67 |
| Скрининг по активности белка .....                                    | 69 |
| Клонирование структурных генов эукариот .....                         | 70 |
| Векторы для клонирования крупных фрагментов ДНК .....                 | 71 |
| Векторы на основе бактериофага $\lambda$ .....                        | 71 |
| Космиды .....   | 74 |
| Векторные системы для клонирования очень крупных фрагментов ДНК ..... | 76 |
| Генетическая трансформация прокариот .....                            | 76 |
| Перенос ДНК в <i>E. coli</i> .....                                    | 76 |
| Электропорация .....  | 76 |
| Конъюгация .....  | 77 |
| Заключение .....  | 77 |
| Литература .....  | 78 |
| Контрольные вопросы .....   | 79 |

|  |     |
|--|-----|
| Глава 5. Химический синтез, определение 11>клеточной последовательности и амплификация ДНК ..... | 80  |
| Химический синтез ДНК .....  | 80  |
| Фосфорамидитный метод .....  | 80  |
| Применение синтезированных олигонуклеотидов .....  | 85  |
| Синтез генов .....   | 86  |
| Методы секвенирования ДНК .....  | 88  |
| Дидеоксинуклеотидный метод секвенирования ДНК .....  | 89  |
| Секвенирование ДНК с помощью вектора на основе фага M13 .....                                    | 91  |
| Прямая мер-опосредованная прогулка .....   | 93  |
| Полимеразная цепная реакция .....  | 94  |
| Получение с помощью ПЦР кДНК, отвечающих концам молекул мРНК .....                               | 98  |
| Синтез генов с помощью ПЦР .....   | 102 |
| Заключение .....   | 102 |
| Литература .....   | 103 |
| Контрольные вопросы .....  | 104 |

|  |     |
|--|-----|
| Глава 6. Оптимизация экспрессии генов, клонированных в прокариотических системах ..... | 105 |
| Экспрессия генов при участии сильных регулируемых промоторов .....                     | 105 |

|   |            |
|---|------------|
| Регулируемые промоторы .....  | 107        |
| Получение больших количеств белковых<br>продуктов .....   | 108        |
| Крупномасштабные системы .....  | 109        |
| Использование для экспрессии других<br>микроорганизмов .....  | 111        |
| Химерные белки .....  | 112        |
| Расщепление химерных белков .....   | 112        |
| Применение химерных белков .....  | 113        |
| Включение белков в поверхностные струк-<br>туры .....   | 115        |
| Однонаправленное тандемное<br>расположение генов .....  | 117        |
| Трансляционные экспрессирующие век-<br>торы .....   | 118        |
| Стабилизация белков .....   | 121        |
| Рост в условиях недостатка кислорода .....  | 122        |
| Применение хозяйских штаммов с дефи-<br>цитом протеиназ .....   | 122        |
| Бактериальный «гемоглобин» .....  | 122        |
| Интеграция чужеродной ДНК в хромосо-<br>му хозяина .....  | 123        |
| Повышение эффективности секреции .....  | 126        |
| Метаболическая перегрузка .....   | 127        |
| Заключение .....  | 130        |
| Литература .....  | 131        |
| Контрольные вопросы .....   | 133        |
| <b>Глава 7. Получение рекомбинантных белков<br/>с помощью эукариотических систем .....</b>              | <b>135</b> |
| Системы экспрессии <i>Saccharomyces cere-<br/>visiae</i> .....  | 136        |
| Векторы для <i>S. cerevisiae</i> .....  | 137        |
| Прямая экспрессия в <i>S. cerevisiae</i> .....  | 137        |
| Секреция гетерологичных белков, синте-<br>зируемых <i>S. cerevisiae</i> .....                           | 139        |
| Другие дрожжевые системы экспрессии .....   | 140        |
| Синтез поверхностного антигена вируса<br>гепатита В .....   | 141        |
| Синтез бычьего лизоцима С2 .....  | 142        |
| Системы экспрессии с использованием<br>культур клеток насекомых .....                                   | 143        |
| Система экспрессирующих векторов на<br>основе бакуловирусов .....                                       | 144        |
| Получение рекомбинантных бакулови-<br>русов .....   | 145        |
| Создание членичного вектора на основе<br>бакуловирусов для <i>E. coli</i> и клеток на-<br>секомых ..... | 146        |
| Выделение рекомбинантного белка из кле-<br>ток насекомых с помощью аффинного<br>связывания .....        | 149        |

|   |            |
|---|------------|
| Экспрессирующие векторы для работы с<br>клетками млекопитающих .....                          | 149        |
| Селективные маркерные гены .....  | 150        |
| Экспрессия двух клонированных генов<br>в одной клетке млекопитающих .....                     | 151        |
| Заключение .....  | 154        |
| Литература .....  | 155        |
| Контрольные вопросы .....   | 156        |
| <b>Глава 8. Направленный мутагенез и генная<br/>инженерия белков .....</b>                    | <b>158</b> |
| Направленный мутагенез: методика .....  | 158        |
| Олигонуклеотид-направленный мутагенез<br>с использованием ДНК фага М13 .....                  | 159        |
| Олигонуклеотид-направленный мутагенез<br>с использованием плазмидной ДНК .....                | 161        |
| Олигонуклеотид-направленный мутагенез<br>с использованием ПЦР-амплификации .....              | 163        |
| Случайный мутагенез с использованием<br>«вырожденных» олигонуклеотидных i ipm-<br>меров ..... | 163        |
| Случайный мутагенез с использованием<br>аналогов нуклеотидов .....                            | 166        |
| Генная инженерия белков .....   | 168        |
| Образование дополнительных дисульфид-<br>ных связей .....                                     | 168        |
| Замена аспарагина на другие аминокис-<br>лоты .....   | 170        |
| Уменьшение числа свободных сульфид-<br>рильных групп .....                                    | 170        |
| Повышение ферментативной активности .....   | 171        |
| Изменение иогребности ферментов в ме-<br>таллических кофакторах .....                         | 172        |
| Изменение специфичности фермента .....  | 173        |
| Повышение стабильности и специфич-<br>ности фермента .....                                    | 174        |
| Заключение .....  | 175        |
| Литература .....  | 175        |
| Контрольные вопросы .....   | 176        |

