

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ
ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

О.С. Машкина, А.К. Буторина

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ И БИОБЕЗОПАСНОСТЬ

ИЗБРАННЫЕ ЛЕКЦИИ
по курсу “Генетика с основами селекции”

Учебное пособие

по специальности 011600 – биология

Воронеж
2005

Утверждено научно-методическим советом биолого-почвенного факультета 27 октября 2004 года, протокол № 21

Авторы: Машкина О.С.
Буторина А.К.

Учебное пособие подготовлено на кафедре генетики, селекции и теории эволюции биолого-почвенного факультета Воронежского государственного университета

Рекомендуется для студентов биолого-почвенного факультета дневной, вечерней и заочной формы обучения

ВВЕДЕНИЕ	4
1. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ	5
1.1. Клеточная инженерия	5
1.2. Хромосомная инженерия	7
1.3. Генная инженерия	8
1.3.1. Векторная трансформация. Основные этапы создания трансгенных организмов	10
1.3.1.1. Понятие о векторе. Типы векторов, их конструирование ...	10
1.3.2. Методы переноса генов в клетки различных организмов	17
1.3.3. Клонирование генов	18
2. СОЗДАНИЕ И СКРИНИНГ БАНКА ГЕНОВ	18
2.1. Принципы создания банка генов	19
2.2. Выбор нужного гена из клонотеки (скрининг банка генов) ...	20
3. ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ	24
4. ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ РАСТЕНИЙ	24
4.1. Агробактериальная трансформация	24
4.2. Векторы на основе хлоропластной и митохондриальной ДНК ..	29
4.3. Преимущества и трудности использования растений как объекта для генно-инженерных исследований.. ..	31
4.4. Достижения и перспективы генной инженерии растений	32
4.5. Трансгенные растения в сельском хозяйстве	38
5. ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ ЖИВОТНЫХ	41
5.1. Основные направления и достижения генной инженерии животных	41
5.2. Способы создания трансгенных животных	45
5.3. Клонирование животных	48
6. МЕДИЦИНСКИЕ АСПЕКТЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ ЧЕЛОВЕКА	52
6.1. Генодиагностика	53
6.2. Генная терапия ,	54
6.3. Методы генной терапии	56
6.4. Примеры практического применения генной терапии	58
7. ПРОБЛЕМЫ БИОБЕЗОПАСНОСТИ ТРАНСГЕННЫХ ОРГАНИЗМОВ	61
7.1. Понятие о биобезопасности. Природа рисков для здоровья человека и окружающей среды, связанных с использованием трансгенных организмов, методы их оценки и способы предупреждения	61
7.2. Государственное регулирование безопасности генно- инженерной деятельности в России	67
РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА	69

ВВЕДЕНИЕ

Генетическая инженерия – наиболее перспективное направление современной генетики, имеющее важное научное и практическое значение.

В работах по генетической инженерии используются как методы классической генетики, так и самые современные более тонкие методы молекулярной генетики (такие как выделение и идентификация генов, их секвенирование, картирование, химический и ферментативный синтез, генный нокаут, гибридизация нуклеиновых кислот, генная дактилоскопия и др.). В пособии дается подробное описание некоторых из них.

Генетическая инженерия, как известно, высокотехнологичный процесс, основанный на фундаментальных научных знаниях, требующий высококвалифицированных кадров и мощной научно-технической базы. Поэтому будущим специалистам в качестве основы для проведения исследований по генетической инженерии необходимо иметь представление об основных этапах создания трансгенных организмов, принципах конструирования рекДНК, знать процедуры по созданию и скринингу банков генов как источников для получения и изучения функций желаемых для переноса генов. С этими вопросами они могут ознакомиться в данном пособии.

В практическом отношении генетическая инженерия стала одним из наиболее эффективных методов селекции растений, позволяющим существенно сократить сроки создания новых перспективных сортов и получать их направленно путем непосредственного внедрения в растения желаемых генов, минуя процесс гибридизации. Методы генетической инженерии стали незаменимыми в фармакологии. Они позволили получать ценные лекарственные препараты, используя живые организмы в качестве биореакторов. Генно-инженерные методы находят все более широкое применение в медицине, став основой генотерапии (лечения генами), позволившей излечивать многие ранее неизлечимые наследственные заболевания.

В данном учебном пособии можно найти подробное описание примеров и методов клеточной, хромосомной и генной инженерии у микроорганизмов, растений, животных и человека.

Исследования по генной инженерии проводятся в научных лабораториях и крупных фирмах в нашей стране и за рубежом достаточно широко, поэтому специалисты в этой области являются востребованными. Это послужило основанием для выделения темы по генетической инженерии в самостоятельное пособие, чтобы студенты имели возможность самостоятельно подробнее и глубже ознакомиться с ней, поскольку время, отведенное для ее освещения в лекционном курсе, “Генетика с основами селекции” ограничено.

При написании пособия учитывалось также то, что поступление в торговую сеть многих генетически модифицированных продуктов вызывает озабоченность общественности. Поэтому в пособие был включен раздел по биобезопасности в связи с получением и использованием генетически модифицированных организмов. Отмечается, что во всех государствах, где

проводятся исследования по генетической инженерии, приняты соответствующие законы и другие государственные акты, создающие нормативно-правовую базу для проведения таких исследований. По Российской Федерации указана документация, регламентирующая получение и использование генетически модифицированных продуктов. Это особенно важно, т.к. такая информация в рекомендуемой студентам современной научной литературе полностью отсутствует.

При написании данного пособия была использована новейшая литература по теме, в том числе и та, что мало доступна широкому кругу читателей. Поэтому данное пособие может представлять интерес для студентов-биологов, аспирантов, научных сотрудников, выполняющих исследования по генетической инженерии, преподавателей, а также для всех желающих пополнить свои знания по этой животрепещущей проблеме современной науки.

1. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Генетическая инженерия – совокупность методов создания живых генетически измененных организмов, включающих чужеродный генетический материал.

Чаще всего генетическую инженерию отождествляют с генной инженерией, когда проводятся манипуляции на уровне ДНК. В этом случае осуществляют создание генетически измененных организмов в результате целенаправленного переноса в них чужеродных генов, кодирующих нужные человеку признаки и свойства. В более широком плане под генетической инженерией понимают и клеточную, и хромосомную, и генную инженерию, то есть генетическая инженерия включает оперирование (манипулирование) не только генами, но и более крупными частями генома.

1.1. КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Примером клеточной инженерии у животных является получение *моноклональных антител* на основе выращивания *гибридом*. *Гибридома* – клеточный гибрид, полученный в результате парасексуальной (или соматической) гибридизации. Парасексуальная гибридизация или парасексуальный процесс – это формирование клеток-потомков более, чем от одного родителя, в обход мейоза и оплодотворения; часто встречается у грибов. *Гибридому* получают путем слияния нормальной антителообразующей клетки иммунной системы (лимфоцита) с миеломной опухолевой клеткой. Дело в том, что В-лимфоциты (В-клетки), синтезирующие антитела, не могут воспроизводиться и расти в культуре. Гибридома обладает способностью к синтезу моноклональных антител и к неограниченному росту на искусственной питательной среде, так как объединяет в себе свойства нормальных клеток иммунной системы вырабатывать специфические антитела в ответ на введение определенного антигена (вещества, которое восприни-

мается организмом как чужеродное и вызывающее специфический иммунный ответ) и способность раковых клеток неограниченно долго делиться в культуре. Гибридомы используют как эффективное, хотя и очень дорогое средство против рака, а также для изготовления вакцин, например, против ящура крупного рогатого скота, овец и свиней. Этот энтеровирус представляет опасность и для человека. В странах третьего мира ящур представляет эндемическую болезнь, приносящую огромный экономический ущерб. Для получения вакцины используется клонированное белковое анти тело этого вируса.

Гибридизация соматических клеток животных используется как метод генетического анализа для картирования генов, определения их функций. С этой целью, например, проводят гибридизацию клеток человека и мыши, человека и хомячка и др.

Примером генетической инженерии на клеточном и связанном с ним организменном уровнях является получение так называемых *аллофенных мышей*, то есть мышей, содержащих генотипически различные ткани, полученные от разных родителей. Для этого эмбрионы черных и белых мышей, достигшие стадии восьми бластомеров, извлекали из матки самки и с помощью определенного фермента разбивали на отдельные бластомеры. Сливая бластомеры от двух или более зародышей, создавали единый комплексный эмбрион. Такие эмбрионы на стадии гастрюлы вводили в матку мыши, у которой рождались мышата с тканями белого и черного цвета.

Примером клеточной инженерии у растений является получение соматических (парасексуальных) гибридов путем слияния протопластов (клеток, лишенных клеточной стенки) различных видов и родов. Такой подход позволяет соединить в гибридной клетке генетическую информацию ядра и цитоплазмы далеких в систематическом отношении организмов; получать формы растений, которые не существуют в природе или которые трудно получить половым путем. Соматическая гибридизация - способ введения важных цитоплазматических генов, находящихся в мтДНК (например, генов цитоплазматической мужской стерильности) и хлДНК (например, генов устойчивости к гербицидам, патогенам). Соматические гибриды принципиально отличаются от половых. Первые наследуют внеядерные гены от обоих родительских растений, вторые – только по материнской линии. В результате слияния протопластов можно получить генетически разнообразные гибридные формы: растения, гетерозиготные по внеядерным генам, что в свою очередь обуславливает возможность получения растений с различными комбинациями цитоплазматических генов; гибриды, содержащие ядро одного из родителей и цитоплазму обоих родителей; растения с пластомом одного родителя и митохондрионом другого. Кроме этого, в результате полной или частичной элиминации хромосом одного из родителей у отдаленных соматических гибридов может наблюдаться большое генетическое разнообразие, обусловленное ядерными генами. Методом соматической гибридизации получены гибриды между культурным и диким картофелем, картофелем и томатом, арабидопсисом и

турнепсом, турнепсом и капустой, пшеницей и ячменем, рисом и просом и др.

1.2. ХРОМОСОМНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Использование метода хромосомной инженерии в опытах В.А. Струнникова (1971) имело важное теоретическое и практическое значение. С помощью рентгеновского облучения В.А. Струнников сумел перенести на половую W-хромосому самки (WZ) тутового шелкопряда участок аутосомы (10-й хромосомы) с геном, обуславливающим темную окраску кокона (то есть путем транслокации). Ген, обуславливающий темную окраску, наследовался по женской линии и женские гены всегда были темные. Самцы (ZZ) и самки (WZ) в результате развивались из грен с разной окраской, что позволило отбирать самцов для промышленного выращивания, так как они образуют коконы на 25 % продуктивнее, чем самки, что давало соответственно больший выход шелка.

Примером хромосомной инженерии является также получение организмов с замещенными хромосомами. В этом случае осуществляют замещение целых хромосом или отдельных фрагментов. Такой подход представляет большой интерес с точки зрения улучшения существующих сортов сельскохозяйственных растений, которые несут комплексы генов, определяющих нежелательные признаки. Для замещения хромосом, несущих такие гены, необходимо предварительно создать серии *моносомиков* и *нуллисомиков* лучших сортов. Организмы, в диплоидном наборе которых отсутствует одна хромосома ($2n-1$), называются *моносомиками*, пара гомологичных хромосом ($2n-2$) – *нуллисомиками*. В США, например, серия моносомиков получена для сорта пшеницы Чайниз Спринг Сирсом, а в России для сорта пшеницы Безостая 1 – О.И. Майстренко и сорта Саратовская 29 – под руководством В.К. Шумного. Путем бекроссов с моносомиками стандартного сорта в течение шести – семи поколений можно получить моносомик по хромосоме, намеченной для замещения. Затем, проведя самоопыление, отбирают дисомные растения с двумя замещенными хромосомами. Вся работа проводится при строжайшем цитологическом контроле. На базе моносомиков осуществлены также межвидовые и межродовые переносы хромосом. Особый интерес представляет получение у замещенных линий транслокаций между хромосомами пшеницы и ее далеких родственных видов. Таким образом Сирс, например, осуществил передачу устойчивости к листовой ржавчине сорту Чайниз Спринг от эгилопса *Aegilops umbellulata*. Сходным образом пшенице были переданы сегменты хромосомы ржи и пырея, несущие гены устойчивости к стеблевой ржавчине и твердой головне. Известные русские сорта озимой пшеницы Аврора и Кавказ содержат транслоцированный сегмент хромосомы ржи в хромосоме пшеницы. В Новосибирском институте цитологии и генетики СО РАН путем замещения отдельных хромосом мягкой пшеницы хромосомами ржи получены формы пшеницы с более высоким содержанием белка в зерне, устойчивые к засолению, различным видам заболеваний.

Примером рестриктаз, образующих “липкие концы”, являются широко используемые в генно-инженерных работах ферменты бактериального происхождения - *EcoRI* (присутствует у *E.coli*) и *BamHI* (обнаружена в клетках *Bacillus amyloliquefaciens*). Например, *EcoRI* распознает последовательность из 6 нуклеотидов (GAATTC), делая ступенчатые разрезы между нуклеотидами G и A (рисунок 1), *HaeIII* – узнает 4 нуклеотида (GGCC), делая прямые разрезы и образуя “тупые” концы. Для соединения “тупых” концов к ним ферментативным путем присоединяют “липкие” концы. Ферменты рестрикции обозначают по названию организмов, из которых они изолированы. Используют три буквы из названия вида бактерии, например, *EcoRI* из *E.coli*, *HindIII* – из *Haemophilus influenzae*, *HaeIII* – из *Haemophilus aegyptius* и т.д. После трех букв курсивом следуют определенный буквенный символ, обозначающий генетическую линию или штамм, и римская цифра. В настоящее время известно более 400 рестриктаз, способных расщеплять ДНК в различных сайтах.

Формальной датой рождения генной инженерии считают 1972 г., когда группа Берга в США создала первую рекомбинантную молекулу ДНК (рекДНК), объединившую в своем составе генетический материал из трех источников: полный геном онкогенного вируса обезьян *SV40*, часть генома умеренного бактериофага λ и гены лактозного оперона *E. coli*. Сконструированная рекомбинантная молекула не была исследована функционально, так как у авторов этой работы возникли опасения, что методы генетической инженерии могут привести к возникновению микроорганизмов, опасных для здоровья человека, например бактерий *E. coli*, способных перенести онкогенные вирусы в кишечник человека. Поэтому международным научным сообществом было принято решение проводить такие исследования под строжайшим контролем со стороны государства.

Основными задачами, стоящими перед генной инженерией сегодня, являются – борьба с болезнями и производство продовольствия.

Технология переноса в геном растений, животных, микроорганизмов чужеродных генов (*трансгенов* = целевых генов) и их передача в ряду поколений называется *трансгенезом* или *трансгенезом* (от англ. transgenesis). Причем, их направленный перенос может осуществляться между далеко разобщенными в филогенетическом отношении организмами. Например, в геном растения можно встроить гены животных, человека, бактерий, других растений, в результате чего клетки начинают вырабатывать новые продукты (несвойственные данному организму). Организмы, полученные в результате переноса в их геном (с помощью генно-инженерных методов) чужеродных генов, называются *трансгенными* (их еще называют *генетически модифицированными* - ГМ). Это формы с существенно реконструированными геномами. Процесс, в результате которого чужеродная ДНК проникает в реципиентную клетку и вызывает у нее наследуемые изменения, называют *трансформацией*. Трансформацию клеток могут осуществлять как молекулы ДНК, реплицирующиеся в клетках

внехромосомно (плазмиды), так и молекулы ДНК, интегрирующиеся в геном клетки (хромосомы).

Если процесс трансформации у бактерий (то есть перенос генов от одного штамма бактерий к другому) можно осуществить с помощью растворимых фрагментов ДНК, независимо от того, живые клетки или мертвые, то попытки провести трансформацию у эукариот с использованием препаратов тотальной геномной ДНК не привели к ожидаемым результатам. Хотя доказанным примером естественной трансформации у млекопитающих и у человека является внедрение в хромосому клетки-хозяина ДНК онкогенного вируса.

Положительные воспроизводимые экспериментальные результаты у эукариот были получены только с помощью **векторной трансформации**.

1.3.1. Векторная трансформация.

Основные этапы создания трансгенных организмов

Основными этапами создания трансгенных организмов являются следующие:

1. Получение нужного гена (трансгена), намеченного для переноса. Ген может быть выделен из естественных источников (из подходящего генома) или геномной библиотеки. Он может быть синтезирован искусственно: химическим путем (по имеющейся последовательности нуклеотидов) или ферментативным путем с использованием механизма обратной транскрипции (синтез кДНК на матрице мРНК с помощью обратной транскриптазы), получен с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

2. Создание специальных генетических конструкций – векторов (переносчиков), в составе которых гены (трансгены) будут внедряться в геном другого вида или клонированы в клетках про- или эукариот. Клонирование предполагает получением большого числа копий фрагментов ДНК, идентичных исходному.

3. Генетическая трансформация, т.е. перенос и включение генетических векторов (рекДНК) в клетки-мишени хозяина (реципиента).

4. Молекулярная селекция – отбор клонов, несущих рекДНК, что осуществляется с использованием различных маркерных генов, которые находятся в векторной молекуле наряду с трансгеном.

5. Выращивание измененных клеток в целые трансгенные организмы. Рассмотрим подробнее некоторые из этих процедур.

1.3.1.1. Понятие о векторе. Типы векторов, их конструирование

Обязательной генетической конструкцией, используемой в экспериментах по геной инженерии, является *вектор*. *Векторы* – это молекулы ДНК, способные переносить включенные в них чужеродные гены в клетку, где эти молекулы реплицируются автономно или после интеграции с геномом (хромосомой). Т.е. векторы используются в геной инженерии для переноса трансгена от организма-донора в организм-реципиент, а также для клонирования генов. Почему нельзя ввести чужеродный фрагмент ДНК

сразу в клетку эукариот или некоторых бактерий (без вектора)? Это связано с тем, что при обычном введении ДНК в клетку она, как правило, подвергается атаке ферментов, которые разрезают ее на отдельные фрагменты. Для того, чтобы рекДНК стала составной частью генетического аппарата клетки, она должна либо встроиться в ее геном (интегрировать в хромосому) и реплицироваться за его счет, либо быть способной к автономной репликации.

Вектор должен обладать следующими свойствами.

1. Способность к автономной (т.е. независимо от хромосомы реципиента) репликации в клетке реципиента. Например, для репликации в клетке бактерии, вектор должен содержать сайт *ori* (участок инициации репликации).

2. Наличие сайта, в котором возможно встраивание желаемого фрагмента ДНК. Для этого вектор должен содержать один, или самое большое - два участка (сайта рестрикции), чувствительных к определенной рестриктазе, которая расщепляет вектор и позволяет встроить желаемый трансген.

3. Наличие одного или нескольких маркерных генов, благодаря которым клетка-реципиент будет обладать новыми признаками, позволяющими отличить трансформированные клетки (т.е. содержащие рекДНК) от исходных. Это могут быть *селективные гены*, которые придают клеткам селективное преимущество (устойчивость к антибиотикам, гербицидам). Такие гены кодируют ферменты, разрушающие или модифицирующие антибиотики, гербициды. В этом случае трансформанты отбирают на питательных средах с высоким содержанием этих веществ. Например, в присутствии гена лактомазы бактериальная клетка приобретает устойчивость к пенициллину и на среде с этим антибиотиком образует клон (несущий данный ген), тогда как обычные клетки (без этого гена) на данной среде погибают. В качестве маркерных используют и так называемые *репортерные* гены, экспрессия которых не дает селективных преимуществ, но продукты генов удобны для тестирования, например, по изменению окраски. Так, ген *GFP* контролирует синтез зеленого флюоресцирующего белка из медузы. При облучении трансгенных растений, содержащих этот белок, УФ-лучами, появляется зеленое свечение. Гены *luxA* и *luxB*, выделяют из ДНК светлячков. Они контролируют синтез люциферазы, которая обеспечивает переход люциферина из окисленной формы в основную, что и обеспечивает свечение трансгенных растений, накапливающих этот белок. Широко используемым в настоящее время репортерным геном является ген β -глюкоронидазы (*GUS*). Трансгенные клетки, экспрессирующие этот ген, при помещении их на специфический субстрат, окрашиваются в голубой цвет.

4. Кроме того, для того чтобы чужеродный ген экспрессировался, необходимо его поместить под соответствующий промотор. У эукариотических организмов механизм регуляции транскрипции более сложный, чем у эукариот. Регуляторные последовательности эукариотических генов отличаются от прокариотических, и бактериальная РНК-полимераза не узна-

ет их. Поэтому для экспрессии эукариотических генов в клетках прокариот нужно, чтобы гены находились под контролем бактериального промотора (т.е. промотора клетки-хозяина). В качестве промотора широко используется промотор гена β -лактомазы (ген устойчивости к ампициллину), локализованного в векторе pBR322, *lac*-промотор *E. coli* и др.

То есть создается целая генетическая конструкция, в состав которой, помимо трансгена, вводятся маркерные гены и соответствующие регуляторные последовательности.

В качестве векторных молекул могут быть использованы плазмиды бактерий или дрожжей (простых эукариотических организмов), ДНК бактериофагов или вирусов, искусственные хромосомы дрожжей (УАК) и бактерий (ВАК). Созданы также гибридные (искусственные) векторы - космиды, объединяющие преимущества плазмид и фагов.

Плазмиды – внехромосомные генетические элементы про- и эукариот, которые автономно реплицируются в клетке. Природные плазмиды часто содержат гены, полезные для бактерий: придающие устойчивость к антибиотикам, контролирующие способность разрушать различные труднорастворимые токсические соединения (нафталин, камфору, толуол, ксилол, различные пестициды и др.). Благодаря этому, например, бактерии рода *Pseudomonas* существуют в различных экологических нишах, в неблагоприятных условиях окружающей среды, их используют для очистки почвы, воды и загрязнений токсическими соединениями. С плазмидами связана способность ряда почвенных бактерий вступать в симбиоз с бобовыми растениями, обуславливая их способность к образованию корневых клубеньков, необходимых для усвоения почвенного азота. Для генной инженерии большой интерес представляют многокопийные (мультикопийные) плазмиды, которые в клетке представлены большим числом копий (до 10-200 копий на клетку). Используя их, можно достичь сверхсинтеза нужных белковых продуктов. Чаще всего векторы конструируют на основе природных плазмид, удаляя целый ряд лишних генов. Например, широко используемый для этих целей плазмидный вектор *pBR322* создан на основе плазмиды *E. coli*. Плазида *pBR322* имеет сайт *ori* (область, ответственную за репликацию плазмиды), гены устойчивости к антибиотикам ампициллину (*Ap^r*) и тетрациклину (*Tc^r*). В гене *TC^r* имеется уникальный сайт, разрезаемый рестриктазой *Bam HI* (рисунок 2). Для растений используются векторы, сконструированные на основе *Ti*- и *Ri*- плазмид почвенных агробактерий (рисунок 10). Эти бактерии поражают до 60% двудольных растений и некоторые однодольные растения, вызывая формирование опухолей – корончатых галлов (*Agrobacterium tumefaciens*) или образование “косматых” корней (*A. rhizogenes*). В плазмидах можно клонировать фрагменты ДНК размером не более 10 тпн.

Фаговые векторы, чаще всего, создают на базе умеренного бактериофага λ , содержащего двухцепочечную линейную молекулу ДНК (рисунок 3). Левое и правое плечи фага имеют все гены, необходимые для

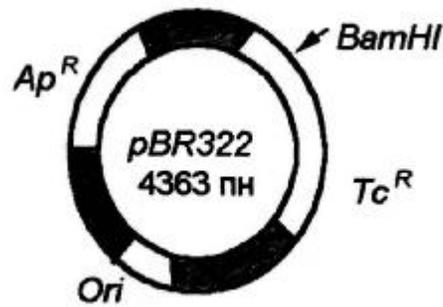


Рисунок 2. Схема строения плазмиды *pBR322*

Селективные маркерные гены, определяющие устойчивость к антибиотикам: ампициллину (Ap^R) и тетрациклину (Tc^R); В гене Tc^R имеется уникальный сайт, разрезаемый рестриктазой *Bam*HI; *Ori* – участок ДНК, ответственный за репликацию плазмиды в клетках *E. coli*.

