

Учреждение образования
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Н. А. Белясова

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

**Электронный курс лекций для студентов
специальности 1-48 02 01 «Биотехнология»**

Минск 2012

УДК 60(07.034.44)

ББК 35:28.4я73

Б44

Рассмотрен и рекомендован к изданию редакционно-издательским советом университета

Рецензенты:

кандидат биологических наук, доцент кафедры физико-химических методов сертификации продукции БГТУ *З. Е. Егорова*;

кандидат биологических наук, доцент,
заведующий лабораторией генетики микроорганизмов
Института генетики и цитологии НАН Беларуси *Д. П. Бажанов*

Белясова, Н. А.

Б44 Молекулярная биотехнология : электронный курс лекций для студентов специальности 1-48 02 01 «Биотехнология» / Н. А. Белясова. – Минск : БГТУ, 2012. – 173 с.

В курсе лекций раскрыто содержание, проблемы и достижения современной молекулярной биотехнологии. Изложена информация об организации геномов, механизмах явлений, направленных на сохранение и изменчивость наследственной информации, принципах организации и экспрессии генов. Охарактеризованы инструменты и основные методы генетической инженерии, обобщены принципы и достижения клеточной инженерии, на конкретных примерах рассмотрены вопросы конструирования и использования генетически модифицированных организмов.

УДК 60(07.034.44)

ББК 35:28.4я73

© УО «Белорусский государственный
технологический университет», 2012

© Белясова Н. А., 2012

ВВЕДЕНИЕ

Самое короткое и емкое определение термина «биотехнология» звучит так: это любая технология, связанная с использованием живых систем.

Но для того чтобы использовать эти «живые системы», нужно знать их особенности, закономерности функционирования, уметь их эксплуатировать, а также целенаправленно повышать эффективность их применения. Становится понятным, что без научных знаний эти задачи решить невозможно. Поэтому термин «биотехнология» с самого начала и по нынешний день охватывает два крупных направления человеческой деятельности и используется двояко: как в отношении к научным достижениям, так и в отношении к производству. Иначе говоря, под биотехнологией понимают:

– науку, изучающую возможности использования организмов, биологических процессов и систем в производстве;

– совокупность промышленных методов, использующих для производства живые организмы и биологические процессы.

Таким образом, предметом дисциплины «Молекулярная биотехнология» будет служить лишь первая часть определения, т. е. речь пойдет о научных изысканиях и достижениях, позволяющих с наибольшей эффективностью использовать биологические системы и процессы для получения целевых продуктов и решения других возникающих перед человеком проблем. Иными словами, мы будем рассуждать о биотехнологии как о науке.

Чтобы проиллюстрировать направления развития современной биотехнологии, можно обратиться к структуре разделов периодического реферативного журнала «Биотехнология», в котором в виде кратких резюме представлены все новейшие достижения этой науки. Можно видеть, что основные разделы (направления) касаются молекулярной биотехнологии, в основе которой лежит перенос наследственной информации из одних организмов в другие – то, что иначе называют технологией рекомбинантных ДНК. В результате подобных манипуляций создаются новые продукты либо повышается эффективность получения уже известных, а также возникают организмы с необычными, привлекательными свойствами.

Достижения молекулярной биотехнологии используются в разных отраслях народного хозяйства:

– для получения первичных и вторичных метаболитов (аминокислот, белка, биополимеров, ферментов, витаминов и др.);

- в фармацевтической промышленности (разработка и синтез вакцин, гормонов, лекарственных препаратов нового поколения, в том числе антибиотиков, молекулярных диагностикумов заболеваний);
- в медицине (новая фармацевтика и генная терапия);
- в области энергетики (получение этанола, биогаза, метанола, водорода и др.);
- в сельском хозяйстве (получение трансгенных растений и животных, производство экологически безопасных средств защиты растений, регуляторов роста растений и животных и др.);
- для защиты окружающей среды (биоремедиация, очистка сточных вод, переработка промышленных отходов, биodeградация ксенобиотиков, восстановление плодородия почв);
- в пищевой промышленности (использование новых заквасочных культур для производства новых продуктов, использование ферментов, новых приправ и других ингредиентов);
- для сохранения и изменения генофонда растений и животных (банки генов, генетическая и клеточная инженерия, криосохранение);
- в судебной практике (доказательство отцовства, идентификация улик, генотипирование);
- в геологии (повышение отдачи пластов нефти, выщелачивание минералов из руд).

Разделами молекулярной биотехнологии являются:

- 1) **генетическая инженерия** – получение гибридных ДНК, введение их в клетки микроорганизмов, растений и животных;
- 2) **клеточная инженерия** – выращивание клеток и тканей, слияние соматических клеток или их протопластов;
- 3) **биологическая инженерия** – изучение биологических особенностей организмов и внедрение компьютерных методов контроля технологических режимов, позволяющих максимально реализовать полезные свойства клеток.

Можно видеть, что разделы биотехнологии, по сути, воспроизводят стадии создания нового организма и технологии его использования: вначале необходимы манипуляции с ДНК (молекулярный уровень), затем – манипуляции с клетками, потом – с целыми организмами или популяциями клеток, а на последней стадии – технологические вопросы их эксплуатации и получение целевого продукта. В таком случае можно утверждать, что основу биотехнологии, ее базу составляет генетическая инженерия. Именно этому разделу в данном курсе будет уделено наибольшее внимание.

Биотехнология – стремительно развивающаяся отрасль человеческих знаний, которая по темпам развития превосходит большинство других. Можно привести несколько доказательств. Так, начало развития молекулярной биотехнологии датируется 70-ми гг. XX в., и к нынешнему этапу (за неполных 40 лет) человечество уже не мыслит себя без достижений этой науки, которые затронули все главные сферы жизнедеятельности. С момента создания первого трансгенного растения (1983 г.) до его использования в сельском хозяйстве (1994 г.) прошло всего 11 лет, в то время как до появления на рынке телевизоров (1936 г.) с момента их изобретения (1907 г.) прошло целых 29 лет!

Подобная ситуация приводит к тому, что достижения молекулярной биотехнологии начинают использоваться человеком быстрее, чем происходит осознание их сути и роли, т. е. человеческая мораль не успевает сформировать отношение общества и его индивидуумов к новым реалиям (знание геномов пациентов, широкое использование трансгенных животных и растений, клонирование и криосохранение человека и др.). В результате в обществе рождается страх перед внедрением в практику некоторых достижений биотехнологии, что предопределяет необходимость правового регулирования безопасности генноинженерных разработок и оценку риска последствий их широкого использования. Поэтому в данном курсе мы уделим определенное внимание вопросам биоэтики и биобезопасности.

История развития биотехнологии. Если исходить из определения биотехнологии как любой технологии, связанной с использованием живых систем, становится понятным, что люди неосознанно эксплуатировали эту отрасль знаний и умений еще в древности, когда культивировали растения, выращивали скот и, уж тем более, когда пекли хлеб, сквашивали молоко, получали уксус, готовили вино и варили пиво, вымачивали лен и др.

Показательно, что этот термин придумал в 1917 г. венгерский инженер Карл Эреки для описания процесса крупномасштабного выращивания свиней с использованием в качестве корма сахарной свеклы. По определению К. Эреки, биотехнология – это все виды работ, при которых из сырьевых материалов с помощью живых организмов производятся те или иные продукты. Несмотря на такое точное определение введенного в обиход термина, его смысл долгое время был искажен, и под биотехнологией понимали промышленную ферментацию, которую осуществляли с участием микроорганизмов. Объяснением того, что биотехнологию до 70-х гг. XX в. связывали с микробиологическими процессами, может служить то, что к середине XX в. микробиологиче-

ская отрасль промышленности оказалась хорошо развитой: на микробиологических предприятиях в промышленных масштабах получали этанол, органические растворители, фармацевтические препараты, в том числе антибиотики (пенициллин начали получать в промышленном масштабе в 1943 г.), биоудобрения, средства защиты растений и др. В 60–70-е гг. целью научных исследований в данной области являлось повышение эффективности процессов обработки сырья, совершенствование биореакторов и интенсификация происходящих в них процессов, а также разработка промышленных способов отделения продуктов от компонентов среды и их очистки. В результате был усовершенствован инструментальный контроль процессов ферментации, значительно расширились возможности крупномасштабного культивирования микроорганизмов.

Одновременно с этим интересы биотехнологии затрагивали вопросы совершенствования продуцентов производимых продуктов. В качестве продуцентов использовали различные микроорганизмы – дрожжи, мицелиальные грибы, бактерии. Подходами для селекции улучшенных штаммов-продуцентов поначалу служили мутагенез, тестирование огромного количества колоний и отбор перспективных вариантов. Эта стратегия отличалась необычайной трудоемкостью, высокой затратностью и длительностью, а также существенными ограничениями биологического плана – она позволяла изменить лишь существующие в клетке гены, но не давала возможности привнести новые.

Ситуация в корне изменилась с разработкой технологии рекомбинантных ДНК. Предпосылками для этого послужили следующие события:

- в 1941 г. Дж. Бидл и Э. Тейтум расшифровали функции гена, выдвинув знаменитый постулат «Один ген – один фермент»;
- в 1944 г. О. Эвери, К. Мак-Леод и М. Мак-Карти доказали роль ДНК в хранении и передаче наследственной информации;
- в 1953 г. Дж. Уотсон и Ф. Крик расшифровали структуру ДНК;
- в 1961–1966 гг. М. Ниренберг и Х. Корана расшифровали генетический код;
- в 1970 г. выделена первая рестрицирующая эндонуклеаза;
- в 1972 г. Х. Корана синтезировал ген тРНК;
- в 1973 г. американские ученые С. Коэн и Э. Чанг встроили в состав бактериальной плазмиды фрагмент ДНК лягушки и после трансформации такой ДНК клеток бактерий добились того, что они стали синтезировать лягушачьи белки, а также передавать потомкам «лягушачью» ДНК.

Таким образом, был найден метод, позволяющий встраивать чужеродные гены в геном определенного организма. Появилась возможность создавать, а не просто отбирать высокопродуктивные штаммы, использовать прокариотические и эукариотические клетки как «биологические фабрики» для производства продуктов. Первыми с помощью бактериального синтеза промышленным путем были получены инсулин и интерферон. Эта дата считается началом развития молекулярной биотехнологии. Дальнейшие успехи в области биотехнологии проследим в процессе изучения разделов этой науки, в результате чего у нас появится возможность значительно дополнить список важнейших достижений биотехнологии и воссоздать целостную картину развития этой отрасли человеческого знания и мастерства.

1. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ И МЕХАНИЗМЫ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ

1.1. Организация генетического аппарата клетки

Развитие представлений о ДНК как о веществе, в котором зашифрована наследственная информация клетки, осуществлялось в истории биохимии на протяжении примерно 20 лет в ходе нескольких этапов. Причиной такого длительного спора между исследователями в отношении одного из главных вопросов естествознания послужила, с одной стороны, консервативность взглядов на структуру нуклеиновых кислот как на «просто организованные молекулы». При недостаточной их изученности полагалось, что ДНК и РНК представляют собой полимеры, в которых многократно повторяются тетра nukлеотиды. С другой стороны, белковые молекулы стали исследоваться раньше других клеточных макромолекул, и к 1928 г. в изучении их организации удалось достичь определенного прогресса: было известно, что в их составе присутствует, как минимум, 20 аминокислот, которые чередуются в произвольном порядке, определяя огромное количество вариантов строения полипептидов.

История становления постулата «ДНК – носитель наследственной информации» показательна с точки зрения изящества человеческой мысли, а также объясняет многие закономерности процессов наследования признаков организмами, поэтому заслуживает внимания.

Становление постулата «ДНК – носитель генетической информации». Первым прямым доказательством генетической роли ДНК послужили эксперименты Фредерика Гриффита по трансформации пневмококков (1928 г.). Он работал с двумя типами штаммов *Diplococcus pneumoniae* – S-формами, образующими на агаризованных средах гладкие, блестящие (от англ. *smooth* – гладкий) колонии, и R-формами, характеризующимися шероховатой (от англ. *rough* – шероховатый) поверхностью колоний. S-формы были высоковирулентными для мышей и вызывали у них пневмонию. Однако убитые нагреванием до 65°C пневмококки S-формы не приводили к болезни и гибели мышей. R-формы были низковирулентными и редко вызывали заболевание мышей.

Ф. Гриффит обнаружил, что если мышью заразить смесью живых R-форм и убитых нагреванием (до 65°C) S-форм, то животные заболевают, а из их крови можно выделить жизнеспособные S-формы пнев-

мококков, причем того же серотипа, что и убитые нагреванием S-формы. Это наблюдение позволило Ф. Гриффиту сделать вывод о явлении трансформации в организме мыши бактерий одного типа (R) в бактерии другого типа (S). Трансформирующим фактором в этом случае должно было выступать вещество, определяющее наследственные свойства и содержащееся в убитых нагреванием клетках. Поскольку при используемой температуре (60–65°C) белок подвергается денатурации, Ф. Гриффит предположил, что трансформирующим фактором является не белок, а ДНК.

Со времен экспериментов Ф. Гриффита данный метод переноса генетической информации называется **трансформацией**. Позже стало известно, что характер клеточной поверхности пневмококков определяется двумя аллелями гена: аллель S контролирует способность клетки формировать полисахаридную капсулу, придающую гладкую поверхность колониям и защищающую пневмококков от иммунной системы мыши; если в клетке присутствует аллель R, то капсула не образуется, и клетки легко распознаются и уничтожаются иммунной системой хозяина.

В свое время результаты экспериментов и выводы Ф. Гриффита, выходящие за рамки традиционных представлений об этих процессах, не были приняты научной общественностью. Понадобилось воспроизведение похожих манипуляций *in vitro*, которое осуществили в 1944 г. американские исследователи Освальд Эвери, Колин Мак-Леод и Маклин Мак-Карти. Эти ученые трансформировали растущую культуру пневмококков R-типа выделенной из клеток S-штамма ДНК. Оказалось, что некоторые бактерии приобретали способность синтезировать полисахаридную капсулу и, соответственно, патогенность для мышей. При этом единственным фактором, способным сообщить R-клеткам данное свойство, была очищенная ДНК. Кроме того, в данных экспериментах было выявлено, что на трансформацию не оказывают влияния протеолитические ферменты, и наоборот, обработка трансформирующего фактора нуклеазами приводит к предотвращению процесса трансформации. Наконец, из экспериментов следовало, что возникающие в результате трансформации бактерии S-типа обладают способностью передавать приобретенное свойство (синтез капсульных полисахаридов) дочерним клеткам. Полученные американскими учеными доказательства роли ДНК в хранении и передаче наследственной информации носили фундаментальный характер и вошли в историю, однако и они не были оценены сразу по указанным выше причинам. Кроме того, изучение основ наследственности в

1944 г. только начиналось, и еще не было точно установлено, что бактерии обладают генами, во всех отношениях сходными с генами высших организмов.

Решающим доказательством в пользу генетической роли ДНК стали эксперименты, осуществленные Альфредом Херши и Маргарет Чейз в 1952 г. Им удалось доказать, что носителем наследственной информации у бактериофага T2 является ДНК. Суть экспериментов сводилась к следующему. Одну культуру клеток кишечной палочки выращивали на среде, содержащей радиоактивные изотопы фосфора (^{32}P), а другую – в присутствии изотопов серы (^{35}S), в результате чего эти изотопы включались в содержимое клеток. Затем каждую из меченых бактериальных культур использовали для получения лизата T2. Получали разные лизаты меченными изотопами фагов: в одном из них содержались частицы T2, у которых изотоп ^{35}S включался в состав белка (капсида), а в другом – частицы T2 с ^{32}P в составе ДНК. Радиоактивные метки позволяли проследить пути белка и ДНК фага при его репродукции.

Литический цикл начинается с прикрепления фаговой частицы к клеточной поверхности, и через определенное время фаговая ДНК инъецируется в клетку. Это подтверждалось результатами центрифугирования суспензий на отмеченных стадиях: вначале вместе с бактериями осаждались и фаги (^{35}S и ^{32}P регистрировались в осадке). Однако через определенное время большая часть меченого изотопом серы белка может быть отделена от клеток при встряхивании суспензии, при этом большая часть меченой изотопом фосфора ДНК не отделяется от бактерий и обнаруживается в осадке. Это дает основание предполагать, что ДНК оказывается уже внутри клеток.

Удаление из культуры пустых фаговых оболочек («теней») не оказывает влияния на дальнейшие события: бактерии лизируются, и из них выходит фаговое потомство точно так же, как и в случае, если «тени» остаются на поверхности клеток. Оказалось, что удаление «теней» сопровождается удалением не менее 80% ^{35}S , а основная масса ^{32}P остается в клетках и в дальнейшем (при репродукции фага) передается потомству. Таким образом, очевиден вывод, что именно ДНК, а не белок определяет процесс репродукции фага в клетках.

Эксперимент А. Херши и М. Чейз привлек внимание к работам, выполненным на пневмококках несколькими годами ранее. Этому способствовало несколько причин: к 1952 г. исследование структуры нуклеиновых кислот достигло больших успехов и было опровергнуто представление об этих молекулах как о консервативных; данный эксперимент был осуществлен на бактериофаге, относительно характера

наследования признаков которого было хорошо известно, что он аналогичен таковому для высших организмов; наконец, для фага Т2 было продемонстрировано существование мутаций и так же, как у высших организмов, описана рекомбинация мутантных генов.

Дополнительным доказательством генетической роли ДНК явилось обнаружение инфекционных свойств у очищенного препарата ДНК вируса табачной мозаики.

Типы нуклеиновых кислот и их функции. Из двух типов нуклеиновых кислот – ДНК и РНК – дезоксирибонуклеиновая кислота выполняет роль вещества, в котором закодирована вся основная наследственная информация клетки и которое способно к самовоспроизведению, а рибонуклеиновые кислоты выполняют роль посредников между ДНК и белком. Такие функции нуклеиновых кислот тесно связаны с особенностями их индивидуальной структуры.

ДНК и РНК – это полимерные макромолекулы, мономерами которых служат **нуклеотиды**. Каждый нуклеотид сформирован из трех частей – моносахарида, остатка фосфорной кислоты и азотистого основания. Азотистое основание соединено с сахаром β-N-гликозидной связью (рис. 1.1).