## ЧАСТЬ II МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ .....179

|   |            |
|---|------------|
| <b>Глава 9. Молекулярная диагностика .....</b>  | <b>181</b> |
| Методы иммунодиагностики .....  | 182        |
| Ферментный иммуносорбентный анализ .....  | 182        |
| Моноклональные антитела .....   | 184        |
| Образование и отбор гибридных клеток ,...1 й5   |            |
| Идентификация гибридных клеточных ли-<br>ний, секретирующих специфические ан-<br>титела ..... | 185        |

|   |     |   |     |
|---|-----|---|-----|
| Системы ДНК-диагностики .....   | 187 | Пептидные вакцины .....   | 231 |
| Гибридизационные зонды .....  | 188 | Генная иммунизация .....  | 233 |
| Диагностика малярии .....   | 188 | Аттенуированные вакцины .....   | 234 |
| Выявление <i>Trypanosoma cruzi</i> .....                                    | 189 | Противохолерные вакцины .....   | 235 |
| Нерадиоактивные методы детекции .....                                       | 190 | Противосальмонеллезные вакцины .....  | 236 |
| Геномная дактилоскопия .....  | 192 | Противолеишманиозные вакцины .....  | 237 |
| Использование полиморфных ДНК-маркеров .....                                | 194 | «Векторные» вакцины .....   | 238 |
| Молекулярная диагностика генетических заболеваний .....                     | 195 | Противогрибковые вакцины .....  | 238 |
| Серповидноклеточная анемия .....  | 195 | Противобактериальные вакцины .....  | 242 |
| Метод ПЦР/ЛОЗ .....   | 196 | Бактерии как системы доставки антигенов .....   | 242 |
| Генотипирование с использованием флуоресцентно меченных ПЦР-праймеров ..... | 198 | Закключение .....   | 243 |
| Мутации в разных сайтах одного гена .....                                   | 199 | Литература .....  | 244 |
| Перспективы .....   | 201 | Контрольные вопросы .....   | 246 |
| Закключение .....   | 201 |   |     |
| Литература .....  | 202 | Глава 12. Использование рекомбинантных микроорганизмов для получения коммерческих продуктов .....       | 247 |
| Контрольные вопросы .....   | 203 | Эндонуклеазы рестрикции .....   | 247 |
| Глава 10. Микробиологическое производство лекарственных средств .....       | 204 | Малые биологические молекулы .....  | 250 |
| Лекарственные препараты .....   | 204 | Синтез L-аскорбиновой кислоты .....   | 250 |
| Выделение кДНК интерферонов .....   | 204 | Синтез индиго .....   | 252 |
| Интерфероны человека, полученные методом генной инженерии .....             | 207 | Синтез аминокислот .....  | 255 |
| Гормон роста человека, полученный методом генной инженерии .....            | 208 | Антибиотики .....   | 257 |
| Оптимизация генной экспрессии .....   | 208 | Клонирование генов биосинтеза антибиотиков .....  | 259 |
| Ферменты .....  | 209 | Синтез новых антибиотиков .....   | 259 |
| ДНКаза! .....   | 209 | Разработка новых методов получения поликетидных антибиотиков .....                                      | 260 |
| Альгинат-лиаза .....  | 209 | Усовершенствование производства антибиотиков .....  | 263 |
| Моноклональные антитела как лекарственные средства .....                    | 210 | Биополимеры .....   | 266 |
| Структура и функции антител .....   | 211 | Создание рекомбинантной бактерии <i>Xanthomonas campestris</i> с целью получения кантановой слизи ..... | 266 |
| Профилактика отторжения трансплантированных органов .....                   | 212 | Выделение генов биосинтеза меланина .....   | 267 |
| Лекарственные вещества, связанные с моноклональными антителами .....        | 212 | Микробиологический синтез животного биополимера с адгезивными свойствами .....                          | 268 |
| Моноклональные антитела человека .....                                      | 214 | Микробиологический синтез каучука .....   | 270 |
| Гибридные Моноклональные антитела человека и мыши .....                     | 215 | Микробиологический синтез полигидроксиспиритов .....  | 270 |
| Производство антител с помощью <i>E. coli</i> .....                         | 218 | Закключение .....   | 272 |
| Лекарственные средства против ВИЧ .....                                     | 222 | Литература .....  | 272 |
| Закключение .....   | 224 | Контрольные вопросы .....   | 274 |
| Литература .....  | 224 |   |     |
| Контрольные вопросы .....   | 226 | Глава 13. Биodeградация токсичных соединений и утилизация биомассы .....                                | 275 |
| Глава 11. Вакцины .....   | 227 | Дсфакция ксенобиотиков с помощью микроорганизмов .....  | 275 |
| Субъединичные вакцины .....   | 228 | Метаболические пути биodeградации ксенобиотиков, созданные методами генной инженерии .....              | 276 |
| Противогерпетические вакцины .....  | 230 |   |     |
| Противоящурные вакцины .....  | 230 |   |     |
| Противотуберкулезные вакцины .....  | 231 |   |     |

|   |            |
|---|------------|
| Перенос плазмид.....  | 276        |
| Изменение генов .....   | 281        |
| Утилизация крахмала и Сахаров .....                           | 286        |
| Промышленное производство фруктозы и этанола .....            | 287        |
| Повышение эффективности производства фруктозы и этанола ..... | 289        |
| <i>Zymomonas mobilis</i> .....                                | 292        |
| Получение силоса.....   | 294        |
| Утилизация целлюлозы .....                                    | 294        |
| Компоненты лигноцеллюлозы .....                               | 294        |
| Выделение прокариотических целлюлазных генов .....            | 2%         |
| Выделение эукариотических целлюлазных генов .....             | 298        |
| Манипуляции с целлюлазными генами .....                       | 300        |
| Белок одноклеточных организмов .....                          | 301        |
| Заключение .....  | 302        |
| Литература .....  | 303        |
| Контрольные вопросы .....                                     | 305        |
| <b>Глава 14. Бактерии, стимулирующие рост растений .....</b>  | <b>306</b> |
| Фиксация азота .....  | 306        |
| Нитрогеназа .....   | 308        |
| Компоненты.....   | 308        |
| Генная инженерия кластера генов нитрогеназы.....              | 310        |
| Гидрогеназа.....  | 313        |
| Метаболизм водорода.....                                      | 313        |
| Модификация генов гидрогеназ.....                             | 314        |
| Образование клубеньков.....                                   | 316        |
| Конкуренция среди организмов, образующих клубеньки .....      | 316        |
| Манипуляции с генами образования клубеньков .....             | 316        |
| Биоконтроль патогенных микроорганизмов .....                  | 320        |
| Сидсрофоры .....  | 321        |
| Антибиотики .....   | 322        |
| Ферменты.....   | 323        |
| Образование кристаллов льда и антифризных белки .....         | 325        |
| Стимуляция роста растений свободноживущими бактериями.....    | 326        |
| Заключение .....  | 327        |
| Литература .....  | 328        |
| Контрольные вопросы .....                                     | 330        |
| <b>Глава 15. Микробные инсектициды .....</b>                  | <b>331</b> |
| Токсин, синтезируемый <i>Bacillus thuringiensis</i> .....     | 332        |
| Механизм действия и использование .....                       | 332        |
| Идентификация генов токсинов .....                            | 335        |

|  |            |
|--|------------|
| Генная инженерия генов токсинов <i>B. thuringiensis</i> .....                                | 336        |
| Бакуловирусы как инструмент биоконтроля.....   | 342        |
| Механизм действия .....  | 342        |
| Усиление биоконтроля с помощью генной инженерии .....  | 343        |
| Заключение .....   | 344        |
| Литература.....  | 345        |
| Контрольные вопросы.....   | 347        |
| <b>Глава 16. Промышленный синтез белков при участии рскомбинантных микроорганизмов .....</b> | <b>349</b> |
| Рост микроорганизмов.....  | 350        |
| Периодическая культура .....   | 351        |
| Периодическая культура с добавлением субстрата .....   | 352        |
| Непрерывная культура.....  | 353        |
| Повышение эффективности ферментации .....  | 354        |
| Культуры с высокой плотностью.....   | 356        |
| Биореакторы .....  | 357        |
| Типичные крупномасштабные системы ферментации.....   | 359        |
| Двухступенчатая ферментация в тандемных эрлифтных биореакторах.....                          | 360        |
| Двухступенчатая ферментация в одном реакторе с механическим перемешиванием .....             | 362        |
| ! Периодическая ферментация и периодическая ферментация с добавлением субстрата .....        | 363        |
| Сбор клеток.....   | 363        |
| Разрушение клеток .....  | 365        |
| Дальнейшая обработка .....   | 366        |
| Солюбилизация белков .....   | 367        |
| Заключение.....  | 367        |
| Литература .....   | 368        |
| Контрольные вопросы.....   | 369        |