литического цикла (репликации, размножения). Средняя же часть генома бактериофага λ (содержащая гены, контролирующие лизогению, т.е. его интеграцию в ДНК бактерии-хозяина) не существенна для его размножения и около 50% (≈ 25 тпн) может быть заменена на чужеродный фрагмент ДНК. Такие модифицированные фаги проходят литический цикл, но лизогения не происходит. Векторы на основе бактериофага λ используют для клонирования фрагментов ДНК эукариот (т.е. более крупных генов) размером до 23 тпн. Причем, фаги без вставок (< 38 тпн) или, напротив, со слишком большими вставками (> 52 тпн) не развиваются и не поражают бактерии.

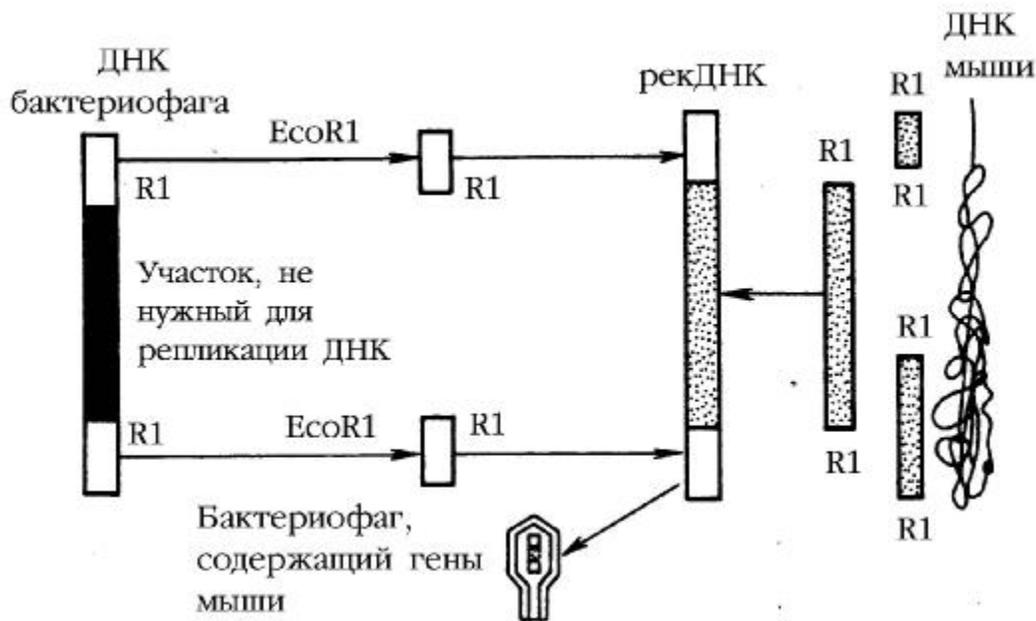


Рисунок 3. Структура вектора, созданного на основе ДНК бактериофага λ [Шевелуха, 2003]

Космида – это векторная плаزمида, предназначенная для клонирования больших фрагментов ДНК эукариот (до 45 тпн) в клетках *E. coli*. Термин обозначает, что вектор является плазмидой, внутри которой вставлен *cos*-участок фага λ (*cos-sites*), представляющий собой нуклеотидную последовательность, отвечающую за упаковку фаговой ДНК в ее протеиновую капсулу (рисунок 4). Как следствие и плазмидная ДНК, включающая чужеродные гены, может быть упакована в космидах в протеиновую капсулу бактериофага.



Рисунок 4. Схема строения зрелого бактериофага λ .

Линейная двухцепочечная ДНК бактериофага λ состоит примерно из 50 тпн. На концах ДНК имеются *cos*-участки, отвечающую за упаковку фаговой ДНК в ее протеиновую капсулу.

Зачастую полноразмерные гены и мультигенные комплексы (≥ 100 тпн) эукариот слишком велики для встраивания в обычные векторы. Для переноса крупных трансгенов и их клонирования используют *искусственные хромосомы дрожжей* (YAC- яки от англ. *yeast artificial chromosomes*), вмещающие фрагменты геномной ДНК длиной от 100 тпн до 1 млн пн. Для их создания к плазмиде дрожжей “пришивают” центромерные (*SEN*) последовательности, теломеры (концевые последовательности), последовательности для автономной репликации (*ARS*) в дрожжевой клетке, сайты рестрикции и селективные маркеры (*TRP1* и *URA3* - независимость от наличия триптофана и урацила соответственно).

Челночные векторы. Это векторы (сконструированные на основе плазмидной ДНК), способные реплицироваться в клетках двух и более организмов. Например, плазмида *YEp24* способна размножаться в клетках дрожжей и *E. coli*. В этом случае векторы имеют специфические нуклеотидные последовательности (специфичные для дрожжей и *E. coli*), позволяющие реплицироваться или в бактерии, или в дрожжевой клетке. С помощью челночного вектора удалось ввести гены лейкоцитарного интерферона человека в клетки дрожжей. Сконструирован штамм дрожжей, который выделяет в культуральную среду почти чистые α -, β - и γ -интерфероны. Интерферон – ценный лекарственный препарат, широко ис –

пользуемый для борьбы с вирусными инфекциями и другими заболеваниями, включая злокачественные опухоли.

Типичная схема опыта по генетической инженерии представлена на рисунках 5 и 6. Эксперимент включает следующие этапы.

1,2. Для конструирования рекомбинантной ДНК (рекДНК) векторную ДНК (например, плазмиду) и чужеродную ДНК, содержащую интересный нас ген (трансген), разрезают одной и той же рестриктазой. Образуются одинаковые “липкие” концы (рисунок 5). К генам, синтезированным химическим путем или полученным по матрице их мРНК, такие “липкие” концы можно пришить искусственно.

3. Смешивание различных по происхождению фрагментов ДНК и сшивание их ДНК-лигазой. Липкие концы чужеродной ДНК и плазмиды взаимодействуют друг с другом, образуя комплементарные пары оснований. Происходит гибридизация векторной и чужеродной ДНК. “Липкие” концы замыкаются с помощью водородных связей, а ковалентные сшивают с помощью фермента ДНК-лигазы.

4. Генетическая трансформация, т.е. перенос и включение рекДНК, содержащей трансген, в клетки реципиента (например, *E. coli*). Плазида, встроенная в бактерию, ведет себя как вектор (переносчик) нового гена, который реплицируется в каждом новом поколении.

5. Молекулярная селекция – отбор трансформантов, т.е. клонов, несущих рекДНК. В процессе генетической трансформации *E. coli* могут образоваться 3 типа клеток: не содержащие плазмиду, содержащие плазмиду без встройки (без рекДНК), содержащие плазмиду с рекДНК. Для отбора трансформантов среди нетрансформированных клеток используют различные маркерные гены, которые находятся в векторной молекуле наряду с трансгеном.

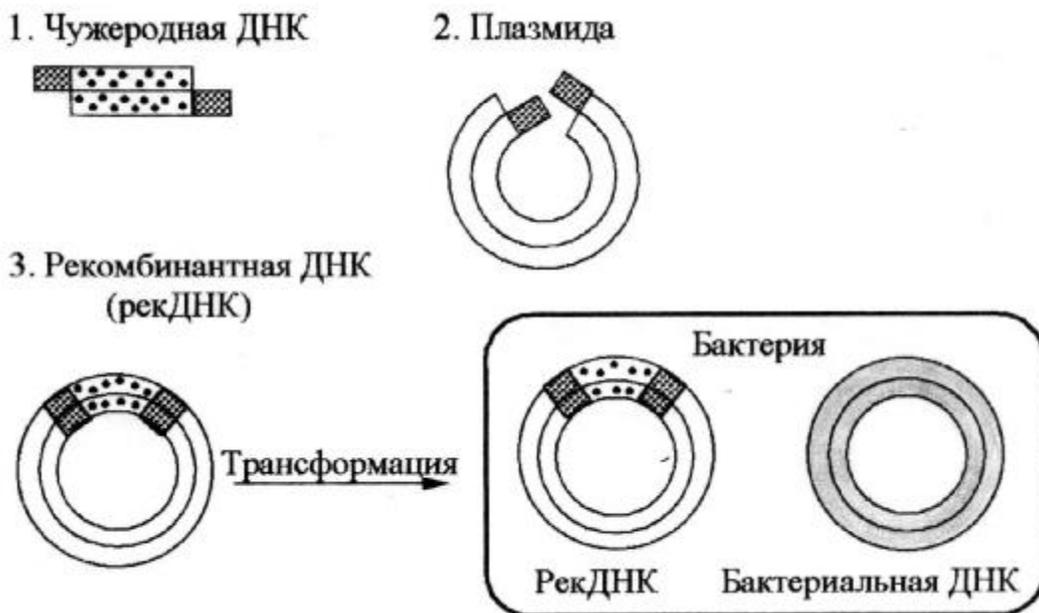


Рисунок 5. Схема опыта по генетической инженерии (конструирование рекДНК)

Так, плазмида *pBR322* имеет два гена устойчивости к антибиотикам ампициллину (Ap^R) и тетрациклину (Tc^R). Один из них служит для идентификации бактерий, несущих плазмиду (вектор) путем отбора клеток, устойчивых к антибиотику, а другой – для отличия гибридной плазмиды (рекДНК) от родительского вектора. В гене Tc^R имеется уникальный сайт, разрезаемый рестриктазой *Bam*HI (рисунок 6). Предположим, мы разреза-

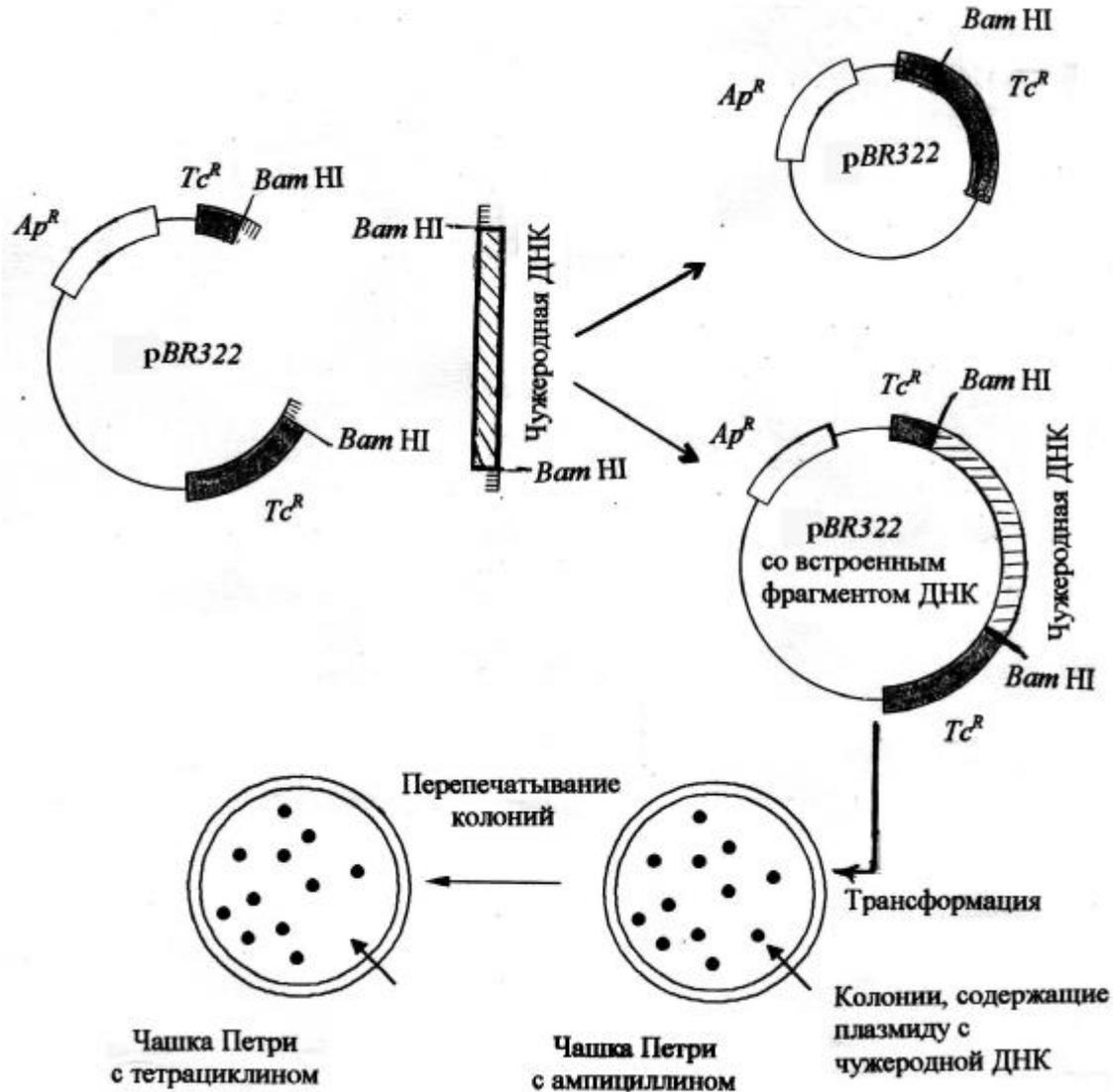


Рисунок 6. Схема интеграции чужеродной ДНК в плазмиду *pBR322* и отбор трансформированных клонов *E. coli*, содержащих плазмиду с рекДНК [Айала, 1987], (пояснение в тексте)

ли вектор в гене Tc^R рестриктазой *Bam*HI и встроили в него фрагмент чужеродной ДНК, полученный при помощи той же рестриктазы. Ген Tc^R инактивируется, следовательно, у бактерий, несущих плазмиду, исчезает устойчивость к тетрациклину, но сохраняется устойчивость к ампициллину. Отбор на среде с ампициллином покажет, содержит ли *E. coli* плазмиду или нет. Содержащие плазмиду бактерии будут расти на среде с ампициллином. Для отбора клеток, несущих чужеродную ДНК (интересующий нас

ген), бактерии выращивают на среде с тетрациклином. Трансформированные клетки устойчивы к ампициллину, но чувствительны к тетрациклину (такие колонии отсутствуют на среде с тетрациклином), т.к. ген устойчивости к тетрациклину разрушен в результате инсерции фрагмента чужеродной ДНК. Стрелкой на рисунке 6 отмечены колонии - трансформанты, которые собирают для опытов с ампициллинового газона.

1.3.2. Методы переноса генов в клетки различных организмов

Известны многочисленные методы, с помощью которых можно внедрить чужеродную ДНК в геном различных организмов.

В качестве реципиентов, в геном которых встраиваются чужеродные гены, используют клетки культуры, эмбриональные клетки млекопитающих, некоторых растений, дрозиды, протопласты млекопитающих, у растений – протопласты, изолированные клетки и ткани, микроспоры, незрелые зиготические зародыши, проростки. Трансформация экзогенной ДНК может осуществляться либо в культуре клеток (*in vitro=ex vivo*), либо непосредственно в организме (*in vivo*).

- Микроинъекция. С помощью тонких микроигл и микроманипулятора в клетку или прямо в ядро вводится векторная ДНК с включенным в нее трансгеном. С помощью микроинъекций осуществляется трансформация у дрозиды, растений.

- Электропорация. Растительные протопласты или животные клетки обрабатывают импульсами электрического поля высокого напряжения, что обратимо увеличивает проницаемость биомембран. Через образующиеся на короткое время поры чужеродная ДНК проникает в клетку.

- Перенос ДНК в составе липосом. Липосомы – это искусственно созданные сферические образования, оболочка которых состоит из фосфолипидов. Липосомы, содержащие внутри трансформирующую ДНК, способны непосредственно сливаться с мембраной клетки или поглощаться клетками в результате процесса, подобного эндоцитозу. В клетке происходит разрушение оболочки липосом и высвобождение рекДНК. Это один из методов, используемый для защиты трансформирующего генетического материала от разрушительного действия нуклеаз, присутствующих вне клеток. Метод применяется для введения нуклеиновых кислот в культивируемые животные клетки, растительные протопласты.

- Бомбардировка микропулями (баллистическая трансформация). Это один из самых эффективных методов трансформации однодольных и хвойных растений (в которые не удастся ввести чужеродную ДНК с помощью агробактерий), а также трансформации животных клеток. Таким путем проводят генотерапию (т.е. исправление наследственных дефектов путем введения в геном полноценных генов) у животных и человека. Для “обстрела” тканей используются частицы из золота или вольфрама размером 0,6-3 мкм, на которые наносится ДНК вектора, содержащий трансген. Этими частицами (“микропулями”) заряжают “генные” пушки. Микропули разгоняются в установке под действием электрического разряда или под

давлением газа гелия. При достаточной скорости эти частицы могут непосредственно проникать в ядро, что сильно повышает эффективность трансформации. Этим же методом можно трансформировать и другие ДНК-содержащие органеллы – хлоропласты и митохондрии.

Для многих двудольных растений эффективна векторная трансформация на основе *Ti*- и *Ri*- плазмид с помощью агробактерий. Эффективными переносчиками ДНК в клетки млекопитающих являются “природные шприцы” – вирусы.

1.3.3. Клонирование генов

Клонирование генов проводят с целью получения того или иного фрагмента ДНК в большом количестве. Этот процесс необходим для получения многочисленных копий желаемых генов. Клонирование ДНК возможно благодаря способности бактериальных плазмид и фагов продолжать нормальное функционирование после встраивания в их геном чужеродной ДНК. Поскольку встроенные в геном чужеродные последовательности ДНК не влияют на свойства химерных штаммов бактерий, практически любая последовательность ДНК может быть клонирована таким образом. Для клонирования плазмиду, содержащую рекДНК, вводят в клетки бактерии (например, *E. coli*) или дрожжей, где происходит ее многократная репликация. Для клонирования небольших фрагментов ДНК используют плазмиды, фаговые ДНК, а для крупных - космиды и искусственные хромосомы. Клонирование рекомбинантных молекул с генами человека или животных в клетках бактерий дает возможность в условиях микробиологического синтеза получать большое количество нужных белков. Так, искусственно синтезированный человеческий ген инсулина введен в бактерию, что дало возможность получать человеческий инсулин (гормон, широко используемый в медицине при лечении сахарного диабета) в промышленных количествах. Раньше для лечения сахарного диабета использовали инсулин животного происхождения, получаемый из поджелудочной железы крупного рогатого скота. В 1979 г. из 60 млн. больных диабетом во всем мире только 4 млн. получали этот гормональный препарат. Однако, у 5% возникали аллергические реакции, обусловленные антигенной несовместимостью гормона и клеток человека, т.е. такие больные были обречены на гибель. Кишечная палочка со встроенным геном инсулина синтезирует в культуре до 200 г инсулина на 1 литр культуральной среды, что эквивалентно количеству инсулина, выделенному из 1600 кг поджелудочной железы коровы или свиньи и не вызывает аллергии. Природные штаммы бактерий инсулин никогда не продуцировали.

2. СОЗДАНИЕ И СКРИНИНГ БАНКА ГЕНОВ

Как уже отмечалось, выделение (получение) нужного гена (трансгена), намеченного для переноса – один из главных этапов в генетической инженерии. Ген может быть выделен из естественных источников (из под-

ходящего генома), синтезирован химическим путем (по имеющейся последовательности нуклеотидов) или ферментативным путем с использованием механизма обратной транскрипции (синтез кДНК на матрице мРНК с помощью обратной транскриптазы), получен с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Часто нужный ген выделяют из *банка генов*.

2.1. Принципы создания банка генов

Банк генов, или *клонотека (геномная библиотека)* – это коллекция клонов ДНК, включающая все фрагменты, входящие в состав генома данного вида.

Для ее создания необходимо выделение всей (тотальной) геномной ДНК, ее фрагментация с помощью рестриктаз или методом дробовика (ультразвуком); присоединение полученных фрагментов к клонирующим векторным молекулам, введение рекомбинантных ДНК в реципиентные бактерии для их последующего клонирования. В результате получают клоны с разными фрагментами одной молекулы ДНК. Набор клонированных фрагментов генома и называется *банком генов*, а точнее, – это произвольная (случайная) коллекция клонированных фрагментов ДНК, представляющая собой совокупность всех нуклеотидных последовательностей ДНК данного индивида или вида. Однажды полученная, библиотека генов может храниться и использоваться неограниченно долго. В библиотеке содержится вся наследственная информация организма. Банк генов – это не только источник для получения нужного трансгена, но и источник материала для изучения структуры, функции и регуляции индивидуальных генов, структуры и функции белков. С его помощью можно также решить проблему сохранения генофонда исчезающих видов.

Гены эукариот занимают достаточно протяженные участки ДНК (до 2,5 млн пн). Для клонирования таких крупных фрагментов плазмидные векторы не подходят. В этом случае используют клонирующие векторы, созданные на основе бактериофага λ (возможный размер клонируемого фрагмента – до 23 тпн), космиды (до 45 тпн) или же искусственные хромосомы (от 100 до >1000 тпн).

Первую геномную библиотеку создали Т. Маниатис с сотрудниками в 1978 г. Они использовали ДНК из генома *D. melanogaster*, которую клонировали в клетках *E. coli*.

Аналогичные коллекции, полученные из индивидуальных хромосом или их частей, называются *хромосомными библиотеками*.

Библиотеки кДНК составляют копии ДНК, комплементарные РНК (рисунок 7). Поскольку кДНК получают из зрелых мРНК, прошедших процессинг, они не содержат интронов. Библиотека кДНК отражает спектр генной активности в клетках, из которых она была выделена. Создание таких библиотек полезно для сравнения генной активности в клетках разных тканей.

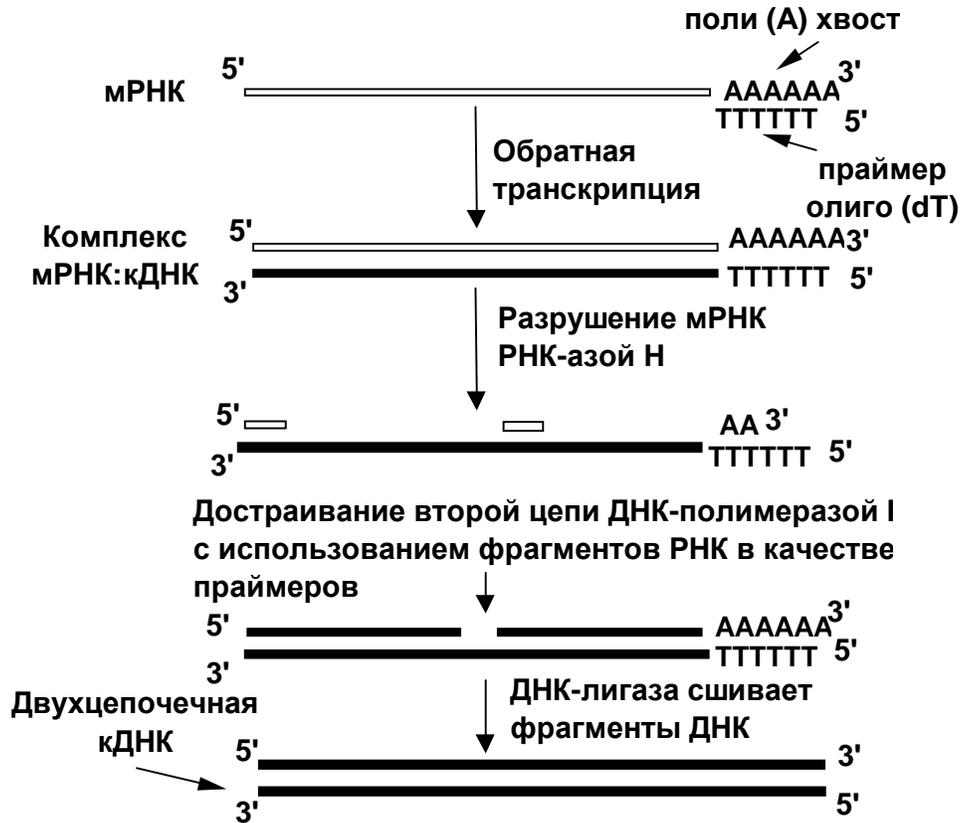


Рисунок 7. Синтез двухцепочечной кДНК на мРНК

У эукариот только мРНК содержит поли-А хвосты. Используя это качество, мРНК выделяют. Затем *in vitro* к этой мРНК добавляют короткую цепь олиго (dT), которая после отжига служит праймером для действия обратной транскриптазы, синтезирующей комплементарную цепь ДНК на молекуле мРНК. Далее с помощью РНК-азы Н разрушают мРНК в комплексе мРНК:кДНК. Остатки полуразрушенной мРНК служат праймерами для синтеза второй цепи ДНК с помощью ДНК-полимеразы I по матрице кДНК. Фрагменты новой ДНК-цепи сшиваются с помощью ДНК-лигазы. После того как молекулы кДНК синтезированы, к ним с помощью ДНК-лигазы “пришивают” липкие концы, после чего встраивают в клонирующий вектор и переносят для их размножения в бактерии.