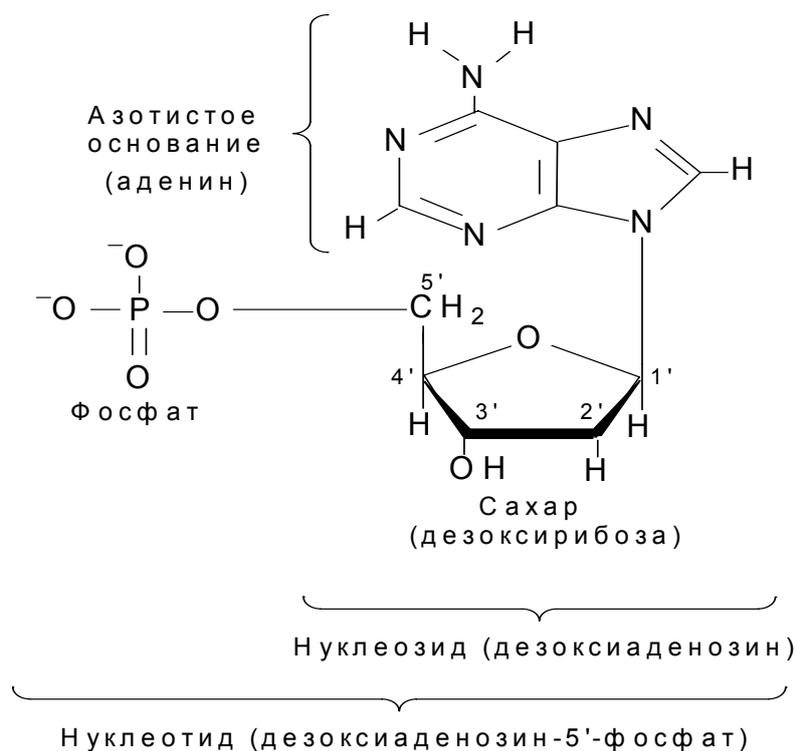


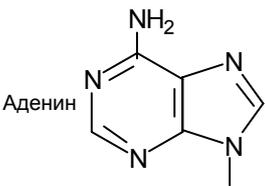
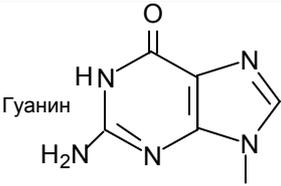
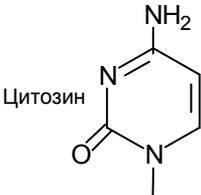
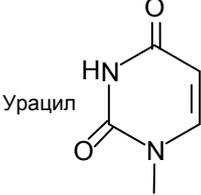
Рис. 1.1. Структура нуклеозида и нуклеотида (цифрами обозначено положение атомов в остатке пентозы)

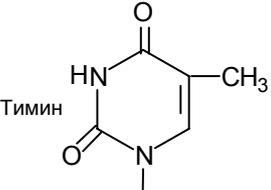
Сахар, входящий в состав нуклеотида (пентоза), может присутствовать в одной из двух форм – β -D-рибозы и β -D-2-дезоксирибозы. Различие между ними состоит в том, что гидроксил рибозы при 2'-углеродном атоме пентозы замещен в дезоксирибозе на атом водорода. Нуклеотиды, содержащие рибозу, называются рибонуклеотидами и являются мономерами РНК, а нуклеотиды, содержащие дезоксирибозу, носят название «дезоксирибонуклеотиды» и формируют ДНК.

Азотистые основания являются производными одного из двух соединений – *пурина* или *пиримидина*. В нуклеиновых кислотах преобладают два пуриновых основания – аденин (А) и гуанин (G) – и три пиримидиновых – цитозин (С), тимин (Т) и урацил (U). В рибонуклеотидах и, соответственно, в РНК присутствуют основания А, G, С, U, а в дезоксирибонуклеотидах и в ДНК – А, G, С, Т.

Номенклатура нуклеозидов и нуклеотидов широко используется в биохимии и молекулярной биологии и представлена в таблице.

Номенклатура нуклеотидов и нуклеозидов

Основание	Нуклеозид	Нуклеотид
Аденин 	Аденозин	Аденилат, аденозинфосфат (AMP, ADP, ATP)
Гуанин 	Гуанозин	Гуанилат, гуанозинфосфат (GMP, GDP, GTP)
Цитозин 	Цитидин	Цитидилат, цитидинфосфат (CMP, CDP, CTP)
Урацил 	Уридин	Уридилат, уридинфосфат (UMP, UDP, UTP)

Основание	Нуклеозид	Нуклеотид
 <p>Тимин</p>	Дезокситимидин	Дезокситимидилат, дезокситимидинфосфат (dTMP, dTDP, dTTP)

Длинные полинуклеотидные цепочки ДНК и РНК образуются при соединении нуклеотидов между собой с помощью фосфодиэфирных мостиков. Каждый фосфат соединяет гидроксил при 3'-углеродном атоме пентозы одного нуклеотида с ОН-группой при 5'-углеродном атоме пентозы соседнего нуклеотида (рис. 1.2).

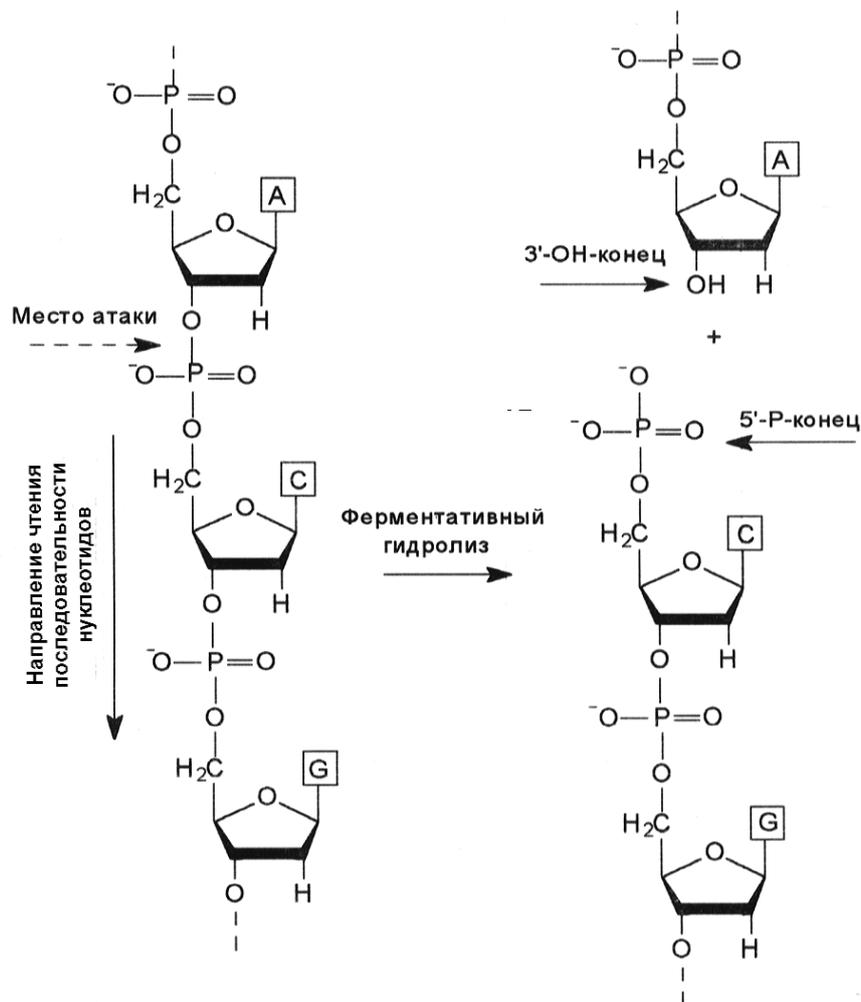


Рис. 1.2. Вторичная структура ДНК. Ферментативный гидролиз цепочки ДНК с обнажением 3'- и 5'-свободных концов молекулы

При кислотном гидролизе нуклеиновых кислот образуются отдельные компоненты нуклеотидов, а при ферментативном гидролизе с помощью *нуклеаз* расщепляются определенные связи в составе фосфодиэфирного мостика и при этом обнажаются 3'- и 5'-концы молекулы (рис. 1.2).

Это дает основание считать цепочку нуклеиновой кислоты полярной, и появляется возможность определять направление чтения последовательности нуклеотидов в ней. Следует отметить, что большинство ферментов, участвующих в синтезе и гидролизе нуклеиновых кислот, работают в направлении от 5'- к 3'-концу ($5' \rightarrow 3'$) цепочки нуклеиновой кислоты. Согласно соглашению между исследователями, последовательность нуклеотидов в цепочках нуклеиновых кислот тоже читается в направлении $5' \rightarrow 3'$ (рис. 1.2).

Особенности строения ДНК. Согласно трехмерной модели, предложенной Дж. Уотсоном и Ф. Криком в 1953 г., молекула ДНК состоит из двух полинуклеотидных цепей, которые образуют правую спираль относительно одной и той же оси. Направление цепей в молекуле взаимно противоположное, она имеет почти постоянный диаметр и другие параметры, которые не зависят от нуклеотидного состава, в отличие от белков, у которых последовательность аминокислотных остатков определяет вторичную и третичную структуру молекулы.

Сахарофосфатный остов располагается по периферии спирали, а азотистые основания находятся внутри, и их плоскости перпендикулярны оси спирали. Между основаниями, расположенными друг напротив друга в противоположных цепях, формируются специфические водородные связи: аденин всегда связывается с тиминном, а гуанин – с цитозином. Причем в АТ-паре основания соединены двумя водородными связями: одна из них образуется между амино- и кетогруппами, а другая – между двумя атомами азота пурина и пиримидина соответственно. В GC-паре имеется три водородные связи: две из них образуются между амино- и кетогруппами соответствующих оснований, а третья – между атомом азота пиримидина и водородом (заместителем у атома азота) пурина.

Таким образом, более объемные пурины всегда спариваются с пиримидинами, имеющими меньшие размеры. Это приводит к тому, что расстояния между C1'-атомами дезоксирибозы в двух цепях оказываются одинаковыми для АТ- и GC-пар и равными 1,085 нм. Два указанных типа пар нуклеотидов, АТ и GC, называют **комплементарными** парами. Образование пар между двумя пуринами, двумя

пиримидинами или некомplementарными основаниями (A + C или G + T) стерически затруднено, поскольку при этом не могут образовываться подходящие водородные связи и, следовательно, нарушается геометрия спирали.

Геометрия двойной спирали такова, что соседние нуклеотиды в цепи находятся друг от друга на расстоянии 0,34 нм. На один виток спирали приходится 10 пар нуклеотидов, и шаг спирали равен 3,4 нм ($10 \cdot 0,34$ нм). Диаметр двойной спирали равен примерно 2,0 нм. В связи с тем что сахарофосфатный остов расположен дальше от оси спирали, чем азотистые основания, в двойной спирали имеются желобки – большой и малый (рис. 1.3).

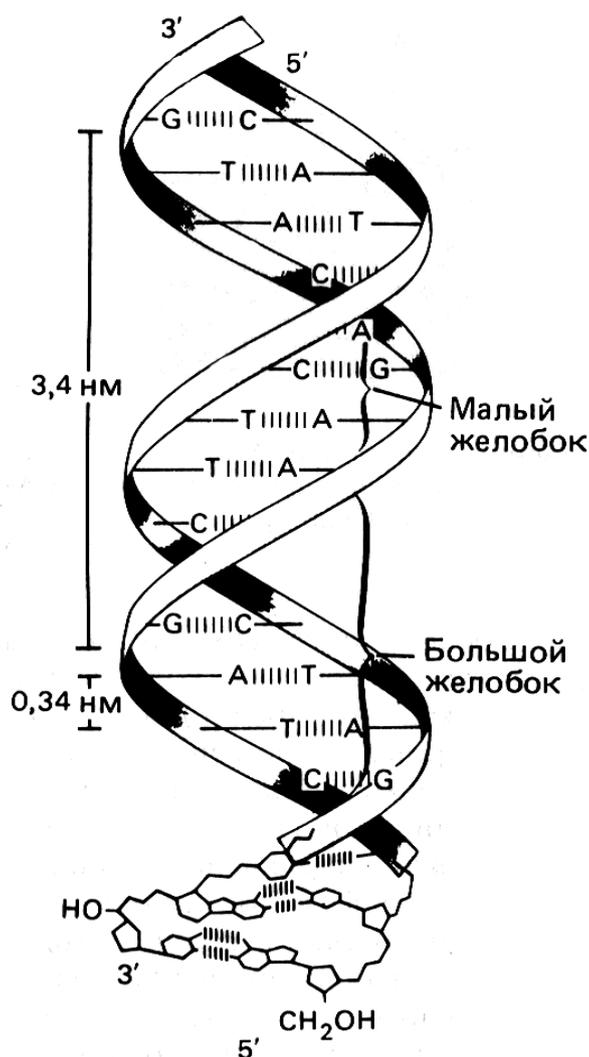


Рис. 1.3. Схематическое изображение В-формы двойной спирали ДНК (видны большой и малый желобки; указаны расстояние между ближайшими парами оснований и шаг спирали) [4]

Молекула ДНК способна принимать различные конформации. Обнаружены А-, В- и Z-формы. В-ДНК – это обычная форма, в которой ДНК находится в клетке. В этой форме плоскости колец оснований перпендикулярны оси двойной спирали. В А-форме ДНК плоскости пар оснований повернуты примерно на 20° от нормали к оси правой двойной спирали. Z-форма ДНК – это левая спираль с 12 парами нуклеотидов на виток. Биологические функции А- и Z-форм ДНК до конца не выяснены. Стабильность двойной спирали обусловлена водородными связями между комплементарными нуклеотидами в антипараллельных цепях, стэкинг-взаимодействием (межплоскостные вандерваальсовы контакты между атомами и перекрывание π -орбиталей атомов контактирующих оснований), а также гидрофобными взаимодействиями. Последние выражаются в том, что неполярные азотистые основания обращены внутрь спирали и защищены от непосредственного контакта с полярным растворителем, и наоборот, заряженные сахарофосфатные группы обращены наружу и контактируют с растворителем.

Поскольку две цепи ДНК связаны между собой только нековалентными связями, молекула ДНК легко распадается на отдельные цепочки при нагревании или в щелочных растворах (*денатурация*). Однако при медленном охлаждении (*отжиг*) цепи способны вновь ассоциировать, и между комплементарными основаниями восстанавливаются водородные связи (*ренатурация*). Эти свойства ДНК имеют большое значение для методологии генетической инженерии.

Размер молекул ДНК выражают в числе пар нуклеотидов (п. н.), при этом за единицу принимается тысяча пар нуклеотидов (т. п. н.), или 1 килобаза (кб). Молекулярная масса 1 т. п. н. В-формы ДНК составляет около $6,6 \cdot 10^5$ Да, а ее длина равна 340 нм. Полный геном *E. coli* ($\approx 4 \cdot 10^3$ т. п. н.) представлен одной кольцевой молекулой ДНК (*нуклеоид*) и имеет длину 1,4 мм.

Особенности строения и функции РНК. Молекулы РНК представляют собой полинуклеотиды, состоящие из одной цепи, включающей 70–10 000 нуклеотидов (иногда и больше), представленные следующими типами: мРНК (матричная, или информационная), тРНК (транспортная), рРНК (рибосомная) и только в клетках эукариот – гяРНК (гетерогенная ядерная), а также мяРНК (малая ядерная). Перечисленные виды РНК выполняют специфические функции, кроме того, в некоторых вирусных частицах РНК является носителем генетической информации.

Матричная РНК является транскриптом определенного фрагмента *смысловой цепи* ДНК и синтезируется в ходе *транскрипции*. Информационная РНК – это программа (матрица), по которой строится полипептидная молекула. Каждые три последовательно расположенных нуклеотида в мРНК выполняют функцию *кодона*, определяя положение соответствующей аминокислоты в пептиде. Таким образом, мРНК служит посредником между ДНК и белком.

Транспортная РНК (рис. 1.4) также участвует в процессе синтеза белка.

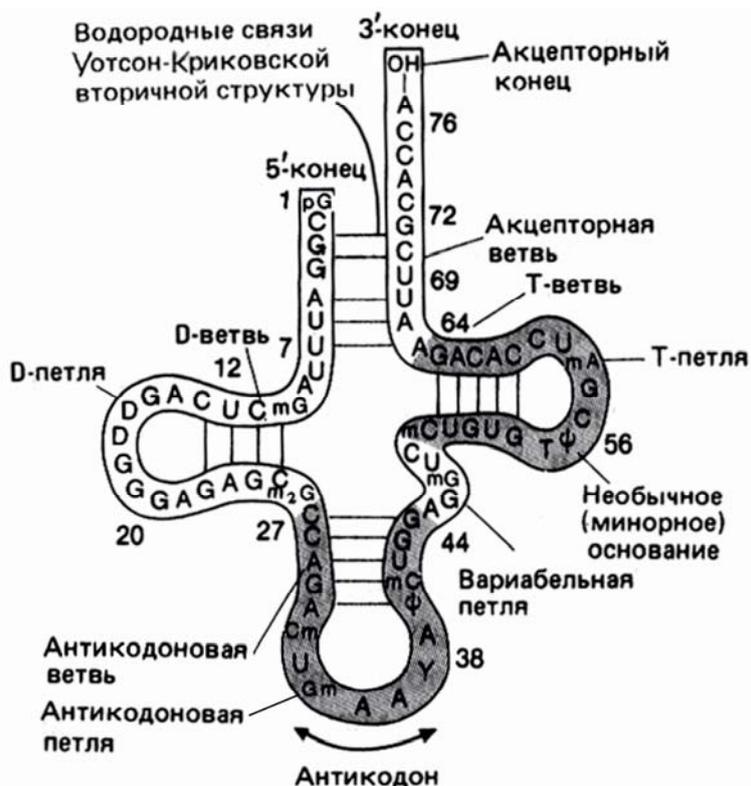


Рис. 1.4. Структура тРНК [4]

Функция тРНК состоит в доставке аминокислот к месту синтеза и определении положения аминокислоты в пептиде. Для этого в ее составе имеется специфический *триплет* нуклеотидов, носящий название «*антикодон*», и вся молекула характеризуется уникальным строением. Структурное представление о молекуле тРНК носит название «клеверный лист».