## ЧАСТЬ III

### ЭУКАРИОТИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ..... 371

|   |            |
|---|------------|
| <b>Глава 17. Генная инженерия растений: методология .....</b>                 | <b>373</b> |
| Трансформация растений Ti-плазмидой из <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ..... | 373        |
| Векторные системы на основе Ti-плазмид .....                                  | 377        |
| Физические методы переноса генов в растительные клетки.....                   | 379        |
| Бомбардировка микрочастицами.....   | 380        |
| Применение репортерных генов при трансформации клеток растений .....          | 381        |

|   |     |
|---|-----|
| Эксперименты по экспрессии чужеродных генов в растениях .....       | 382 |
| Выделение различных промоторов и их использование .....             | 383 |
| Введение чужеродных генов в хлоропласт-ную ДНК .....                | 384 |
| Получение трансгенных растений, не содержащих маркерных генов ..... | 386 |
| Заключение .....  | 386 |
| Литература .....  | 387 |
| Контрольные вопросы .....   | 388 |

## Глава 18. Генная инженерия растений: применение.....389

|   |     |
|---|-----|
| Выведение растений, устойчивых к насекомым-вредителям, вирусам и гербицидам ..... | 389 |
| Растения, устойчивые к насекомым-вредителям .....                                 | 389 |
| Растения, устойчивые к вирусам .....  | 395 |
| Растения, устойчивые к гербицидам .....   | 400 |
| Растения, устойчивые к грибам и бактериям .....                                   | 401 |
| Получение растений, противостоящих неблагоприятным воздействиям и старению .....  | 403 |
| Окислительный стресс .....  | 403 |
| Солевой стресс .....  | 404 |
| Созревание плодов .....   | 405 |
| Изменение окраски цветков .....   | 406 |
| Изменение пищевой ценности растений .....   | 407 |
| Аминокислоты .....  | 408 |
| Липиды .....  | 408 |
| Изменение вкуса и внешнего вида плодов .....                                      | 410 |
| Изменение внешнего вида .....   | 410 |
| Изменение вкуса .....   | 411 |
| Растения как биореакторы .....  | 412 |
| Антитела .....  | 412 |
| Полимеры .....  | 412 |
| Чужеродные белки, накапливающиеся в семенах .....                                 | 413 |
| Заклучение .....  | 413 |
| Литература .....  | 413 |
| Контрольные вопросы .....   | 416 |

## Глава 19. Трансгенные животные.....418

|   |     |
|---|-----|
| Трансгенные мыши; методология .....                                 | 419 |
| Использование ретровирусных векторов .....                          | 419 |
| Метод микроинъекций ДНК .....                                       | 420 |
| Использование модифицированных эмбриональных стволовых клеток ..... | 422 |
| Клонирование с помощью переноса ядра .....                          | 426 |

|  |     |
|--|-----|
| Перенос генов с помощью искусственных дрожжевых хромосом ..... | 428 |
| Трансгенные мыши: применение .....                             | 430 |
| Трансгенный крупный рогатый скот .....                         | 433 |
| Трансгенные овцы, козы и свиньи .....                          | 435 |
| Трансгенные птицы .....  | 436 |
| Трансгенные рыбы .....   | 438 |
| Заклучение .....   | 439 |
| Литература .....   | 439 |
| Контрольные вопросы .....                                      | 441 |

## Глава 20. Молекулярная генетика человека ....442

|  |     |
|--|-----|
| Генетическое сцепление и картирование генов .....  | 444 |
| Обнаружение и оценка генетического сцепления у человека .....                                      | 446 |
| Анализ сцепления методом максимального правдоподобия: логарифм соотношения шансов (лод-балл) ..... | 447 |
| Построение генетических карт хромосом человека .....   | 450 |
| Генетический полиморфизм .....   | 450 |
| Полиморфизм длины рестрикционных фрагментов .....  | 451 |
| Полиморфизм коротких tandemных повторов .....  | 454 |
| Картирование локуса генетического заболевания в определенном районе хромосомы .....                | 456 |
| Построение мультилокусных хромосомных карт человека .....  | 459 |
| Локализация гена заболевания на карте сцепления .....  | 460 |
| Картирование с использованием радиационных гибридов .....  | 460 |
| Физическое картирование генома человека .....  | 462 |
| Построение контигов из YAC-, BAC- и PAC-библиотек .....  | 462 |
| Построение контигов из космидных, P1- и λ-библиотек .....  | 463 |
| Транскрипционное картирование .....  | 465 |
| Клонирование генов заболеваний человека .....  | 467 |
| Выявление мутаций в генах человека .....   | 467 |
| Функциональное картирование .....  | 468 |
| Кандидатное картирование .....   | 469 |
| Позиционное картирование .....   | 469 |
| Позиционно-кандидатное картирование .....  | 476 |
| Программа *Геном человека* .....   | 477 |
| Заклучение .....   | 479 |
| Литература .....   | 481 |
| Контрольные вопросы .....  | 482 |

|   |     |
|---|-----|
| Глава 21. Генная терапия.....                   | 483 |
| Генная терапия ex vivo .....                    | 487 |
| Генная терапия in vivo .....                    | 493 |
| Вирусные системы доставки генов .....           | 493 |
| Ретровирусные векторы .....                     | 493 |
| Аденовирусные векторы .....                     | 494 |
| Векторы на основе аденоассоциированных          |     |
| вирусов .....                                   | 4%  |
| Векторы на основе вируса простого герпеса ..... | 496 |
| Невирусные системы доставки генов .....         | 498 |
| Активация предшественника лекарствен-           |     |
| ного вещества («пролкарства») .....             | 502 |
| Лекарственные средства на основе олиго-         |     |
| нуклеотидов .....                               | 503 |
| Синтез «антисмысловых» мРНК in vivo .....       | 504 |
| «Антисмысловые» олигонуклеотиды как             |     |
| лекарственные средства .....                    | 506 |
| Олигонуклеотиды, связывающиеся с бел-           |     |
| ками: антитромбиновый аптамер .....             | 508 |
| Рибозимы как лекарственные средства .....       | 508 |
| Коррекция генетических дефектов с помо-         |     |
| щью олигонуклеотидов .....                      | 509 |
| Заключение .....                                | 510 |
| Литература .....                                | 511 |
| Контрольные вопросы .....                       | 513 |