Таким образом, библиотека генов представляет собой набор фрагментов ДНК, встроенных в вектор.

2.2. Выбор нужного гена из клонотеки (скрининг банка генов)

Поиск нужных генов в смеси клонированных фрагментов ДНК библиотеки осуществляется различными способами; суть всех их состоит в скринировании библиотек. Рассмотрим некоторые из них.

1. Если нам доступен искомый ген, мы знаем его местоположение, молекулярную массу, то его можно выделить путем деления фрагментов по молекулярной массе и заряду при помощи гель-электрофореза. Для

этого исследуемые образцы (содержащие различные фрагменты одной и той же ДНК) наносят сверху на агарозный или полиакриламидный (ПААГ) гель. При наложении на гель электрического поля фрагменты начнут перемещаться вниз (от отрицательного к положительному полюсу, поскольку молекулы ДНК отрицательно заряжены) со скоростью, зависящей от длины (массы) фрагмента. Это связано с тем, что в гелевой среде, состоящей из пор, молекулы ДНК разного размера тратят разное время на преодоление пор. Чем меньше размер фрагментов, тем быстрее они движутся. В результате электрофореза в геле образуется ряд полос, расположенных одна под другой. Верхние полосы соответствуют фрагментам, имеющим более крупные размеры, а нижние – фрагментам с более мелкими размерами. Полосы выявляются при окрашивании гелей бромистым этидием и просмотре гелей в ультрафиолетовом свете (рисунок 8). Чтобы определить относительную молекулярную массу разделенных фрагментов, одновременно проводят электрофорез маркерных молекул с известными молекулярными массами. Зная, какую массу имеет фрагмент, содержащий интересующий нас ген, можно выделить его из электрофоретического геля и использовать по назначению.

2. Если единственным “паспортом” искомого гена служит его нуклеотидная последовательность, то поиск нужного гена в смеси фрагментов ДНК осуществляют с помощью метода гибридизации нуклеиновых кислот (так называемой *in situ* – гибридизации). Для этого применяют *молекулярные зонды*. Зонды – это искусственно синтезированные меченые (изотопами или флуоресцентными красителями – химически) небольшие (10-30 нуклеотидов) сегменты одноцепочечной ДНК (или РНК, или ее ДНК-копии), комплементарные искомому гену. Зонд – это синтетический олигонуклеотид (короткий сегмент одноцепочечной ДНК) с известной нуклеотидной последовательностью, который используется для выявления комплементарных последовательностей с помощью гибридизации (т.е. зонды служат индикаторами гомологии при гибридизации соответствующих последовательностей). Для успеха работ по генетической инженерии важно, чтобы каждый конкретный зонд представлял копии одной молекулы ДНК с известной последовательностью нуклеотидов, а данные по ДНК-гибридизации *во всех лабораториях мира* можно было сравнивать между собой.

Реакция гибридизации нуклеиновых кислот – чувствительный метод выявления специфических последовательностей нуклеотидов. Гибридизация *in situ* – это отжиг одноцепочечного фрагмента ДНК на комплементарный ему участок другой молекулы ДНК с образованием двухцепочечной гибридной молекулы. Отжиг – процесс восстановления (ренатурации) двухцепочечных молекул ДНК из одиночных полинуклеотидных цепей путем постепенного охлаждения.

Процедура поиска нужных генов в банке получила название *блоттинга* (от англ. blotting - промокание). *Блоттинг* – это метод перенесения электрофоретических фрагментов ДНК на специальную пленку (мембрану)

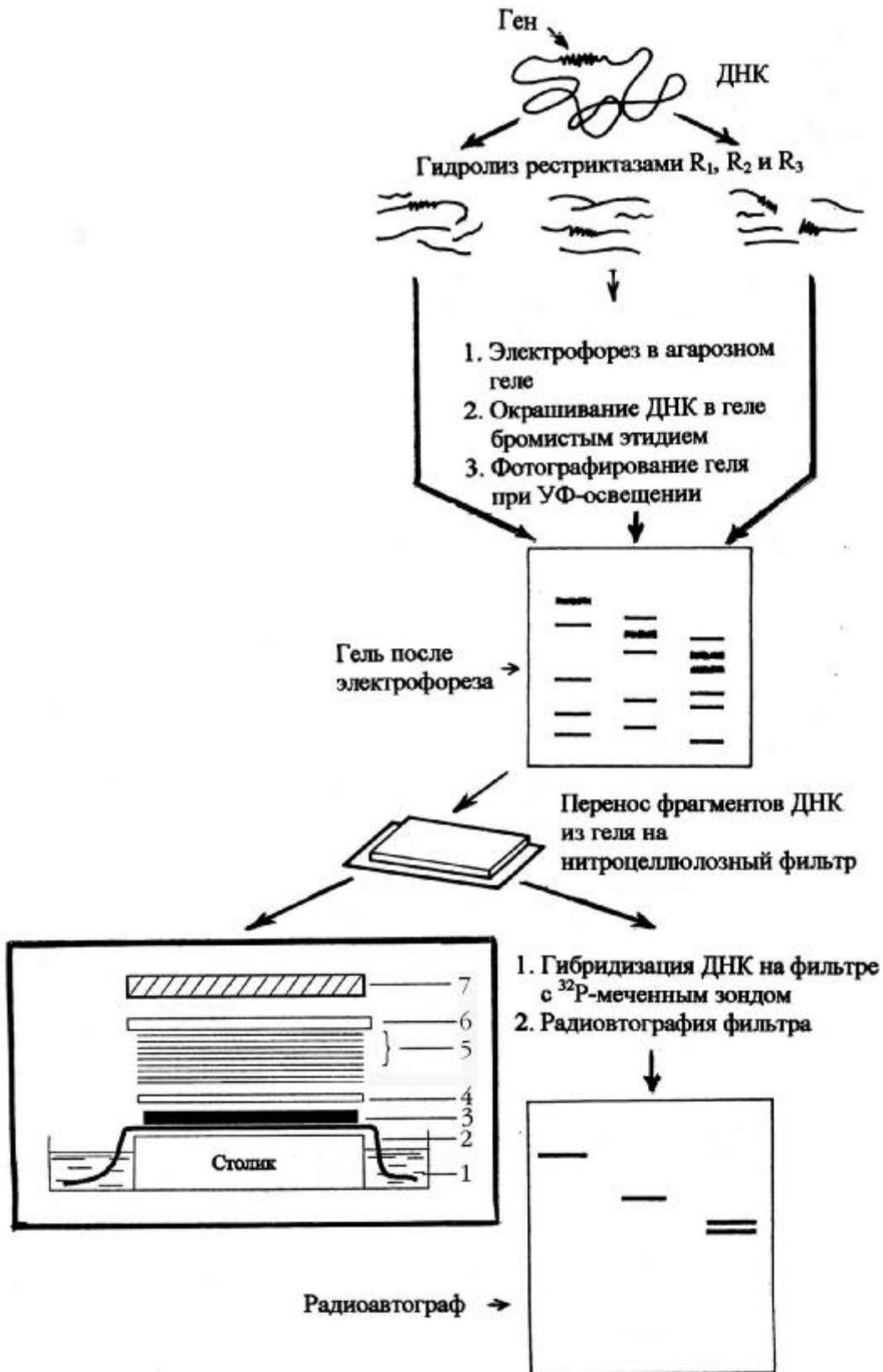


Рисунок 8. Схема блоттинга по Саузерну:

1 – буфер; 2 – ватман; 3 – гель; 4 – нитроцеллюлозный фильтр; 5 и 6 – фильтровальная бумага; 7 – стекло; 8 – груз (0,5 кг)

из нитроцеллюлозы, связывающую (иммобилизующую) одноцепочечные молекулы ДНК.

Саузерн-блоттинг (по фамилии предложившего его автора) основан на перемещении фрагментов ДНК благодаря капиллярному эффекту. Процесс переноса фрагментов ДНК, находящихся в агарозном геле, на пленку из нитроцеллюлозы с помощью фильтровальной бумаги похож на промокание.

Анализ проводят следующим образом (рисунок 8).

- Выделенную, очищенную, денатурированную и разбитую на фрагменты ДНК помещают на лист агарозного геля, где происходит электрофоретическое разделение фрагментов по массе и заряду.

- Лист агарозного геля, где произошло электрофоретическое фракционирование смеси фрагментов ДНК по массе и заряду, помещают на фильтровальную бумагу, смоченную концентрированным солевым (буферным) раствором.

- Затем на гель накладывают нитроцеллюлозный фильтр, где происходит иммобилизация (или адсорбция, или фиксация) одноцепочечных фрагментов ДНК.

- Поверх фильтра накладывают стопку листов сухой фильтровальной бумаги, которая обеспечивает медленный ток буферного раствора через гель (т.е. служит своеобразным капиллярным насосом). Солевой раствор, проходя через агарозный гель, увлекает за собой фрагменты ДНК, которые задерживаются нитроцеллюлозой, и связываются с ней, а раствор впитывается сухой фильтровальной бумагой.

- Далее ДНК денатурируют щелочью, а фильтр выдерживают в вакууме при температуре 80°C, в результате чего одноцепочечные фрагменты ДНК необратимо иммобилизуются (фиксируются) на нитроцеллюлозе. При этом расположение полос иммобилизованной ДНК точно соответствует их расположению в геле.

- ДНК, связанную с фильтром, помещают в раствор с меченым ДНК зондом, в котором и происходит гибридизация. Гибридизоваться (образовывать водородные связи) со специфическим зондом будут только комплементарные ему фрагменты ДНК, которые можно обнаружить в виде светлых полос на рентгеновской пленке, т.е. радиоавтографии нитроцеллюлозного фильтра (рисунок 8).

Для выделения и анализа РНК (например, для выяснения того, присутствует ли в данном типе клеток мРНК, считанные с данного гена, т.е. экспрессируется ген или нет; для определения количества этой РНК и его изменения в развитии данного типа клеток; для определения размера транскрипта какого-то гена и др.) применяется *Нозерн-блот анализ*, во многом похожий на *Саузерн-блоттинг*. В данном случае молекулы РНК, выделенные из клетки, разделяются по размерам с помощью гелеэлектрофореза, а затем переносятся на фильтр. После гибридизации с меченым одноцепочечным зондом выявляются места гибридизации (гомологии) РНК и зонда.

3. Если нуклеотидная последовательность искомого гена (или мРНК) не известна, но известен белок, синтез которого он контролирует, то можно выделить небольшое количество чистого белка, определить аминокислотную последовательность некоторой его части (достаточно знание 5-6 аминокислотных остатков). Пользуясь таблицей генетического кода, можно установить все возможные последовательности нуклеотидов в том участке мРНК (или самого гена), который кодирует данную аминокислотную последовательность. В этом случае можно синтезировать зонд для поиска нужных клонов в библиотеке генов.

Существуют и другие способы выделения нужных генов из клонотеки.

3. ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Методы генной инженерии наиболее детально разработаны на микроорганизмах. Началом промышленной генной инженерии микроорганизмов принято считать 1980 г, когда в США был выдан первый патент на генно-инженерный штамм микроорганизма, способный разлагать нефть. Еще через 2 года был разрешен для клинического использования полученный из бактерии первый лекарственный препарат – человеческий инсулин. Более 20 фирм Японии и несколько Американских фирм разработали другой очень важный медицинский препарат – интерферон, который эффективен при различных вирусных заболеваниях и злокачественных новообразованиях. В нашей стране Ю.А. Овчинников и В.Г. Дебабов с сотрудниками получили микроорганизмы, эффективно синтезирующие интерферон человека (до 5 мг интерферона на 1л суспензий бактерий, что в 5000 раз больше, чем содержится в 1 литре крови доноров). В США около 63% медицинских препаратов производится с помощью биотехнологических методов, в странах Западной Европы – 25%, в Японии – 7%.

Примером генной инженерии является также получение бактерии *E. coli* со встроенным геном соматотропина – гормона роста человека, который используется не только в медицинских целях, но и в практическом животноводстве, повышая с его помощью интенсивность роста животных.

В современной биотехнологии широко используются трансгенные микроорганизмы, продуцирующие лекарственные препараты: антибиотики, гормоны, ферменты, витамины; вакцины против инфекционных заболеваний; различные диагностические препараты для диагностики наследственных и инфекционных болезней (например, ВИЧ, вирусного гепатита и др); для производства незаменимых аминокислот, биодобавок и др.

4. ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ РАСТЕНИЙ

4.1. Агробактериальная трансформация

Примеры образования трансгенных растений в природных условиях широко известны.

Опухолевое заболевание, известное как корончатый галл, описал еще Аристотель. В 1907 г. Э. Смит и К. Таунсенд показали, что это заболевание вызывает почвенная бактерия *Agrobacterium tumefaciens*. Выделенная в чистой культуре, эта бактерия может приводить к образованию опухолей (как правило, у корневой шейки) у многих голосеменных и покрытосеменных растений, что по существу может рассматриваться как природная генно-инженерная система (рисунок 9).

В 70-х годах Дж. Шелл и др. выявили, что причиной опухолеобразования являются так называемые *Ti*-плазмиды (от англ. tumor inducing- индуцирующая опухоль), обнаруженные в клетках некоторых штаммов *A. tumefaciens*. *Ti*-плазида проникает из клетки бактерии в растение и часть ее, называемая *T*-ДНК (от англ. transferred DNA- переносимая), ковалентно встраивается в хромосомы инфицируемого растения. В природе этот фрагмент переносит гены, которые способствуют размножению агробактерий и дают им возможность паразитировать на пораженном растении.

Гены, входящие в состав *T*-ДНК, функционируют лишь после их переноса в растительную клетку. Будучи интегрированной с хромосомой, *T*-ДНК индуцирует в месте заражения неконтролируемый рост недифференцированных клеток, вызывая образование опухоли (корончатых галлов, напоминающих раковые клетки животных), гиперпродукцию фитогормонов: цитокининов и индолилуксусной кислоты - ИУК (ауксина), а также синтез ряда производных аминокислот, объединенных под общим термином *опины*, которых нет в здоровых клетках ни у одного растения.

При культивировании в условиях *in vitro* клетки опухоли могут расти в отсутствие специальных гормонов (ауксинов/цитокининов), необходимых для культивирования нормальных растительных клеток, поскольку эти гормоны клетки опухоли синтезируют сами. Опухоль возникает вследствие нарушения баланса фитогормонов, от которого зависит нормальный морфогенез растения. Т.е. это результат функционирования онкогенов, продуктами которых являются фитогормоны (ауксины и цитокинины). *Опины*, выделяемые клетками опухоли, бактерия использует в качестве источников углерода и азота для своего роста и размножения. Сама бактерия в клетку не проникает, а остается в межклеточном пространстве и использует клетки со встроенной *T*-ДНК как фабрику, продуцирующую *опины*. *Ti*-плазида относится к классу конъюгативных плазмид.

Доказательством того, что именно *Ti*-плазмиды, а не гены хромосомы бактерии ответственны за поддержание трансформированного состояния клеток корончатых галлов, является то, что если бы агробактерии содержали мутантные *Ti*-плазмиды, не происходило бы ни заражения, ни образования корончатых галлов, ни синтеза *опинов*.

Ti-плазмиды рассматриваются как природные векторы, поскольку могут передаваться от бактерии в клетки растений в природных условиях. Т.е. взаимоотношения бактерий с растениями представляют особый вид паразитизма, когда бактерия не просто использует питательные вещества растения-хозяина, а заставляет растительные клетки изменить свой мета -

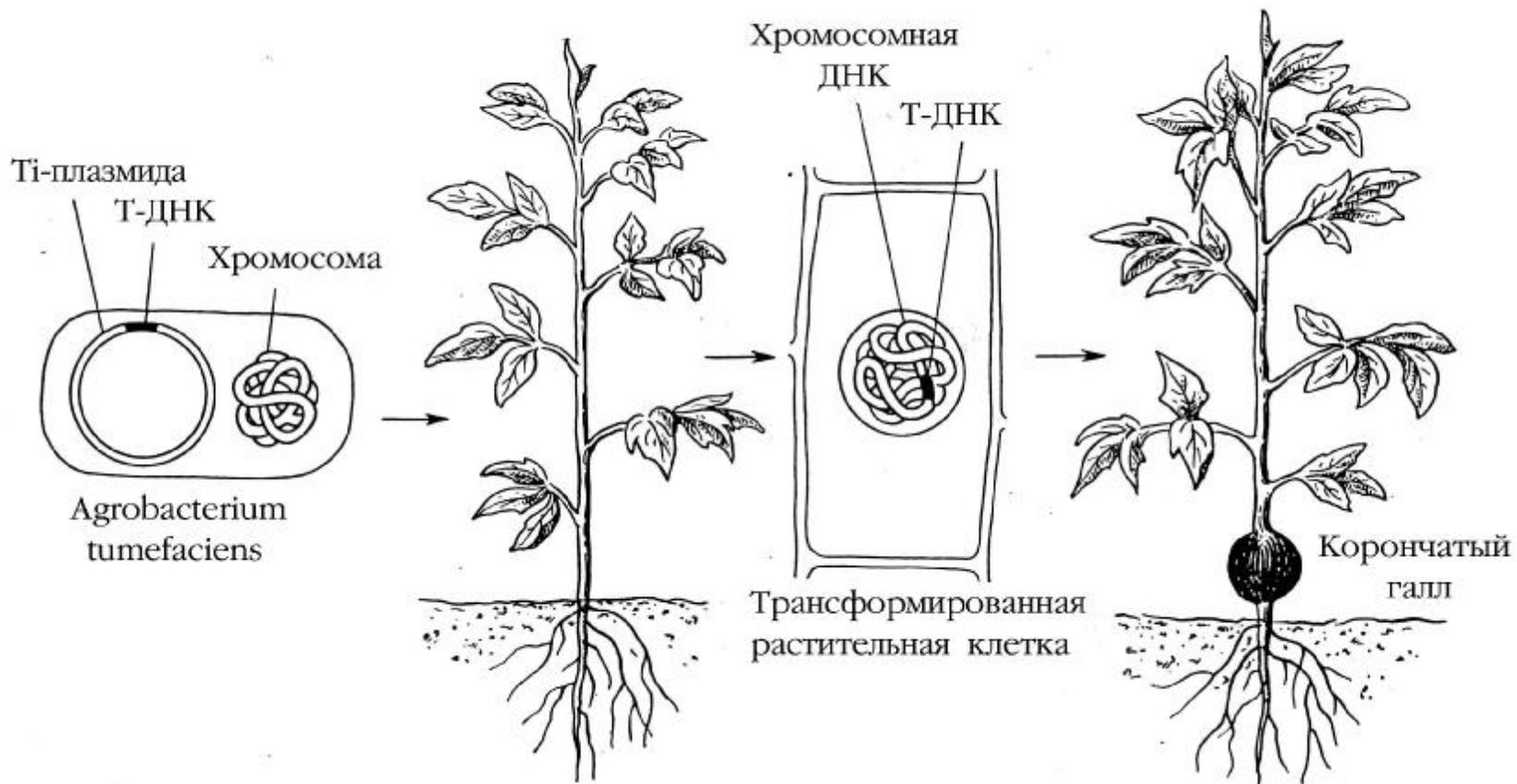


Рисунок 9. “Генетическая колонизация” высшего растения бактерией *A. tumefaciens* (Пирузян, 1988).

A. tumefaciens существует в ризосфере растения. В клетках бактерии наряду с хромосомой содержится *Ti* – плазмида, которая проникает в клетку растения и часть ее, T-ДНК, встраивается в геном растения, приводя к образованию опухоли и синтезу опинов

болизм и синтезировать те вещества (опины), которые необходимы агробактериям. Такие отношения *A. tumefaciens* и растения Шелл назвал генетической колонизацией, которая представляет собой эксперимент по генной инженерии, поставленный самой природой.

Ti-плазида оказалась идеальным природным вектором для введения чужеродных генов в клетки растения. На ее основе в условиях эксперимента создаются искусственные векторы. Для этого генетическую конструкцию, содержащую ген, намеченный для переноса, встраивают в *T*-ДНК (рисунок 10).



Рисунок 10. Схема агробактериальной трансформации растительной клетки [Alberts, 1994]:

Область *T*-ДНК, содержащая трансген (это, например, может быть ген устойчивости к гербицидам, или вредным насекомым и др.), маркерный ген (например, ген устойчивости к антибиотику канамицину) и все необходимые регуляторные последовательности и сайты рестрикции, вырезается из рекомбинантной *Ti*-плазмиды агробактерии, переносится в растительную клетку, где встраивается в хромосому растения.

Что представляет собой область *T*-ДНК?

Размер всей *Ti*-плазмиды составляет 200-250 тпн, размер *T*-ДНК в разных плазидах варьирует от 10 до 30 тпн (что составляет примерно 10% *Ti*-плазмиды). На *T*-области картировано не менее 7 генов, каждый из которых регулируется собственным промотором (что сходно с генами эукариот). Эти гены отвечают за синтез опинов (тип которых, например, нопалин, октопин, агроцинопин, манопин зависит от штамма агробактерии, вызывающего его образование) и подавление дифференцировки клеток (онкогены) – подавление образования корней и побегов. Эти гены функционируют лишь после их переноса в растительную клетку. С концов *T*-ДНК ограничена правым и левым прямыми повторами из 25 пн, что придает ей сходство с мобильными генетическими элементами (рисунок 11). По-

этому любая ДНК, вставленная между этими повторами, будет принята за *T*-ДНК и перенесена в растительную клетку. Важно отметить, что все гены (их около 35), ответственные за перенос и интеграцию *T*-ДНК, находятся не в *T*-ДНК, а в области вирулентности (*vir*-область), рисунок 11.

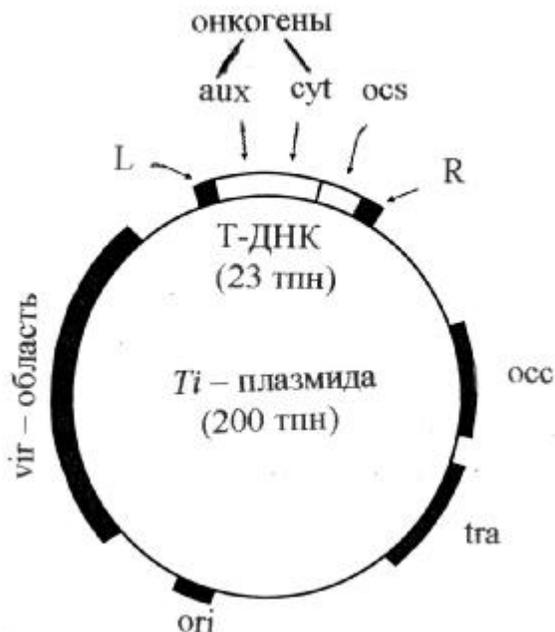


Рисунок 11. Генетическая карта *Ti*-плазмиды октопинового типа

T-ДНК (трансформирующая ДНК) содержит гены ауксина (*aux*), цитокинина (*cyt*) и опина (*ocs*), которые транскрибируются и транслируются только в растительных клетках; *vir*-область, содержащая гены, продукты которых обеспечивают вырезание и перенос *T*-ДНК в растительную клетку; *tra*-область, где локализованы гены, контролируемые конъюгацию бактерий; *ori* – сайт инициации репликации, обеспечивающий репликацию и стабильное поддержание плазмиды в *A. tumefaciens*; *ocs* – гены, кодирующие ферменты катаболизма опина; *L* и *R* – левая и правая фланкирующие последовательности *T*-ДНК соответственно.