Молекула тРНК короткая и состоит из 74–90 нуклеотидов. Как и любая цепь нуклеиновой кислоты, она имеет два конца – фосфорилированный 5'-конец и 3'-конец, на котором всегда присутствуют 3 нуклеотида

(ССА) и концевая 3'-ОН-группа. К 3'-концу тРНК прикрепляется аминокислота, и он называется акцепторным. В составе тРНК обнаружено несколько необычным образом модифицированных нуклеотидов, не встречающихся в других нуклеиновых кислотах.

Несмотря на то что молекула тРНК одноцепочечная, в ней присутствуют отдельные дуплексные участки, формирующие так называемые стебли, или ветви, где между асимметричными участками цепи образуются Уотсон-Криковские пары (рис. 1.4). Все известные тРНК формируют «клеверный лист» с четырьмя стеблями (акцепторным, D, антикодонным и T). Стебли имеют форму правой двойной спирали, известной как А-форма ДНК. Петли тРНК представляют собой одноцепочечные участки. Некоторые тРНК имеют дополнительные петли и/или стебли (например, переменная петля дрожжевой фенилаланиновой тРНК).

Узнавание молекулой тРНК соответствующего сайта в мРНК осуществляется с помощью антикодона, расположенного в антикодонной петле (рис. 1.4). При этом водородные связи между основаниями кодона и антикодона образуются при условии, что формирующие их последовательности комплементарны, а полинуклеотидные цепи антипараллельны (рис. 1.5).

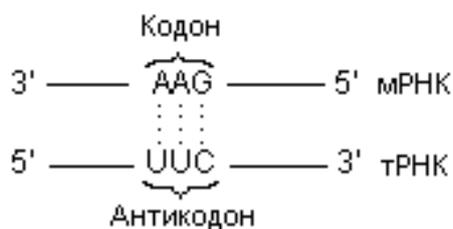


Рис. 1.5. Взаимодействие кодона мРНК с антикодоном тРНК (точками обозначены водородные связи между комплементарными нуклеотидами)

Молекулы разных тРНК отличаются друг от друга последовательностью нуклеотидов, однако их третичная структура сходна. Молекула имеет такой характер укладки, что напоминает по форме букву Г. Акцепторный и T-стебли уложены в пространстве особым образом и образуют одну непрерывную спираль – «перекладину» буквы Г; антикодонный и D-стебли образуют «ножку». Правильная укладка молекул тРНК в пространстве имеет большое значение для их функционирования.

В количественном отношении в клетке преобладает рибосомная РНК, однако ее разнообразие по сравнению с другими типами РНК наименьшее: на долю рРНК приходится до 80% массы клеточных РНК, и она представлена 3–4 видами. В то же время масса почти 100 видов тРНК составляет около 15%, а доля нескольких тысяч различных мРНК – менее 5% массы клеточной РНК.

В клетках *E. coli* обнаружено три типа рРНК – 5 S, 16 S и 23 S, а в эукариотических клетках функционируют 18 S-, 5,8 S-, 28 S- и 5 S-рРНК. Эти виды рРНК входят в состав рибосом и составляют примерно 65% их массы. В составе рибосом рРНК плотно упакованы, способны складываться с образованием стеблей со спаренными основаниями, подобными таковым в тРНК. Считается, что рРНК принимают участие в связывании рибосомы с тРНК. Показано, в частности, что 5 S-рРНК взаимодействует с Т-плечом тРНК.

Кроме перечисленных типов РНК, у эукариот в ядрах обнаружены гетерогенные ядерные РНК и малые ядерные РНК. На долю гяРНК приходится менее 2% от общего количества клеточной РНК. Эти молекулы способны к быстрым превращениям – для большинства из них время полужизни не превышает 10 мин. Одной из немногих выявленных функций гяРНК является ее роль в качестве предшественника мРНК. Малые ядерные РНК ассоциированы с рядом белков и формируют так называемые *малые ядерные рибонуклеопротеидные частицы* (мяРНП), осуществляющие *сплайсинг* РНК.

Структура и функции гена. Организация генов в хромосомах. Термин «ген» ввел датский ученый В. Иогансен в 1909 г., когда еще не была известна его материальная природа. Пониманию структуры и функций гена способствовали результаты экспериментов американских исследователей Дж. Бидла и Э. Тейтума, которые изучали биохимическую роль различных генов у гриба *Neurospora crassa*. Было установлено однозначное соответствие между появлением генетической мутации, индуцированной рентгеновским излучением, и исчезновением определенного фермента, необходимого для данной биохимической стадии метаболизма. Исходя из этого, Дж. Бидл и Э. Тейтум сформулировали гипотезу «Один ген – один фермент», которая означала, что каждый ген направляет синтез одного фермента. В настоящее время эта гипотеза претерпела лишь одно изменение, связанное с тем, что структура некоторых белков, включающих более чем одну полипептидную цепь, кодируется несколькими генами. При этом последовательность аминокислот в каждой полипептидной цепи кодируется отдельным геном, цепи синтезируются отдельно и лишь затем

соединяются в готовый продукт. Чаще гены, контролирующие синтез двух или нескольких полипептидных цепей, располагаются рядом на хромосоме, но не всегда. Так, например, гены, определяющие структуру α - и β -цепей гемоглобина, не сцеплены между собой. Таким образом, современная трактовка постулата Дж. Бидла и Э. Тейтума звучит: «Один ген – одна полипептидная цепь». Это открытие позволило вплотную подойти к расшифровке механизмов реализации генетической информации.

В настоящее время ген понимают как структурную единицу наследственной информации, далее неделимую в функциональном отношении. Ген – это участок молекулы ДНК (реже РНК – только у некоторых вирусов), кодирующий структуру одной макромолекулы – полипептида, тРНК или рРНК. В структуре генов прокариот, эукариот и вирусов, а также в организации этих генов в хромосомах много общего, однако есть и существенные различия.

Нуклеоид прокариот содержит примерно 2000–3000 не перекрывающихся генов. Среди них выделяют *независимые гены* и гены, организованные в группы. Независимые гены называются так потому, что мРНК, считанная с такого гена, всегда *моноцистронная* (под цистроном понимают последовательность нуклеотидов, кодирующую единую полипептидную цепь или стабильную РНК). В свою очередь, независимые гены у прокариот могут содержать регуляторные области (рис. 1.6, а), и в таком случае их *транскрипция* подвержена регуляции. Если независимые гены не содержат регуляторных областей, они носят название *конститутивных генов*, поскольку их транскрипция осуществляется непрерывно (*конститутивно*), независимо от ситуации в клетке. Конститутивные гены кодируют структуру конститутивных белков.

Однако в большинстве случаев единицы транскрипции прокариот являются *полицистронными* и содержат последовательности, кодирующие не один, а несколько типов белков или РНК (рис. 1.6, б и в). Как правило, транскрипция кодирующих последовательностей в полицистронной единице осуществляется согласованно, с участием общих 5'- и 3'-регуляторных элементов. При этом последовательности, кодирующие один или несколько полипептидов, транскрибируются с образованием зрелой мРНК, которая не претерпевает событий *модификации* перед *трансляцией*. Наоборот, последовательности, кодирующие разные типы РНК, специфически расщепляются в ходе *посттранскрипционного процессинга* с образованием зрелых стабильных РНК-продуктов.

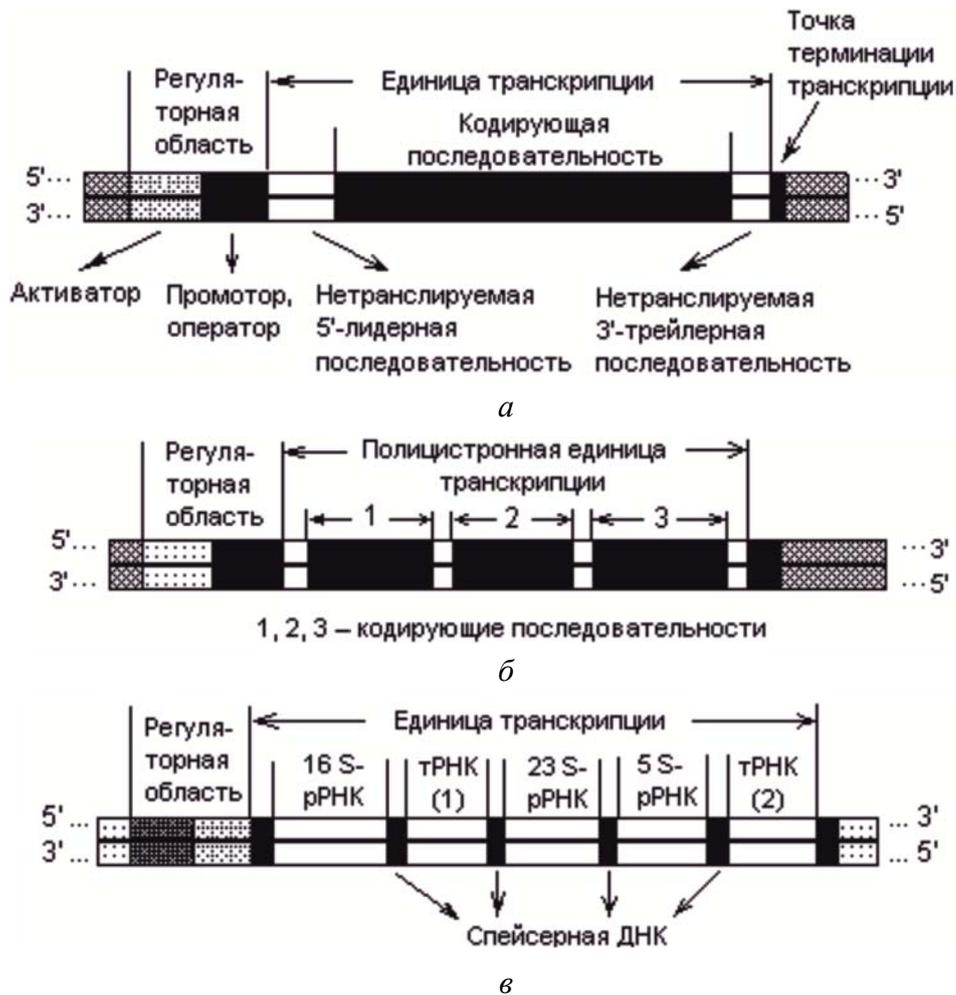


Рис. 1.6. Особенности строения прокариотических генов:
а – гена, кодирующего один белок; *б* – генов, кодирующих белки и организованных в оперон; *в* – единиц транскрипции, кодирующих рРНК и тРНК

Таким образом, современное представление о прокариотическом гене распространяется на следующие элементы:

1) единицы транскрипции, включающие последовательности, кодирующие зрелую РНК, либо полипептид, **5'-лидерную** и **3'-трейлерную** последовательности, а также **спейсерную ДНК**;

2) 5'-последовательности, необходимые для начала правильной транскрипции (**промотор**), и 3'-последовательности, нужные для правильного окончания транскрипции (**терминатор**);

3) последовательности, регулирующие частоту инициации транскрипции.

На рис. 1.6 показаны все перечисленные элементы, входящие в состав разных прокариотических генов. Единица транскрипции пред-

ставляет собой участок ДНК между сайтами, в которых начинается и заканчивается транскрипция. Для белок-кодирующих генов характерно наличие в составе транскрипционной единицы определенного количества нуклеотидов, которые предшествуют белок-кодирующей последовательности (5'-лидер) или следуют за ней (3'-трейлер). Эти элементы присутствуют в зрелых мРНК, известно участие 5'-лидерной последовательности в процессе регуляции транскрипции.

Спейсерная ДНК представляет собой промежуточные последовательности, разделяющие кодирующие области, и удаляется в ходе *процессинга* первичных транскриптов. Последовательности, необходимые для правильного начала транскрипции, представляют собой, прежде всего, промотор, с которым связывается РНК-полимераза, и участки, влияющие на скорость инициации транскрипции (оператор, активатор). Нуклеотидные последовательности, ответственные за терминацию транскрипции, располагаются на 3'-конце гена.

В нуклеоиде гены почти непрерывно следуют один за другим по всей длине ДНК, а иногда (в очень редких случаях) даже перекрываются. Значительная часть прокариотических генов объединена в группы по функциональному признаку. Например, гены путей биосинтеза аминокислот, путей катаболизма углеводов у прокариот часто объединяются в *опероны*. В этом случае их *экспрессия* осуществляется согласованно.

Число генов в геномах эукариот обычно на порядок больше, чем у прокариот. Например, в геноме человека по разным оценкам насчитывается 20 000–25 000 генов. Организация в эукариотических хромосомах и сама структура генов характеризуются некоторыми отличительными особенностями. Во-первых, у эукариот в процессе транскрипции принимает участие не один тип РНК-полимеразы, как это имеет место в прокариотических клетках, а несколько разных ферментов. Поэтому сами единицы транскрипции и их регуляторные последовательности отличаются большей сложностью и разнообразием структурных элементов. Во-вторых, в составе эукариотических генов изобилуют мозаичные единицы транскрипции, в которых чередуются кодирующие (*экзоны*) и некодирующие (*интроны*) последовательности. Интроны чаще всего встречаются в генах, кодирующих полипептиды и тРНК, и реже в рРНК-генах. Размеры, число и местоположение интронов у разных генов различны. В целом общая длина последовательностей интронов превышает суммарную длину экзонов в 2–10 раз и больше. Интроны вырезаются из состава мРНК в процессе *сплайсинга*. Третья особенность эукариотических генов состоит в том, что

все белок-кодирующие мРНК у них моноцистронные, не сгруппированные в опероны. Гены 5 S-рРНК располагаются в хромосомах эукариот **тандемно** (следуя один за другим в количестве нескольких копий), но каждый ген транскрибируется со своего собственного промотора с образованием РНК, имеющей только одну последовательность 5 S-рРНК на молекулу. Напротив, остальные типы рРНК образуют **кластеры** (группы тесно расположенных генов с общим промотором) и транскрибируются в виде полицистронной молекулы РНК, из которой в ходе посттранскрипционного процессинга образуются зрелые молекулы 18 S-, 5,8 S- и 28 S-рРНК. Количество генов в геномах разных эукариот сильно отличается, приближаясь к 10^5 .

Количество генов в вирусных геномах самое маленькое – обычно до 10. Их особенностью является способность к перекрыванию в результате использования нескольких **рамок считывания** генетического кода. При таком способе записи наследственной информации увеличивается емкость генетического материала, что необходимо вирусам из-за ограниченных размеров капсидов, в которые может поместиться строго определенное количество нуклеиновых кислот.

Генетический код. Первые представления о том, каким образом в генах закодирована наследственная информация, изложил Ф. Крик в своей гипотезе «последовательности», согласно которой последовательность аминокислот в полипептидной цепи определяется последовательностью элементов в гене. Экспериментальное подтверждение данной гипотеза получила уже после расшифровки генетического кода в опытах Чарльза Яновского, который в 1964 г. показал совпадение относительного положения индуцированных мутаций в гене *trpA* *E. coli* и аминокислотных замен в кодируемом этим геном ферменте – триптофан-синтетазе. Таким образом, была доказана **коллинеарность** структуры гена и кодируемого им полипептида.

Тем не менее молекулярные основы этой коллинеарности были вовсе не очевидны, поскольку все разнообразие аминокислот в полипептидах описывается значением 20, а разнообразие нуклеотидов в ДНК – значением 4. Таким образом, один нуклеотид никак не может кодировать одну аминокислоту в пептиде.

Эксперименты Ф. Крика и его соавторов по исследованию мутаций у бактериофага Т4 кишечной палочки позволили прийти к заключению, что каждая аминокислота кодируется тремя нуклеотидами, т. е. генетический код **триплетный**. Этот вывод следовал из наблюдения, что мутации, сопровождающиеся вставками или выпадениями (**делециями**) одного либо двух нуклеотидов из генома Т4, приводили к

образованию аномальных белков с нарушенной функцией. Наоборот, вставки или делеции трех нуклеотидов часто сопровождались незначительными изменениями в составе белков, в результате чего последние сохраняли активность. Ф. Крик и С. Бреннер заключили, что генетический код считывается дискретными единицами по три нуклеотида. В таком случае вставка (делеция) триплета нуклеотидов должна приводить к добавлению (изъятию) всего одной аминокислоты из состава соответствующего полипептида. В ситуации, когда вставка (делеция) нуклеотидов совершается в количестве, не кратном трем, должен происходить сдвиг рамки считывания и последовательность аминокислот в белке должна полностью меняться.

Таким образом, генетический код триплетный, т. е. положение каждой аминокислоты в полипептиде задается последовательностью из трех нуклеотидов, которая носит название «**кодон**». Поскольку число разных нуклеотидов в ДНК равно четырем, то количество возможных вариантов триплетов нуклеотидов будет описываться числом: $4 \cdot 4 \cdot 4 = 64$. При этом 61 из 64 триплетов кодирует аминокислоты, причем каждый триплет – только одну аминокислоту, а 3 оставшихся кодона служат сигналами окончания (**терминации**) трансляции (рис. 1.7). Эти кодоны называют стоп (*stop*)-кодонами, или **нонсенс-кодонами**, поскольку они не определяют никакой аминокислоты. Помимо этого, два кодирующих триплета (чаще ATG – для *Met*, иногда GTG – для *Val*) выполняют двойную функцию: кодируют аминокислоты метионин или валин и служат **стартовыми кодонами**, на которых начинается процесс трансляции (рис. 1.7).