#### ЧАСТЬ IV

### КОНТРОЛЬ ИССЛЕДОВАНИЙ В ОБЛАС- ТИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОТЕХНОЛО- ГИИ И ПАТЕНТОВАНИЕ БИОТЕХНОЛО- ГИЧЕСКИХ ИЗОБРЕТЕНИЙ.....515

|  |        |
|--|--------|
| Глава 22. Контроль применения биотехно-  |        |
| логических методов.....                  | 517    |
| Контроль экспериментов с рекомбинант-    |        |
| ными ДНК.....                            | 518    |
| Контроль за производством и потреблением |        |
| пищевых продуктов и пищевых добавок..... | 519    |
| Химозин...                               | ...520 |

|   |     |
|---|-----|
| Триптофан .....                                   | 520 |
| Бычий соматотропин .....                          | 521 |
| Контролируемое псевдообращение генети-            |     |
| чески модифицированных организмов в               |     |
| окружающую среду.....                             | 523 |
| <i>Pseudomonas syringae</i> , не образующие крис- |     |
| таллов льда .....                                 | 523 |
| Открытые полевые испытания других ге-             |     |
| нетически модифицированных организ-               |     |
| мов .....   | 525 |
| Генная терапия человека .....                     | 526 |
| Политика в области генной терапии соматических    |     |
| клеток.....                                       | 527 |
| Накопление дефектных генов в будущих              |     |
| поколениях.....                                   | 528 |
| Генная терапия клеток зародышевой линии .....     | 529 |
| Клонирование человека.....                        | 529 |
| Заключение .....                                  | 530 |
| Литература.....                                   | 531 |
| Контрольные вопросы .....                         | 532 |

|  |     |
|--|-----|
| Глава 23. Патентование биотехнологичес-      |     |
| ких изобретений.....                         | 533 |
| Общие вопросы патентования изобретений ..... | 534 |
| Патентование изобретений в разных стра-      |     |
| нах .....                                    | 536 |
| Патентование ДНК-последовательностей.....    | 537 |
| Патентование многоклеточных организмов ..... | 539 |
| Патентование и фундаментальные иссле-        |     |
| дования .....                                | 539 |
| Заключение .....                             | 541 |
| Литература.....                              | 541 |
| Контрольные вопросы.....                     | 542 |

|                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| Словарь терминов .....          | 543    |
| Предметный указатель .....      | 564    |
| Указатель латинских названий .. | ...577 |



Учебное издание  
Бернард Глик, Джек Пастернак  
**МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ**

Зав. редакцией канд. биол. наук М. Р. Погосбекова  
Ведущий редактор Н. Н. Шафрановская  
Редактор Р. Ф. Куликова  
Художник Н. В. Зотова  
Технический редактор Е. В. Денюкова  
Корректор Р. Ф. Куликова  
Оригинал-макет подготовлен Л. К. Васильевой  
График-дизайнер С. В. Машин  
Оператор Н. Е. Кизилова

Лицензия ЛР № 010174 от 20.05.97 г.

Подписано к печати 10.09.01. Формат 84 × 108/к>. Бумага офсетная. Печать офсетная. Гарнитура NewionС. О&ьем 18,50 бум, л. Усл. печ. л. 62.16. Уч.-изд я. 62,07. Изд. № 4/9698. Тираж 5000 экз. Зак. 5185.

Издательство «Мир» Министерства РФ по делам печати, телерадиовещания и средств массовых коммуникации 107996, ГСП-6, Москва, 1-й РИЖСКИЙ пер., 2.

Диапозитивы изготовлены в издательстве «Мир»

Отпечатано в полном соответствии

С качеством предоставленных диапозитивов

в ОАО «Можайский полиграфический комбинат»,

143200, г. Можайск, ул. Мира, 93

ЛУЧШИЙ  
ЗАРУБЕЖНЫЙ  
УЧЕБНИК

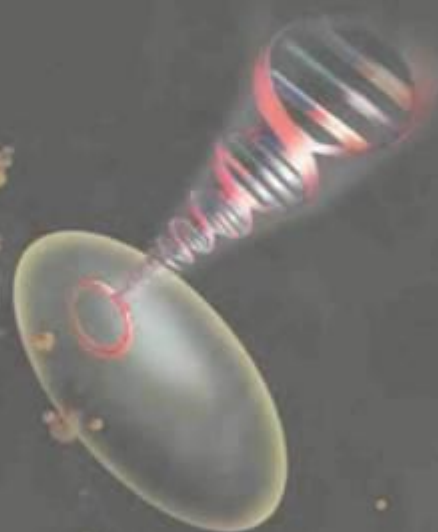
Б. Глик, Дж. Пастернак

# Молекулярная биотехнология

## Принципы и применение

Книга несомненно войдет в ряд лучших переводных изданий по биологии и станет незаменимым учебным пособием для студентов биологов, химиков, врачей, фармацевтов, агрономов, ветеринаров — всех тех, кто хочет специализироваться в области генной инженерии.