Однако практическое использование природных *Ti*-плазмид как векторов для переноса генетической информации в растительные клетки и клонирования генов затруднено из-за ее больших размеров (до 250 тпн, тогда как для прокариот вектор *pBR322* имеет размеры всего 4,4 тпн). Ученными были разработаны различные стратегии введения чужеродных генов в состав *T*-ДНК, одна из которых, нашедшая широкое применение, – создание бинарной векторной системы. В этом случае конструируют два вектора, совместно взаимодействующие друг с другом, один из которых содержит область *T*-ДНК, а другой – гены *vir*-области, обеспечивающие все функции переноса *T*-ДНК в геном растительных клеток. Трансгены, кодирующие хозяйственно ценные признаки, встраивают в *T*-ДНК (рисунок 11). Эта же область снабжается маркерными генами (для отбора трансформированных растительных клеток), эукариотическим промотором (узнаваемым растительными полимеразами, например 35S-промотор вируса мозаики цветной капусты - *CAMV*) и уникальными сайтами рестрикции (в ко-

которые встраиваются чужеродные фрагменты ДНК). Причем, гены, подавляющие дифференцировку растительных клеток и вызывающие развитие опухоли (онкогены), инактивируются или вырезаются, вследствие чего рост трансформированных растений не нарушается. Таким образом, плаزمиды и агробактерия начали работать на получение трансгенных растений.

В последние годы для создания искусственных векторов используется *Ri*-плазмиды (от англ. root inducing – индуцирующая корни), присутствующая в штаммах *Agrobacterium rhizogenes*. *Ri*-плазмиды выгодно отличаются от *Ti*-плазмид тем, что они являются естественными безвредными векторами, т.е. после встраивания *T*-ДНК в хромосомную ДНК растительных клеток в области заражения наблюдается усиленное образование корешков (“бородатость”), из которых легче регенерировать здоровые плодовые растения, чем из недифференцированной ткани опухоли.

Как на практике осуществляют генетическую трансформацию растительных клеток? Необходимым условием для инфекции *Ti*-плазмиды является поранение растения. Поэтому агробактерии, содержащие рекомбинантные плазмиды, наносят на срезанную часть растения (например, побег) или осуществляют совместное культивирование (кокультивирование) агробактерий и стерильного растительного материала (например, сегментов междоузлий, листовых дисков, протопластов) на питательных средах в условиях *in vitro*. На рисунке 12 приведен типичный пример получения трансгенного растения табака путем агробактериальной трансформации листовых дисков.

Однако, несмотря на эффективность агробактериальной трансформации, круг хозяев агробактерий ограничен. Агробактерии обладают способностью интегрировать свой генетический материал преимущественно в клетки двудольных растений. Альтернативными способами преодоления проблемы ограниченного круга растений, чувствительных к трансформации, являются методы прямого переноса чужеродной ДНК - микроинъекция, электропорация, бомбардировка микропулями (один из самых эффективных методов для трансформации однодольных растений) и др.

4.2. Векторы на основе хлоропластной и митохондриальной ДНК

Не менее перспективным для создания векторов является использование хлоропластной (хп) и митохондриальной (мт) ДНК (т.е. внеядерной, цитоплазматической ДНК). Это связано с тем, что растительная клетка может содержать большое количество копий (до 50 тыс.) хп ДНК или мт ДНК. Поэтому перенос чужеродных генов в их составе приведет к накоплению большого количества белкового продукта по сравнению с функционированием этого же гена в составе ядерной ДНК. Кроме того, для большинства видов растений существует материнское наследование цитоплазматических генов. Поэтому использование генетических конструкций на основе хпДНК или мтДНК исключает возможность присутствия в пыльце чужеродных генов и ограничивает их неконтролируемое распространение

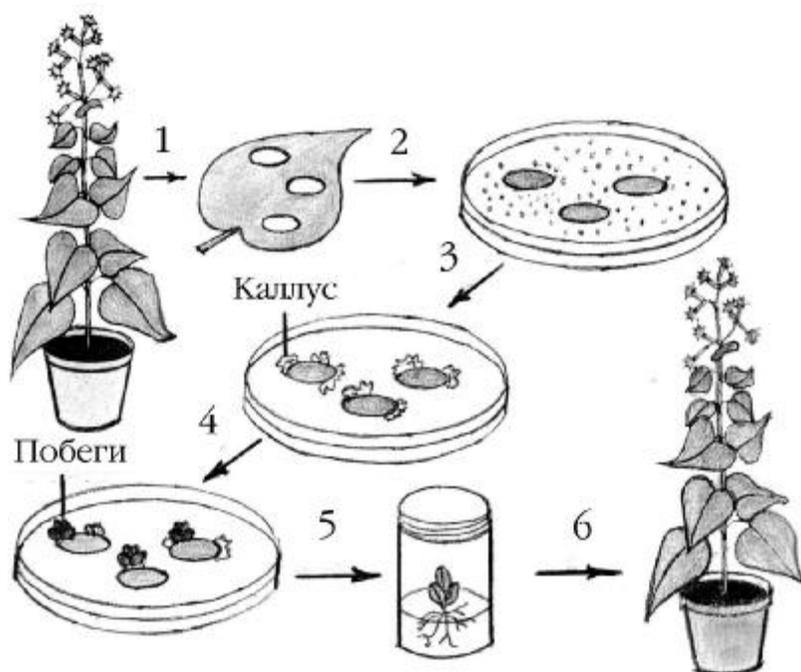


Рисунок 12. Этапы получения трансгенных растений табака путем агробактериальной трансформации листовых дисков [Alberts, 1994]:

1 – из листа табака вырезают диски, которые помещают в чашки Петри со специальной питательной средой; 2 – листовые диски инкубируют с агробактериями, содержащими рекомбинантные плазмиды с трансгеном; 3 – отбор трансформантов (включивших в свой геном трансген) на селективной среде и индукция каллуса (ткани, состоящей из активно делящихся недифференцированных = дедифференцированных клеток); 4 – 5 – регенерация целого растения из каллуса листовых дисков: при переносе каллусной ткани на морфогенную среду, происходит образование побегов (4), а при переносе последних на среду для укоренения развиваются корни (5); 6 – пробирочное растение с корнями переносят в почву, оно содержит трансген, придающий растению новый признак.

(например, генов устойчивости к гербицидам от культурных растений к сорнякам с помощью пыльцы). Т.е. растения, полученные с их использованием, более безопасны для окружающей среды по сравнению с обычными трансгенными растениями.

Рассмотрим преимущества и особенности создания векторов на основе хпДНК.

Пластиды находятся в большом количестве в разных органах и тканях растений. Геном пластид (*пластом*) – кольцевая молекула двухцепочечной ДНК размером 120-180 тпн. В каждой пластиде содержится от 10 до 100 пластом. Единичная клетка листа может содержать до 100 пластид, а следовательно, до 10 тыс. пластидных геномов. В состав кольцевых молекул входят гены рРНК и тРНК, а также гены, продукты которых необходимы для функционирования хлоропластов. Репликация и транскрипция хлоропластного генома осуществляется автономно от ядерного, что дает возможность использовать хпДНК в качестве вектора.

Если же “сшить” бактериальную плазмиду с фрагментом ДНК хлоропласта, содержащим участки начала репликации, а также участки инициации и терминации транскрипции, то можно получить челночный вектор, способный реплицироваться в прокариотических клетках и клетках эукариот. При проникновении рекомбинантной плазмиды в хлоропласты (например, при бомбардировке микропулями образцов листа) происходит не только ее репликация, но и экспрессия чужеродной генетической информации.

Растения, содержащие трансгенные пластомы, называют *транспластомными* (transplastomic). Важным отличием таких растений от классических трансгенных является то, что при *пластидной трансформации* получают клоны со встройкой трансгена в одно и то же место хлДНК, т.е. идентичные. При встройке в ядерные хромосомы в результате агробактериальной трансформации все клоны отличаются друг от друга по месту встройки трансгена, а следовательно, и по степени его экспрессии. Поскольку интеграция чужеродной ДНК в пластом происходит в результате гомологичной рекомбинации, отобранные клоны одинаковы и в них отсутствует эффект положения гена, характерный для случайной встройки трансгена при ядерной трансформации растений. В пластидах не наблюдается сайленсинг трансгена (“замолкание” генов), поэтому его экспрессия стабильно сохраняется в последующих поколениях.

Так, в 2001 г. Х. Даниэл с сотрудниками создали векторную конструкцию, в которую встроили трансген субъединицы В холерного токсина (ген *CTB*). Белок СТ-В эффективно синтезировался в транспластомных растениях табака, собирался в функциональные олигомеры и был антигенно идентичен очищенному природному СТ-В. Данный чужеродный белок накапливался в листьях табака до уровня 4,1% суммарного растворимого белка, что в 400 раз больше продуктивности, достигнутой при интеграции трансгена в эдерный геном этих растений. Подобным образом в лаборатории Малига (1995 г.) были получены транспластомные растения табака, эффективно экспрессирующие ген *cry2Aa2* и накапливающие в хлоропластах инсектицидный токсин *Bt*, что делает такие растения устойчивыми к вредным насекомым.

4.3. Преимущества и трудности использования растений как объекта для генно-инженерных исследований

Важным преимуществом растений по сравнению с животными является способность их клеток и протопластов при наличии подходящих условий в культуре *in vitro* развиваться (регенерировать) в целое фертильное растение - тотипотентность. Т.е. для трансформации можно использовать практически любую часть растения. Это свойство тотипотентности соматических клеток используется для получения трансгенных растений, открывает возможность для изучения функционирования генов, внедренных в растения, а также для использования их в селекции. Таким образом, методология генной инженерии в отношении растений направлена на корен-

ное изменение методов традиционной селекции тем, чтобы желаемые признаки растений можно было получать путем прямого введения в них соответствующих генов вместо длительной работы по скрещиванию.

К числу существенных трудностей генно-инженерных работ с растениями относится то обстоятельство, что многие хозяйственно ценные признаки имеют полигенный характер наследования, т.е. контролируются не одним, а многими генами. Кроме того, геном растений изучен хуже, чем геном млекопитающих. Это связано: 1) с огромными размерами геномов многих растений (десятки и даже сотни млрд. пн); 2) их чрезвычайной обогащенностью некодирующими, т.е. не содержащими структурные гены, участками ДНК (доля избыточной ДНК может достигать 90 и даже 99% и среди этих последовательностей надо найти функциональные участки – гены); 3) большим числом полиплоидных форм (содержащих более двух геномов на клетку), среди которых много аллополиплоидов (имеющих в ядре нескольких близких, но не идентичных геномов). Например, у человека ($2n=46$) – 3,2 млрд пн, а у мягкой (гексаплоидной) пшеницы (*Triticum aestivum*, $2n=6x=42$) – в 5 раз больше (≈ 16 млрд пн), у лилейных (*Lilium*) – в 10 раз больше (50-60 млрд пн), сосны (*Pinus sylvestris*, $2n=2x=24$) – в 20 раз больше (≈ 68 млрд.пн). Многие виды растений имеют мелкие хромосомы (длина хромосом не превышает 3 мкм), а для некоторых видов до сих пор не установлено точное число хромосом. Несмотря на указанные трудности, к настоящему времени (в 2002 г.) полностью расшифрован (секвенирован) геном арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* – горчица малая, или резушка Таля, $2n=2x=10$) двудольного растения с маленьким геномом – 125 млн пн, 25 тыс генов и в 2003г. - генома риса (*Oryza sativa*, $2n=2x=24$) – однодольного растения, имеющего также небольшой геном - 430 млн пн. Арабидопсис не имеет никакого хозяйственного значения. Но это удобный модельный объект для генетиков. Его геном используется в качестве “базового” или “справочного” генома для изучения и анализа геномов других растений (сравнительная геномика), а также как донор генов для генно-инженерных работ. Текст каждого из генов и их расположение на хромосомах стали доступны любому исследователю, чей компьютер подключен к Интернету. С этой же целью применяются и сведения о важной продовольственной культуре – рисе, являющемся основным источником пищи для половины человечества.

Доля известных генов в геноме растений очень мала, поэтому получение каждого трансгенного растения – результат огромного труда.

4.4. Достижения и перспективы генной инженерии растений

В настоящее время с помощью методов генной инженерии в растения привнесены гены, контролируемые многие хозяйственно ценные признаки. К их числу относятся: устойчивость к гербицидам, насекомым, вирусам, бактериальным и грибковым заболеваниям, абиотическим стрессам, способность к длительному хранению; мужской стерильности, модификация запасных белков и вторичных метаболитов, получение белков живот-

ного происхождения и вакцин, изменение окраски цветков у декоративных растений. Полученные трансгенные растения можно затем скрещивать между собой и получать гибриды с двумя и более чужеродными генами. Это позволяет решать широкий круг проблем, обеспечивая большую экономическую выгоду.

Остановимся на некоторых результатах генно-инженерного улучшения растений.

Устойчивость к насекомым. Давно известна тюрингская бактерия *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), продуцирующая белок, который очень токсичен для многих видов насекомых и в то же время безопасен для млекопитающих. Этот протоксин (*cry*-белок, гены которого локализованы на плазмидах) в кишечнике насекомых протеолитически расщепляется и превращается в токсин (дельта-токсин), убивая их. Активированный токсин специфично связывается с рецепторами в средней кишке насекомых, что приводит к лизису клеток кишечного эпителия. Взаимодействие токсина с рецепторами насекомого строго специфично. В природе найдено большое количество штаммов *B. thuringiensis*, чьи токсины действуют только на определенные виды насекомых (например, действуют на жуков и не действуют на бабочек и пчел). *Bt*-протеин не представляет угрозы для теплокровных животных и человека, поскольку у них другие протеолитические ферменты и пищеварительный тракт устроен иначе, чем у насекомых. Более того, *Bt*-протеин – весьма нестойкий белок, который легко денатурирует при нагревании, в кислой среде желудка, быстро переваривается желудочными соком.

Встраивание гена этого белка в геном растений (табак, томаты, хлопчатник, кукуруза, рис, рапс, тополь и др.) дало возможность получить трансгенные растения (*Bt*-растения), не поедаемые насекомыми. Это позволило отказаться от инсектицидов. Создание трансгенного картофеля, устойчивого к колорадскому жуку, потребовало от Американской компании «*Monsanto*» 10 лет. В Северной Америке картофель с встроенным геном *cry* IIIA (с токсичными для колорадского жука свойствами) получил широкое распространение. В настоящее время полевые испытания трансгенного картофеля проводятся в России. Опытная посадка его в открытый грунт на изолированных участках была согласована с Минздравом, Минсельхозом, Госкомитетом по охране окружающей среды и РАН.

Устойчивость к гербицидам. В борьбе с сорняками используют химические соединения – гербициды. Однако многие из них не обладают селективным действием, токсичны, проявляют мутагенный эффект и накапливаются в растениях и в почве. Путем введения в геном ряда сортов кукурузы, хлопчатника, сои и др. культур генов, обеспечивающих разрушение или дезактивацию гербицидов либо кодирующих нечувствительные к данному классу гербицидов ферменты-мишени, получены трансгенные растения, генетически устойчивые к глифосату (коммерческое название Roundup), глюфозинату аммония и др. Полевые испытания показали, что

гербициды не воздействуют на трансгенные растения (они не погибают и сохраняют свои сортовые особенности), тогда как сорняки уничтожаются.

Среди всех трансгенных культур гербицидоустойчивые формы составляют подавляющее большинство. Так, в 2003 г. в мире под ними было занято 73% площади, засеянной генно-инженерными сортами, или 49,7 млн. га. Лидером среди всех трансгенных культур является соя, устойчивая к гербициду глифосату.

Глифосат (коммерческое название Roundup) относится к гербицидам нового поколения, для которых характерна относительная безопасность для здоровья человека и окружающей среды. “Мишенью” глифосата (т.е. ферментом, с которым связывается гербицид) у растений является фермент 5-энолпирувилшикимат-3-фосфат синтетаза (*EPSPS*), играющий важную роль в синтезе ароматических аминокислот (тирозина, фенилаланина и триптофана). Под действием гербицида у неустойчивых к нему растений наблюдаются симптомы азотного голодания (из-за недостатка названных аминокислот) и они погибают в течение двух недель. Путем переноса гена *cp4* (ген, кодирующий *EPSPS* и несущий точечную мутацию- “мутацию мишени”) от почвенной бактерии *A. tumefaciens* в геном растений, было изменено сродство гербицида с его ферментом-мишенью. В результате гербицид “не узнает” свою мишень, фермент сохраняет активность, а растение становится устойчивым к его действию. Именно таким способом в 1977 г. был получен сорт сои, устойчивый к Roundup, признанный в США сельскохозяйственным продуктом года. Причем, в полученной трансгенной сое отсутствуют селективные гены устойчивости к антибиотикам, поскольку сам ген устойчивости к глифосату можно использовать в качестве селективного.

Регуляция сроков созревания и хранения плодов. С помощью генно-инженерного подхода можно не только вводить в организм новый чужеродный ген, но и заблокировать (провести “адресное” разрушение), ослабить (или, наоборот усилить) действие природного гена.

Например, плоды томата во время созревания содержат значительное количество специального белка-фермента PG (полигалактуроназы), придающего плодам рыхлость. Этот фермент участвует в разрушении пектина – основного компонента межклеточного пространства растительных тканей. Продукт гена *PG* синтезируется в период созревания плодов томатов, а увеличение его количества приводит к тому, что плоды постепенно теряют упругость, становятся более мягкими и загнивают, что значительно сокращает срок их хранения. Для устранения этого белка (с целью увеличения сроков хранения томатов) проводят отключение гена *PG* путем встраивания в геном томатов антисмысловой конструкции по отношению к этому гену (содержащей перевернутую копию гена). В результате транскрипции получается антисмысловая (перевернутая) мРНК (так называемая асРНК), которая комплементарно связывается с нормальной (смысловой) мРНК. Образуется молекула двухцепочечной РНК (дуплекс), которая уже не может служить матрицей для синтеза белка. С помощью этого подхода

получены первые коммерческие растения томата *Flavr Savr*, отличающиеся пониженной деполимеризацией пектина клеточной стенки плодов, в результате чего они дольше хранились, сохраняя товарные и пищевые качества зрелых плодов, а сами растения были более устойчивы к грибковым заболеваниям. Этот же подход интересен и в цветоводстве для длительного хранения срезанных цветов.

Такой же подход применяют для регулирования сроков созревания томатов, а в качестве мишени в этом случае используют ген *EFE* (ethylene-forming enzyme), продуктом которого является фермент, участвующий в биосинтезе этилена. Этилен – это газообразный гормон, одна из функций которого – контроль за процессом созревания плодов.

Повышение урожайности, регуляция скорости роста. С помощью генной инженерии можно повышать и урожайность сельскохозяйственных культур, несмотря на то что этот признак является полигенным. Тем не менее, можно найти и применить отдельные гены, продукты которых позволяют существенно усилить процессы роста и в итоге повысить продуктивность растения.

Так, встраивание в геном картофеля гена фитохрома В от арабидопсиса приводило к повышению интенсивности фотосинтеза и увеличению урожая клубней.

По данным российских ученых (Р.К. Саляев и др.) из Иркутского университета, перенос в геном картофеля гена, кодирующего образование фермента УДФГ трансферазы созревающего зерна кукурузы, сопровождался усилением биосинтеза ростовых фитогормонов. Это позволило повысить урожай клубней в 2 раза, уровень сухих веществ в клубнях до 27% (у обычных сортов менее 20%), аскорбиновой кислоты до 9%. Разрезанные клубни не темнели на воздухе. Этими же учеными были получены быстрорастущие трансгенные растения осины путем введения в них гена *ugt* из кукурузы и *acb*^{p302} из арабидопсиса. Продукты этих генов влияют на скорость роста растений через изменение их гормонального (ауксинового) статуса.

С помощью генной инженерии можно добиться *повышения качественных и потребительских свойств* сельскохозяйственной продукции. Ведутся работы и получены обнадеживающие результаты по созданию кофе без кофеина, табака без никотина (полагают, что курение сигарет из такого табака будет менее вредным для здоровья), арахиса, не содержащего характерных для него аллергенов.

В шлифованном рисе, являющемся основным источником пищи в ряде тропических стран с многочисленным населением, отсутствует провитамин А (β -каротин). Это приводит к дефициту витамина А и способствует развитию различных заболеваний (например, к ухудшению зрения), особенно у детей. Швейцарским ученым удалось разработать генно-инженерный подход создания так называемого “золотого” риса. Они перенесли в геном риса генетическую конструкцию, содержащую сразу три гена от разных организмов, необходимых для биосинтеза β -каротина: гены

фитоендесатуразы и ликопин β -циклазы от нарцисса и ген каротиндесатуразы от бактерии. Зерна трансгенного риса накапливали в эндосперме провитамин А в достаточном количестве и были окрашены в золотистый цвет.

Ведутся работы по созданию трансгенных растений лесных древесных пород с пониженным содержанием лигнина. В создании низколигниновых деревьев заинтересована целлюлозно - бумажная промышленность, т. к. лигнин, который составляет 15-35% от сухого вещества в древесине при производстве бумаги – “лишний” компонент, а его удаление – дорогостоящий и экологически опасный процесс.

Устойчивость к абиотическим стрессам. В связи с развитием индустриальных технологий во многих развитых странах мира актуальной стала разработка методов, позволяющих вести хозяйство в условиях высокого техногенного загрязнения окружающей среды. Одна из проблем – все большее повышение концентрации тяжелых металлов в почве. Один из генно-инженерных подходов для решения этой проблемы – клонирование и встраивание в геном растений гена, кодирующего белок животного происхождения – металлотионеина, способного связывать многие тяжелые металлы. Выделен ген, продукт которого связывает кадмий.

Важным направлением генной инженерии является селекция сортов, устойчивых к засухе, жаре, повышенному засолению почвы. Поскольку все эти стрессовые факторы относятся к разряду осмотических, то подходы по всем этим направлениям общие. Идет работа над выявлением, клонированием и переносом в растения трансгенов, кодирующих образование различных осмопротекторов (ионов протеинов, аминокислот, сахаров, полиаминов), регулирующих содержание ненасыщенных жирных кислот в мембранах клеток и т.д. Исследования показали, что некоторые растения, в частности табак и томаты, не накапливают глицинбетаин (осмопротектор) и поэтому высокочувствительны к солевому шоку. Г. Джа с соавторами в 2002 г. получил трансгенные томаты, экспрессирующие бетаинальгидрогеназу (БАД, участвующий в биосинтезе глицинбетаина) лебеды *Atriplex hortensis* и проявляющие достаточно высокую устойчивость к солевому стрессу.

Изменение окраски у декоративных растений. Голландские ученые создали сорт голубых (синих) роз, перенеся в них ген из дельфиниума. Этот ген контролирует синтез голубого пигмента. Получены и испытываются трансгенные растения хлопка с окрашенным волокном. Предполагается, что в будущем натуральное хлопковое волокно станет крепче, не будет ни мяться, ни садиться и будет иметь различную окраску без использования химических красителей.

Метаболическая инженерия. Нынешний этап развития генетической инженерии растений получил название “метаболическая инженерия”. При этом ставится задача не только улучшить те или иные имеющиеся качества растения, как при традиционной селекции, сколько научить растение производить совершенно новые соединения, используемые в медицине, химическом производстве и других областях. Этими соединениями мо-

гут быть, например, особые жирные кислоты, белки с высоким содержанием незаменимых аминокислот, съедобные вакцины и др.