<i>Ala</i> – GCA, GCG, GCT, GCC;	<i>Asp</i> – GAT, GAC;
<i>Arg</i> – AGA, AGG, CGA, CGG, CGT, CGC;	<i>Asn</i> – AAT, AAC;
<i>Gly</i> – GGA, GGG, GGT, GGC;	<i>Cys</i> – TGT, TGC;
<i>Ileu</i> – ATA, ATT, ATC;	<i>Glu</i> – GAA, GAG;
<i>Leu</i> – TTA, TTG, CTA, CTG, CTT, CTC;	<i>Gln</i> – CAA, CAG;
<i>Pro</i> – CCA, CCG, CCT, CCC;	<i>His</i> – CAT, CAC;
<i>Ser</i> – AGT, AGC, TCA, TCG, TCT, TCC;	<i>Lys</i> – AAA, AAG;
<i>Thr</i> – ACA, ACG, ACT, ACC;	<i>Met</i> – <u>ATG</u> ;
<i>Val</i> – GTA, <u>GTG</u> , GTT, GTC;	<i>Phe</i> – TTT, TTC;
<i>Trp</i> – TGG;	<i>Tyr</i> – TAT, TAC
<i>stop</i> – TAA, TAG, TGA;	

Рис. 1.7. Структура генетического кода
(подчеркнуты кодоны, выполняющие функции стартовых при трансляции)

Особенностью генетического кода является то, что в нем отсутствуют запятые, т. е. нет знаков, отделяющих один кодон от другого. При этом генетический код не перекрывается в пределах одной рамки считывания, а рамка считывания задается первым «читаемым» нуклеотидом (рис. 1.8).

Нуклеотидная последовательность	5'...ATGTGGCAGTAT...3'
Первая рамка считывания	5'...ATG ¹ TGG CAG TAT...3'
Последовательность аминокислот	N...Met Trp Gln Tyr...C
Вторая рамка считывания	5'...A ¹ TGT GGC AGT AT...3'
Последовательность аминокислот	N... Cys Gly Ser ...C
Третья рамка считывания	5'...AT ¹ GTG GCA GTA T...3'
Последовательность аминокислот	N... Val Ala Val ...C

Рис. 1.8. Рамки считывания генетического кода (цифрой «1» обозначены первые нуклеотиды, задающие каждую из трех возможных рамок считывания)

Максимальное количество рамок считывания в гене – 3, столько же, сколько и «букв» в коде. Для большинства клеточных организмов характерна реализация лишь одной рамки считывания, в то время как у некоторых вирусов их может быть две или даже три.

Направление чтения закодированной записи – от 5'-конца к 3'-концу мРНК, являющейся транскриптом «+»-цепи ДНК, считанным с нее в направлении 5' → 3'. Первый с 5'-конца кодон отвечает N-концевой аминокислоте полипептидной цепи. Следовательно, белки синтезируются от N-конца к C-концу (рис. 1.8).

Еще одним свойством генетического кода является его **вырожденность**. Это означает, что одна аминокислота может кодироваться более чем одним триплетом нуклеотидов. С другой стороны, код не является двусмысленным: каждый кодон кодирует только одну аминокислоту. Такая закономерность выражается в том, что если известна последовательность нуклеотидов в ДНК, то с ее помощью легко узнать последовательность аминокислот в белке; наоборот, известную последовательность аминокислот нельзя однозначно перевести в нуклеотидную последовательность ДНК. Вырожденность генетического

кода, как правило, приводит к тому, что у кодонов, определяющих одну и ту же аминокислоту, реально распознаются только первые два нуклеотида, а третий может не иметь значения.

Полипептид строится от N-конца (свободная аминогруппа) к C-концу (свободная карбоксильная группа). Сдвиг рамки считывания приводит к изменению последовательности аминокислот в пептидной молекуле. Для объяснения этого феномена Ф. Крик предложил гипотезу «качания» (от англ. *wobble*), которая впоследствии подтвердилась и в настоящее время называется правилом **неоднозначного соответствия**. Согласно этому правилу, соответствие третьего нуклеотида в кодоне мРНК первому нуклеотиду в антикодоне тРНК является нестрогим, поскольку часто первое положение в антикодоне тРНК занимает **минорный** нуклеотид, содержащий в качестве азотистого основания инозин. Инозин может образовывать водородные связи с урацилом, цитозином или аденином, находящимися в кодоне в третьем положении. Существование такого механизма позволяет клетке иметь меньше 61 разной тРНК, поскольку многие тРНК способны узнавать до 3 кодонов.

Генетический код универсален. Это свойство кода состоит в том, что любая молекула мРНК при трансляции в клетке любого организма приведет к синтезу полипептида с одинаковой последовательностью аминокислот. Данное правило, однако, имеет исключения, которые касаются генетического кода ДНК митохондрий. Большей частью и здесь используется основной «генетический словарь», но, например, в митохондриях млекопитающих кодон UGA в мРНК «читается» как триптофан, и в пептид в соответствующее положение включается триптофан, в то время как в ядерной мРНК данный кодон служит стоп-кодоном (рис. 1.7) и на нем заканчивается процесс трансляции. Наоборот, в митохондриях млекопитающих триплеты нуклеотидов AGA и AGG прочитываются как сигналы терминации, а в ядре они кодируют аминокислоту аргинин. В митохондриях других организмов могут встречаться иные отклонения от универсального для ядерной ДНК генетического кода.

Структура триплетов нуклеотидов коррелирует с химическими свойствами кодируемых ими аминокислот. Так, все кодоны с уридилатом во втором положении кодируют аминокислоты с гидрофобной боковой цепью (фенилаланин, лейцин, изолейцин, валин, метионин). Если исключить терминирующие кодоны, то наличие аденилата во втором положении определяет полярную, или заряженную боковую цепь (тирозин, гистидин, глютамин, аспарагин,

лизин, глутаминовая и аспарагиновая кислоты). К тому же кодоны для большинства гидрофобных аминокислот различаются только одним нуклеотидом (рис. 1.7). Аналогичная ситуация наблюдается и для кодонов серина и треонина (их боковые группы содержат гидроксил) или аланина и глицина (имеют наименее сложно устроенные боковые группы). Таким образом, генетический код устроен так, что при замене нуклеотидов даже в первой или второй позиции некоторых кодонов в полипептид включается структурно родственная аминокислота, тем самым сводятся к минимуму нарушения во вторичной структуре белка.

Расшифровка генетического кода осуществлена М. Ниренбергом и Х. Кораной в начале 60-х гг. прошлого столетия. В ходе первых экспериментов в бесклеточную систему для синтеза белка, содержащую все необходимые компоненты, в качестве мРНК вносили искусственно синтезированные гомополинуклеотиды (полиуридилат, полицитидилат и др.). Синтезированные в таких условиях полипептиды подвергали аминокислотному анализу. В результате было установлено, что на мРНК, представляющей собой poly(U) (т. е. UUUUUU...), синтезируется полифенилаланин, на poly(C) – полипролин и т. д. Таким образом, можно было заключить, что триплет нуклеотидов UUU кодирует аминокислоту фенилаланин, а триплет CCC – пролин. Окончательную расшифровку всех 64 кодонов удалось осуществить с использованием в бесклеточных системах трансляции синтетических полирибонуклеотидов с известными повторяющимися последовательностями. Эти регулярные сополимеры удалось получить благодаря комбинированию методов органического и ферментативного синтеза.

1.2. Репликация нуклеиновых кислот

Основной функцией ДНК является ее способность к самоудвоению (репликации). Репликация – очень точный механизм, практически не допускающий ошибок. В самой ДНК (у некоторых вирусов – в РНК) закодирована информация о структуре ферментов, осуществляющих удвоение нуклеиновых кислот, синтез новых нуклеотидов – строительной базы репликации, исправление ошибок репликации, а также репарацию повреждений ДНК, вызванных разными факторами. Наконец, сама структура ДНК, а именно наличие двух цепей в ее составе, является условием, облегчающим процесс копирования, поскольку в таком случае каждая из цепочек может выполнять роль матрицы при синтезе новых молекул ДНК. Подобное предположение

высказали Джеймс Уотсон и Фрэнсис Крик еще в 1953 г., и оно получило экспериментальное подтверждение. Такой механизм копирования ДНК, когда каждая из цепей выполняет функцию шаблона, а вновь синтезированные молекулы являются гибридными (состоят из одной старой и одной новой цепей), называется **полуконсервативным**.

Кроме полуконсервативной, были предложены еще две модели репликации – **консервативная** и **дисперсивная**. Особенности этих моделей репликации ДНК состоят в следующем. Согласно дисперсивной модели, родительская спираль ДНК при удвоении разрывается на каждом полуобороте путем множественной фрагментации, а синтез новых цепей происходит на фрагментах (рис. 1.9). По консервативной модели раскручивания спирали ДНК не происходит вовсе, и она служит матрицей для двух новых цепей, в результате чего родительская спираль целиком состоит из старого, а дочерняя – из нового материала. Доказательство реальности полуконсервативного механизма репликации ДНК предоставили М. Месельсон и Ф. Сталь в 1958 г. в экспериментах с **ультрацентрифугированием** меченой бактериальной ДНК.

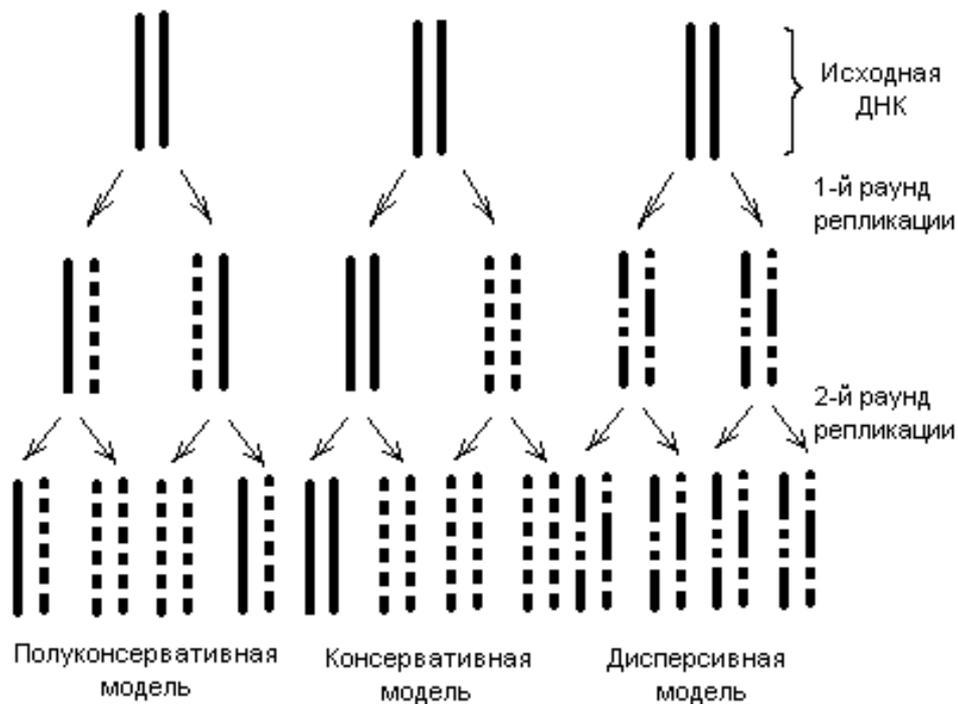


Рис. 1.9. Предполагаемые модели репликации дуплексной ДНК (сплошными линиями изображены исходные («тяжелые», содержащие ^{15}N) цепи ДНК, а прерывистыми линиями показаны полученные в результате репликации новые («легкие», содержащие ^{14}N) цепочки ДНК)

Суть этих экспериментов состояла в следующем. ДНК клеток *E. coli* метили радиоактивным изотопом ^{15}N , а затем давали осуществиться одному раунду репликации ДНК, выращивая клетки в течение примерно 50 мин на питательной среде, содержащей нормальный изотоп азота – ^{14}N . Выделенную из клеток ДНК подвергали ультрацентрифугированию в градиенте плотности хлористого цезия. При таком центрифугировании молекулы CsCl создают в пробирке градиент плотности, и молекулы других веществ распределяются в этом градиенте в соответствии со своей плотностью. ДНК клеток *E. coli*, выращенных на среде, содержащей ^{15}N , имеет плотность $1,724 \text{ г/см}^3$, тогда как ДНК клеток, выращенных на обычной среде с изотопом ^{14}N , характеризуется плотностью $1,710 \text{ г/см}^3$. Таким образом, смесь этих двух типов ДНК легко разделяется по плотности при центрифугировании. Локализацию ДНК в пробирке с градиентом CsCl можно определить по поглощению ультрафиолетовых лучей (ДНК поглощает излучение с длиной волны 260 нм). Таким образом, ДНК в пробирке выявляется в виде «полос»: «легкая» – у верхнего края пробирки, «тяжелая» – ближе ко дну. В данном эксперименте в пробирке с градиентом хлористого цезия образовалась всего одна, средняя по «тяжести» полоса, положение которой соответствовало гибридной ДНК, включающей оба изотопа азота – ^{15}N и ^{14}N . Это обстоятельство исключало возможность реализации только одной модели репликации ДНК – консервативной. Для выбора между оставшимися двумя моделями репликации М. Месельсон и Ф. Сталь позволили бактериям, ДНК которых содержала оба изотопа, совершить еще одно деление на среде с ^{14}N . Затем их ДНК снова подвергли ультрацентрифугированию. На этот раз в пробирке сформировались две полосы ДНК – «легкая» и «средняя по тяжести», что подтверждает справедливость полуконсервативного механизма репликации ДНК.

Итак, все изученные к настоящему времени способы репликации нуклеиновых кислот сводятся к полуконсервативному механизму, согласно которому после каждого раунда репликации одна нить в каждой из двух дочерних молекул является родительской, т. е. консервативной, а другая – синтезированной заново.

Репликация одно- и двухцепочечных нуклеиновых кислот, представляющих геномы разных организмов, осуществляется с соблюдением определенных закономерностей при реализации разных механизмов, рассмотренных ниже. Общим для всех этих процессов является:

- 1) участие сложного комплекса ферментов, которые осуществляют репликацию;

2) наличие трех основных стадий процесса – инициации, *элонгации* и терминации;

3) соблюдение принципа комплементарности при построении новых цепей, при котором шаблоном (матрицей) служит родительская цепочка;

4) высокая точность процесса;

5) возможность исправления ошибок репликации в ходе *корректорской правки*.

Репликация двухцепочечных ДНК. Двухцепочечные ДНК формируют геномы всех клеточных организмов – и прокариот, и эукариот. Наилучшим образом механизм репликации ДНК изучен по отношению к прокариотическим клеткам, в частности бактерий *E. coli*. В экспериментах с прокариотами показано, что в условиях, ограничивающих синтез белка, репликация ДНК не происходит, из чего можно сделать вывод, что этот процесс нуждается в участии белков. В настоящее время известно, что в процессе репликации ДНК участвуют продукты более чем 10 генов. Это, в первую очередь, *ДНК-полимеразы*, а также *топоизомеразы*, *геликазы* и *лигазы*. Появляется все больше доказательств в пользу участия в процессе репликации ДНК высокоорганизованного мультиферментного комплекса – *реплисома*, включающей *праймосома-праймазный* комплекс, геликазы, Pol-III-холофермент и *гиразы*.

ДНК-полимеразы – это ключевые ферменты репликативного процесса, которые собственно и осуществляют наращивание полинуклеотидных цепей, используя принцип комплементарности. Наиболее полно изучены ДНК-полимеразы кишечной палочки. В клетках этих бактерий обнаружено три типа ДНК-полимераз (Pol-I, Pol-II и Pol-III), которые различаются в первую очередь скоростью катализа и нуклеазной активностью. ДНК-полимераза I (Pol-I) представляет собой одиночный полипептид, содержащий порядка 1000 аминокислотных остатков. В клетке *E. coli* насчитывается около 400 молекул этого фермента. Pol-I обладает следующими активностями: полимеразной – присоединение комплементарных матричной цепи дезоксирибонуклеотидов к свободной 3'-ОН-группе праймера в направлении от 5'-конца к 3'-концу ($5' \rightarrow 3'$) строящейся молекулы ДНК; экзонуклеазной – гидролиз фосфодиэфирных связей (отщепление нуклеотидов) в одной цепи ДНК или на неспаренном конце дуплексной ДНК, начиная с 3'-конца ($3' \rightarrow 5'$) и 5'-конца цепи ($5' \rightarrow 3'$). Экзонуклеазные активности играют очень большую роль в репликации и репарации хромосомальной ДНК *E. coli*. При этом $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеазная активность обеспечивает

контроль за присоединением каждого нуклеотида и удаление ошибочных нуклеотидов с растущего конца цепи (корректорская правка), а $5' \rightarrow 3'$ -экзонуклеазная активность используется для удаления димеров пиримидинов и рибонуклеотидов **фрагментов Оказаки**.

ДНК-полимераза II (Pol-II) присутствует в клетках кишечной палочки в значительно меньшем числе копий и осуществляет полимеразную активность гораздо медленнее, чем Pol-I (составляет только 5% активности ДНК-полимеразы I). В отличие от Pol-I этот фермент не обладает $5' \rightarrow 3'$ -экзонуклеазной активностью. Роль этой полимеразы в репликации до конца не выяснена. Считается, что этот фермент не обязателен для репликации ДНК, но может заменять отдельные функции Pol-I при ее повреждении.

ДНК-полимераза III (Pol-III) – основной фермент, ответственный за репликацию хромосомальной ДНК *E. coli*. В каждой клетке содержится только 10–20 молекул этого фермента, но работает он примерно в 60 раз быстрее ДНК-полимеразы I. Кроме того, Pol-III обладает повышенным сродством к матрице и обеспечивает более высокую эффективность копирования. Для данного фермента, так же как и для Pol-II, не характерна $5' \rightarrow 3'$ -экзонуклеазная активность. Поэтому для репликации отстающей цепи необходимо участие Pol-I, чтобы произошло удаление РНК-праймеров на $5'$ -конце фрагментов Оказаки.

В эукариотических клетках выявлено большее количество ДНК-полимераз, но их функции изучены хуже.

Функция топоизомераз сводится к разрешению механических и **топологических** проблем в процессе раскручивания двойной спирали в репликативной вилке. Эти ферменты изменяют степень **сверхспирализации** и приводят к образованию «шарнира», который создает условия для непрерывного движения репликативной вилки. В различных организмах идентифицированы топоизомеразы двух основных типов. Топоизомеразы типа I надрезают одну из двух цепей, в результате чего концевой участок двойной спирали может повернуться вокруг **интактной** цепи, и затем воссоединяют концы разрезанной цепи. Топоизомеразы типа II вносят временные разрывы в обе комплементарные цепи, изменяют степень сверхспирализации, а затем соединяют разорванные концы.