д-р биол. наук Н. К. Янковский



ISBN 5-03-003328-9



9 785030 033280

# ЭЛЕКТРОННОЕ ОГЛАВЛЕНИЕ

|  |           |
|--|-----------|
| От редактора перевода.....   | 5         |
| Предисловие.....   | 7         |
| Предисловие к первому изданию.....   | 9         |
| Благодарности .....  | 10        |
| <b>Часть I. Основы молекулярной биотехнологии.....</b>   | <b>13</b> |
| <b>ГЛАВА 1. Молекулярно-биотехнологическая революция .....</b>   | <b>15</b> |
| Технология рекомбинантных ДНК.....   | 15        |
| Возникновение молекулярной биотехнологии .....   | 16        |
| Коммерциализация молекулярной биотехнологии .....  | 19        |
| Надежды и опасения .....   | 20        |
| Создание функциональных бактериальных плазмид in vitro .....   | 21        |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....   | 22        |
| ЛИТЕРАТУРА .....   | 23        |
| КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ.....   | 23        |
| <b>ГЛАВА 2. Биологические системы, использующиеся в молекулярной биотехнологии.....</b>                | <b>24</b> |
| Прокариоты и эукариоты.....  | 24        |
| Escherichia coli .....   | 24        |
| Появление новых генотипов в смешанной культуре биохимических мутантов бактерий ...                     | 26        |
| Saccharomyces cerevisiae .....   | 27        |
| Культуры эукариотических клеток.....   | 27        |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....   | 28        |
| ЛИТЕРАТУРА .....   | 28        |
| КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ.....   | 28        |
| <b>ГЛАВА 3. ДНК, РНК и синтез белка .....</b>  | <b>29</b> |
| Структура ДНК .....  | 29        |
| Репликация.....  | 32        |
| Расшифровка генетической информации: РНК и белок.....  | 33        |
| Трансляция.....  | 38        |
| Регуляция транскрипции у бактерий.....   | 41        |
| Структура дезоксирибонуклеиновой кислоты .....   | 45        |
| Регуляция транскрипции у эукариот .....  | 45        |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....   | 47        |
| ЛИТЕРАТУРА .....   | 49        |
| КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ.....   | 49        |
| <b>ГЛАВА 4. Технология рекомбинантных ДНК .....</b>  | <b>50</b> |
| Рестрицирующие эндонуклеазы.....   | 50        |
| ДОПОЛНЕНИЕ 4.1 .....   | 54        |
| Гель-электрофорез.....   | 54        |
| Плазмидные векторы .....   | 56        |
| Плазмидный вектор pBR322 .....   | 58        |
| Трансформация и отбор .....  | 58        |
| Другие плазмидные векторы.....   | 60        |
| При расщеплении ДНК рестриктазой RT образуются фрагменты с липкими концами .....                       | 61        |
| Скрининг с помощью гибридизации .....  | 64        |
| ДОПОЛНЕНИЕ 4.2 .....   | 65        |
| Радиоавтография .....  | 65        |
| Иммунологический скрининг .....  | 67        |
| Скрининг по активности белка .....   | 69        |
| Клонирование структурных генов эукариот .....  | 70        |
| Векторы для клонирования крупных фрагментов ДНК.....   | 71        |
| Векторы на основе бактериофага λ.....  | 71        |
| Космиды .....  | 74        |
| Векторные системы для клонирования очень крупных фрагментов ДНК.....                                   | 76        |
| Генетическая трансформация прокариот .....   | 76        |
| Перенос ДНК в E. coli .....  | 76        |
| Электропорация.....  | 76        |
| Конъюгация .....   | 77        |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....   | 78        |
| ЛИТЕРАТУРА .....   | 78        |
| КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ.....   | 79        |
| <b>ГЛАВА 5 Химический синтез, определение нуклеотидной последовательности и амплификация ДНК .....</b> | <b>80</b> |
| Химический синтез ДНК .....  | 80        |
| Фосфорамидитный метод .....  | 80        |
| Применение синтезированных олигонуклеотидов.....   | 85        |
| Синтез генов .....   | 86        |
| Методы секвенирования ДНК.....   | 88        |
| Секвенирование ДНК с помощью терминирующих дидезоксинуклеотидов .....                                  | 89        |
| Специфическая ферментативная амплификация ДНК in vitro: полимеразная цепная реакция.....               | 89        |
| Дидезоксинуклеотидный метод секвенирования ДНК .....   | 89        |
| Секвенирование ДНК с помощью вектора на основе фага M13.....   | 91        |
| Праймер-опосредованная прогулка («Блуждающая затравка»).....   | 93        |
| Полимеразная цепная реакция.....   | 94        |
| Получение с помощью ПЦР кДНК, отвечающих концам молекул мРНК .....                                     | 98        |
| Синтез генов с помощью ПЦР .....   | 102       |

|  |            |
|--|------------|
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....   | 102        |
| ЛИТЕРАТУРА .....   | 103        |
| КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ .....  | 104        |
| <b>ГЛАВА 6. Оптимизация экспрессии генов, клонированных в прокариотических системах .....</b>  | <b>105</b> |
| Экспрессия генов при участии сильных регулируемых промоторов .....   | 105        |
| Регулируемые промоторы .....   | 107        |
| Получение больших количеств белковых продуктов .....   | 108        |
| Крупномасштабные системы .....   | 109        |
| Использование для экспрессии других микроорганизмов .....  | 111        |
| Химерные белки .....   | 112        |
| Расщепление химерных белков .....  | 112        |
| Применение химерных белков .....   | 113        |
| Включение белков в поверхностные структуры .....   | 115        |
| Однонаправленное тандемное расположение генов .....  | 117        |
| Трансляционные экспрессирующие векторы .....   | 118        |
| <i>tac</i> - Промотор: функциональный гибрид, полученный из <i>trp</i> - и <i>lac</i> - промоторов .....   | 120        |
| Стабилизация белков .....  | 121        |
| Рост в условиях недостатка кислорода .....   | 122        |
| Применение хозяйских штаммов с дефицитом протеиназ .....   | 122        |
| Бактериальный «гемоглобин» .....   | 122        |
| Интеграция чужеродной ДНК в хромосому хозяина .....  | 123        |
| Повышение эффективности секретиции .....   | 126        |
| Метаболическая перегрузка .....  | 127        |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....   | 130        |
| ЛИТЕРАТУРА .....   | 131        |
| КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ .....  | 133        |
| <b>ГЛАВА 7 Получение рекомбинантных белков с помощью эукариотических систем .....</b>  | <b>135</b> |
| Системы экспрессии <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....   | 136        |
| Векторы для <i>S. cerevisiae</i> .....   | 137        |
| Прямая экспрессия в <i>S. cerevisiae</i> .....   | 137        |
| Секретиция гетерологичных белков, синтезируемых <i>S. cerevisiae</i> .....   | 139        |
| Другие дрожжевые системы экспрессии .....  | 140        |
| Синтез поверхностного антигена вируса гепатита В .....   | 141        |
| Синтез бычьего лизоцима С2 .....   | 142        |
| Системы экспрессии с использованием культур клеток насекомых .....   | 143        |
| Система экспрессирующих векторов на основе бакуловирусов .....   | 144        |
| Получение рекомбинантных бакуловирусов .....   | 145        |
| Синтез β-глобина кролика в культуре почечных клеток обезьяны, инфицированных рекомбинантным SV40 .....   | 146        |
| Создание члнчного вектора на основе бакуловирусов для <i>E. coli</i> и клеток насекомых ...  | 146        |
| Выделение рекомбинантного белка из клеток насекомых с помощью аффинного связывания .....   | 149        |
| Экспрессирующие векторы для работы с клетками млекопитающих .....  | 149        |
| Селективные маркерные гены .....   | 150        |
| Экспрессия двух клонированных генов в одной клетке млекопитающих .....   | 151        |
| ЛИТЕРАТУРА .....   | 155        |
| КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ .....  | 156        |
| <b>ГЛАВА 8 Направленный мутагенез и генная инженерия белков .....</b>  | <b>158</b> |
| Направленный мутагенез: методика .....   | 159        |
| Олигонуклеотид-направленный мутагенез с использованием ДНК фага М13 .....  | 159        |
| Олигонуклеотид-направленный мутагенез с использованием плазмидной ДНК .....  | 161        |
| Олигонуклеотид-направленный мутагенез с использованием ПЦР-амплификации .....  | 163        |
| Случайный мутагенез с использованием «вырожденных» олигонуклеотидных праймеров .....   | 163        |
| Олигонуклеотид-направленный мутагенез с использованием векторов на основе фага М13: эффективный универсальный метод внесения точковых мутаций в любой фрагмент ДНК ..... | 165        |
| Случайный мутагенез с использованием аналогов нуклеотидов .....  | 166        |
| Генная инженерия белков .....  | 168        |
| Образование дополнительных дисульфидных связей .....   | 168        |
| Замена аспарагина на другие аминокислоты .....   | 170        |
| Уменьшение числа свободных сульфгидрильных групп .....   | 170        |
| Повышение ферментативной активности .....  | 171        |
| Изменение потребности ферментов в металлических кофакторах .....   | 172        |
| Изменение специфичности фермента .....   | 173        |
| Повышение стабильности и специфичности фермента .....  | 174        |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....   | 175        |
| ЛИТЕРАТУРА .....   | 175        |
| КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ .....  | 176        |