Растения – фабрика белков. Растения являются, безусловно, наиболее дешевыми продуцентами белков. Так, стоимость белка, полученного путем сельскохозяйственного культивирования сои или кукурузы составляет менее 1 долл./кг. Использование же микробных клеток в закрытых системах (ферментерах) и особенно культивируемых клеток животных в качестве продуцентов фармацевтических белков обходится в сотни и тысячи раз дороже. Кроме того, синтезируемые в бактериальных клетках чужеродные эукариотические белки далеко не всегда имеют правильную третичную структуру (от чего зависит их биологическая активность) и не могут подвергаться посттрансляционной модификации. Отмеченные недостатки отсутствуют у растений.

К настоящему времени показано, что растения могут производить белки животного происхождения. Так, встраивание в геном арабидопсиса химерного гена, состоящего из части гена запасного 2S-белка арабидопсиса и кодирующей части для нейропептида – энкефалина, приводило к синтезу химерного белка в количестве до 200 нг на 1г семян. Два структурных белковых домена были связаны последовательностью, узнаваемой трипсином, что давало возможность в дальнейшем изолировать чистый энкефалин, используемый в качестве болеутоляющего и успокаивающего средства. Японские ученые получили растения картофеля и табака со встроенным геном человеческого интерферона альфа, который применяют для лечения человека от гепатита С и некоторых форм рака. Созданы растения табака с человеческим интерлейкином 10 (стимулятор иммунитета), растения арабидопсиса, синтезирующие витамин Е. Преимущества таких “биофабрик” очевидны. Можно производить вещества, являющиеся ранее очень редкими и дорогими, практически в неограниченных количествах.

Растения становятся продуцентами вакцин, фармакологических белков и антител, что позволяет значительно удешевить лечение различных заболеваний, в том числе и онкологических. Так, получены трансгенные растения, продуцирующие человеческий β -интерферон, повышающий иммунитет. Причем, такой способ получения β -интерферона оказался гораздо эффективнее и дешевле, чем при использовании микробиологических методов. Разработаны также подходы, позволяющие получать бактериальные антигены в растениях и использовать их в качестве вакцин. Так, получен картофель, продуцирующий нетоксичные субъединицы В-токсина холеры. Такие растения могут быть использованы для получения дешевых “съедобных” вакцин против холеры. Иммунизация такой антихолерной вакциной вполне эффективно происходит путем преорального приема. Созданы бананы, вырабатывающие вакцину против полиомиелита.

Индукцированная мужская стерильность растений. Ведутся исследования по получению трансгенных растений с мужской стерильностью. Хорошо известно, что цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС), возникновение которой обусловлено специфическим взаимодей-

вием генов ядра и цитоплазмы, широко используется в селекции на гетерозис при производстве гибридных семян F₁ кукурузы, сахарной свеклы, сорго, льна и др. Однако не для всех культур удалось создать традиционными способами селекции линии с ЦМС. Для создания мужски стерильных трансгенных линий растений в его геном переносят ген *barnase* от бактерии *Bacillus amyloliquefaciens*, который кодирует образование фермента РНК-азы, участвующего в расщеплении молекул РНК. Благодаря тканеспецифическому промотору РТА29 от табака этот фермент образуется у трансгенного растения только в одном месте (в пыльнике) и только в одно время (в период цветения). Деградация РНК в тканях пыльника приводит к отсутствию синтеза белка и в конечном итоге – образованию нежизнеспособной пыльцы (мужской стерильности).

Индукцированный партеногенез. В последние годы в практической селекции используется еще одно направление. Оказалось, что плоды трансгенных растений с бактериальным геном *iaaM* (ген контролирует один из этапов биосинтеза ауксина), находящегося под промотором гена *Def* (ген, который экспрессируется только в плодах), являются *партенокарпическими*, т.е сформировавшимися без опыления. Партенокарпические плоды характеризуются либо полным отсутствием семян, либо очень небольшим их количеством, что позволяет решить проблему “лишних косточек”, например, в арбузе, цитрусовых и т.д. Кроме того, завязывание семян без опыления очень важно при воспроизводстве растений в зимнее время в условиях теплицы. Опыление – это очень тонкий процесс. Пыльца формируется и способна к опылению только при определенной температуре и влажности воздуха, что трудно соблюсти в искусственных условиях. Уже получены трансгенные растения кабачков, которые в целом не отличаются от контрольных, но с партенокарпическими плодами.

4.5. Трансгенные растения в сельском хозяйстве

Первые трансгенные растения (растения табака со встроенными генами из микроорганизмов) были получены в 1983 году, что открыло необозримые перспективы для создания растений с улучшенными свойствами путем переноса в них соответствующих генов из других видов. Первые успешные полевые испытания трансгенных растений табака, устойчивых к вирусной инфекции, были проведены в США уже в 1986 году. После прохождения всех необходимых тестов на токсичность, аллергенность, мутагенность и т.д. первые трансгенные продукты появились в продаже в США в 1994 году. Это были томаты *Flavr Savr* с замедленным созреванием, созданные фирмой “Calgen”, а также гербицид-устойчивая соя компании “Monsanto”. Уже через 1-2 года биотехнологические фирмы поставили на рынок целый ряд генетически измененных растений: томатов, кукурузы, картофеля, табака, сои, рапса, кабачков, хлопчатника, свеклы и др. В настоящее время трансгенные формы получены у 120 видов растений.

Количество используемых в сельском хозяйстве трансгенных (или *генетически модифицированных* = ГМ) растений идет по нарастающей.

Сейчас они возделываются в 30 странах мира, из них лидируют США (63% общей площади), Аргентина (21%), Канада (6%), Бразилия (4%), Китай (около 4%) и Южная Африка (около 1%). На эти 6 стран приходится 99% всех посевных площадей трансгенных культур. ГМ – растения выращивают также в Индии, Австралии, Испании, Румынии, Болгарии, Германии, Мексике, Франции и др., всего в 18 странах, заметную долю которых составляют развивающиеся страны. С каждым годом площади, занятые в мире под ГМ - растениями, увеличиваются примерно на 10% (рисунок 13). В 1996 году трансгенные растения были высажены на общей площади порядка 1,7 млн. га, в 2000 г. – 44,2 млн. га (что превышает размеры такой страны как Великобритания), 2003г. – 67,7 млн. га (что составляет половину посевных площадей России).

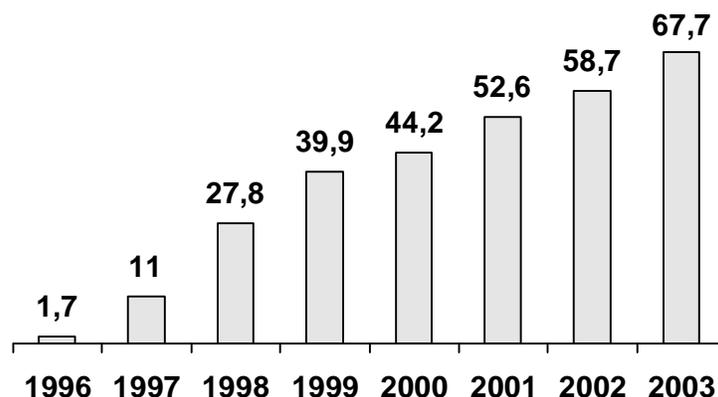


Рисунок 13. Динамика увеличения общей площади возделывания трансгенных сортов сельскохозяйственных культур в мире (млн га)

В США генетически модифицированные растения составляют сейчас около 50% посевов кукурузы и сои и более 30-40% посевов хлопчатника. На российском рынке разрешены для реализации трансгенные сорта кукурузы, сои, хлопчатника, сахарной свеклы и картофеля.

Почему нам так важно получение и использование трансгенных растений? Прежде всего, это связано с бурным ростом населения Земли, численность которого в настоящее время превышает 6 млрд. человек. Жителю России в это трудно поверить, ибо у нас, начиная с 1993 г., рождаемость неуклонно сокращается. Увеличение числа жителей планеты происходит за счет Китая, Индии, Пакистане, Малайзии и других развивающихся странах Азии. Параллельно росту населения уменьшается площадь земель, используемых для производства продуктов питания. В итоге, 800 млн. человек (каждый восьмой) не имеют достаточно пищи, сорок тысяч человек умирают ежедневно от недоедания, и половина из них – дети. К 2010 году численность населения составит по разным прогнозам от 8 до 11 миллиардов человек. Питание и медицинское обслуживание такого количества населения представляет собой наиболее важную проблему, стоящую перед человечеством.

В России со 130 миллионным населением и обширными сельскохозяйственными угодьями на первый взгляд эта проблема не актуальна. Однако в настоящее время на мировом рынке фермеры предпочитают покупать гибридные семена нового поколения генетически модифицированных растений (ГМР), обладающие улучшенными агротехническими и потребительскими свойствами, которые намного дороже семян обычной селекции, но обеспечивают получение гарантированных урожаев и выживание в условиях рыночной экономики. Так, в 2002 году трансгенные сорта дали сельскохозяйственной продукции на 1,8 млрд тонн больше, чем обычные на тех же площадях, при этом пестицидов использовано на 21 тыс. тонн меньше, а доходы увеличились на 1,5 млрд долларов США.

Кроме финансовой прибыли выращивания ГМР несет ощутимые социальные и экологические выгоды.

Существенное увеличение урожая сельскохозяйственных культур за последние десятилетия в значительной степени достигнуто за счет химизации, механизации и мелиорации, что привело к возникновению ряда экономических и экологических проблем, связанных с загрязнением окружающей среды, истощением энергетических ресурсов, возрастанием затрат на единицу продукции и т.д. Кроме того, значительный прогресс в улучшении важнейших сельскохозяйственных культур (например, кардинальное улучшение качества и повышение устойчивости сортов к факторам среды) с использованием традиционных, классических селекции – гибридизации и отбора в большинстве случаев достиг своего предела.

В этой ситуации выращивание трансгенных растений, устойчивых к биотическим и абиотическим факторам, позволяет использовать низкозатратные технологии производства без удобрений и пестицидов, на землях низкого плодородия, в условиях засухи, засоления, экстремально низких или высоких температур. Благодаря сокращению обработки полей пестицидами, использованию менее вредных для окружающей среды гербицидов снижается химическая загрязненность воды и почвы. Предотвращается эрозия почвы, поскольку использования ГМР, устойчивых к гербицидам, позволяет перейти на щадящий беспашотный метод обработки почвы. На полях, занятых трансгенными сортами, отмечено увеличение численности популяций птиц, полезных насекомых.

В настоящее время геновая инженерия, позволяющая направленно получать новые сорта растений с заданными (нужными человеку) хозяйственно ценными признаками и свойствами, является одним из наиболее перспективных и нестандартных подходов для решения многих задач сельского хозяйства. В то же время следует отметить, что их успешное решение возможно лишь при сочетании метода геновой инженерии с традиционными методами генетики и селекции.

5. ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ ЖИВОТНЫХ

5.1. Основные направления и достижения генной инженерии животных

Трансгенные млекопитающие являются лучшей моделью для изучения болезней человека, с другой стороны, их планируют использовать для производства необходимых человеку биомедицинских препаратов.

Первое трансгенное животное было получено в 1982 г. Р.Д. Пальмитером с соавторами. Это была гигантская мышь, которой пересадили ген гормона роста крысы. Попытки увеличить таким же путем размеры более крупных млекопитающих оказались неудачными. Животные с повышенным уровнем индукции гормона роста не увеличивались в размерах, но у них наблюдались значительные нарушения в росте и строении костей.

Трансгенные животные – биореакторы (“биологические фабрики”). Трансгенные животные получили широкое распространение как биореакторы, т.е. продуценты биологически активных лекарственных белков человека, секретируемых в молоко: гормонов, ферментов, антител, факторов свертывания крови и роста и др. Традиционно такие белки выделяли из донорской крови, дефицит которой и низкая концентрация этих белков не позволяли получать необходимого количества препаратов, покрывающего запросы фармакологического рынка. Биореакторами могут быть и бактерии, но бактериальные клетки идут в переработку целиком и поэтому трудно избавиться от посторонних примесей в конечном продукте. Трансгенные животные позволяют решить и эту проблему – очистки лекарственных белков. Даже если после очистки в препарате останутся примеси, это будут нетоксичные для человека белки молока. Кроме того, микроорганизмы неспособны осуществлять посттрансляционные модификации сложных эукариотических белков (гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование, карбоксилирование и др.), необходимые для их нормального функционирования. Известно, что производимые микроорганизмами белки нередко вызывают аллергические реакции.

Стратегия работ в этом направлении такова: получить трансгенное животное, у которого чужой ген экспрессируется в клетках молочной железы и его продукт выделяется в молоко. Использование молока целесообразно потому, что оно образуется в организме животного в большом количестве, является стерильным и его можно выдаивать по мере надобности без вреда для животного. Например, коза в период лактации может произвести до 800 л молока в год при содержании в нем рекомбинантного белка около 5 г/л, т.е. около 4 кг этого белка в год. Таким образом, относительно небольшое стадо трансгенных коз может продуцировать в составе молока сотни килограммов рекомбинантного белка в год при его низкой стоимости.

Чтобы получить трансгенное животное, например козу, создают генетическую конструкцию, содержащую рекомбинантную ДНК трансгена и промотор гена β -казеина – белка, входящего в состав молока. Т.е. под промоторами генов, специфичных для молочных желез (α -, β -казеина, α -

моторами генов, специфичных для молочных желез (α -, β -казеина, α -лактоальбумина или β -лактоглобулина), вводят целевые гены, которые нарабатывают биологически активные вещества. Генетическую конструкцию инъецируют в зиготу. Причем, эта конструкция должна работать только в клетках молочной железы и только во время лактации, не оказывая побочного воздействия на организм трансгенного животного.

В 1988 г. впервые удалось получить трансгенных овец, продуцирующих с молоком фактор свертывания крови, необходимый для лечения людей, больных гемофилией. В последующие годы в мире созданы трансгенные мыши, кролики, овцы и козы, свиньи, коровы, в молоке которых секретируются белки человека (ценнейшие фармацевтические вещества): антитрипсин, антитромбин, белок С, сывороточный альбумин (используемый при операциях), различные моноклональные антитела, эритропоэтин, инсулиноподобный фактор роста, интерлейкины и др.

Так, с помощью гена α -антитрипсина *AAT*, помещенного под контроль промотора гена β -лактоглобулина, были получены трансгенные овцы, в молоке которых содержится до 35г/л этого белка. α -антитрипсин является ингибитором протеазы эластазы. Лица, у которых отсутствует этот белок, предрасположены к заболеванию эмфиземой легких и циррозом печени в детском возрасте, так как у них постепенно распадается соединительная ткань. Его внутривенное введение служит для больных лекарственным средством. Использование трансгенных животных позволит снизить большинство дорогостоящих высокоэффективных препаратов в 10-20 раз и перевести многие лекарства из разряда элитных в число общедоступных. Первые в мире трансгенные животные (овцы), продуцирующие с молоком прохимозин крупного рогатого скота были получены в России в 1995 году. Химозин – ключевой фермент сыроделия, и традиционно его выделяют из слизистой оболочки сычуга забитых молочных телят и ягнят. В ближайшее время на фармакологический рынок поступит первый лекарственный препарат из молока трансгенных коз – противосвертывающее средство антитромбин III человека (используемый для предотвращения инфарктов и инсультов), разработанный американской фармацевтической компанией “*Genzyme Transgenics Corporation*”.

Трансгенные животные с выключенными генами (генный нокаут). *Генный нокаут* (от англ. knock out – выбить) или генный таргетинг – это направленное разрушение (выключение) определенного гена с помощью гомологичной рекомбинации. Большое значение имеют опыты по созданию животных, продуцирующих молоко, максимально приближающееся по составу к материнскому молоку человека. Для этого нужно выключить несколько генов коровы, т.е. получить так называемых животных-нокаутов, а затем ввести в ее геном несколько генов человека.

Кроме того, животные-нокауты являются удобной моделью для исследования функций различных генов. Сложность генома млекопитающих, их эмбрионального развития, длительный период, предшествующий размножению, затрудняют проведение генетического анализа. Большинство

исследований в этой области проводилось на мышах. Мышь, относящаяся к классу млекопитающих, имеющая короткий срок беременности и роста - классический, удобный объект генетики. Создание линий мышей, гомозиготных по направленно инактивированному гену, позволяет изучать детерминируемые данным геном свойства на уровне организма.

Схема получения нокаутных мышей (мутантов с направленно инактивированными генами) выглядит следующим образом: 1. Создание генетической конструкции (так называемого *нацеленного вектора*), содержащей фрагмент целевого гена (который планируют инактивировать *in vivo*), внутрь которого встраивают доминантный селективный маркер. 2. Введение вектора (чаще всего электропорацией) в культуру эмбриональных стволовых клеток, отбор клонов трансформантов на селективной среде. С помощью ПЦР и блоттинга по Саузерну выявляют трансформанты, образовавшиеся в результате гомологичной рекомбинации, приведшей к инсерционно-делеционной инактивации целевого гена. Отбираемые клоны гетерозиготны по мутантному гену, т.к. инактивирующая встройка происходит в одну из гомологичных хромосом. 3. Инъекция трансформированных клеток в бластоцисты, которые затем помещают в яйцевод самок. 4. Скрещивание родившихся химерных мышей с мышами исходной линии, получение гетерозиготного потомства по целевому мутантному гену; 5) скрещивание гетерозигот между собой, отбор в потомстве гомозиготных по мутантному гену мышей. На каждом этапе генотип мутантных мышей определяют с помощью ПЦР и блоттинга по Саузерну.

Трансгенные животные как генетические модели наследственных заболеваний человека. По данным секвенирования генома у мыши и человека содержится около 70-80% гомологичных генов (генов-ортологов). На этом объекте можно получать мутации, осуществлять генно-инженерные манипуляции и изучать механизмы регуляции экспрессии генов, проводить скрещивание трансгенных животных и анализ наследования в потомстве, что недопустимо с человеком. Трансгенные линии животных используются для моделирования различных генетических болезней человека, что имеет огромное значение для медицинской генетики. Путем введения в геном мыши генов, ответственных за конкретное заболевание человека, созданы “мышинные” модели таких генетических болезней человека, как болезнь Альцгеймера (старческое слабоумие, дегенеративная болезнь), артрит, атеросклероз, мышечная дистрофия (миодистрофия Дюшенна), образование опухолей, гипертония, сердечно-сосудистые и прионные заболевания и др.

На основе изучения трансгенных животных разрабатываются методы генной терапии (способы лечения различных наследственных заболеваний). При этом используется соматическая трансфекция - метод, когда генетические конструкции вводятся в определенные клетки и ткани организма пациента. Как и все другие методы лечения, генотерапевтические методы разрабатываются и проходят испытания на модельных трансгенных животных.

Трансгенные животные – источники органов для пересадки человеку. Значительный интерес представляет создание трансгенных животных как источников органов для пересадки человеку. Органы свиньи, например, очень подходят человеку по строению, размерам и многим биохимическим показателям. Свиньи считаются наиболее подходящими животными в качестве доноров сердца для пересадки людям, т.к. сердце свиньи по размерам наиболее соответствует сердцу человека и сердечные клапаны свиньи уже более десятилетия используются при кардиологических операциях на людях. Клонирование трансгенных свиней позволит создать постоянный запас органов для пересадки людям. Но пересаживать их без генетического изменения (трансформации) невозможно, т.к. эти органы будут немедленно отторгнуты иммунной системой пациента. Чтобы этого не произошло, необходимо создать трансгенную свинью, у которой нокаутированы соответственные гены гистонесовместимости (тканесовместимости), а вместо них введены гены гистосовместимости человека. Эти гены располагаются компактно в локусах гистосовместимости, и при проведении генного нокаута можно выключить сразу несколько генов.

В январе 2002 г. компания PPL Therapeutics plc объявила о рождении в США пометов трансгенных клонов свиньи с отключенными генами гистонесовместимости.

Получение трансгенных промысловых рыб ведется в трех направлениях: 1) увеличения скорости их развития и прибавки веса путем введения в их геном генов гормона роста; 2) повышения их холодостойкости с помощью введенного гена *AFP*, кодирующего белок-антифриз; 3) придания устойчивости к вирусным заболеваниям с помощью противовирусных антисмысловых РНК.

Интересны и перспективны работы по созданию животных - продуцентов белка паутины пауков, поскольку прочность на разрыв нитей паутины в расчете на площадь поперечного сечения на порядок превосходит прочность стальных канатов. Так, перенеся в геном коз гены паука, отвечающие за выработку паутины, американские и канадские генетики получили трансгенных животных, продуцирующих “биосталь” – молоко, содержащее белок, по прочности превосходящий металл.

Итак, получение трансгенных животных представляет интерес не только для фундаментальных исследований, но и для практического использования. Однако, несмотря на то что первые трансгенные животные были получены более 20 лет назад, до сих пор на рынке нет ни одного генетически модифицированного животного для использования в хозяйственной деятельности. Это связано с определенными техническими (сложности получения и размножения), финансовыми, а иногда и этическими проблемами. Тем не менее, успехи в генетической инженерии животных очевидны. Разработаны различные методы переноса генов в генетический материал животных и получены трансгенные особи у млекопитающих, низших позвоночных и у беспозвоночных животных. Ученые научились не

только переносить в генетический материал животных отдельные гены, но и “выключать” или заменять некоторые конкретные гены.

5.2. Способы создания трансгенных животных

Если вводить ДНК в клетки многоклеточного организма, то результатом трансформации будет изменение свойств лишь небольшого числа клеток, которые приобрели новый ген или гены. В этом случае животное будет химерным (т.е. клетки разных тканей будут иметь разный генотип). Поэтому для изменения свойств всего организма необходимо изменять геном половых клеток или зиготы (оплодотворенной яйцеклетки, представленной одной клеткой), несущих новые свойства потомкам. В этом случае трансформацию клеток осуществляют путем микроинъекции чужеродной ДНК прямо в ядро или, например, электропорацией.

Генетические конструкции часто создаются на основе ДНК вирусов (например, SV40, вируса бычьей папилломы и т.д.), ретровирусов, которые легко проникают в клетку хозяина и встраиваются в ее ДНК путем обычной инфекции (например, путем инфицирования рекомбинантным вирусом эмбриона на ранних стадиях развития). При вирусной инфекции каждая клетка может получить большое число копий чужеродного гена. Перенос таким способом полезных генов оказался возможным после ослабления путем генно-инженерных манипуляций патогенности вируса для клеток организма-реципиента.

Существуют две основные схемы создания трансгенных животных. Первая из них – *микроинъекция чужеродной ДНК* (в составе генетической конструкции) *в оплодотворенную яйцеклетку*, разработанная для получения трансгенных мышей, которая позднее стала применяться для получения крупных животных – продуцентов лекарственных белков человека: кроликов, коз, овец, коров. Оптимальной фазой введения инородного материала является стадия оплодотворенной яйцеклетки до слияния пронуклеусов. Пронуклеус – одно из двух гаплоидных ядер в яйце млекопитающих в период после проникновения сперматозоида, но до слияния мужского и женского пронуклеусов в ядро зиготы в процессе оплодотворения; мужской пронуклеус формируется из ядерного материала сперматозоида, женский – из хромосом яйцеклетки.

В 1980 г. Дж. Гордоном было показано, что гены, инъецированные в пронуклеус оплодотворенного яйца мыши, встраиваются в хромосомы и присутствуют во всех клетках новорожденного мышонка. С этой работы началась эра получения трансгенных животных.