Геликазы осуществляют образование и продвижение вдоль спирали ДНК **репликативной вилки** – участка молекулы с расплетенными цепями. Эти ферменты используют для расплетения цепей энергию, высвобождающуюся при гидролизе АТФ. Для обеспечения более

высокой скорости раскручивания несколько геликаз действуют в комплексе с белками второго типа, которые связываются с одноцепочечными участками молекулы и тем самым стабилизируют расплетенный *дуплекс*.

Наконец, ДНК-лигазы катализируют процессы воссоединения фрагментов цепей ДНК, участвуя в образовании ковалентных связей (фосфодиэфирных мостиков) между 5'-Р- и 3'-ОН-группами соседних дезоксирибонуклеотидов. Эти ферменты также используют энергию макроэргических связей, образующуюся при гидролизе АТФ или ГТФ.

Механизм репликации двухцепочечной ДНК лучше всего исследован для бактерий *E. coli* и будет рассмотрен на данном примере.

Инициация репликации ДНК. Процесс репликации ДНК кишечной палочки начинается в строго определенной точке, которая называется *origin (ori)*, или точкой начала репликации, и расположена на 85-й минуте генетической карты хромосомы этих бактерий. В *ori* репликации на ДНК действуют ферменты (топоизомеразы, геликазы), обуславливающие формирование репликативной вилки, в которой собственно и происходит копирование цепей. Для репликации необходимо наличие ДНК-матрицы в виде одноцепочечного участка ДНК, смеси дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, реплисома (комплекса ферментов, принимающих участие в репликации) и 3'-ОН-группы нуклеиновой кислоты – затравки, к которой ДНК-полимераза должна присоединять следующий нуклеотид. Дело в том, что ни одна из ДНК-полимераз не может начинать процесс полимеризации нуклеотидов *de novo*. Эту функцию выполняют РНК-полимеразы, которые узнают *ori* репликации в репликативной вилке и синтезируют коротенькие (10–60 рибонуклеотидов) последовательности – РНК-затравки (праймеры). При этом синтез затравок осуществляется в направлении от 5'-конца к 3'-концу, и в результате образуется свободный 3'-ОН-конец, который может использовать ДНК-полимераза для продолжения процесса полимеризации цепей на стадии элонгации репликации (рис. 1.10).

Элонгация репликации ДНК. Синтез новых цепей ДНК осуществляется с соблюдением принципа комплементарности: каждый подбираемый в растущую цепь нуклеотид должен быть комплементарен соответствующему (расположенному напротив) нуклеотиду в исходной (матричной) цепи.

Поскольку все ДНК-полимеразы осуществляют процесс полимеризации нуклеотидов только в одном направлении (5' → 3'), а репликативная вилка движется вдоль ДНК в обоих направлениях, непрерывно синтезироваться в каждом из направлений может лишь одна нить, ко-

торую называют *лидирующей*. Вторая (противоположная) нить синтезируется короткими фрагментами (фрагменты Оказаки) и называется отстающей (рис. 1.10). Фрагменты Оказаки у прокариот содержат порядка 1000 нуклеотидов, а у эукариот – 100–200 нуклеотидов.

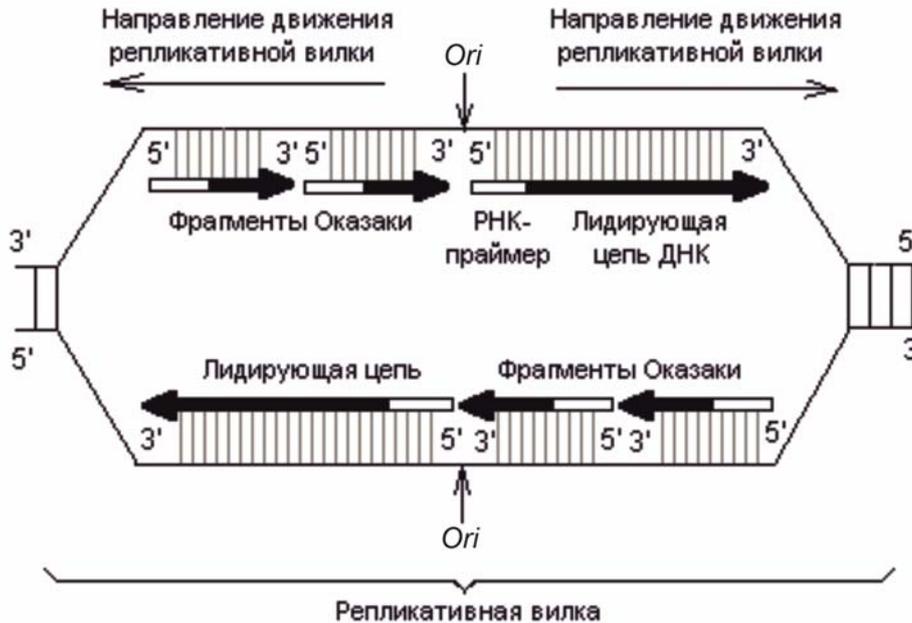


Рис. 1.10. Репликация у клеток *E. coli* (стрелками показано направление синтеза новых цепей ДНК. Незаштрихованные толстые линии – РНК-праймеры, начинающие синтез; сплошные жирные линии – фрагменты удлиняющихся цепей ДНК. Вертикальными линиями показаны водородные связи между комплементарными нуклеотидами)

Кроме полимеризации цепей, которую осуществляет в основном ДНК-полимераза III, в процессе репликации ДНК происходят следующие события:

- вырезание РНК-затравок из лидирующей цепи и из каждого фрагмента Оказаки. Эту функцию выполняет Pol-I с помощью своей 5' → 3'-экзонуклеазной активности;
- заполнение «брешей», оставшихся после вырезания РНК-затравок. Эту работу также осуществляет ДНК-полимераза I, используя свободную 3'-ОН-группу соседнего фрагмента Оказаки;
- соединение фрагментов ДНК в отстающей цепи с помощью фермента ДНК-лигазы: когда растущий 3'-гидроксильный конец каждого фрагмента Оказаки доходит до 5'-дезоксинуклеотидного конца соседнего фрагмента, вступает в действие ДНК-лигаза, и образуется непрерывная отстающая цепь;

– исправление ошибок репликации – корректорская правка. Этот механизм характерен как для Pol-I, так и для Pol-III и основывается на их 3' → 5'-экзонуклеазной активности. Известно, что ДНК-полимераза проверяет комплементарность подбираемого нуклеотида, контролируя размер новой предполагаемой пары нуклеотидов в своем активном центре, и ее полимеразная активность включается лишь тогда, когда эта комплементарность установлена. С другой стороны, каждый вновь встроенный нуклеотид также проверяется на соответствие своей паре в активном центре фермента. Если размер образовавшейся пары нуклеотидов не соответствует истинному (когда основания противоположных нуклеотидов не комплементарны друг другу), с помощью своей 3' → 5'-экзонуклеазной активности фермент вырезает некомплементарный нуклеотид и ищет ему замену.

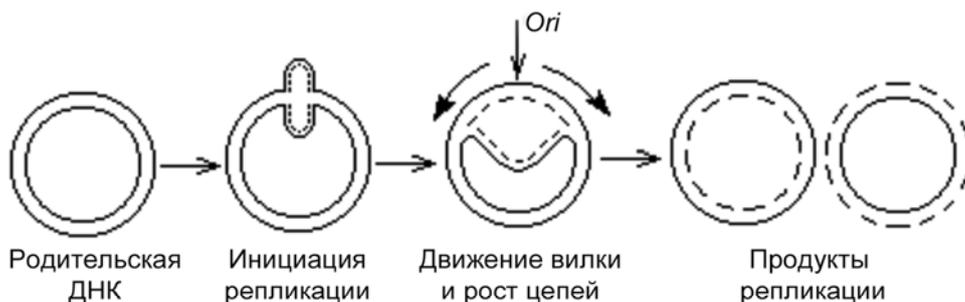
Дополнительным механизмом, уменьшающим ошибки репликации, служит репарация ДНК. В результате частота ошибочного включения нуклеотидов в образующуюся при репликации цепь ДНК крайне низка (10^{-10} – 10^{-8}).

Терминация репликации. При двунаправленной репликации кольцевого генома (как у кишечной палочки) репликативные вилки встречаются на расстоянии 180° от точки репликации, и в этом месте репликация завершается. Кольцевые ДНК в месте встречи соединяются лигазой, при этом они оказываются попарно сцепленными, и в дальнейшем происходит их разделение на отдельные геномы с помощью топоизомеразы типа II.

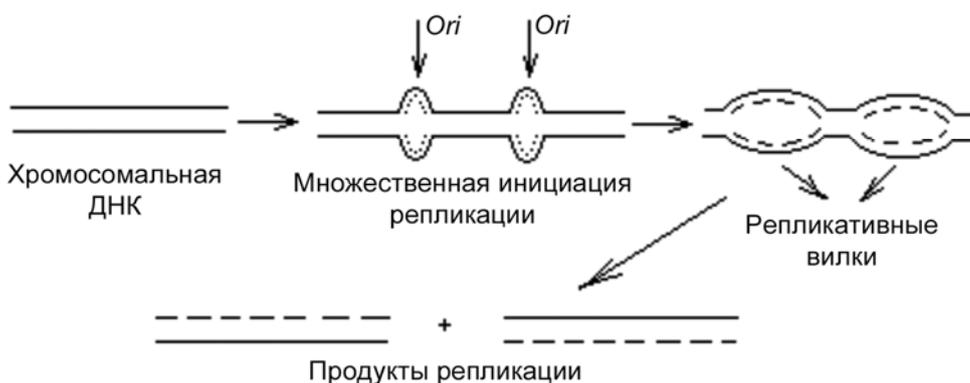
Скорость репликации ДНК у бактерий *E. coli* составляет примерно 1,5 т. п. н. в секунду. Таким образом, полный **геном** кишечной палочки ($4 \cdot 10^3$ т. п. н.) реплицируется примерно за 40 мин. Однако клетки *E. coli* делятся быстрее – каждые 20 мин, и это означает, что при прежней скорости копирования увеличивается частота актов инициации в той же самой точке начала репликации. То есть еще до завершения первого раунда репликации генома в сайте *ori* иницируется второй раунд репликации. Скорость движения репликативной вилки в эукариотических клетках значительно меньше (10–100 п. н. в секунду), но завершение репликации в разумное время обеспечивается одновременной инициацией во множестве точек. В результате хромосома дрозофилы, содержащая, например, $6,5 \cdot 10^4$ т. п. н., реплицируется за несколько минут.

В целом закономерности репликации, выявленные для прокариот, характерны и для большинства эукариотических геномов. Отличия

состоят, в первую очередь, в наличии у эукариот множества сайтов инициации репликации на каждой хромосоме, иных, чем у прокариот, механизмах исправления ошибок репликации, а также в ферментативном оснащении процесса репликации. Схематическое изображение процессов репликации циклических ДНК, формирующих геномы прокариот и плазмид, и линейных (эукариотических) геномов представлено на рис. 1.11.



Двунаправленная репликация с Θ -петлей (например, *E. coli*)



Двунаправленная репликация с множественной инициацией (эукариоты)

Рис. 1.11. Типы двунаправленной репликации двухцепочечной ДНК (сплошными линиями обозначены исходные цепи ДНК; пунктиром – новые цепи)

В линейной ДНК раскручивание цепей осуществляется путем вращения одной цепи вокруг другой. В кольцевой ДНК раскручивание и репликация ведут к образованию структуры, напоминающей кольцо с внутренней петлей. Ее называют **тэта-петлей**, поскольку по форме она похожа на греческую букву Θ . Такие петли можно наблюдать на **радиоавтографах** реплицирующихся бактериальных ДНК, что впервые осуществил Ж. Кэрнс для ДНК *E. coli*.

Приведенный механизм двунаправленной репликации ДНК является наиболее распространенным, но не единственным. ДНК фагов P22, 186, P2, а также T4 и λ на поздних стадиях литического цикла реплицируется по однонаправленному механизму (тип *катящегося кольца*). В этом случае двухцепочечная кольцевая ДНК надрезается специфическим ферментом в уникальном сайте одной цепи (точке начала катящегося кольца). Образовавшийся в результате надреза 5'-конец цепи связывается с ферментом, осуществившим надрез. Синтез ДНК начинается с вытеснения 5'-конца, связанного с ферментом, в раствор, что позволяет ДНК-полимеразе присоединять нуклеотиды к 3'-ОН-концу. Происходит полуконсервативная репликация, в ходе которой 5'-конец разорванной цепи вытесняется в виде свободного хвоста, длина которого все увеличивается, а матрицей служит интактная замкнутая цепь. Эту реплицирующуюся структуру (рис. 1.12) называют катящимся кольцом, т. к. разматывание свободной одиночной цепи сопровождается вращением двухцепочечной матрицы вокруг своей оси.

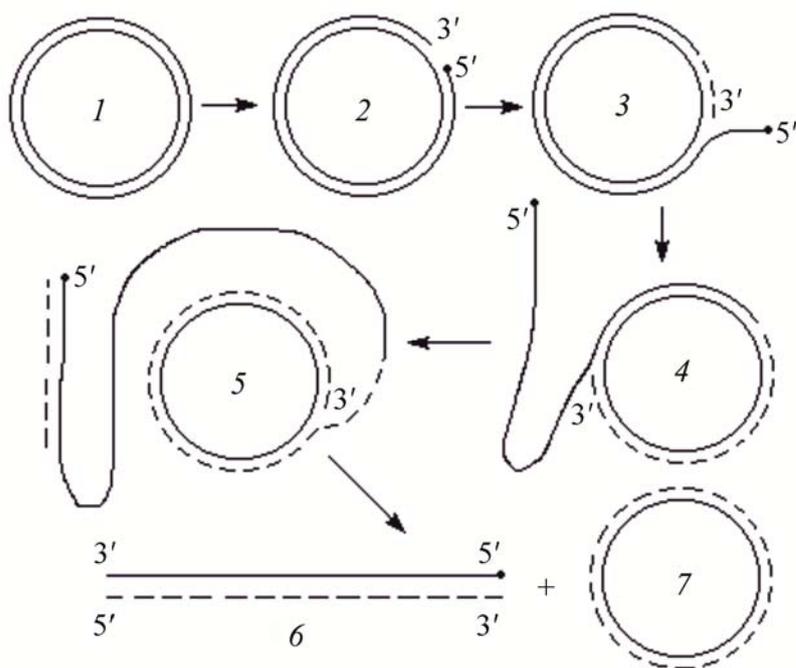


Рис. 1.12. Репликация двухцепочечной ДНК по типу катящегося кольца (сплошной линией обозначены цепи исходной ДНК; пунктиром – вновь синтезированные в ходе репликации цепочки):
 1 – исходная кольцевая ДНК; 2 – формирование надреза в одной из цепей с обнажением 3'- и 5'-концов;
 3, 4 – репликация кольцевой цепи в репликативной вилке;
 5 – начало репликации 5'-хвоста; 6, 7 – продукты репликации

Если этот механизм используется для репликации двухцепочечной ДНК, то 5'-концевые хвосты служат матрицами для синтеза небольших фрагментов ДНК, которые сразу же сшиваются вместе под действием ДНК-лигазы. В результате растущие хвосты вскоре после своего образования приобретают двухцепочечную структуру.

Элонгация хвостов иногда приводит к тому, что их длина многократно превышает общую длину исходной кольцевой молекулы. Такой способ репликации использует, например, фаг λ . При упаковке ДНК в капсиды в специальных участках, называемых *cos*-сайтами и отстоящих друг от друга на длину вирусного генома, образуются надрезы, в результате чего длинные дуплексы многократно повторенной фаговой ДНК расчленяются на фрагменты, соответствующие по размерам зрелой ДНК, обнаруживаемой в вирионах бактериофага λ .

Репликация по типу катящегося кольца характерна также для процесса образования копии бактериальной хромосомы *E. coli* Hfr и фактора F^+ , передающихся при конъюгации в реципиентную клетку.

Репликация одноцепочечных ДНК. У фагов M13 или фX174, чьи зрелые геномы представлены одиночными кольцевыми ДНК, репликация осуществляется по механизму катящегося кольца (рис. 1.12).

Это происходит на поздних стадиях инфекционного процесса, после того, как инфицирующая ДНК превращается в двухцепочечную кольцевую форму. В данном случае не осуществляется репликация 5'-концевых участков, в отличие от репликации геномов фага λ (рис. 1.12, позиция 5), поэтому продуктом репликации являются длинные одиночные цепи ДНК, постоянно отделяющиеся от «катящегося кольца». Эти цепи надрезаются в каждой точке начала репликации и замыкаются с образованием зрелых кольцевых форм, упаковываемых в капсиды.

Репликация РНК. Образование РНК-содержащих вирусов происходит путем репликации их РНК, тогда как все клеточные РНК образуются в результате транскрипции ДНК. За исключением ретровирусов, репликация РНК в основном повторяет процесс репликации ДНК. Как и при репликации ДНК, порядок расположения нуклеотидов определяется комплементарным копированием матрицы, в данном случае обязательно цепи РНК. Ферменты, осуществляющие этот процесс, называются РНК-зависимыми репликазами. РНК бактериальных вирусов R17 и MS2, а также полиовирусов и вируса Синдбис, инфицирующих животных, всегда обозначается знаком (+), поскольку последовательность их РНК-геномов идентична последовательности

мРНК. Таким образом, геном инфицирующего вируса может служить в качестве мРНК и содержит информацию о синтезе некоторых, если не всех, вирусных белков. Специфическая *репликаза*, кодируемая геном вируса и образующаяся вскоре после инфекции, связывается с одним или несколькими белками клетки хозяина и инициирует процесс копирования (+)-цепи с ее 3'-конца с образованием полной (-)-цепи, ассоциированной с (+)-цепью-матрицей. Затем та же репликаза синтезирует множество копий (+)-цепи РНК, используя новосинтезированную (-)-цепь в качестве матрицы. Геномы некоторых вирусов (вирус везикулярного стоматита, гриппа) представлены одной или несколькими (-)-цепями. В этом случае они служат матрицами для синтеза (+)-цепей, которые играют роль мРНК и используются при синтезе дочерних (-)-цепей.