## **ЧАСТЬ II. Молекулярная биотехнология микробиологических систем .....**

**179**

|  |            |
|--|------------|
| <b>ГЛАВА 9. Молекулярная диагностика .....</b>   | <b>181</b> |
| Методы иммунодиагностики .....   | 182        |
| Ферментный иммуосорбентный анализ .....  | 182        |
| Моноклональные антитела .....  | 184        |
| Образование и отбор гибридных клеток .....   | 185        |
| Идентификация гибридных клеточных линий, секретирующих специфические антитела .....                | 185        |
| Системы ДНК-диагностики .....  | 187        |
| Гибридизационные зонды .....   | 188        |
| Диагностика малярии .....  | 188        |
| Выявление аллелей β-глобинового гена методом гибридизации с синтетическими олигонуклеотидами ..... | 189        |

|  |            |
|--|------------|
| Выявление <i>Trypanosoma cruzi</i> .....   | 189        |
| Нерадиоактивные методы детекции .....  | 190        |
| Геномная дактилоскопия .....   | 192        |
| Использование полиморфных ДНК-маркеров.....  | 194        |
| <b>Молекулярная диагностика генетических заболеваний .....</b>   | <b>195</b> |
| Серповидноклеточная анемия .....   | 195        |
| Метод ПЦР/ЛОЗ .....  | 196        |
| <b>Генотипирование с использованием флуоресцентно меченных ПЦР-праймеров.....</b>  | <b>198</b> |
| Мутации в разных сайтах одного гена .....  | 199        |
| <b>Перспективы .....</b>   | <b>201</b> |
| <b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>  | <b>201</b> |
| <b>ЛИТЕРАТУРА .....</b>  | <b>202</b> |
| <b>КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ .....</b>   | <b>203</b> |
| <b>ГЛАВА 10. Микробиологическое производство лекарственных средств.....</b>  | <b>204</b> |
| <b>Лекарственные препараты.....</b>  | <b>204</b> |
| Выделение кДНК интерферонов.....   | 204        |
| Интерфероны человека, полученные методом генной инженерии .....  | 207        |
| Гормон роста человека, полученный методом генной инженерии.....  | 208        |
| Оптимизация генной экспрессии .....  | 208        |
| <b>Ферменты .....</b>  | <b>209</b> |
| ДНКаза I.....  | 209        |
| Альгинат-лиаза .....   | 209        |
| <b>Моноклональные антитела как лекарственные средства .....</b>  | <b>210</b> |
| Структура и функции антител.....   | 211        |
| Профилактика отторжения трансплантированных органов.....   | 212        |
| Лекарственные вещества, связанные с моноклональными антителами.....  | 212        |
| Моноклональные антитела человека .....   | 214        |
| <b>Полипептид, обладающий действием лейкоцитарного интерферона человека, синтезируется в <i>E. coli</i>. .....</b>   | <b>215</b> |
| Гибридные моноклональные антитела человека и мыши .....  | 215        |
| <b>Производство антител с помощью <i>E. coli</i> .....</b>   | <b>218</b> |
| <b>Лекарственные средства против ВИЧ .....</b>   | <b>222</b> |
| <b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>  | <b>224</b> |
| <b>ЛИТЕРАТУРА .....</b>  | <b>224</b> |
| <b>КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ .....</b>   | <b>226</b> |
| <b>ГЛАВА 11. Вакцины.....</b>  | <b>227</b> |
| <b>Субъединичные вакцины .....</b>   | <b>228</b> |
| Противогерпетические вакцины .....   | 230        |
| Противоящурные вакцины .....   | 230        |
| Противотуберкулезные вакцины .....   | 231        |
| Пептидные вакцины .....  | 231        |
| Генная иммунизация .....   | 233        |
| <b>Аттенуированные вакцины .....</b>   | <b>234</b> |
| <b>Иммунизация с помощью пептида, синтезированного исходя из данных о нуклеотидной последовательности РНК вируса ящура.....</b>                              | <b>235</b> |
| Противохолерные вакцины .....  | 235        |
| Противосальмонеллезные вакцины .....   | 236        |
| Противолейшманиозные вакцины .....   | 237        |
| <b>«Векторные» вакцины .....</b>   | <b>238</b> |
| Противовирусные вакцины .....  | 238        |
| Противобактериальные вакцины .....   | 242        |
| Бактерии кок системы доставки антигенов.....   | 242        |
| <b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>  | <b>243</b> |
| <b>ЛИТЕРАТУРА .....</b>  | <b>244</b> |
| <b>КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ .....</b>   | <b>246</b> |
| <b>ГЛАВА 12 Использование рекомбинантных микроорганизмов для получения коммерческих продуктов .....</b>  | <b>247</b> |
| <b>Эндонуклеазы рестрикции .....</b>   | <b>247</b> |
| <b>Малые биологические молекулы.....</b>   | <b>250</b> |
| Синтез L-аскорбиновой кислоты .....  | 250        |
| Синтез индиго.....   | 252        |
| Синтез аминокислот.....  | 255        |
| <b>Антибиотики .....</b>   | <b>257</b> |
| Клонирование генов биосинтеза антибиотиков .....   | 259        |
| Синтез новых антибиотиков.....   | 259        |
| Разработка новых методов получения поликетидных антибиотиков .....   | 260        |
| Усовершенствование производства антибиотиков .....   | 263        |
| <b>Получение 2-кето-L-гулоната промежуточного продукта синтеза L- аскорбиновой кислоты — с помощью рекомбинантной бактерии <i>Erwinia herbicola</i>.....</b> | <b>265</b> |
| <b>Биополимеры .....</b>   | <b>266</b> |
| Создание рекомбинантной бактерии <i>Xanthomonas campestris</i> с целью получения ксантановой слизи .....   | 266        |
| Выделение генов биосинтеза меланина .....  | 267        |
| Микробиологический синтез животного биополимера с адгезивными свойствами.....  | 268        |
| Микробиологический синтез каучука .....  | 270        |
| Микробиологический синтез полигидроксиканоатов .....   | 270        |
| <b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>  | <b>272</b> |
| <b>ЛИТЕРАТУРА .....</b>  | <b>272</b> |
| <b>КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ .....</b>   | <b>274</b> |
| <b>ГЛАВА 13. Биodeградация токсичных соединений и утилизация биомассы .....</b>  | <b>275</b> |
| <b>Деградация ксенобиотиков с помощью микроорганизмов.....</b>   | <b>275</b> |
| <b>Метаболические пути биodeградации ксенобиотиков, созданные методами генной инженерии.....</b>   | <b>276</b> |