Процесс получения трансгенных мышей с помощью микроинъекции схематически показан на рисунке 14. Он заключается в следующем. Яйцеклетки выделяют из самок-доноров, у которых была индуцирована гипероуляция (увеличение числа яйцеклеток до 35 вместо обычных 5-10) и проведено спаривание с самцами-производителями (яйцеводы вскрывают -

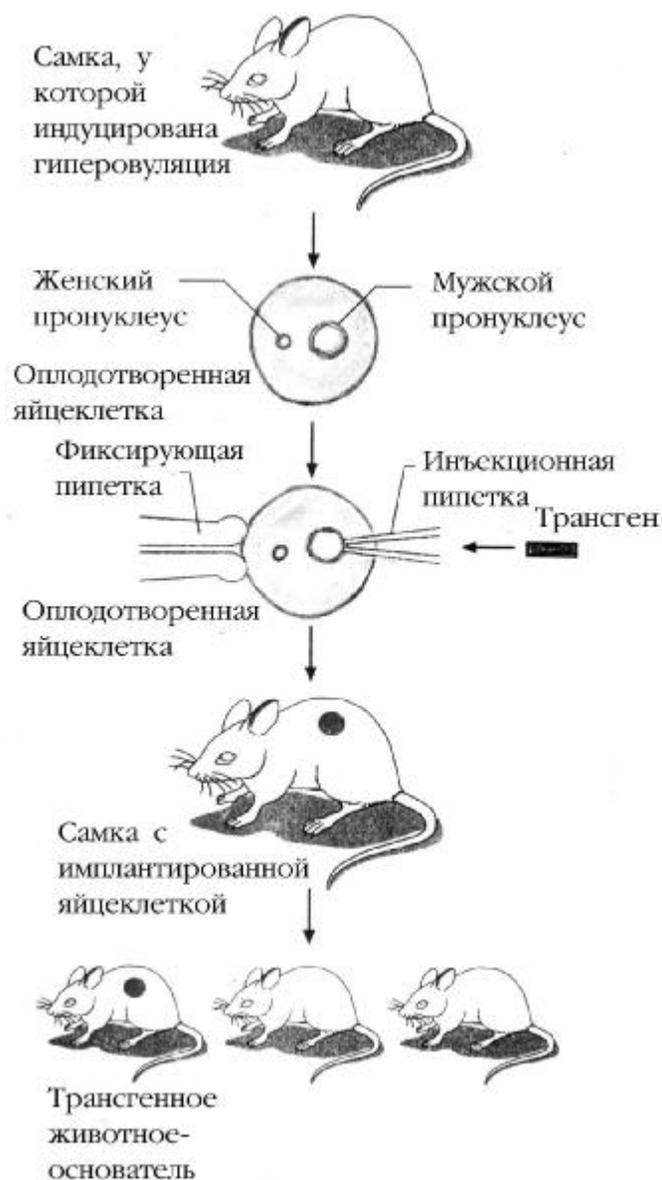


Рисунок 14. Получение линий трансгенных мышей методом микроинъекций [Глик, 2002], (пояснение в тексте)

через 12 часов после спаривания, выделяют оплодотворенные яйцеклетки и помещают их в культуру). Далее в больший из двух пронуклеусов (обычно мужской) инъецируют трансгенную конструкцию. После трансформации яйцеклетку немедленно имплантируют в яйцевод (или матку) “приемной”=“суррогатной” матери, которая производит потомство, или культивируют в условиях *in vitro* до стадии бластоцисты (бластоциста = бластула – зародыш, эмбрион млекопитающих на одной из ранних стадий развития), после чего имплантируют в матку. Для отбора трансгенных особей (несущих введенный ген) проводят молекулярно-генетический анализ родившегося потомства. Скрещивая трансгенных животных, можно получить чистые (гомозиготные) трансгенные линии. Недостатком традиционной технологии создания трансгенных животных путем микроинъекции

генетических конструкций в пронуклеус яйцеклетки является ее трудоемкость и малоэффективность. Так, полного развития достигает менее 1-5% зигот, трансдуцированных чужеродным геном.

Вторая схема получения трансгенных животных (более новая) – введение генетической конструкции в эмбриональные стволовые клетки (ЭСК=ES-клетки), взятые из бластоцисты (рисунок 15). Эти клетки явля -

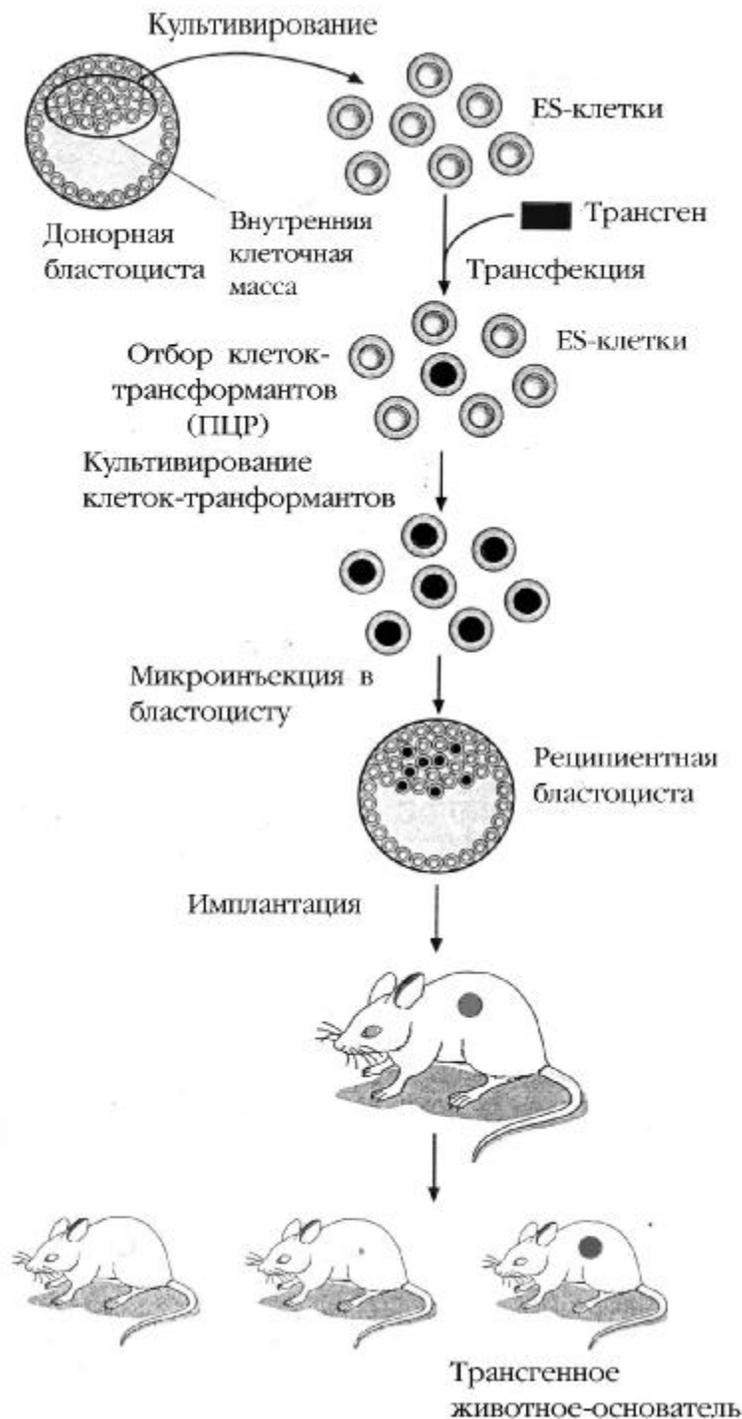


Рисунок 15. Получение трансгенных мышей с помощью генетической модификации эмбриональных стволовых (ES) клеток [Глик, 2002], (пояснение в тексте)

ются недифференцированными, плюрипотентными (тотипотентными), т.е. способны дифференцироваться в любые типы клеток, включая клетки зародышевой линии. ES-клетки, выделенные из эмбрионов на стадии бластоцисты, можно культивировать *in vitro* и после введения в них необходимого трансгена путем трансфекции (т.е. искусственного введения в клетки вектора, несущего трансген) либо инфицирования рекомбинантными вирусами ввести в другой эмбрион на стадии бластоцисты, а затем имплантировать в матку “суррогатной” матери, производящей потомство. Скрещивая животных-основателей, несущих трансген в клетках зародышевой линии, можно получить линии трансгенных животных. В отличие от метода микроинъекции в оплодотворенную яйцеклетку здесь еще на этапе работы с ЭСК можно проанализировать встраивание трансгена в геном клетки и проверить его экспрессию, что дает возможность выбрать линию ЭСК с наилучшими свойствами. Часть этих клеток можно заморозить в жидком азоте и хранить многие годы для последующего создания трансгенных животных.

Впервые культивируемые линии ЭСК были получены из бластоцист мыши Эвансом, Кауфманом и Мартином в 1981 году. Позже они были получены из бластоцист многих других млекопитающих: золотистый хомячок (1988); свинья, овца (1990); корова, норка (1992); кролик (1993); крыса (1994); обезьяна (1995) и даже человек (1994). Такой путь получения трансгенных животных выгоден еще тем, что используются не зиготы, а бластоцисты, которые легко вымываются из половых путей самок крупных видов млекопитающих нехирургическим путем. Затем получают химерные эмбрионы (путем введения трансгенных ЭСК в полость бластоцисты), которые трансплантируются нехирургическим путем “суррогатным” матерям для рождения трансгенных животных – основателей трансгенных линий. Кроме того, ЭСК – удобный объект для проведения в культуре генного нокаута (вектор замещает собой или встраивается в нокаутируемый ген).

Создание трансгенных животных – очень трудоемкий процесс. Так, по статистике одно трансгенное животное удается получить на 40 инъецированных зигот мыши, или на 100 зигот овцы или козы, или на 1500 зигот коровы. Из этих трансгенных животных не более 50% экспрессируют – трансгенный белок, не у всех животных чужой ген попадает в половые клетки, т.е. способен передаваться потомству. Поэтому большой интерес вызывают опыты по клонированию животных.

5.3. Клонирование животных

Под клоном обычно подразумевается популяция клеток или организмов – потомков одной клетки или организма, полученных неполовым путем. Таким образом, все особи в клоне имеют идентичный набор генов и должны быть точной копией взятого для размножения экземпляра (соответствующего прототипа).

Для генетиков растений получение клонов не составляет особых проблем. Клонирование растений черенками, почками, клубнями в садоводстве известно уже более 4 тыс. лет. Начиная с 70-х годов 20 века для клонирования растений *in vitro* (вне организма, на питательной среде) стали широко использовать небольшие группы и даже отдельные соматические (неполовые) клетки. Это стало возможным благодаря тому, что у растений (в отличие от животных) по мере их роста в ходе клеточной специализации - дифференцировки - клетки не теряют свойство тотипотентности, т.е. способности реализовывать всю генетическую информацию, заложенную в ядре. Поэтому практически любая растительная клетка, сохранившая в процессе дифференцировки свое ядро, может дать начало новому организму. Так, с использованием меристематической ткани взрослых деревьев карельской березы воронежские ученые (НИИ лесной генетики и селекции и ВГУ) на протяжении многих лет успешно клонируют хозяйственно ценные формы с декоративной узорчатой древесиной, которая широко используется в мебельной промышленности и кустарных промыслах.

У животных генетики могут получить подобные клоны в том случае, когда используемые ими объекты размножаются путем партеногенеза, т.е. бесполом путем, без предшествующего оплодотворения. У нас в стране блестящие работы по клонированию выполнены на шелкопряде академиком В.А. Струнниковым. Выведенные ими клоны шелкопряда (партеноклоны мужского пола, дающие на 20% больше шелка, чем женские) известны на весь мир.

Высшие животные в природе размножаются только половым путем. Клетки животных, дифференцируясь, лишаются тотипотентности. Считают, что в ходе клеточной дифференцировки у позвоночных происходит или потеря определенных генных локусов или их необратимая инактивация. В этом - одно из существенных их отличий от клеток растений и главное препятствие для клонирования взрослых позвоночных животных. Поэтому для клонирования взрослых позвоночных в основном используют малодифференцированные (не прошедшие специализации) делящиеся клетки.

Для клонирования животных ядро оплодотворенной яйцеклетки заменяют ядром, взятым от другой особи (с другой генетической информацией). Собственно ядро удаляется или инактивируется хирургически. Оказалось, что тотипотентность (возможность развиваться во взрослую особь) сохраняют ядра из клеток очень ранних эмбрионов. Когда число клеток (бластомер) эмбриона не превышает восьми, они еще тотипотентны и каждая из них может дать начало новому организму. Это позволяет проводить искусственное разделение 4-8 клеточных эмбрионов на отдельные клетки, культивировать их *in vitro* до стадии бластоцисты и имплантировать в матку "приемной" (суррогатной) матери, где они развиваются до рождения. Таким путем можно получать генотипически одинаковые особи (однойяйцевых близнецов).

Другая возможность заключается в использовании малодифференцированных эмбриональных стволовых клеток (ЭСК=ES-клетки), получаемых из бластоцист и характеризующихся высокой скоростью деления. В этом случае осуществляют перенос ядра из стволовой клетки в энуклеированные зиготы (т.е. в только что оплодотворенную *in vitro* яйцеклетку, из которой удалены оба пронуклеуса), которые затем имплантируют в матку “приемной” матери. Число идентичных стволовых клеток не ограничено, поскольку их можно клонировать. Поэтому количество получаемых однояйцевых близнецов зависит только от доступности яйцеклеток и наличия “приемных” матерей.

С использованием эмбриональных клеток был получен теленок Мистер Джефферсон, клоны мышей, поросят, обезьяна Тетра и др.

Сенсационность работы доктора Яна Вильмута с соавторами из Шотландии (1997г.) заключается в том, что впервые для клонирования млекопитающих были использованы ядра *соматических (дифференцированных) клеток взрослой овцы* (клетки соединительной ткани – фибробласты) беломордой породы Финский дорсет, выделенные из нижней части вымени овцы, находившейся на четвертом месяце беременности. Беременное животное было выбрано из-за того, что при беременности клетки вымени активно делятся и, следовательно, хорошо выживают в культуре. Ядра пересаживались в энуклеированные яйцеклетки овец шотландской черномордой породы, а затем были имплантированы в матку “приемной” матери черномордых овец. В результате появилась всемирно известная овца Долли, генотип и фенотип (беломордый ягненок) которой были полностью идентичны исходной матери (рисунок 16). Маркерами в данном случае

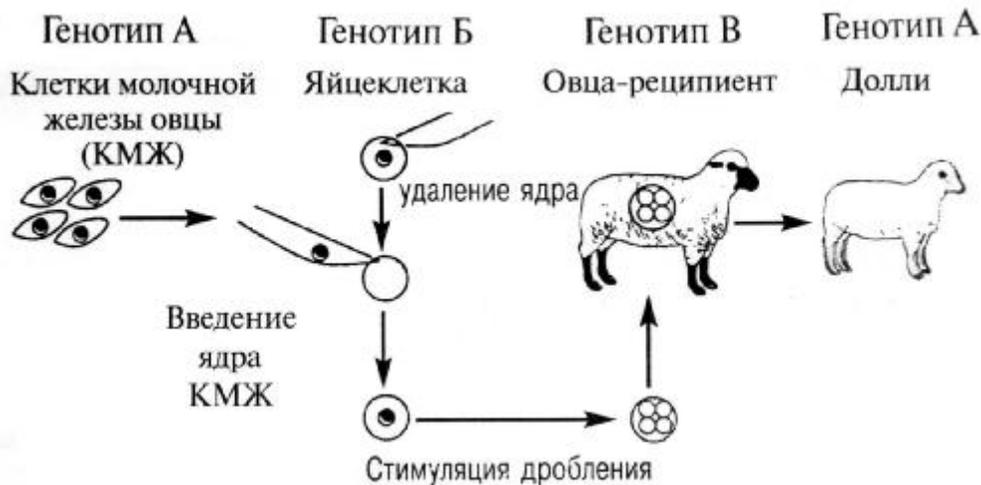


Рисунок 16. Схема генетического клонирования овцы [Корочкин, 2004], (пояснение в тексте)

служили масть овец и различные микросателлиты в составе ДНК. Этот эксперимент доказывает, что и соматические клетки взрослой особи могут быть тотипотентными, у них отсутствуют необратимые модификации генетического материала в ходе нормального развития. Однако процент вы-

хода нормально развитых жизнеспособных рожденных животных был ничтожно мал (только одно нормально сформированное животное из 277 зигот с трансплантированными ядрами – 0,4%). Большая часть трансплантированных зародышей погибла еще в утробе матери, остальные клоны имели различные патологии. Так, некоторые из новорожденных были ненормально велики, что, по мнению исследователей, было связано с опозданием в подсадке развивающихся эмбрионов в матку суррогатной матери. Кроме того, клонированная овца Долли старела в несколько раз быстрее своих "нормально рожденных" родственников. Согласно одному из наиболее вероятных объяснений быстрого старения является гипотеза, что оно происходит в силу запрограммированного ограничения количества делений и продолжительности жизни каждой соматической клетки высших организмов. По одной из версий это определяется длиной концевых участков плеч хромосом - теломерных повторов. При каждом делении клетки их длина уменьшается, что, соответственно и определяет оставшееся разрешенное клетке время жизни. Поскольку в качестве донорской при создании Долли использовалась клетка уже взрослого животного, которая претерпела до этого по крайней мере несколько делений, теломеры ее хромосом к тому времени были несколько укорочены, что и могло определить общий биологический возраст клонированного организма. Кроме того, у овечки Долли было обнаружено прогрессирующее заболевание легких, и в 2003 году животное пришлось умертвить - в возрасте семи лет. Этот эксперимент еще раз подтверждает извечную истину о том, что природа далеко не так проста и однозначна, как это может показаться.

В настоящее время перенос ядра соматической клетки в энуклеированную зиготу успешно проведен на мышах японскими учеными. Процент выхода рожденных мышат составил 2-2,8%. Таким образом, по крайней мере в некоторых случаях была доказана способность ядер соматических клеток обеспечивать нормальное развитие млекопитающих.

Имеются сообщения о клонировании свиньи, коровы, кошки. Однако, продолжительность жизни клонированных животных ниже нормы. Так, овечка Долли дотянула лишь до половины средней продолжительности жизни овец (7 лет). Ее австралийский "двойник" – Матильда погибла через два года после рождения, "помешав" своему создателю получить гигантский грант на создание клонированной овечьей отары. Клонированные в различных лабораториях мыши характеризуются пониженной жизнеспособностью и также "выдерживают" на этом свете не более половины средней продолжительности жизни, их обучаемость по сравнению с "исходным образцом" оставляет желать лучшего (это к вопросу о клонировании гениев! Как бы вместо гениев не получились идиоты!).

Недавними работами американских ученых доказано, что у клонированных таким способом млекопитающих примерно 4% генов работают ненормально. Следовательно, невозможно ожидать точного копирования образцов. Более того, такие аномалии в работе генов непременно приведут к развитию уродств различного рода. Кроме всего прочего, условия разви-

тия в матке разных матерей будут различаться. Это означает, что в разных условиях развития зародыша одинаковые гены будут работать по-разному. Т.е. вероятность полного сходства “клонированных” животных будет не очень велика. Не случайно “создатель” Долли Ян Вильмут вместе с выдающимся специалистом по эмбриологии млекопитающих Янишем написали в журнале “Science” заметку “*Не клонируйте людей!*”. Действительно, допустим, что трансплантировали развивающиеся яйцеклетки с чужеродными ядрами нескольким сотням приемных матерей (ведь процент выхода низкий!), чтобы получить хотя бы одну единственную живую копию, например, видного политического деятеля. А что будет с остальными зародышами? Ведь большая часть погибнет в утробе матери или разовьется в уродов, часть которых, не дай Бог, родится. Представляете себе – сотни искусственно полученных человеческих уродов. Именно поэтому известный ученый, член-корреспондент РАН Л.И. Корочкин рассматривает клонирование людей как преступление и выступает за принятие Государственной Думой моратория на манипуляции с человеческими зародышами.

Для чего проводят клонирование животных? Появление клонов важно для испытания новых лекарств, условий развития младенцев. Полная схожесть организмов дает возможность сравнивать влияние на них различных препаратов и внешних условий (например, оценивать мутагенность различных химических соединений). Исследования по клонированию животных имеют важное фундаментальное значение. Они позволяют выяснить механизмы дифференцировки клеток в процессе онтогенеза и можно ли этим процессом управлять. Это путь к генотерапии, искусственному созданию органов для трансплантации. Наконец, такие исследования представляют большой интерес для размножения трансгенных животных, которые могут утратить чужеродный ген в процессе полового размножения.

Первый клон трансгенных сельскохозяйственных животных был получен в 1997 г. на овцах методом пересадки ядер эмбриональных фибробластов, несущих в своем геноме ген фактора свертывания крови человека *FIX*. Первое размножение трансгенных животных с использованием соматического клонирования было выполнено в 1999 г. на козах. Используя ядра эмбриональных клеток (*CFF6-1*) плода коз, трансгенных по гену антитромбина III человека (*rhAT*), был получен клон из трех трансгенных животных, идентичность которых доказана методом Саузерн – блоттинг.

6. МЕДИЦИНСКИЕ АСПЕКТЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ ЧЕЛОВЕКА

Медицинские аспекты генетической инженерии человека затрагивают в основном 2 круга проблем – диагностику заболеваний и генную терапию.

6.1. Генодиагностика

Генодиагностика – совокупность методов по выявлению изменений в структуре генома. Генодиагностика - относительно новый раздел диагностики, получивший развитие в последние десятилетия.

Успехи современной медицины во многом зависят от того, насколько рано и точно можно диагностировать наиболее распространенные генетические и инфекционные заболевания, а также новообразования. Например, профилактику и лечение любого инфекционного заболевания значительно облегчает ранняя диагностика и точная идентификация вызвавшего его патогенного микроорганизма. Традиционно для проведения диагностической процедуры сначала выращивают культуру потенциально патогенного микроорганизма и лишь затем анализируют 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. Кроме того, весьма ограничена возможность выявления тех патогенных микроорганизмов, которые плохо растут в культуре, либо вообще не поддаются культивированию. К их числу относятся, например, облигатные внутриклеточные паразиты *Chlamydia trachomatis*, которые вызывают хламидиоз, болезнь, передающуюся половым путем.

Генная инженерия ввела в практику ДНК-диагностику, основанную на выявлении специфических нуклеотидных последовательностей в биологических образцах методом гибридизации (ДНК-ДНК, ДНК-РНК) или полимеразной цепной реакции (ПЦР). Гибридизация нуклеиновых кислот основана на применении зондов, используемых для выявления комплементарных последовательностей (искомого участка ДНК). Использование метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) для мультипликации тестируемой ДНК обеспечивает высокую чувствительность этих зондов. Зонды применяются: 1) в клинической микробиологии для обнаружения генов или нуклеотидных последовательностей, специфичных для возбудителя инфекционного заболевания, определения патогенных микроорганизмов – бактерий, вирусов и простейших. С помощью этого метода можно обнаружить в тканях единичные бактериальные клетки или частицы: хламидии, вирус гепатита С, возбудителей туберкулеза и др.; 2) для диагностики наследственных заболеваний путем нахождения специфических изменений в генах. Преимущества ДНК-диагностики – быстрота (возможность рутинного применения), надежность, высокая чувствительность и специфичность,

Диагностика наследственных заболеваний. Многообразие форм наследственных болезней (а их уже известно около 5 тыс.), изменчивость их клинических проявлений и часто отсутствие радикального лечения делают особенно актуальной разработку точных ранних (пре- и постнатальных) методов диагностики этих болезней, а также выявления носителей генов наследственных заболеваний. А это прежде всего ДНК-диагностика

и молекулярная цитогенетика. Гибридизационные зонды способны выявлять различия в тестируемых последовательностях, составляющих даже один нуклеотид. Подобные зонды существуют для диагностирования более 1000 наследственных заболеваний, в том числе, фенилкетонурии, серповидно-клеточной анемии, дефицита α -антитрипсина, мышечной дистрофии, болезни Альцгеймера и др. Одно из наиболее продвинутых направлений – ДНК-диагностика и лечение муковисцидоза (кистозного фиброза поджелудочной железы) – самого частого наследственного заболевания в европеоидных популяциях, а также гемофилий.

Гибридизационные зонды к минисателлитам, метод ПЦР стали эффективным средством в *геномной дактилоскопии*, т.е. метода выявления индивидуальных различий и особенностей у людей на уровне структуры ДНК. Геномная дактилоскопия широко применяется в области криминалистики и судебно-медицинской экспертизы (для идентификации личности). Метод основан 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. Анализ амплифицированных с помощью ПЦР участков мтДНК позволил идентифицировать останки последнего русского царя Николая II и его семьи.