Отличительной особенностью репликации геномов *ретровирусов* является то, что после проникновения их РНК в клетку хозяина вирусный геном подвергается обратной транскрипции. При этом сначала образуется дуплекс РНК–ДНК, а затем – двухцепочечная ДНК. Фермент, катализирующий комплементарное копирование РНК с образованием ДНК, называется обратной транскриптазой (*ревертазой*). Он содержится в ретровирусных частицах (вирионах) и активируется после попадания в клетку. Появляется все больше данных о том, что обратная транскрипция происходит в самых разных эукариотических клетках, а обратная транскриптаза играет важную роль в процессах перестройки генома. Репликация двухцепочечной формы ретровирусной ДНК не начинается до тех пор, пока она не встроится в клеточную ДНК. Механизм рекомбинационного встраивания пока полностью не установлен. После интеграции ретровирусная ДНК реплицируется как часть клеточной ДНК. РНК дочерних вирионов образуется в результате транскрипции интегрированных копий вирусной ДНК.

1.3. Сохранение постоянства и изменчивость геномов

Сохранение постоянства наследственной информации, с одной стороны, и изменчивость геномов – с другой, представляют собой две противодействующие силы, между которыми происходит постоянное соперничество. Сама организация ДНК, являющихся молекулами, в которых зашифрована генетическая информация всех клеточных организмов, способствует надежному хранению этой информации, по-

сколькx содержит две комплементарные цепочки. В случае каких-либо нарушений в одной из них вторая может служить матрицей для исправления этих искажений, что действительно имеет место в многочисленных репарационных процессах. Кроме того, двойная спираль обуславливает возможность воспроизведения себе подобных молекул, и процессы репликации ДНК осуществляются с высокой точностью. Наконец, многие (если не все) клетки имеют систему защиты от проникновения в них чужеродной ДНК; это, в первую очередь, набор нуклеаз – ферментов, способных деградировать нуклеиновые кислоты. Среди таких нуклеаз особое значение имеют рестрикционные ферменты (*рестриктазы*).

Однако эволюция была бы невозможной, если бы отсутствовали процессы генетической изменчивости: несмотря на все усилия организмов сохранить неизменным свой геном, он все же поддается изменениям. Основную вклад в процесс изменчивости геномов вносят следующие процессы: *мутация*, генетический обмен и *рекомбинационные* события, а также деятельность *мобильных генетических элементов*.

Перечисленные процессы, направленные на сохранение постоянства и изменение наследственной информации, рассмотрены в данной теме.

Явление рестрикции-модификации ДНК. В систему рестрикции-модификации входят ферменты, относящиеся к двум классам: одни из них модифицируют молекулы ДНК, находящиеся в клетке, а другие расщепляют чужеродные молекулы ДНК (или свои, не модифицированные) в этих же сайтах.

Впервые явление рестрикции-модификации было обнаружено С. Лурия в 50-х гг. прошлого столетия в экспериментах по инфицированию бактерий *E. coli* бактериофагом λ . Оказалось, что бактериофаги, размноженные на бактериях одного штамма кишечной палочки, инфицировали клетки некоторых других штаммов с низкой эффективностью. Наблюдалось и обратное явление: полученные в ходе этого низкопродуктивного литического цикла фаги инфицировали клетки исходного штамма так же плохо. Было высказано предположение (которое впоследствии подтвердилось), что фаговая ДНК подвергается в бактериях *E. coli* модификации, которая защищает ее от хозяйских ферментов рестрикции, но не от подобных ферментов в других штаммах.

В настоящее время известно, что модификацией, защищающей геном клетки и некоторые инфицирующие фаговые ДНК, является

штамм-специфическое метилирование определенных азотистых оснований в ДНК. Причем ферментативное присоединение заместителей к азотистым основаниям происходит уже после включения соответствующих нуклеотидов в цепи ДНК, начиная с этапа образования фрагментов Оказаки. Метилируются нуклеотиды, занимающие строго определенное положение в молекуле, а ферменты, осуществляющие эти реакции, относятся к единой **системе рестрикции-модификации**. Ферменты рестрикции, входящие в такую систему, узнают в ДНК те же последовательности нуклеотидов и осуществляют специфическое расщепление ДНК в этих (либо прилегающих) последовательностях, если они не модифицированы.

Структура сайтов рестрикции-модификации расшифрована для более чем 200 рестрикционных ферментов.

Различают три типа эндонуклеаз рестрикции (I, II, III). Ферменты I и III типов обладают как нуклеазной, так и метилирующей активностями. При этом эндонуклеазы I типа узнают в ДНК определенную последовательность и разрезают двухцепочечную ДНК на разном (не фиксированном) расстоянии от сайтов узнавания. Эндонуклеазы III типа осуществляют двухцепочечные разрезы ДНК на расстоянии около 25 п. н. от своих сайтов узнавания. Только эндонуклеазы II типа производят двухцепочечные разрезы ДНК по специфическим фосфодиэфирным связям либо в пределах самого сайта узнавания, либо на небольшом, но вполне определенном удалении от него. Ферменты этого типа не обладают метилирующей активностью. Некоторые из эндонуклеаз II типа узнают специфические группы из четырех нуклеотидов, другие – гексануклеотидные последовательности, причем их общей особенностью является **палиндромная** структура (рис. 1.13). В этом случае одна и та же последовательность располагается в двух цепях в противоположных направлениях симметрично относительно оси симметрии в середине палиндрома.

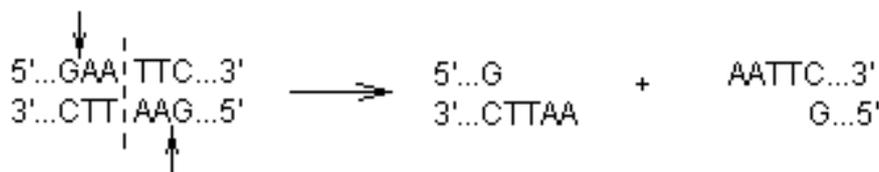


Рис. 1.13. Расщепление ДНК с помощью рестриктазы *Eco* RI из *E. coli* RY13 (слева показана структура сайта рестрикции фермента *Eco* RI: пунктиром изображена ось симметрии палиндрома; вертикальными стрелками – ковалентные связи между нуклеотидами, которые подвергаются расщеплению. Справа показаны фрагменты ДНК, образованные в результате рестрикции)

Как показано на рис. 1.13, результатом действия многих рестриктаз на молекулы ДНК является разрезание их «уступом» в немодифицированных сайтах. При таком способе расщепления двухцепочечных ДНК образуются фрагменты, у которых имеется концевая избыточность, или так называемые «липкие» концы. В составе «липких» концов, образованных под действием одной рестриктазы, последовательности нуклеотидов комплементарны (рис. 1.13). Указанные особенности функционирования рестриктаз II типа делают их незаменимыми инструментами в генетической инженерии: это молекулярные ножницы, с помощью которых *in vitro* осуществляется фрагментирование ДНК.

В настоящее время рестрикции ферменты выделены из более чем 400 штаммов бактерий, и для большей их части определена структура *сайтов рестрикции*. Система рестрикции-модификации может рассматриваться как своеобразный барьер, охраняющий клетку от включения в нее чужеродного генетического материала. Возникновение мутантов, лишенных способности к рестрикции, открывает дополнительные возможности для изменчивости у этих штаммов.

Недавно обнаружена способность некоторых конъюгативных плазмид и фагов преодолевать барьеры рестрикции клеток хозяев, куда они попадают при конъюгации или инфекционном процессе. Это явление получило название *антирестрикции*. В геномах плазмид и фагов обнаружены гены *ard*, детерминирующие структуру белков-антирестриктаз. Эти белки ингибируют ферменты, принадлежащие к системе рестрикции-модификации типа I.

Репарация ДНК. Несмотря на высокую точность работы ферментов, осуществляющих репликацию ДНК, а также на существование механизма корректорской правки, при синтезе новых цепей ДНК все же происходят ошибки, связанные с включением в их состав некомплементарных нуклеотидов. Кроме того, молекулы ДНК подвергаются в клетках воздействию разнообразных физических и химических факторов, нарушающих их структуру. К числу наиболее часто возникающих повреждений ДНК можно отнести следующие:

– разрыв β -N-гликозидных связей между пурином и дезоксирибозой (*депуринизация*), который чаще всего является следствием повышения температуры. За сутки в клетке человека совершается от 5000 до 10 000 актов депуринизации;

– спонтанное дезаминирование остатков цитозина и аденина с образованием соответственно остатков урацила и гипоксантина (примерно 100 событий на геном в сутки);

- алкилирование азотистых оснований под действием химических веществ особого класса (*алкилирующих агентов*);
- *интеркаляцию* (встраивание) некоторых соединений между соседними парами нуклеотидов;
- образование ковалентных сшивок между цепями ДНК под действием бифункциональных агентов;
- образование при поглощении ультрафиолетового света (УФ) циклобутановых димеров (рис. 1.14) между соседними пиримидинами в цепи.

Большинство перечисленных повреждений нарушают процессы репликации и экспрессии генов, например каждый тиминовый димер в ДНК *E. coli* задерживает репликацию на 10 с. Кроме того, эти повреждения являются источником мутаций, если их исправление не осуществится до начала репликации ДНК.

Чаще всего подобные нарушения происходят лишь в одной из нитей ДНК, при этом во второй нити напротив повреждения в большинстве случаев содержится «правильная» последовательность, которая может служить матрицей для исправления ошибок. Таким образом, двойная спираль ДНК, а также то, что в ней закодирована информация о структуре репарационных ферментов, делают возможным уникальный механизм исправления ошибок (репарацию), характерный только для одного класса молекул – ДНК.

Репарационных систем и механизмов, существующих у разных организмов, очень много; среди них есть такие, которые специфичны для исправления повреждений лишь одного рода, а есть и менее специфичные.

Для удобства все известные к настоящему времени репарационные процессы можно разделить на две категории:

- 1) те, что не требуют участия репликации и представляют собой непосредственное исправление нарушений в ДНК;
- 2) более сложные процессы, в ходе которых происходит репарационная репликация.

Лучше всего репарационные механизмы изучены по отношению к исправлению повреждений, вызванных УФ-облучением, – пиримидиновых димеров (рис. 1.14).

Поскольку в наиболее известных процессах репарации последствий УФ-облучения принимают участие зависимые от УФ-света ферменты, репарационные механизмы делят также на световую (способную осуществиться лишь на видимом свете) и темновую (не требующую участия видимого света) репарацию.

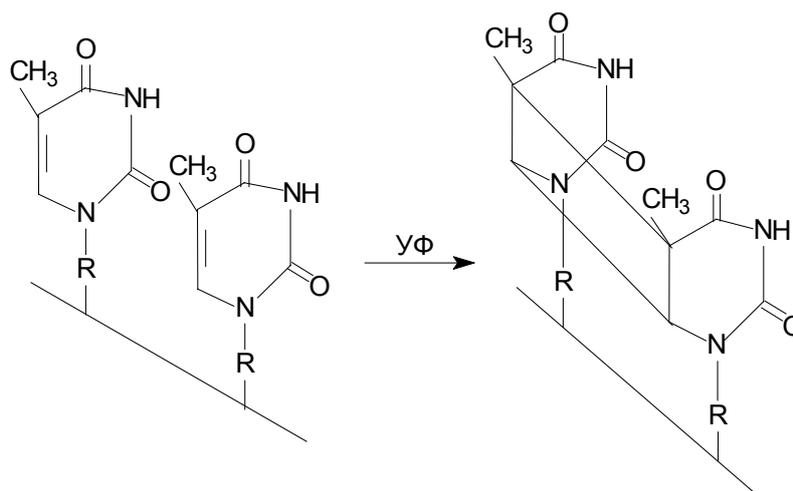


Рис. 1.14. Образование тиминных димеров в одной из цепей ДНК, включающее формирование циклобутанового кольца (состоит из четырех углеродных атомов) при взаимодействии атомов соседних пиримидиновых оснований

К репарационным механизмам прямого исправления повреждений можно отнести дезалкилирование остатков гуанина и мономеризацию циклобутановых димеров между соседними пиримидиновыми основаниями. Дезалкилирование метилгуаниновых остатков относится к темновой репарации и происходит при участии ферментов, присутствующих в клетках бактерий и млекопитающих. При этом O^6 -метилгуанин-ДНК-алкилтрансфераза катализирует перенос алкильных групп на сульфгидрильные группы цистеиновых остатков фермента (рис. 1.15).

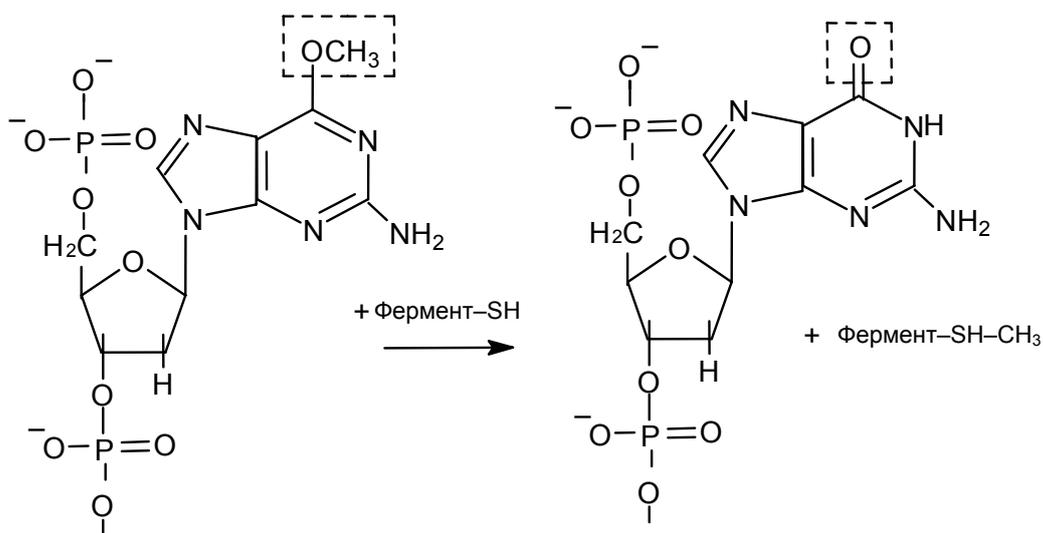


Рис. 1.15. Дезалкилирование O^6 -метилгуаниновых остатков, которое катализируется специфической ДНК-алкилтрансферазой

Расщепление димеров между пиримидиновыми нуклеотидами происходит в процессе **фотореактивации** – восстановления структуры молекул ДНК, поврежденных УФ-излучением, в результате последующего воздействия видимого света (световая репарация). Известна неферментативная коротковолновая фотореактивация, которая заключается в мономеризации димеров при действии ультрафиолетового излучения с длиной волны 240 нм, а также ферментативная фотореактивация. Последнюю обычно и подразумевают под собственно фотореактивацией. Этот процесс требует участия видимого света с длиной волны 300–600 нм и осуществляется под действием специфических фотореактивирующих ферментов (дезоксирибопиримидинфототиазы). Субстратом фототиазы служат димеры пиримидиновых оснований, с которыми она образует комплекс (с неповрежденной ДНК фермент не связывается). Используя энергию поглощенного света, фермент разрушает димер без разрыва цепей ДНК (рис. 1.16).



Рис. 1.16. Образование тиминных димеров под действием УФ-облучения и их разрушение на свету при помощи фотореактивирующего фермента

Явление фотореактивации широко распространено в природе и обнаружено даже у таких примитивных микроорганизмов, как микоплазмы. Фотореактивирующие ферменты найдены у некоторых высших растений и животных, а также у всех изученных бактерий, за исключением *Deinococcus radiodurans*, которые тем не менее чрезвычайно устойчивы к действию УФ-света: эти бактерии выдерживают дозы в 1000 раз более высокие, чем те, которые убивают *E. coli*. При полном отсутствии способности к фотореактивации *D. radiodurans* обладает мощной системой эксцизионной репарации.

Репарационные события, связанные с заменой искаженных участков, не требуют участия видимого света, и в них, кроме других ферментов, важную роль играют нуклеазы двух типов – экзо- и эндонуклеазы. Экзонуклеазы осуществляют расщепление ДНК, начиная с концов цепей, а эндонуклеазы атакуют цепи во внутренних частях, формируя в ДНК однонитевые разрывы. Среди многообразия видов репарации, связанной с репаративным синтезом ДНК, можно выделить два основных – **эксцизионную** и **пострепликативную репарацию**.

Эксцизионная репарация. Отличительной особенностью эксцизионной репарации является удаление поврежденного участка ДНК. Этот вид репарации не столь специфичен в отношении повреждений ДНК, как фотореактивация, и с его помощью могут исправляться не только пиримидиновые димеры, но и многие другие изменения структуры ДНК. Эксцизионная репарация (рис. 1.17, *а*) представляет собой многоэтапный процесс и включает следующие события:

- 1) узнавание повреждения в ДНК, которое осуществляется специфическими эндонуклеазами;
- 2) надрезание одной цепи ДНК вблизи повреждения – *инцизия* (осуществляют эндонуклеазы);
- 3) удаление группы нуклеотидов вместе с повреждением – *эксцизия* (осуществляют экзонуклеазы);
- 4) ресинтез ДНК – заполнение образовавшейся брешы (ДНК-полимеразная активность);
- 5) восстановление непрерывности репарируемой цепи за счет образования ковалентных связей сахарофосфатного остова молекулы.