|   |            |
|---|------------|
| Перенос плазмид .....   | 276        |
| Изменение генов .....   | 281        |
| <b>Утилизация крахмала и сахаров .....</b>  | <b>286</b> |
| Промышленное производство фруктозы и этанола .....  | 287        |
| <b>Получение мультиплазмидных микроорганизмов, способных утилизировать несколько соединений .....</b>                             | <b>289</b> |
| Повышение эффективности производства фруктозы и этанола .....   | 289        |
| <i>Zymomonas mobilis</i> .....  | 292        |
| Получение силоса .....  | 294        |
| <b>Утилизация целлюлозы .....</b>   | <b>294</b> |
| Компоненты лигноцеллюлозы .....   | 294        |
| Выделение прокариотических целлюлозных генов .....  | 296        |
| Выделение эукариотических целлюлазных генов .....   | 298        |
| Манипуляции с целлюлозными генами .....   | 300        |
| <b>Белок одноклеточных организмов.....</b>  | <b>301</b> |
| <b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>   | <b>302</b> |
| <b>ЛИТЕРАТУРА .....</b>   | <b>303</b> |
| <b>КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ .....</b>  | <b>305</b> |
| <b>ГЛАВА 14. Бактерии, стимулирующие рост растений.....</b>   | <b>306</b> |
| Фиксация азота.....   | 306        |
| Нитрогеназа.....  | 308        |
| Компоненты .....  | 308        |
| Генная инженерия кластера генов нитрогеназы.....  | 310        |
| Гидрогеназа .....   | 313        |
| Метаболизм водорода .....   | 313        |
| Модификация генов гидрогеназ.....   | 314        |
| Образование клубеньков .....  | 316        |
| Конкуренция среди организмов, образующих клубеньки .....  | 316        |
| Манипуляции с генами образования клубеньков.....  | 316        |
| Идентификация генов образования клубеньков <i>Rhizobium meliloti</i> путем прямой комплементации Nod <sup>+</sup> -мутантов ..... | 319        |
| Биоконтроль патогенных микроорганизмов .....  | 320        |
| Сидерофоры .....  | 321        |
| Антибиотики.....  | 322        |
| Ферменты .....  | 323        |
| Образование кристаллов льда и антифризные белки.....  | 325        |
| Стимуляция роста растений свободноживущими бактериями.....  | 326        |
| <b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>   | <b>327</b> |
| <b>ЛИТЕРАТУРА .....</b>   | <b>328</b> |
| <b>КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ .....</b>  | <b>330</b> |
| <b>ГЛАВА 15. Микробные инсектициды .....</b>  | <b>331</b> |
| Токсин, синтезируемый <i>Bacillus thuringiensis</i> .....   | 332        |
| Механизм действия и использование .....   | 332        |
| Идентификация генов токсинов.....   | 335        |
| Генная инженерия генов токсинов <i>B. thuringiensis</i> .....   | 336        |
| Клонирование и экспрессия гена, кодирующего токсин <i>Bacillus thuringiensis</i> , в <i>Escherichia coli</i> .....                | 338        |
| Бакуловирусы как инструмент биоконтроля .....   | 342        |
| Механизм действия .....   | 342        |
| Усиление биоконтроля с помощью генной инженерии.....  | 343        |
| <b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>   | <b>344</b> |
| <b>ЛИТЕРАТУРА .....</b>   | <b>345</b> |
| <b>КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ .....</b>  | <b>347</b> |
| <b>ГЛАВА 16. Промышленный синтез белков при участии рекомбинантных микроорганизмов .....</b>                                      | <b>349</b> |
| Рост микроорганизмов .....  | 350        |
| Периодическая культура.....   | 351        |
| Периодическая культура с добавлением субстрата .....  | 352        |
| Непрерывная культура.....   | 353        |
| Повышение эффективности ферментации.....  | 354        |
| Экспрессия гена гемоглобина стимулирует синтез белка в <i>E. coli</i> в условиях недостатка кислорода .....                       | 355        |
| Культуры с высокой плотностью.....  | 356        |
| Биореакторы .....   | 357        |
| Типичные крупномасштабные системы ферментации .....   | 359        |
| Двухступенчатая ферментация в тандемных эрлифтных биореакторах .....  | 360        |
| Двухступенчатая ферментация в одном реакторе с механическим перемешиванием.....   | 362        |
| Периодическая ферментация и периодическая ферментация с добавлением субстрата .....   | 363        |
| Сбор клеток .....   | 363        |
| Разрушение клеток .....   | 365        |
| Дальнейшая обработка .....  | 366        |
| Солюбилизация белков.....   | 367        |
| <b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>   | <b>367</b> |
| <b>ЛИТЕРАТУРА .....</b>   | <b>368</b> |
| <b>КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ .....</b>  | <b>369</b> |
| <b>ЧАСТЬ III. Эукариотические системы .....</b>   | <b>371</b> |
| <b>ГЛАВА 17. Генная инженерия растений: методология.....</b>  | <b>373</b> |
| Трансформация растений Ti-плазмидой из <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....   | 373        |
| Грамотрицательная почвенная бактерия.....   | 373        |
| Векторные системы на основе Ti-плазмид.....   | 377        |
| Физические методы переноса генов в растительные клетки .....  | 379        |
| Бомбардировка микрочастицами .....  | 380        |