6.2. Генная терапия

В настоящее время нет способов для исправления дефектов генетического материала человека, являющихся причиной развития наследственной патологии. При всех наследственных заболеваниях широко применяется симптоматическое лечение, с помощью которого удастся в той или иной мере снизить тяжесть клинической картины болезни. Оно включает применение различных лекарственных препаратов, физиотерапевтическое лечение, климатолечение и др. При некоторых наследственных болезнях такое лечение является единственно возможным способом облегчения развившейся симптоматики.

Большие перспективы в лечении наследственных заболеваний человека открывает *генная терапия (генотерапия)*, возможности которой сегодня интенсивно изучают, экспериментируя на различных биологических моделях (клетках бактерий, растений, животных, человека и др.) и используя в клинической практике.

Генная терапия – это устранение генетических дефектов (коррекция наследственных патологий) путем введения в соматические клетки полноценных (функционально активных) генов вместо (или помимо) поврежденного (мутантного) гена. Это способы лечения различных заболеваний, основанные на введении в организм чужеродной генетической информации с целью получения терапевтического эффекта. Т.е. генотерапия направлена на компенсацию нарушенных функций клетки на генетическом уровне. Причем, таким способом возможно лечение не только генетических, но и других неинфекционных и инфекционных заболеваний (рак,

СПИД и т.п.), поэтому методы генной терапии различны. В случае генетических болезней генная терапия осуществляется путем введения нормального гена (трансгена, находящегося в составе генно-инженерной конструкции) в ту ткань, где этот ген должен функционировать. Крайне желательно, чтобы введение сопровождалось замещением мутантного аллеля. Однако технически это пока не удается, и обычно добавленные в клетки гены функционируют на фоне мутантных в силу своей доминантности.

Как уже отмечалось, описано около 5 тыс. наследственных заболеваний у человека, но только примерно для тысячи из них найдены и картированы повреждаемые гены. Согласно последним данным, дефекты в 770 генах вызывают моногенные заболевания (мышечная дистрофия Дюшенна, фенилкетонурия, хорей Гентингтона, болезнь Гоше - лизосомная болезнь накопления, гемофилии А и В и др.). Большая часть этих генов клонирована и ведется поиск методов их использования для генной терапии. В том случае, когда болезнь связана с отсутствием или малым количеством белкового продукта (что характерно для действия рецессивного мутантного гена) используется так называемая заместительная терапия: в клетку вводится неповрежденный ген и создаются условия для его экспрессии (наряду с экспрессией мутантного гена) с целью получения достаточного количества нормального белка-продукта. При корректирующей терапии дефектный ген реально заменяется в геноме нормальной копией (например, путем замены пары нуклеотидов, связанной с данным дефектом в мутантном гене, на “правильную” пару).

Большинство же генетических болезней являются полигенными (атеросклероз, рак, артрит и др.). В этом случае предлагается не исправлять генетические дефекты, а вводить такие гены, которые ослабляют последствия этих дефектов. Например, генная терапия некоторых видов рака развивается по линии повышения иммунного ответа по отношению к раковым клеткам и по линии индуцирования гибели раковых клеток путем доставки к ним таких веществ, которые в процессе метаболизма образуют токсические для них молекулы. В случае, когда опухоль была вызвана суперэкспрессией онкогена *K-RAS*, ее дальнейшее развитие удалось предотвратить введением в клетки ретровирусного вектора, обеспечивающего синтез антисмысловой РНК, комплементарной к мРНК онкогена. Белок *p53* является супрессором и подавляет развитие опухолей, а его дефектность вызывает рак. Лечение таких больных заключается в введении неповрежденного гена – супрессора *p53* в опухолевые клетки (дефектные по гену *p53*), что приводит к их гибели.

Вирусные инфекции могут рассматриваться как приобретенные генетические заболевания, поскольку некоторые из них (вирус Эпштейна-Барр, вирус гепатита В) могут вызвать развитие рака у инфицированных индивидуумов. Генная терапия таких людей может заключаться во введении в определенные ткани генов с антивирусным эффектом, чтобы предотвратить их онкотрансформацию. Выявление таких тканей (клеток) определяет успех генной терапии. Например, известно, что основной мишенью

для вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) являются *CD4* лимфоциты, которые можно легко выделять из организма, вводить в них нужный ген (например, антисмысловой РНК для вирусной мРНК) и возвращать обратно. Цель манипуляций – предотвратить в клетках развитие вируса (явление предложено называть внутриклеточным иммунитетом).

6.3. Методы генной терапии

Принципиальный смысл генной терапии заключается в замещении мутантного белка клеток человека (с которым связано развитие болезни) на соответствующий нормальный белок, который будет синтезироваться в таких клетках.

Для лечения заболевания на молекулярном уровне применяют два основных подхода. 1. Генная терапия *ex vivo* - введение “здорового” гена (генов) в выделенные из организма больного и культивируемые *in vitro* соматические клетки (т.е. в клетки-мишени вне организма) с последующей имплантацией трансформированных клеток обратно в организм (в органы или кровотоки). 2. Генная терапия *in vivo* - введение гена непосредственно в ткань или орган больного с генетическим дефектом, рисунок 17.

Для получения терапевтического эффекта необходимо ввести гены в большое число клеток ткани-мишени, для чего более подходят методы *ex vivo*. Для переноса генов чаще всего используют относительно легко доступные клетки: фибробласты, лимфоциты, клетки печени - гепатоциты, каратиноциты, эндотелиальные и мышечные клетки, стволовые клетки костного мозга. Такие клетки можно извлечь из организма, включить в них нужную генную конструкцию, провести отбор и культивирование *in vitro* трансформированных клеток, а затем вновь ввести их (реимплантировать) в организм больного. При этом у реципиента не развивается нежелательного иммунного ответа, но сама процедура является весьма дорогостоящей и трудоемкой. Осуществление этих работ возможно лишь в крупных специализированных центрах, требует больших материальных затрат и высоких биотехнологий. В настоящее время в клиниках экспериментируют с Т-лимфоцитами (острый комбинированный иммунодефицит, вызванный дефектом в гене *ADA*), миобластами (мышечная дистрофия Дюшенна: дефект в гене дистрофина), фибробластами (гемофилия – дефекты в генах факторов IX или VIII), клетками эпителия бронхов (муковисцидоз – дефект в гене CF-трансмембранного фактора) и гепатоцитами (семейная гиперхолестеринемия – дефект в гене рецептора липопротеинов низкой плотности). Причем, “здоровые” гены необязательно вводят в те клетки, где они в норме экспрессируются. Например, факторы IX и VIII синтезируются в гепатоцитах, но в лечебных целях их гены вводят в фибробласты.

В том случае, когда клетки с дефицитным геном нельзя извлекать и культивировать, проводят трансгеноз *in vivo* (инъекции в ткань рекДНК, рекомбинантного вируса, липосом с ДНК и др.). Это очень перспективный подход, рассчитанный на массовое лечение широко распространенных за-

болеваний, однако пока он апробирован только для лечения муковисцидоза.

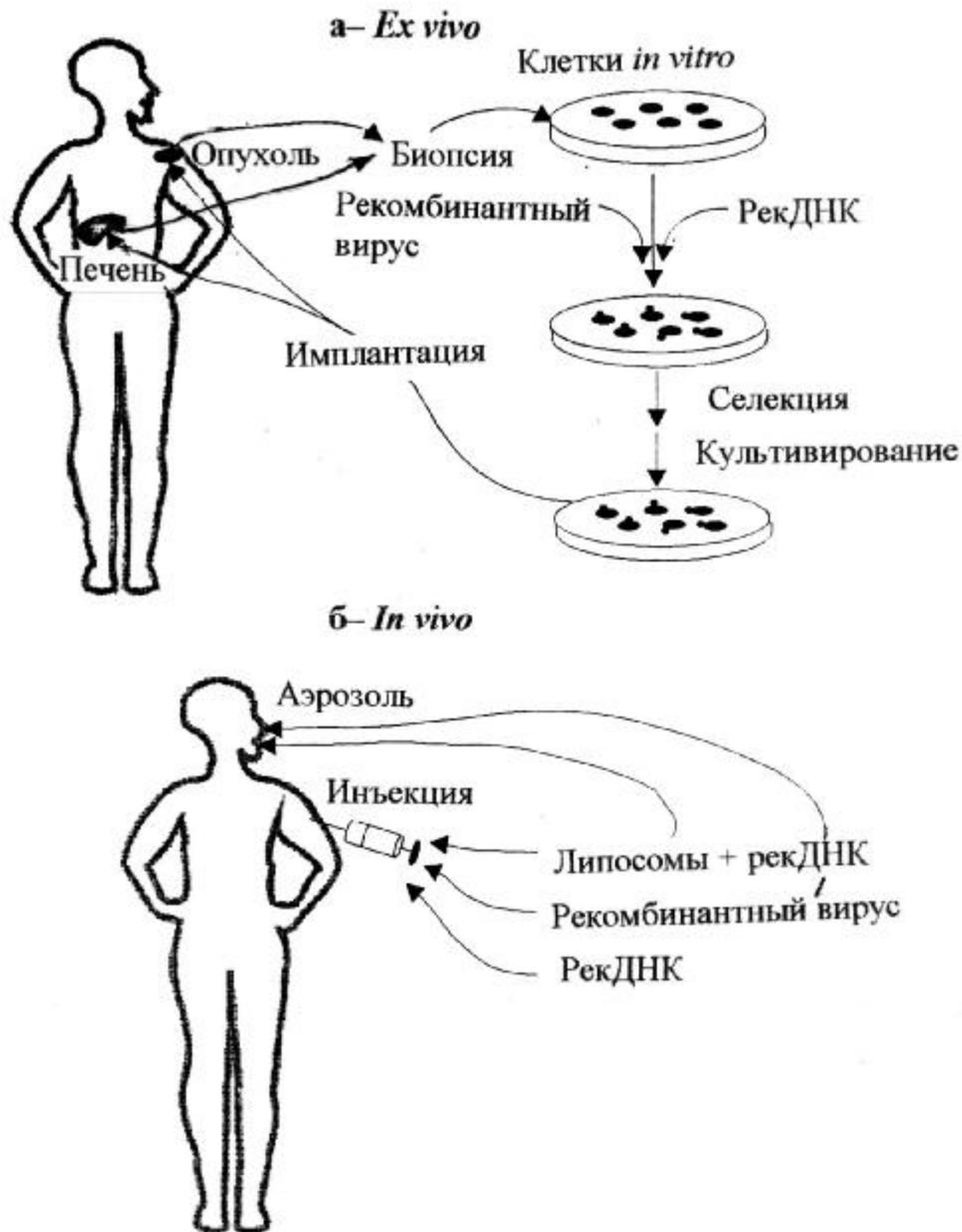


Рисунок 17. Две стратегии генотерапии: введение терапевтических генов в клетки-мишени вне организма (а) или внутри организма (б)
[Рыбчин, 1999]

Какие существуют системы переноса чужеродных генов? Для этой цели испытываются плазмидные и вирусные (ретровирусные, аденовирусные) векторы (комплекс вирусная ДНК-ген человека), инъекция чистой ДНК, бомбардировка микропулями, трансген в составе липосомного комплекса, трансплантация клеток и др.

Прежде чем приступать к генной терапии человека, каждая конкретная система (определенный ген, вектор, ткань, способ введения вектора в

клетки ткани и клеток в организм) должна быть апробирована в аналогичных условиях на животных. Это необходимо для того, чтобы убедиться, что новый ген можно вводить в клетки определенных тканей и что он сохранится достаточно долго, будет экспрессироваться в клетках на необходимом уровне и не причинит вреда (клетке или всему организму).

6.4. Примеры практического применения генной терапии

Первая успешная попытка применить генотерапию в клинической практике была предпринята в 1990 году в США для излечения у 4-летнего ребенка иммунодефицита, обусловленного мутацией в гене аденозиндезаминазы (*ген ADA*). При этом заболевании в крови накапливается в высокой концентрации 2'-дезоксиаденозин, оказывающий токсическое воздействие на Т- и В-лимфоциты. Пациенты не переносят контактов с любой инфекцией из-за тотального отсутствия иммунитета. У больного ребенка извлекали клетки Т-лимфоциты крови, культивировали в пробирке и при помощи ретровирусного вектора вводили неповрежденный ген (нормальную копию гена *ADA*), кодирующий аденозиндезаминазу. Рекомбинантные клетки вырастили до общего количества в несколько миллиардов и ввели в кровь пациентке. На протяжении 10,5 месяцев пациентке было сделано 8 аутологичных вливаний трансформированных лимфоцитов и после полугодового перерыва программу реинфузии повторяли каждые 3-5- месяцев. Уже после первого цикла число Т-лимфоцитов нормализовалось, концентрация *ADA* в циркулирующих клетках крови увеличилась с 1 до 20-25% нормального уровня и резко улучшились основные иммунные характеристики. На протяжении более чем 6 мес после прекращения массивных вливаний в кровотоке пациентки устойчиво сохранялось высокое число корреktированных Т-лимфоцитов, что позволило в дальнейшем снизить количество вводимых клеток и значительно увеличить промежуток между этими процедурами. Это событие считается "днем рождения генной терапии". С 1990 г. стал издаваться журнал "Генная терапия".

Хорошие перспективы существуют для излечения генно-инженерными методами лизосомных болезней накопления. На сегодняшний день поддаются излечению с помощью транспозона уже около 10 болезней человека.

Ряд исследователей в разных странах полагают, что сегодня наиболее реальна генотерапия муковисцидоза. Это тяжелое, рецессивно наследуемое заболевание (поражающее в странах Европы одного из 2500 новорожденных), обусловленное дефектами в гене *CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane regulator*), которые приводят к поражению экзокринных желез и проявляются чаще всего в виде бронхолегочных изменений. В протоках некоторых органов (особенно в легких и поджелудочной железе) скапливается слизь. Она становится источником бактериальной инфекции, которая с трудом поддается лечению антибиотиками. Продолжительность жизни больных муковисцидозом составляет в настоящее время 25-30 лет. Надеяться на более быстрый успех генотерапии позволяет доступность ле-

гочной ткани для ингаляций; тем более что, по имеющимся данным, для терапевтического эффекта достаточно всего 5 - 10% нормально функционирующих клеток. Среди возможных векторов для доставки корригирующих ДНК к клеткам и тканям-мишеням при генотерапии муковисцидоза рассматриваются вирусные, плазмидные и липосомные конструкции. Например, для лечения легочной формы муковисцидоза лечебный ген, включенный в липосомы, вводят в дыхательные пути в форме аэрозоля. Однако до клинических испытаний предстоит еще решить непростые вопросы взаимодействия генетических препаратов с клетками, устойчивости эффекта и т.д.

В настоящее время успешно разрабатываются, в том числе и в нашей стране, генно-инженерные подходы лечения мышечной дистрофии Дюшенна. Мышечная дистрофия Дюшенна – заболевание, сцепленное с X-хромосомой, приводит к ранней инвалидности и летальному исходу в возрасте до 20 лет одного из каждых 3500 новорожденных мальчиков. Причиной заболевания являются мутации (преимущественно делеции) гена (локализованного в X-хромосоме), отвечающего за синтез дистрофина – мышечного белка, играющего ключевую роль в поддержании структурной целостности, обеспечении нормальной трофики и формирования клеточного материала поперечно-полосатых мышц. Отсутствие дистрофина приводит к прогрессирующей дегенерации скелетных и сердечных мышц. Один из возможных подходов к терапии этой болезни – восстановление экспрессии дистрофина путем трансплантации миобластов в мышцы. Миобласты являются предшественниками клеток скелетных мышц и рассматриваются как клеточный вектор благодаря своей уникальной способности сливаться с мышечными волокнами или образовывать новые. Миобласты легко выделяются из мышечной ткани, хорошо выращиваются в культуре, сохраняя при этом способность к дифференцировке. Стабильная экспрессия введенных (нормальных) генов в ядрах трансплантированных миобластов наблюдается до 6 мес. Описан положительный терапевтический эффект, когда 21 мальчику в возрасте 6-14 лет, имеющим это заболевание, трансплантировали в мышцы нормальные миобласты, взятые от братьев или отца и выращенные в культуре до нужного количества. Инъекции производились в разные мышцы обеих нижних конечностей. Ранее неподвижный ребенок приобретал способность двигаться!

В опытах с мышами введенные в кровоток миобласты, содержащие ген гормона роста человека, вошли в состав мышечной ткани и экспрессировали этот ген, что позволяет рассматривать возможности использования миобластов для доставки генов, кодирующие другие гормоны, ростовые факторы, противоопухолевые агенты.

Другой генно-инженерный подход лечения мышечной дистрофии Дюшенна – ген дистрофина вводят непосредственно в скелетные мышцы с мышечной дистрофией путем инъекции. Процедура должна неоднократно повторяться. Векторная ДНК попадает в кровь и разносится по всему организму. В опытах на мышах показано, что увеличение количества гена дис-

трофина происходило не только в скелетных мышцах, но также в диафрагме и в сердце, поражение которых – одна из частых причин смерти. Ген дистрофина экспрессируется и оказывает терапевтический эффект. Уже через 20 дней после баллистической трансфекции поперечные размеры мышечных волокон (содержащих доставленный ген) приближались к нормальным. Для снятия симптомов заболевания необходимо восстановить экспрессию дистрофина примерно в 20-30% мышечных волокнах.

При лечении “семейной гиперхолестеринемии”, обусловленной мутацией белка-рецептора, который в клетках печени должен связывать частицу, переносящую холестерин в плазме крови, у больного отсекают 200-300 г печени. Гепатоциты (клетки печени) культивируют и подвергают трансформации в лабораторных условиях. В них вводят нормальный ген, используя в качестве вектора аденовирус или путем бомбардировки клеток из специальной “генной пушки” золотыми пулями, т.е. частицами золота с нанесенными на них фрагментами ДНК, включающими лечебный ген. Трансформированные гепатоциты вводят больному обратно в печень через кровеносные сосуды. Сходная процедура осуществляется при лечении врожденного иммунодефицита, болезни Гоше, для некоторых форм рака. В последнем случае в клетки доставляется ген-супрессор опухоли *p-53*.

В настоящее время разрабатывается ряд подходов для лечения некоторых опухолей генно-инженерными методами. Так, например, для лечения меланом используют инфильтрирующие опухоль лимфоциты, в которые введен ген фактора некроза опухоли. При введении таких лимфоцитов в пораженный организм наблюдается лечебный эффект. Имеются данные о возможности лечения опухолей головного мозга при использовании ретровирусных векторов, которые переносят обладающий лечебным эффектом трансген только в делящиеся клетки опухоли, но не затрагивают при этом делящиеся клетки.

В международных документах Всемирной организации здравоохранения, ЮНЕСКО, Совета Европы и других признается этически допустимой только генотерапия соматических, но не зародышевых клеток, поскольку прогноз отдаленных последствий и побочных эффектов последней невозможен. Свою роль должны сыграть и методы выращивания и исследования эмбрионального материала вне организма (*in vitro*).

В СМИ 2001 г. появились сенсационные сообщения о рождении в США первых генетически модифицированных детей. Генно-инженерный подход использован для преодоления врожденного бесплодия женщин, вызванного дефектом митохондрий. Известно, что инактивация в результате мутаций митохондриальных генов является причиной различных патологических состояний – от наследственной слепоты и глухоты до диабета и старческого слабоумия. Все митохондриальные заболевания (так же, как и сами митохондрии) наследуются по материнской линии. Генетически модифицированные дети появились у обреченных на бесплодие матерей благодаря переносу в их яйцеклетки ДНК недефектных митохондрий. Для этого в яйцеклетку женщины, страдающей бесплодием, тончайшей пипет-

кой вводится сперматозоид мужа и капелька цитоплазмы из яйцеклетки здоровой женщины-донора. Перенесенные митохондрии донора приживаются в яйцеклетке, восстанавливают нормальный уровень энергетического метаболизма клетки и обеспечивают ее дальнейшее нормальное развитие в матке матери, куда подвергшаяся микрооперации яйцеклетка возвращается. Из 15 детей, искусственно зачатых с помощью такого подхода, 13 живут в США, 1 ребенок в Великобритании, 1 – во Франции. Изучение мтДНК двух младенцев показало, что в их клетках действительно присутствуют митохондрии как родной матери, так и женщины-донора.

Таким образом, в будущем генная терапия может стать одним из ведущих направлений в лечении наследственно патологии человека в связи с возможностью исправлять функции генетического аппарата больного, нормализуя, таким образом, его фенотип.

7. ПРОБЛЕМЫ БИОБЕЗОПАСНОСТИ ТРАНСГЕННЫХ ОРГАНИЗМОВ

7.1. Понятие о биобезопасности. Природа рисков для здоровья человека и окружающей среды, связанных с использованием трансгенных организмов, методы оценки и способы предупреждения

Генетическая инженерия – передовое направление науки. Возможность манипулировать генами – одно из величайших достижений биологии XX века, но оно накладывает на ученого большую ответственность за возможные экологические последствия такого манипулирования, которые необходимо учитывать наряду с ростом экономической выгоды от получения трансгенных организмов. Нельзя закрывать глаза на то, что генетическая инженерия может привести и к результатам, опасным для человека. При объединении разнородных генов могут возникнуть молекулы ДНК с непредсказуемыми свойствами. Особенно опасны опыты, которые могут привести к появлению форм болезнетворных бактерий, устойчивых к антибиотикам и другим медикаментам, а также опыты с вирусами, вызывающие злокачественные опухоли.

Поэтому в лабораториях, занимающихся генной инженерией, необходимо соблюдение строгих мер, предотвращающих получение опасных результатов. Такие меры сейчас разработаны учеными разных стран и должны обязательно соблюдаться.

Сознавая серьезную ответственность перед человечеством за вмешательство в природу организмов, ученые, занимающиеся генной инженерией, способствовали развитию нового научного направления – *биобезопасности*. Главная задача этого направления – оценить, не несет ли использование ГМО нежелательное воздействие на окружающую среду, здоровье человека и животных, а *главная цель* – открыть путь к использованию достижений современной биотехнологии, гарантируя при этом безопасность. Под *биобезопасностью* понимается защищенность человека, общества, цивилизации и окружающей среды от вредного воздействия, опасного для

жизни и здоровья людей токсичных и аллергенных биологических веществ и соединений, содержащихся в природных или генно-инженерно-модифицированных биологических объектах и полученных из них продуктов.

В 1974 г. одиннадцать ведущих молекулярных биологов мира во главе с отцом генной инженерии американцем П. Бергом, создавшим первую рекомбинантную молекулу ДНК, обратились к мировому сообществу с письмом через журнал “*Science*”, в котором предложили отказаться от экспериментов с рекомбинантными ДНК до проведения международной конференции по этой проблеме. Однако уже в 1975 г. на конференции в Асиломаре (США) ученые пришли к выводу, что эксперименты в области биотехнологии, генной инженерии не более опасны, чем аналогичные работы в других отраслях, но в них, как и везде, необходим строгий контроль за соблюдением мер биобезопасности. В 1976 г. в США были приняты первые правила, регламентирующие работу с рекомбинантными микроорганизмами.

Важность контроля за использованием новых методов биотехнологии связана с озабоченностью общественности тем, чтобы не возникла проблема «биологического Чернобыля».

В чем могут заключаться причины и какова природа рисков от использования генетически модифицированных организмов (ГМО)? Можно выделить три группы таких причин:

1. Общебиологические.
2. Воздействие на здоровье человека.
3. Загрязнение окружающей среды.