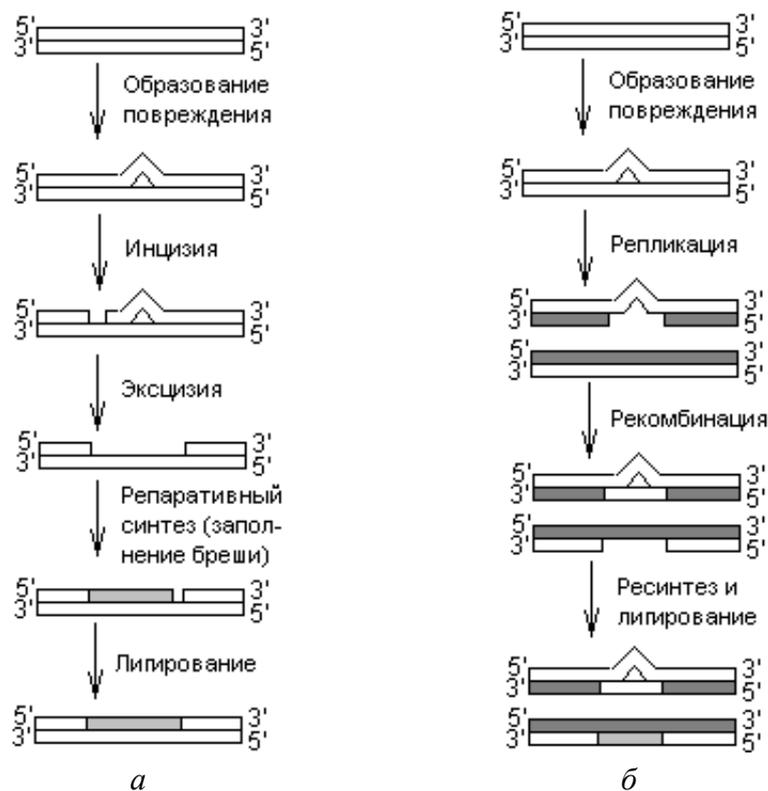


Рис. 1.17. Два типа темновой репарации:
а – эксцизионная репарация; *б* – пострепликативная репарация
 (светлые линии – исходные цепи ДНК; темные линии – цепи ДНК, синтезированные в ходе репарационных событий)

Лучше всего механизм эксцизионной репарации изучен на примере темнового удаления пиримидиновых димеров из ДНК клеток *E. coli*, облученных ультрафиолетом. В клетках кишечной палочки за данный процесс отвечают гены *uvrA–D* (кодируют структуру ферментов, вырезающих участок цепи ДНК с димером), а также *polA* (определяет структуру ДНК-полимеразы I, осуществляющей репаративный синтез ДНК). Особенностью такого способа эксцизионной репарации является образование одноцепочечных надрезов по обе стороны тиминового димера.

Некоторые организмы используют для репарации повреждений, в том числе связанных с образованием тиминовых димеров, еще одну разновидность эксцизионной репарации, предусматривающую участие в процессе особого фермента – N-гликозилазы. В данном случае первым репаративным событием является расщепление гликозидной связи между поврежденным основанием (например, одним из тиминов в димере, N-алкилированным пурином и др.) и дезоксирибозой. Таким образом, имеет место локальная **апуринизация** или **апириимидинизация**; возникает так называемый AP-сайт, узнаваемый AP-специфической эндонуклеазой, которая расщепляет фосфодиэфирную связь рядом с AP-сайтом. Затем брешь заполняется с помощью обычного репаративного синтеза.

В бактериальных и эукариотических клетках обнаружен целый ряд различных N-гликозилаз. Например, урацил-ДНК-гликозилаза узнает неправильную пару *dG/dU*, возникшую в результате спонтанного дезаминирования остатка дезоксицитозина из пары *dG/dC*. Дезаминирование цитозина при репликации может привести к возникновению мутантной нуклеотидной пары *dA/dT*, поскольку с точки зрения образования водородных связей урацил ведет себя аналогично тимину. Другой широко распространенный фермент подобного типа представляет собой пиримидиновый димер-N-гликозилазу, которая создает апириимидиновый сайт при репарации повреждений, связанных с образованием пиримидиновых димеров.

Сайты, в которых произошла депуринизация или депириимидинизация, выщепляются ферментами AP-эндонуклеазами (апуриновыми и апириимидиновыми эндонуклеазами). В клетках про- и эукариот имеется много разнообразных AP-эндонуклеаз. Некоторые из них надрезают цепь с 3'-стороны AP-сайта, а другие расщепляют диэфирную связь с 5'-стороны; в любом случае образуются 3'-гидроксильный и 5'-фосфорильный концы. Это позволяет экзонуклеазе удалить прилегающие остатки по обе стороны надреза вместе с повреждением.

Различные варианты эксцизионной репарации широко распространены у про- и эукариотических организмов, в том числе у млекопитающих. Нарушения процессов эксцизионной репарации могут приводить к драматическим последствиям. Так, у людей известно наследственное заболевание – *пигментная ксеродерма*, основным симптомом которого является повышенная чувствительность к солнечному свету, приводящая к развитию рака кожи. У этих больных обнаружены различные дефекты эксцизионной репарации.

Пострепликативная репарация. Этот тип репарации требует участия продуктов генов, задействованных также в рекомбинационных событиях (*rec*-гены), и не осуществляется в клетках *rec*-мутантов, поэтому его называют еще и рекомбинационной репарацией. Рекомбинационная пострепликативная репарация основана на процессах репликации и рекомбинации поврежденной ДНК, она наименее специфична из всех рассмотренных типов репарации, поскольку в ней отсутствует этап узнавания повреждения. Это довольно быстрый способ восстановления *нативной* структуры ДНК в дочерних (вновь синтезированных) цепях: доказано, что репарация происходит уже в первые минуты после облучения. Особенностью данного процесса является сохранение повреждения в исходных (материнских) цепочках (рис. 1.17, б).

Наряду с быстрой существует и медленная пострепликативная репарация, для которой требуется несколько часов. Ее производит система ферментов, которая отсутствует в необлученных клетках и которую индуцирует облучение. Этот механизм получил название SOS-репарации. Его удивительным отличием является значительное увеличение частоты мутаций, несмотря на то что ДНК и так уже повреждена. Это может являться следствием использования в качестве матрицы цепи ДНК, содержащей повреждения.

Пострепликативная репарация существует не только у бактерий, но и в клетках эукариот, в том числе у млекопитающих.

Мутационный процесс. Если повреждения в молекулах ДНК не успеют репарироваться до начала репликации, они, скорее всего, будут закреплены в ходе репликативного удвоения ДНК в виде *мутаций*. В общем виде мутации можно определить как скачкообразные наследуемые изменения в генетическом материале организмов. Различают спонтанные (произошедшие без видимого вмешательства) мутации, частота которых обычно находится на уровне 10^{-8} – 10^{-6} на клетку,

и индуцированные (возникающие в ответ на использование какого-либо мутагенного фактора) мутации. Частота возникновения последних зависит от особенностей организма, типа и дозы мутагена, а также условий обработки и может достигать 10^{-3} на клетку. Мутации можно считать первоисточником генетической изменчивости организмов; наряду с рекомбинационными процессами они являются мощным фактором эволюции.

Для характеристики всего многообразия мутационных изменений в системном порядке используют несколько принципов классификации мутаций:

1) по характеру изменения генома различают **геномные** мутации – изменение числа хромосом; **хромосомные** перестройки – изменения структуры хромосом, приводящие к изменению числа и порядка расположения в них генов; **генные** мутации – изменения последовательности нуклеотидов в пределах одного гена (мутации в узком смысле слова);

2) по проявлению в гетерозиготе мутации делят на **доминантные** (проявляются в **гетерозиготе**) и **рецессивные** (проявляются только в **гомозиготе**);

3) по направлению действия мутации подразделяют на **прямые** (изменения исходного, или так называемого дикого типа) и **обратные (реверсии)**, которые представляют собой возврат к дикому типу;

4) по локализации в клетке выделяют **ядерные** мутации, которые осуществляются в хромосомах у эукариот и нуклеоидах у прокариот, и **цитоплазматические**, затрагивающие внеядерную наследственность;

5) по фенотипическому проявлению различают мутации **летальные** (приводящие к гибели), **морфологические** (изменения морфологии), **биохимические** (изменения обмена веществ), **поведенческие** (сдвиги в физиологии), **криптические** (не имеющие видимого фенотипического эффекта), **устойчивости или чувствительности к повреждающим агентам** и др.

В свою очередь, генные мутации (они наиболее распространены) подразделяются на **делеции** (выпадения одного или нескольких нуклеотидов), **транзиции** (замены пуринов на пурины или пиримидинов на пиримидины), **трансверсии** (замены пуринов на пиримидины и наоборот), **дупликации** (удвоения группы нуклеотидов), **амплификации** (умножения групп нуклеотидов). Последние два типа более характерны для хромосомных перестроек, в этом случае речь идет об удвоении

или умножении числа отдельных генов либо даже групп генов. Для хромосомных мутаций характерны также **транспозиции** (вставки участков хромосом в новые места), **транслокации** (обмен участками между хромосомами), **инверсии** (изменения порядка расположения генов на хромосоме).

Следует отметить, что мутации могут приводить как к утрате функций, так и к приобретению новых признаков, особенно в тех случаях, когда происходит слияние генов и они оказываются под контролем несвойственных им регуляторных элементов.

Генетический обмен и рекомбинация. Не менее важный, чем мутации, вклад в изменчивость вносят способы генетического обмена и следующие за ними рекомбинационные события. Генетический обмен характерен как для эукариот, так и для прокариот и может осуществляться в ходе различных процессов. Для эукариотических организмов изучены половой и парасексуальный процессы. В ходе первого происходит слияние половых клеток с образованием диплоидной зиготы, которая в большинстве случаев подвергается **мейотическому** делению, сопровождающемуся рекомбинацией между хромосомами. В **парасексуальном** цикле происходят объединение и последующая рекомбинация генов на основе событий, осуществляющихся в митозе без участия оплодотворения половым путем.

Обмен генетической информацией у прокариот *in vivo* происходит в ходе **конъюгации**, **трансдукции** и трансформации, а в лабораторных условиях – еще и при слиянии протопластов.

Конъюгация – процесс генетического обмена, требующий физического контакта клеток. При этом перенос генов осуществляется из **донорских** бактерий (содержат конъюгативные **плазмиды**) в реципиентные клетки (бесплазмидные) по специальному каналу – конъюгативному мостику. Этот процесс опосредуется генами, расположенными на плазмидах. Плазмиды представляют собой суперспирализованные ковалентнозамкнутые кольцевые молекулы ДНК небольшой величины (2–600 т. п. н.), способные к автономной репликации. Клетки, содержащие плазмиды, могут приобретать новые признаки. Эти признаки используются для обозначения впервые выявленных плазмид: *F*-плазмиды (факторы фертильности, или половые факторы) ответственны за донорские свойства бактерий; *Col*-плазмиды (факторы колициногенности) опосредуют способность клеток синтезировать особый класс бактериоцинов – колицины; *R*-плазмиды (факторы резистентности) обуславливают устойчивость бактерий к антибиотикам и др. Плазмиды характеризуются рядом

общих и специфических свойств. К общим свойствам плазмид можно отнести способность к автономной репликации, конъюгативному переносу, интеграции в нуклеоид (*эписомы*), несовместимость (не-способность некоторых плазмид стабильно наследоваться одной и той же клеткой).

Специфические (индивидуальные) свойства характеризуют небольшие группы плазмид и придают клеткам разные фенотипические свойства: устойчивость к антибиотикам, катионам, анионам, мутагенным факторам, бактериоцинам, бактериофагам; способность деградировать *ксенобиотики*; синтез антибиотиков, бактериоцинов, пигментов, инсектицидов, поверхностных антигенов, токсинов, ферментов; использование в качестве источников углерода разных сахаров и аминокислот; индукцию опухолей у растений и др.

Трансдукция – способ генетического транспорта, при котором переносчиками генов выступают умеренные или вирулентные бактериофаги. Фрагменты бактериальных хромосом обычно включаются в состав фаговых частиц либо в ходе неправильного вырезания профагов из бактериального генома (характерно для умеренных вирусов), либо в ходе ошибочной упаковки в головки бактериальной ДНК при сборке вирулентных фагов. Образующиеся фаговые частицы носят название «дефектные», поскольку в большинстве случаев не способны обеспечить литический цикл. Однако они сохраняют способность адсорбироваться на клетках и инъецировать в них свою нуклеиновую кислоту, которая может вступать в события рекомбинации с клеточным геномом.

Трансформация – способ генетического обмена, открытый Ф. Гриффитом, при котором в клетки проникает свободная ДНК. Трансформирующая способность описана как для хромосомальных, так и для плазмидных ДНК. Процесс, в котором выделенная ДНК фагов поступает в бактериальные клетки и обуславливает образование в них зрелых фаговых частиц, называется *трансфекцией*. В естественных условиях трансформация осуществляется с невысокой эффективностью за счет высвободившейся из спонтанно лизировавшихся клеток ДНК. В лабораторных условиях частоту трансформации можно существенно повысить, увеличив концентрацию трансформирующей ДНК и переводя клетки в *компетентное* состояние (только в таком состоянии клетки способны адсорбировать и поглощать ДНК). Еще легче трансформируются протопласты, и этот прием – один из самых распространенных при введении гибридных (полученных в экспериментах по генной инженерии) молекул ДНК в клетки.

Слияние протопластов представляет собой искусственный метод объединения геномов. Он основан на способности плазматических мембран – пограничных структур протопластов – к спонтанной агрегации с обобществлением всего содержимого двух или более протопластов. При этом между геномами могут происходить сложные рекомбинационные события, сопровождающиеся возникновением разных вариантов организмов.

Процессы трансформации клеток и протопластов, а также слияние протопластов используют и для селекции некоторых эукариотических организмов: дрожжей, мицелиальных грибов, растений.

Итак, перечисленные выше процессы приводят к поступлению в клетки нового генетического материала, который может подвергаться у бактерий рестрикции, если модифицирован *неадекватно* имеющейся в клетке системе рестрикции-модификации, но может и успеть вступить во взаимодействие с резидентными молекулами ДНК – рекомбинацию. Рекомбинация свойственна всем группам организмов, за исключением РНК-содержащих вирусов (у них она не обнаружена). Это ферментативный процесс, и генетическая информация о синтезе ферментов, опосредующих рекомбинацию, есть во всех клетках и у многих вирусов. Некоторые ферменты, играющие ключевую роль при рекомбинации, участвуют также в процессах репликации и репарации ДНК.

Различают три типа рекомбинации – *общую* (регулярную, гомологичную), *сайт-специфическую* и *незаконную* (негомологичную, случайную). Основное отличие между этими типами заключается в протяженности сайтов *гомологии*, которые обуславливают взаимодействие молекул ДНК, приводящее к перекомбинированию генов.

Общая рекомбинация. Это обмен участками между гомологичными (идентичными) нуклеотидными последовательностями, или *кроссинговер*. При данном типе рекомбинации происходит разрыв гомологичных цепей ДНК с последующим реципрокным соединением их в новом сочетании (рис. 1.18). Обмен производится одноцепочечными участками, причем имеющими одинаковую ориентацию. В процессе принимает участие большое количество разнообразных ферментов. В частности, общая рекомбинация у *E. coli* катализируется *recA*-белком (обеспечивает обмен одиночными цепями), *recBCD*-нуклеазой (осуществляет разрыв и расплетение цепочек), геликазами и белками, связывающимися с одноцепочечной ДНК (необходимы для миграции креста Холлидея), а также ДНК-полимеразой I и ДНК-лигазой.

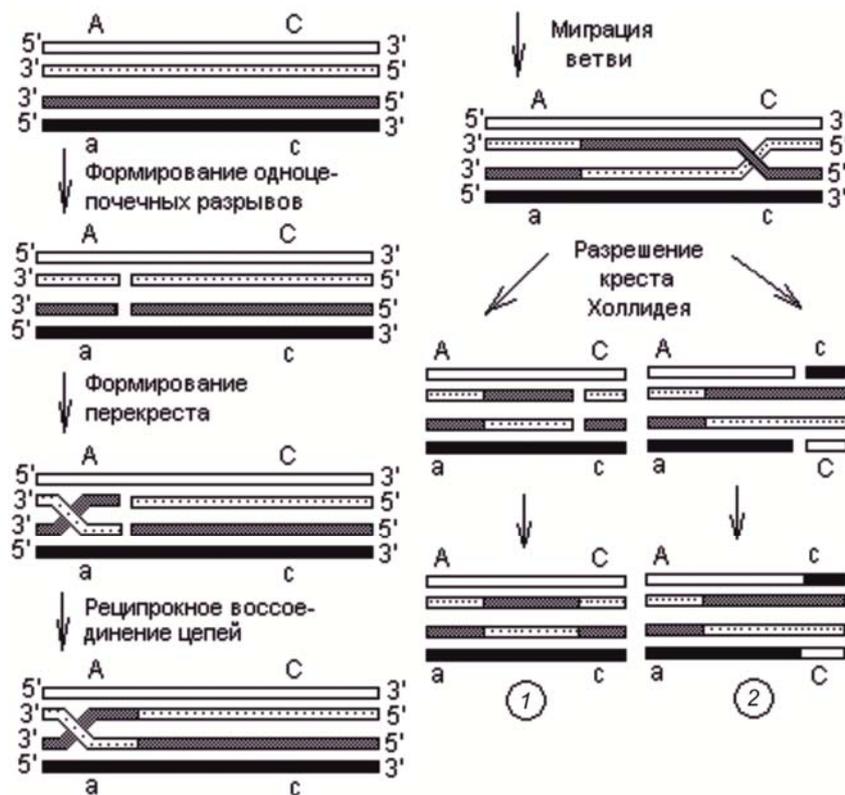


Рис. 1.18. Этапы процесса рекомбинации между гомологичными молекулами ДНК:
 1 – продукт разрезания и воссоединения перекрещивающихся цепей;
 2 – продукт разрезания и воссоединения неперекрещивающихся цепей

Гомологичная рекомбинация начинается с надрезания однонаправленных цепей в гомологичных молекулах ДНК, после чего свободные концы одной цепи спариваются со свободными концами другой цепочки, и формируется структура Холлидея (по имени исследователя, впервые предложившего ее). Точка перекреста обменивающихся цепей перемещается вдоль рекомбинирующих молекул – миграция ветви (креста). При этом происходит размыкание водородных связей между комплементарными нуклеотидами внутри одной родительской молекулы ДНК и замыкание соответствующих связей между нуклеотидами цепей, принадлежащих разным молекулам ДНК.

Структуры Холлидея затем переходят в рекомбинантные двойные спирали (разрешаются) путем внесения разрывов и воссоединения цепей двумя альтернативными способами. В первом способе разрезаются и воссоединяются перекрещивающиеся однонаправленные цепи, а в другом – неперекрещивающиеся однонаправленные цепочки. При миграции креста Холлидея осуществляется спаривание цепей, принадлежащих разным молекулам ДНК, т. е. образуются *гетеродуплек-*

сы. В их составе могут содержаться некоплементарные нуклеотиды, которые удаляются так же, как при репарации ДНК, а шаблоном в данном случае может служить любая из цепей.