|   |     |
|---|-----|
| Применение репортерных генов при трансформации клеток растений .....  | 381 |
| Эксперименты по экспрессии чужеродных генов в растениях .....   | 382 |
| Регенерация жизнеспособных фертильных растений, синтезирующих октопинсинтазу, из<br>корончатого галла табака после делеции генов, контролирующего образование опухоли ..... | 383 |
| Выделение различных промоторов и их использование .....   | 383 |
| Введение чужеродных генов в хлоропластную ДНК .....   | 384 |
| Получение трансгенных растений, не содержащих маркерных генов .....   | 386 |
| <b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b> .....   | 386 |
| <b>ЛИТЕРАТУРА</b> .....   | 387 |
| <b>КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ</b> .....  | 388 |
| <b>ГЛАВА 18. Генная инженерия растений: применение</b> .....  | 389 |
| Выведение растений, устойчивых к насекомым-вредителям, вирусам и гербицидам .....   | 389 |
| Растения, устойчивые к насекомым-вредителям .....   | 389 |
| Растения, устойчивые к вирусам .....  | 395 |
| Растения, устойчивые к гербицидам .....   | 400 |
| Растения, устойчивые к грибам и бактериям .....   | 401 |
| Светоиндуцируемая экспрессия химерного гена, введенного в <i>Nicotiana tabacum</i> с помощью<br>Ti-плазмидного вектора .....  | 403 |
| Получение растений, противостоящих неблагоприятным воздействиям и старению .....  | 403 |
| Окислительный стресс .....  | 403 |
| Солевой стресс .....  | 404 |
| Созревание плодов .....   | 405 |
| Изменение окраски цветков .....   | 406 |
| Изменение пищевой ценности растений .....   | 407 |
| Аминокислоты .....  | 408 |
| Липиды .....  | 408 |
| Изменение вкуса и внешнего вида плодов .....  | 410 |
| Изменение внешнего вида .....   | 410 |
| Изменение вкуса .....   | 411 |
| Растения как биореакторы .....  | 412 |
| Антитела .....  | 412 |
| Полимеры .....  | 412 |
| Чужеродные белки, накапливающиеся в семенах .....   | 413 |
| <b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b> .....   | 413 |
| <b>ЛИТЕРАТУРА</b> .....   | 413 |
| <b>КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ</b> .....  | 416 |
| <b>ГЛАВА 19. Трансгенные животные</b> .....   | 418 |
| Трансгенные мыши: методология .....   | 419 |
| Использование ретровирусных векторов .....  | 419 |
| Метод микроинъекции ДНК .....   | 420 |
| Использование модифицированных эмбриональных стволовых клеток .....   | 422 |
| Клонирование с помощью переноса ядра .....  | 426 |
| Генетическая трансформация эмбрионов мыши микроинъекцией очищенной ДНК .....  | 428 |
| Экспрессия гена тимидинкиназы вируса простого герпеса в соматических клетках мыши<br>после инъекции рекомбинантного гена в яйцеклетки .....                                 | 428 |
| Перенос генов с помощью искусственных дрожжевых хромосом .....  | 428 |
| Трансгенные мыши: применение .....  | 430 |
| Трансгенный крупный рогатый скот .....  | 433 |
| Трансгенные овцы, козы и свиньи .....   | 435 |
| Трансгенные птицы .....   | 436 |
| Трансгенные рыбы .....  | 438 |
| <b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b> .....   | 439 |
| <b>ЛИТЕРАТУРА</b> .....   | 439 |
| <b>КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ</b> .....  | 441 |
| <b>ГЛАВА 20. Молекулярная генетика человека</b> .....   | 442 |
| Генетическое сцепление и картирование генов .....   | 444 |
| Обнаружение и оценка генетического сцепления у человека .....   | 446 |
| Анализ сцепления методом максимального правдоподобия: логарифм соотношения шансов<br>(лод-балл) .....   | 447 |
| Построение генетических карт хромосом человека .....  | 450 |
| Генетический полиморфизм .....  | 450 |
| Полиморфизм длины рестрикционных фрагментов .....   | 451 |
| Полиморфизм коротких tandemных повторов .....   | 454 |
| Картирование локуса генетического заболевания в определенном районе хромосомы .....   | 456 |
| Построение генетической карты сцепления человека с помощью метода, основанного на<br>полиморфизме длины рестрикционных фрагментов .....                                     | 458 |
| Часто встречающиеся типы полиморфизма у человека, которые можно типировать с<br>помощью полимеразной цепной реакции .....   | 458 |
| Построение мультилокусных хромосомных карт человека .....   | 459 |
| Локализация гена заболевания на карте сцепления .....   | 460 |
| Картирование с использованием радиационных гибридов .....   | 460 |
| Физическое картирование генома человека .....   | 462 |
| Построение контигов из YAC-, BAC- и PAC-библиотек .....   | 462 |
| Построение контигов из космидных, P1- и $\lambda$ -библиотек .....  | 463 |
| Транскрипционное картирование .....   | 465 |
| Клонирование генов заболеваний человека .....   | 467 |
| Выявление мутаций в генах человека .....  | 467 |
| Функциональное картирование .....   | 468 |
| Кандидатное картирование .....  | 469 |
| Позиционное картирование .....  | 469 |
| Позиционно-кандидатное картирование .....   | 476 |
| Программа «Геном человека» .....  | 477 |
| <b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b> .....   | 479 |

|   |            |
|---|------------|
| ЛИТЕРАТУРА .....  | 481        |
| КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ .....   | 482        |
| <b>ГЛАВА 21. Генная терапия.....</b>  | <b>483</b> |
| Генная терапия ex vivo .....  | 487        |
| Создание «пакующей» клеточной линии и ее использование для производства хелпер-независимого дефектного ретровируса .....        | 492        |
| Генная терапия in vivo.....   | 493        |
| Вирусные системы доставки генов .....   | 493        |
| Ретровирусные векторы .....   | 493        |
| Аденовирусные векторы.....  | 494        |
| Векторы на основе аденоассоциированных вирусов .....  | 496        |
| Векторы на основе вируса простого герпеса .....   | 496        |
| Невирусные системы доставки генов.....  | 498        |
| Активация предшественника лекарственного вещества («пролекарства»).....   | 503        |
| Лекарственные средства на основе олигонуклеотидов .....   | 503        |
| Синтез «антисмысловых» мРНК in vivo .....   | 504        |
| «Антисмысловые» олигонуклеотиды как лекарственные средства .....  | 506        |
| Олигонуклеотиды, связывающиеся с белками: антитромбиновый аптамер.....  | 508        |
| Рибозимы как лекарственные средства .....   | 508        |
| Коррекция генетических дефектов с помощью олигонуклеотидов .....  | 509        |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....  | 510        |
| ЛИТЕРАТУРА .....  | 511        |
| КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ.....  | 513        |
| <b>ЧАСТЬ IV. Контроль исследований в области молекулярной биотехнологии и патентование биотехнологических изобретений .....</b> | <b>515</b> |
| <b>ГЛАВА 22. Контроль применения биотехнологических методов .....</b>   | <b>517</b> |
| Контроль экспериментов с рекомбинантными ДНК .....  | 518        |
| Контроль за производством и потреблением пищевых продуктов и пищевых добавок.....   | 519        |
| Химозин .....   | 520        |
| Триптофан.....  | 520        |
| Бычий соматотропин.....   | 521        |
| Контролируемое высвобождение генетически модифицированных организмов в окружающую среду .....                                   | 523        |
| Pseudomonas syringae, не образующие кристаллов льда.....  | 523        |
| Открытые полевые испытания других генетически модифицированных организмов .....   | 525        |
| Возможная биологическая угроза, связанная с рекомбинантными ДНК .....   | 526        |
| Генная терапия человека.....  | 526        |
| Политика в области генной терапии соматических клеток .....   | 527        |
| Накопление дефектных генов в будущих поколениях.....  | 528        |
| Генная терапия клеток зародышевой линии .....   | 529        |
| Клонирование человека .....   | 529        |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....  | 530        |
| ЛИТЕРАТУРА .....  | 531        |
| КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ .....   | 532        |
| <b>ГЛАВА 23. Патентование биотехнологических изобретений <sup>1)</sup> .....</b>  | <b>533</b> |
| Общие вопросы патентования изобретений .....  | 534        |
| Патентование изобретений в разных странах .....   | 536        |
| Патентование ДНК-последовательностей .....  | 537        |
| Трансгенные млекопитающие, не относящиеся к человеку.....   | 538        |
| Патентование многоклеточных организмов.....   | 539        |
| Патентование и фундаментальные исследования .....   | 539        |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....  | 541        |
| ЛИТЕРАТУРА .....  | 541        |
| КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ .....   | 542        |
| Словарь терминов .....  | 543        |
| Предметный указатель <sup>1)</sup> .....  | 566        |
| Указатель латинских названий .....  | 582        |
| Оглавление.....   | 584        |
| <b>ЭЛЕКТРОННОЕ ОГЛАВЛЕНИЕ .....</b>   | <b>592</b> |