1. Известно, что встраивание трансгенов происходит случайным образом, т.е. новые гены могут встроиться в любую часть ядерного генома, в результате чего функционирование других близлежащих генов может быть нарушено, вплоть до их “замолкания” (сайленсинга), или, наоборот, суперэкспрессии. В последнем случае сорта растений, образующие какие-либо токсичные соединения (например, соланины картофеля) в концентрациях, безвредных для здоровья человека, могут усилить их синтез до уровня, превышающего предельно допустимые значения. Кроме того, привнесенный ген может встроиться в область ДНК, уже занятую другим геном, в результате чего продукт данного гена образовываться не будет, что может привести к нарушению определенной функции в организме. Правда, вероятность этих событий слишком мала, т.к. основную часть в геноме эукариотических организмов занимает избыточная (некодирующая) ДНК. На долю же структурных генов и их регуляторных элементов приходится всего около 10%. Т.е. структурные гены в молекуле ДНК расположены не плотно один за другим (как кадры на фотопленке), а через большие промежутки, занятые некодирующими последовательностями нуклеотидов. Более того, даже в пределах структурного гена имеются некодирующие участки (интроны), которые вырезаются в ходе созревания мРНК.

- В настоящее время не хватает данных о функционировании измененной ДНК и возможности неблагоприятных мутаций.

- Использование генетически однородных ГМО может привести к их одновременной гибели в результате патогенного воздействия грибов, вирусов и пестицидов.

- ГМО могут быть перенесены насекомыми, птицами в другие районы. Это в свою очередь может вызвать изменение флоры и фауны этих районов.

2. Возможность побочных эффектов от изменения состава пищи человека.

- Возникновение мутаций у ГМО и, в связи с этим, образование новых веществ в пище.

- Развитие неизвестных аллергических реакций в результате синтеза новых для ГМО белков-продуктов.

- Снижение питательной ценности продуктов питания, получаемых из ГМО.

- Возможность переноса трансгенов в другие организмы: вертикальный перенос генов от ГМО диким сородичам культурного вида или горизонтальный перенос генов, например селективных генов устойчивости к антибиотикам от генетически модифицированного растения микроорганизмам пищеварительного тракта (в том числе болезнетворным). В этом случае гены и их продукты, безобидные у ГМО, могут оказаться весьма опасными в другой генетической и экологической среде.

Так, одним из главных возражений против употребления “*трансгенных*” *пищевых продуктов* (или их еще называют *генетически модифицированными источниками пищи – ГМИ*) является наличие во многих из них генов устойчивости к антибиотику (в частности, к канамицину), которые содержались в исходной конструкции ДНК в качестве селективных. Предполагается, что эти гены устойчивости могут при переваривании пищи передаваться эндогенной микрофлоре, в том числе патогенной, в результате чего микробы могут приобрести резистентность к данному антибиотику. Однако в реальности вероятность такого события ничтожно мала (она оценивается как приблизительно 10^{-17}). Не стоит забывать, что встраиваемые в растения гены устойчивости “настроены” для экспрессии лишь в эукариотических, но не бактериальных клетках. Тем не менее, протесты общественности сделали свое дело: генные инженеры уже давно разрабатывают подходы, чтобы исключить присутствие “подозрительных” генов в трансгенных растениях. В большинстве случаев маркерные гены устойчивости к антибиотикам заменяют на гены устойчивости к гербицидам. Правда, применение “гербицидных” генов также встречает возражение, но уже защитников окружающей среды. Уже сейчас предложено несколько способов избирательной элиминации маркерного гена после получения желаемого трансгенного растения, когда он фактически уже не нужен. Перспективным в этом плане является замена селективных генов на репортерные при отборе трансгенных форм растений.

Стратегия оценки безопасности генетически модифицированных источников пищи основана на принципе “*существенной эквивалентности*”, разработанном OECD (Организацией экономического сотрудничества и развития). Согласно этому принципу, оценивается не уровень безопасности новых продуктов питания как таковой, а его изменение в сравнении с традиционными пищевыми аналогами, имеющими длительную историю безопасного использования. Ведь потенциально опасными для здоровья человека и окружающей среды могут быть и сорта, породы, штаммы организмов, выведенные с помощью традиционной селекции. Для того чтобы вычлнить эффект именно генетической модификации, необходимо сравнивать генетически модифицированный организм с исходным, обычным сортом. Т.е. проводят тщательный сравнительный анализ генетически модифицированного организма и исходного (немодифицированного) организма. Для этого сопоставляют агрономические показатели, продукты встроенных генов, состав ключевых химических компонентов, профиль основных метаболитов и др. При оценке возможной токсичности или аллергенности трансгенных растений применяют те же жесткие стандарты, как и для полученных традиционным путем новых сортов культурных растений или новых видов продуктов питания.

Анализ “существенной” эквивалентности ГМО и исходной линии наиболее актуален для видов растений, которые в принципе могут быть опасными для здоровья человека: картофель, томаты (из-за токсичных гликоалкалоидов), хлопок (из-за токсичного госсипола) и другие.

Чтобы трансгенный сорт был допущен к хозяйственному использованию, он не должен существенно отличаться от исходного, кроме как по принесенному в результате трансгенеза признаку или по признакам, которые были целью генетической модификации.

3. К факторам загрязнения окружающей среды в результате использования ГМО можно отнести взаимодействие ГМО с дикими родственными видами и часто непредсказуемые изменения окружающей среды (например, риск переноса генов устойчивости к гербицидам от трансгенных растений к их диким сородичам-сорнякам). В других случаях такие изменения можно спрогнозировать. Так, доктор Энн Капучински описывает возможные последствия от скрещивания модифицированных рыб со встроенным гормоном роста, которые быстрее росли и активнее размножались, с родственными им нормальными организмами. Однако выживаемость их потомства была ниже, чем у нормальных собратьев.

Проблема возможного ущерба для окружающей среды имеет несколько аспектов. Так, опасность ГМР для окружающей среды может возникнуть вследствие появления у них повышенной конкурентноспособности (например, за счет приобретенной устойчивости к холоду, жаре, засухе, засолению, болезням и вредителям), результатом которой может стать сокращение биоразнообразия растений и быстрое истощение почвы, а устойчивость к насекомым-вредителям способна нарушить природное равновесие.

Возможность появления суперсорняков и супервредителей также фигурирует среди основных проблем, когда рассматривают экологические риски, связанные с ГМО. Так, существует опасение, что устойчивые к гербицидам культурные растения могут при межвидовом опылении передавать эти гены близкородственным сорнякам, которые могут превратиться в неистребимые суперсорняки (superweeds). Сорняки – это группа растений с определенным набором адаптивных признаков, которые помогают им существовать в окружающей среде, в том числе среди посевов культурных растений, несмотря на жесткую конкуренцию со стороны других организмов, а также постоянное воздействие со стороны человека, который всеми возможными средствами пытается их извести. Как считают специалисты, вероятность такого события очень мала. Кроме того, в практике сельского хозяйства уже давно используется ряд устойчивых к гербицидам сортов, полученных путем обычной селекции. При этом никакой экологической катастрофы широкое использование таких устойчивых сортов до сих пор не вызвало. Тем не менее, генные инженеры активно разрабатывают подходы для исключения подобной опасности. К их числу относится, например, введение генов устойчивости не в ядерный, а в хлоропластный геном. Это может предотвратить нежелательное распространение генов с помощью пыльцы, т.к. хлоропласты наследуются по материнской линии. Кроме того, при оценке риска неблагоприятных экологических эффектов ГМО обязательно анализируется сам трансгенный признак на предмет его адаптивности, а также вероятности его переноса диким сородичам.

Нежелательное следствие использования трансгенных растений с генами инсектицидов заключается в том, что пыльца этих растений может быть токсичной для полезных насекомых, которые данной пылью питаются. Некоторые экспериментальные данные говорят о том, что такая опасность действительно существует. Однако и здесь уже предложены и испытаны адекватные генно-инженерные решения. Например, использование трансгенеза через хлоропластную ДНК или промоторов, не работающих в пыльце.

Можно констатировать, что практически для всех выдвигаемых возражений против использования трансгенных растений наука находит адекватные и эффективные ответы.

Что касается практических результатов проведения генно-инженерных исследований, то наибольшая озабоченность у населения, особенно европейских стран, вызывает возможность использования трансгенных пищевых продуктов (ГМИ), которые поступают на рынок.

Общественные дебаты в Западной Европе привели к неприятию продукции биотехнологии, но что характерно, не всей, а именно агrobiотехнологии – генетически модифицированных с/х растений, пищи и кормов. Промышленная биотехнология и фармакологическое направление остались как бы “невидимыми” для широких масс. Главным аргументом, использованным общественными организациями “Гринпис”, “Друзья земли” и т.д. являлась “уверенность” в прогнозируемом неблагоприятном воздей-

ствии ГМР на окружающую среду. В результате начиная с октября 1998 г. фактически был введен мораторий на ширококомасштабное выращивание и размещение на рынке тех ГМО, которые не были еще зарегистрированы. До этого уже были разрешены 18 ГМР, включая масличный рапс, кукурузу, цикорий, гвоздику и табак. Дискуссия об опасности ГМР, проводимая в Европейском Союзе (ЕС) отодвинула ЕС на много лет назад по сравнению со странами – лидерами биотехнологии, к которым относятся США, Аргентина, Канада и др. Ситуация оставалась без изменений до конца 2002 г. и ее экономические последствия для ЕС уже сказались. ЕС становится менее конкурентноспособным в новом секторе мирового сельского хозяйства – агробиотехнологии, фармацевтической промышленности; упущена выгода в улучшении экологии; предприниматели терпят убытки; отсутствие вложений в новую область ведет и к потере научных кадров.

В 2002 г. ситуация начала меняться: Европейская Комиссия приступила к разработке новой стратегической линии: “Науки о жизни и биотехнология – Стратегия для Европы”, а в ноябре 2002 г. парламент ЕС проголосовал за поддержку исследований в сфере биотехнологии и регулирования ГМО; новая директива создала юридическую основу для выпуска ГМО в окружающую среду и на рынок.

Однако негативное отношение Европы оказало заметное влияние на позицию общественности других стран – России, например. Обеспокоенность общественности растет, невзирая на информацию ученых о проведенной научной оценке, показывающей достоверно минимальный риск ГМР для окружающей среды, на подтвержденную всесторонними проверками безопасность пищи из генетически модифицированных источников.

Создание ГМР – высоко технологичный процесс, основанный на фундаментальных научных знаниях, требующих высоко квалифицированных кадров и мощной современной инструментальной базы. Трансгенное растение создается в научных лабораториях, проходит стадию испытаний в теплицах и в полевых условиях, затем государственное сортоиспытание, регистрацию и, наконец, выходит на рынок: для выращивания в окружающей среде; употребления в пищу непосредственно или в переработанном виде; в качестве кормов для животных, или как источник лекарств – “съедобных” вакцин.

С 1975 г. одновременно с бурным развитием генной инженерии развивается новое направление, связанное с живыми измененными организмами – биобезопасность. Совместными многолетними усилиями международных организаций (ЮНЕП), экспертов из разных стран, в т.ч. России, были разработаны базовые понятия, основные положения и методические указания по оценке биобезопасности ГМР. *В течение 20 лет, прошедших с момента выхода ГМР на рынок, не было выявлено ни одного достоверного отрицательного воздействия их на окружающую среду и здоровье человека и животных ни в ходе испытаний, ни при коммерческом использовании.*

7.2. Государственное регулирование безопасности генно-инженерной деятельности в России

Во всех государствах с развитой генно-инженерной деятельностью в науке и производстве в настоящее время приняты законы и другие государственные акты, создающие нормативно-правовую базу для генно-инженерных исследований.

Как же обеспечивается биобезопасность в России? Началом включения России в мировую систему биобезопасности считают ратификацию страной “Конвенции о биоразнообразии” в 1995 г. С этого момента началось формирование национальной системы биобезопасности (НСБ) как части системы национальной безопасности страны, при этом учитывались международные рекомендации.

Отправная точка создания действующей в настоящий момент НСБ – вступление в силу Федерального закона РФ “О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности” (1996г.). Законом установлены четыре уровня риска возможного потенциального вредного воздействия генно-инженерной деятельности на здоровье человека, в соответствии с которыми устанавливаются требования по строгому соблюдению условий при их осуществлении.

Все работы генно-инженерного плана подразделяются на два типа – ведущиеся в “закрытых” или “открытых” системах.

Работы в “закрытых” системах подразделяются на четыре категории:

I. Работа не представляет опасности здоровью человека. Меры безопасности сравнимы с теми, которые установлены при работе с непатогенными микроорганизмами.

II. Работа представляет незначительную опасность здоровью человека. Меры безопасности сравнимы с теми, которые установлены при работе с микроорганизмами, потенциально патогенными лишь при определенных обстоятельствах.

III. Работа представляет умеренный риск здоровью человека. Меры безопасности сравнимы с теми, которые установлены при работе с микроорганизмами, потенциально способными к передаче инфекционных заболеваний.

IV. Работа представляет значительную опасность здоровью человека. Меры безопасности сравнимы с теми, которые установлены при работе с патогенами, вызывающими особо опасные болезни.

Генно-инженерная деятельность в условиях “открытых” систем приравнивается к третьему и четвертому уровням риска. Закон содержит требования к лицам, которые осуществляют генно-инженерную деятельность, главными из которых являются обязательная профессиональная подготовка и состояние здоровья, соответствующие требованиям правил безопасности генно-инженерной деятельности; наличие соответствующих помещений, отвечающих тем же правилам; обязательное получение разрешения (лицензий) при работах, соответствующих третьему и четвертому уровням риска.

На государственном уровне система биобезопасности должна работать непрерывно. В России каждый поступающий на продовольственный рынок ГМИ проходит полную процедуру государственной регистрации.

На Федеральном уровне НСБ обеспечивается следующим образом: Минпромнауки России несет ответственность за биобезопасность ГМО, в т.ч. трансгенных растений; Минздрав России отвечает за безопасность пищевых продуктов из ГМИ; Минсельхоз России – за безопасность кормов. Главная функция этого уровня – принятие решений о государственной регистрации ГМО перед первым выпуском в России в окружающую среду, промышленным использованием или импортом.

Полевые испытания трансгенных растений проводятся на специально оборудованных, зарегистрированных, строго охраняемых опытных участках (10 участков в разных агроклиматических зонах России). Каждое полевое испытание ГМР обязательно регистрируется в МВКГИД (межведомственной комиссии по проблемам генно-инженерной деятельности, в состав которой входит 19 представителей министерств и ведомств, включенных в круг проблем генной инженерии), разрабатывается индивидуальная программа испытаний ГМР на биобезопасность, в ходе испытаний проводится инспекция.

Такой порядок гарантирует защиту от несанкционированного распространения ГМР в окружающей среде и получение необходимых научных данных о биобезопасности ГМР в полевых условиях.

Полевые испытания в России начались в 1994 г. В 2002 г. было испытано всего 28 ГМР, из них 23 разработки отечественных биотехнологов: трансгенные яблони, груши, садовая земляника, картофель, масличный рапс. Свойства у российских ГМР разнообразны – от устойчивого к колорадскому жуку картофеля до садовой земляники с генами суперсладкого белка тауматина.

В России главным направлением трансформации является устойчивость к вредителям и болезням – с 2001 г. проходит полевые испытания на биобезопасность трансгенный картофель на основе российского сорта Луговской, устойчивый к колорадскому жуку (разработка Центра “Биоинженерия” РАН).

Оценку рисков ГМР проводит созданный в 2001 г. Экспертный совет Минпромнауки России по вопросам биобезопасности, а безопасности кормов, полученных из ГМО, начиная с 2002 г. – Экспертный совет Минсельхоза России.

Российская система оценки безопасности ГМИ для пищи отличается от принятой в США и Канаде: оценивается не только составное соответствие ГМИ традиционному продукту, но также проводится медико-биологическая оценка, а также оценка технологических параметров пищи. Т.е. применяется такой же подход, как при проверке новой пищи в рационе питания.

С 1999 г. Минздрав России зарегистрировал ГМ сою, картофель, кукурузу, сахарную свеклу как источники для использования в пищевой

промышленности и реализации населению продуктов, полученных на их основе.

С 2002 г. в России введена обязательная маркировка пищевой продукции, если она содержит более 5% компонентов, полученных из ГМИ. Таким образом, достигается важнейший для потребителя момент – информирование, а следовательно, и право выбора. Для маркировки продуктов питания, содержащих генетически модифицированную ДНК (ГМ ДНК = рекДНК), разработаны надежные, информативные и чувствительные методы, основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР). С помощью ПЦР-анализа можно проводить как качественный, так и количественный анализ ГМ ДНК в продуктах питания. В то же время, маркировка – это только информация о продукте, она не играет никакой роли с точки зрения безопасности пищи из ГМИ для человека. Безопасность обеспечивается компетентной проверкой.

Для большей осведомленности населения в этой области в России выпускается Информационный дайджест “Генно - инженерные технологии”, в 2001 г. начат выпуск Информационного бюллетеня МВКГИД, в декабре 2001 г. для открытого доступа в глобальной сети Internet открыт информационный Web-сайт МВКГИД (<http://www.iacgea.ru>).

С момента первого создания и использования ГМР растений прошло почти 20 лет. Что же изменилось за эти годы? Мировое научное сообщество, инвесторы и потребители пришли к заключению, что именно достижения молекулярной биологии и геной инженерии, биоинформатики и биотехнологии будут определять образ жизни человечества в 21-ом столетии.

ОСНОВНАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Геном, клонирование, происхождение человека / Л.И. Корочкин [и др.]. – Фрязино : Век 2. – 2004. – 224с.
2. Глик Б. Молекулярная биотехнология: Принципы и применение. / Б. Глик, Дж. Пастернак. - М. : Мир, 2002.- 589с.
3. Жимулев И.Ф. Общая и молекулярная генетика / И.Ф. Жимулев. - Новосибирск: Изд-во Новосиб. ун-та, 2002. - 458 с.
4. Лутова Л.А. Биотехнология высших растений / Л.А. Лутова. - СПб : Изд-во СПб. ун-та, 2003. - 228с.
5. Рыбчин В.Н. Основы генетической инженерии / В.Н. Рыбчин. – СПб. : Изд-во СПбГТУ, 1999. - 521с.
6. Сельскохозяйственная биотехнология / В.С. Шевелуха [и др.]. - М. : Высш. шк., 2003. - 469 с.
7. Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия / С.Н. Щелкунов. – Новосибирск : Сиб. унив. изд-во, 2004. – 496с.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Абелев Г.И. Моноклональные антитела / Г.И. Абелев // Соросовский образовательный журнал. - 1998. - №1. - С.16-20.

2. Айала Ф. Современная генетика / Ф. Айала, Дж. Кайгер. - М. : Мир, 1987, том 1. - 295с.; М. : Мир, 1988, тома 2 и 3.
3. Алиханян С.И. Общая генетика / С.И. Алиханян, А.П. Акифьев, Л.С. Чернин. - М. : Высшая школа, 1985. - 446с.
4. Баранов В.С. Генная терапия – медицина XXI века / В.С. Баранов // Соросовский образовательный журнал. - 1999. - №3. - С. 63-68.
5. Баранов В.С. Современное состояние и перспективы генной терапии миодистрофии Дюшенна в мире и России / В.С. Баранов, А.Н. Баранов, А.В. Зеленин // Генетика. - 2001. - Т.37, №8. - С. 1046-1054.
6. Бурьянов Я.И. Успехи и перспективы генно-инженерной биотехнологии растений / Я.И. Бурьянов // Физиология растений, 1999. - Т.46, №6. - С. 930-944.
7. Буторина А.К. Лекции по генетике человека. Учебное пособие по курсу “Человек” / А.К. Буторина, В.Н. Калаев. - Воронеж: ВГУ, 2003. - 79с.
8. Генетика развития растений / Л.А. Лутова [и др.]. – СПб : Наука, 2000. - 539с.
9. Гинцбург А.Л. Генодиагностика инфекционных заболеваний / А.Л. Гинцбург // Микробиология, эпидемиология и иммунобиология. - 1998. - №3. - С. 86-94.
10. Глеба Ю.Ю. Биотехнология растений / Ю.Ю. Глеба // Соросовский образовательный журнал. - 1998. - №6. - С. 3-8.
11. Гольдман И.Л. Трансгенные козы в мировой фарминдустрии XXI века / И.Л. Гольдман, С.Г. Кадулин, С.В. Разин // Генетика. - 2002. - Т.38, №1. - С. 5-21.
12. Ермишин А.П. Генетически модифицированные организмы. Мифы и реальность / А.П. Ермишин. – Минск : Технология, 2004. – 118с.
13. Захаров И.А. Цитодукция у человека: первые генетически модифицированные дети / И.А. Захаров // Вестник ВОГиС. - 2001. - №17. - <http://www.bionet.nsc.ru/vogis>
14. Зеленин А.В. Геном растений / А.В. Зеленин // Вестник РАН. – 2003. – т.73, №9. – С. 797-806.
15. Зеленин А.В. Введение в геномику растений / А.В. Зеленин, Е.Д. Бадаева, О.В. Муравенко // Молекулярная биология. – 2001.- Т.35, №3.- С.339-348.
16. Инге-Вечтомов С.Г. Генетика с основами селекции / С.Г. Инге-Вечтомов. - М.: Высшая школа, 1989. - 592с.
17. Конюхов Б.В. Клонирование позвоночных: успехи и проблемы / Б.В. Конюхов // Генетика.- 1997. - Т.33. - С. 1605-1620.
18. Корочкин Л.И. Клонирование животных / Л.И. Корочкин // Соросовский образовательный журнал. - 1999. - №4. - С. 10-16.
19. Кучук Н.В. Генетическая инженерия высших растений / Н.В. Кучук. – Киев : Наукова Думка, 1997. - 152с.
20. Куликов А.М. Генетически-модифицированные организмы и риски их использования / А.М. Куликов // Физиология растений. – 2005. – Т.52, №1. – С. 115-128.

21. Лещинская И.Б. Генетическая инженерия / И.Б. Лещинская // Соросовский образовательный журнал. - 1996. - №1. - С. 32-39.
22. Лутова Л.А. Генетическая инженерия растений: свершения и надежды / Л.А. Лутова // Соросовский образовательный журнал. - 2000. - Т.6, №10. - С. 10-17.
23. Машкина О.С. Генетическая инженерия лесных древесных растений / О.С. Машкина, А.К. Буторина // Генетика. - 2003. - Т.39, №3. - С. 309-317.
24. Молекулярная биология клетки / Б. Албертс [и др.]. - М. : Мир, 1994. Т.1, стр. 253-348, 485-502; т.2, стр. 93-253.
25. Мутовин Г.Р. Основы клинической генетики / Г.Р. Мутовин. - М. : Высш. шк., 2001. - 234 с.
26. Пирузян Э.С. Основы генетической инженерии растений / Э.С. Пирузян. - М. : Наука, 1988. - 304 с.
27. Романов Г.А. Генетическая инженерия растений и пути решения проблемы биобезопасности / Г.А. Романов // Физиология растений. - 2000, Т.47, №3. - С. 343-353.
28. Семенова М.Л. Зачем нужны трансгенные животные / М.Л. Семенова // Соросовский образовательный журнал. - 2001. - Т.7, №4. - С. 13-20.
29. Сингер М. Гены и геномы / М. Сингер, П. Берг. - М. : Мир, 1998. Т.1.- 373 с.; т.2 – 391 с.
30. Фаворова О.О. Лечение генами – фантастика или реальность? / О.О. Фаворова // Соросовский образовательный журнал. - 1997. - №2. - С. 21-27.
31. Федеральный закон “О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности” / Российская газета.- Июль, 1996. - №86-ФЗ.
32. Шумный В.К. Генная и хромосомная инженерия для растений / В.К. Шумный // Вестник РАН. - 2001. - Т.71, №8. - С. 725-732.
33. Шумный В.К. Проблемы генетики растений / В.К. Шумный // Вестник ВОГиС. - 2004. - Т.8. - №2. - С. 32-39.
34. Щипков В.П. Общая и медицинская генетика / В.П. Щипков, Г.Н. Кривошеина. – М. : Академия, 2003. – 253 с.
35. Molecular biology of the cell / В. Alberts [et. al.] – New York – London : Garland Publishing Inc., 1994. – 1294 p.
36. Jaenisch R., Don't clone humans! / R. Jaenisch, I. Wilmut // Science. - 2001. - V.291. - P. 2552.

Авторы:

Ольга Сергеевна Машкина,

Анастасия Константиновна Буторина

Редактор

О.А. Тихомирова