Существует альтернативный способ общей рекомбинации, в ходе которого происходит двухцепочечный разрыв в одной молекуле ДНК. В этом случае на одном из этапов тоже формируется структура Холлидея, и происходит миграция ветви.

Сайт-специфическая рекомбинация. Этот способ рекомбинации не зависит от продуктов генов *recA*, *B* и *D* и происходит между специфическими сегментами молекул ДНК, не имеющими протяженных областей гомологии. Лучше всего этот тип рекомбинации изучен на примере интеграции фага λ в нуклеоид кишечной палочки и его обратного исключения. Рекомбинационные события при этом происходят в коротких участках ДНК бактериофага и клетки – *att*-сайтах (от англ. *attachment* – прикрепление). В составе фаговой ДНК присутствует *attP*OP'-сайт, а в составе бактериальной ДНК – *attB*OB'-сайт, располагающийся между оперонами *gal* (отвечает за утилизацию галактозы) и *bio* (отвечает за биосинтез биотина).

Нуклеотидные последовательности *att*-сайтов на фаговой и клеточной ДНК различаются, за исключением участка «O» протяженностью 15 п. н., одинаковых для обоих сайтов. Эта последовательность, общая для рекомбинирующих геномов, служит для образования «липких» концов за счет двух надрезов уступом (рис. 1.19). Образование этих надрезов катализирует белок *Int* – продукт фагового гена *int*.

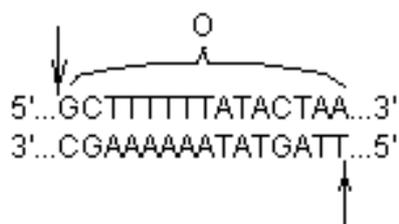


Рис. 1.19. Нуклеотидная последовательность участка «O», входящего в состав *att*-сайтов (стрелками показаны места надрезов уступом)

ДНК фага λ проникает в клетку в линейной форме и сразу замыкается в кольцо благодаря существованию «липких» концов. Затем на фаговую и бактериальную ДНК воздействуют нуклеазы (белок *Int*), и образующиеся «липкие» концы в составе разных *att*-сайтов могут взаимодействовать, приводя к интеграции профага в хромосому (рис. 1.20).

В результате сайт-специфической рекомбинации, сопровождающей процесс интеграции ДНК фага λ в нуклеоид кишечной палочки, происходит образование новых (рекомбинантных) сайтов – $VO P'$ и $PO B'$ (рис. 1.20).

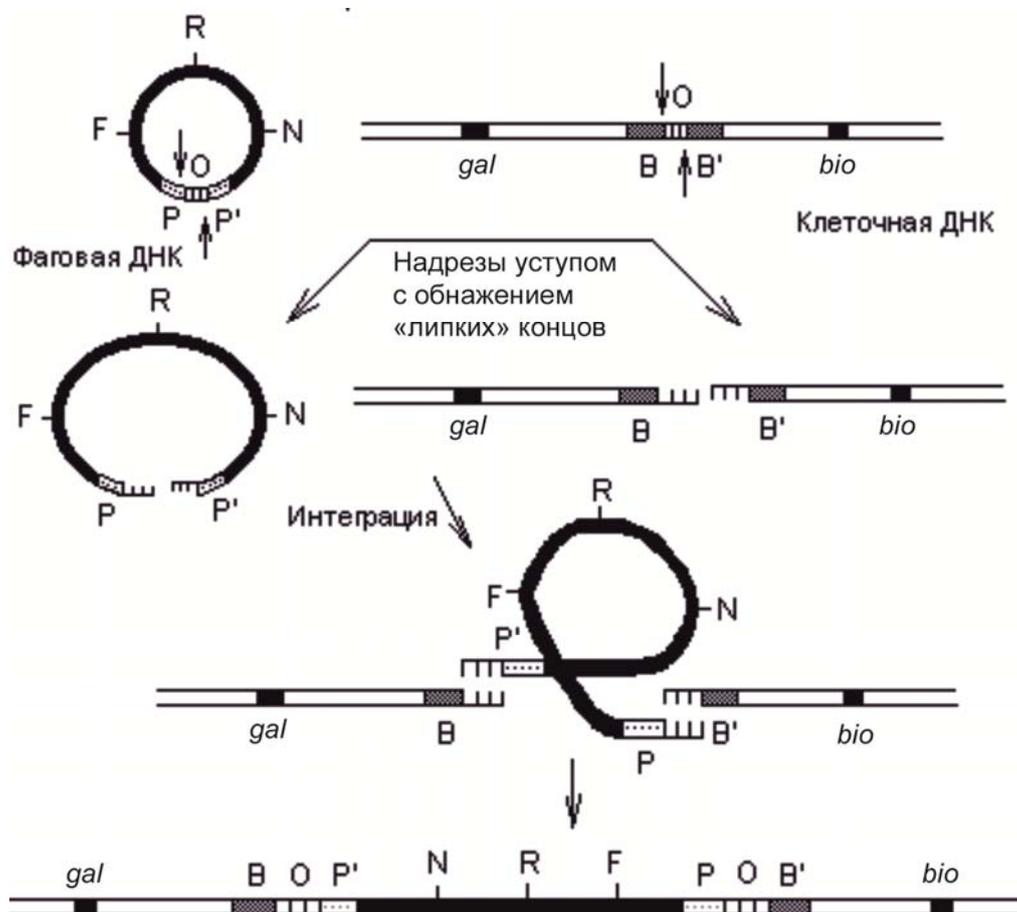


Рис. 1.20. Интеграция ДНК фага λ в хромосому *E. coli*

Исключение профага λ из хромосомы *E. coli* может происходить также в результате сайт-специфической рекомбинации, и в этом процессе, кроме белка *Int*, играют роль фаговый белок *Xis* и клеточный белок *HF*. Следует отметить, что интеграция профага λ может осуществляться и в другие сайты нуклеоида *E. coli*, однако это происходит с частотой примерно в 200 раз меньшей, чем интеграция между локусами *gal* и *bio*, и в таких случаях реализуются закономерности незаконной рекомбинации.

Незаконная рекомбинация. Примерами незаконной (негомологичной) рекомбинации служат события транспозиции перемещаю-

щихся (мобильных) элементов, для которых в геномах отсутствуют предпочтительные сайты интеграции. Полагают, что для этих событий не требуются участки гомологии ДНК. К незаконной рекомбинации относят также процессы случайного встраивания вирусной или плазмидной ДНК в клеточные геномы. Эти события наиболее часты для клеток животных.

Деятельность мобильных элементов. К мобильным элементам относят профаг μ , **транспозоны**, **IS-элементы** (*Insertion Sequences*), которые представляют собой дискретные сегменты ДНК, способные перемещаться внутри одного генома или между геномами, находящимися в одной клетке. Все мобильные элементы содержат гены, опосредующие процесс транспозиции, а также специфические **инвертированные повторы** на концах, которые тоже принимают участие в перемещении.

IS-элементы – это линейные фрагменты ДНК размером 0,2–2,0 т. п. н., содержащие на концах инвертированные повторы (**фланкированные** повторами). Существует несколько типов IS-элементов, отличающихся между собой последовательностью нуклеотидов, длиной, величиной инвертированных повторов (10–40 п. н.), частотой транспозиции (10^{-7} – 10^{-4} на поколение), а также длиной дублированных повторов в ДНК-мишени (5–11 п. н.), которые образуются в процессе транспозиции. IS-элементы не содержат генов, определяющих **фенотипически** различимые свойства, а содержат лишь информацию, необходимую для процесса транспозиции (структуру фермента **транспозазы**). При транспозиции этих элементов в новый сайт исходный IS-элемент остается на прежнем месте, т. е. инсерция сопровождается точным синтезом второй копии и не зависит от репликативных функций и рекомбинационного аппарата хозяина. Не требуется также никакой гомологии между IS-элементом и сайтом-мишенью. В разных репликонах содержится различное количество копий IS-элементов. Например, нуклеоид *E. coli* содержит 4–19 копий IS1, 0–12 копий IS2, 1–2 копии IS4.

Транспозоны (*Tn*) – это созданные на основе IS-элементов (или их производных) сложные мобильные структуры, содержащие гены, определяющие дополнительные (кроме транспозиции) функции. Все транспозоны фланкированы концевыми повторами. Часто ими являются известные IS-элементы, например IS1, которые могут повторяться на концах транспозона в прямой или обратной ориентации (рис. 1.21).

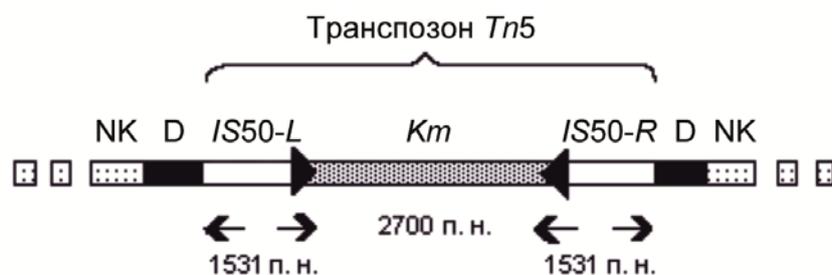


Рис. 1.21. Структура транспозона *Tn5*:

NK – ДНК реплика-мишени; D – дублированные участки мишени; *Km* – гены устойчивости к канамицину (стрелками показаны направления концевых повторов в составе *IS*-элементов, а также ориентация самих *IS*-элементов на концах транспозона)

На рис. 1.21 показано, что с двух сторон центральная область транспозона (*Km*) фланкирована одинаковыми *IS*-элементами – *IS-L* (слева) и *IS-R* (справа), расположенными в *Tn5* в разной ориентации. При этом сами *IS*-элементы также содержат инвертированные концевые повторы. Вся информация, необходимая для перемещения сложного транспозона, содержится в его *IS*-элементах: это та самая информация, которую используют сами *IS*-элементы при транспозиции, – гены, кодирующие транспозазу.

Разные мобильные элементы отличаются друг от друга степенью специфичности при выборе сайтов интеграции в репликоны. При высокой специфичности транспозон использует один или несколько сайтов ДНК-мишени, при низкой – множество предпочтительных либо практически любой сайт. Вероятность транспозиции зависит от свойств мобильного элемента, в первую очередь от его длины: при увеличении транспозона на 1 т. п. н. частота перемещения снижается в 2 раза. Частота транспозиции для одного и того же мобильного элемента тоже может быть неодинаковой. Она зависит от характера донорного и реципиентного репликонов. Так, известны мутации, которые могут подавлять частоту транспозиции. Кроме того, на перемещение мобильных элементов влияют факторы окружающей среды: температура, УФ-облучение, химические агенты.

Механизм транспозиции. Для объяснения механизма транспозиции, тонкости которого остаются невыясненными, предложено несколько моделей, принадлежащих к двум группам, – репликативные и консервативные. Более понятной является репликативная (коинтегративная) модель. Согласно этой модели, на первой стадии происходит слияние молекул донорной и реципиентной ДНК, сопровождающееся дубликацией в местах слияния двух репликонов (рис. 1.22).

На второй стадии репликоны разделяются благодаря реципрокной рекомбинации между идентичными участками (*res*-сайтами) в коинтеграте (рис. 1.22).

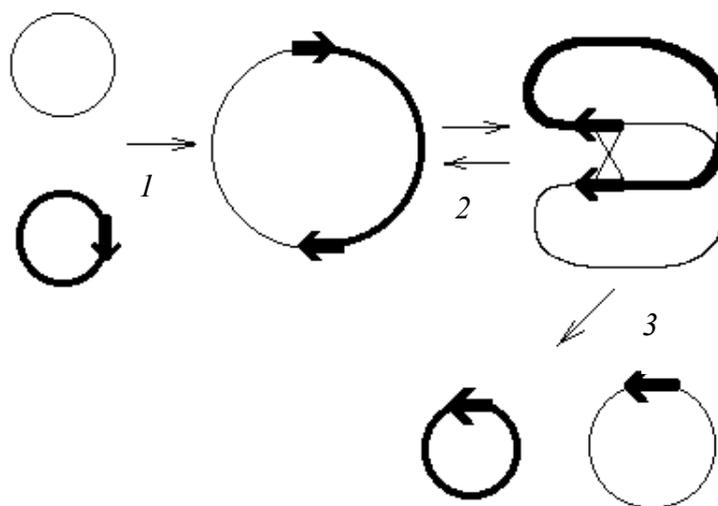


Рис. 1.22. Механизм репликативной транспозиции:
 1 – образование коинтеграта; 2 – реципрокная рекомбинация между *res*-сайтами; 3 – разделение коинтеграта (стрелками обозначены транспозоны)

Для осуществления первой стадии необходима транспозаза и два инвертированных терминальных повтора. Считается, что транспозаза распознает именно эти участки и специфически взаимодействует с ними. Для разделения коинтеграта требуется другой продукт транспозоновых генов – *резолваза*, которая осуществляет сайт-специфическую рекомбинацию в *res*-сайтах.

В транспозиции путем коинтеграции принимают участие не только гены, принадлежащие самому мобильному элементу, но и репликативные функции клетки. Так, показано, что коинтеграты некоторых транспозонов могут диссоциировать только в *RecA*⁺-клетках (где есть *RecA*-белок); иными словами, разрешение этих коинтегратов осуществляется при участии системы гомологичной рекомбинации.

Консервативная (простая, нерепликативная) модель транспозиции допускает выщепление (эксцизию) мобильного элемента из молекулы-донора и вставку (инсерцию) его в молекулу-реципиент, т. е. отсутствие дубликации самого мобильного элемента. Но и в этом случае соблюдается главная особенность процесса транспозиции: в сайтах-мишенях возникают дублицированные повторы (рис. 1.23). Согласно консервативной модели, транспозаза катализирует ступенчатые двухнитевые разрывы реципиентной ДНК, аналогичные тем, что образуют

рестриктазы. Вероятно, транспозазы могут осуществлять надрезы на концах транспозона и соединять их с концами разрывов в ДНК-мишени. При этом формируются одностебельные бреши, которые застраиваются репаративными системами клетки. В результате на концах мобильных элементов всегда создаются одинаковые короткие повторы участка ДНК-мишени (рис. 1.23). Некоторые мобильные элементы, например бактериофаг μ , могут участвовать в обоих типах транспозиции – в интегративной и консервативной.

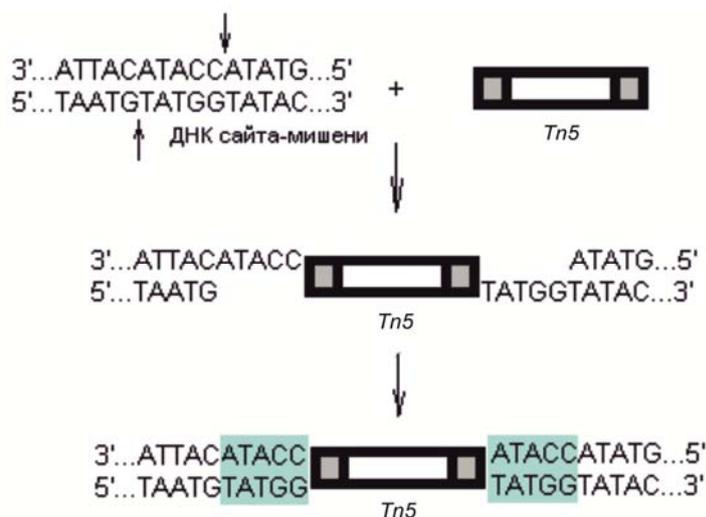


Рис. 1.23. Образование дублированных повторов в ДНК-мишени при транспозиции (стрелками обозначены сайты разрыва ковалентных связей в ДНК – результат воздействия на репликон-мишень транспозазы)

Вырезание транспозонов из ДНК чаще всего осуществляется в результате гомологичной рекомбинации между копиями сайта-мишени.

Перемещение мобильных генетических элементов в пределах одного репликона может приводить к образованию делеций и инверсий, а при межмолекулярной транспозиции могут возникать и другие мутации. Вообще, мобильные элементы индуцируют все виды хромосомных перестроек: слияние и диссоциацию репликонов, транслокации, делеции, инверсии, дубликации. Нередко встраивание мобильного элемента в регуляторный или кодирующий участок приводит к снижению *экспрессии* соответствующего гена. В некоторых случаях – наоборот: *промотор*, расположенный внутри самого транспозона, индуцирует экспрессию соседнего гена, который ранее был молчащим. Совместно с плазмидами и фагами мобильные элементы перемещают гены между разными организмами и вносят весомый вклад в их изменчивость.

1.4. Экспрессия генов

Наследственная информация, записанная языком последовательности нуклеотидов, у большинства организмов (кроме РНК-содержащих вирусов) хранится в ДНК. Последовательность триплетов нуклеотидов в генах определяет последовательность аминокислот в полипептидах или рибонуклеотидов в молекулах транспортных и рибосомных РНК. Для того чтобы генетическая программа реализовалась (синтезировались нужные белки и РНК), требуется участие аппарата *экспрессии* генов. Под процессом экспрессии генов понимают синтез матричных РНК и белков. При этом мРНК выступают в роли посредников между ДНК и белком: синтез белка всегда осуществляется на одностранных мРНК (при участии рибосом), а сами мРНК всегда синтезируются на двухстранных ДНК. Оба процесса относятся к числу матричных и подлежат регуляции, которая существенным образом сказывается на уровне клеточного метаболизма.

Транскрипция ДНК. Экспрессия всех генов начинается с транскрипции их нуклеотидной последовательности. Транскрипция – это процесс перевода информации, записанной на языке последовательности дезоксирибонуклеотидов в смысловой цепи ДНК, на язык последовательности рибонуклеотидов в мРНК. При этом определенный участок одной из двух цепей ДНК (антисмысловой) используется как матрица для синтеза РНК путем комплементарного спаривания оснований.

Ферментами, катализирующими процесс транскрипции, служат ДНК-зависимые РНК-полимеразы. Причем у прокариот, например в клетках кишечной палочки, обнаружен лишь один тип этого фермента, который синтезирует все три типа РНК (мРНК, тРНК, рРНК). В отличие от них эукариоты имеют три разные ДНК-зависимые РНК-полимеразы, каждая из которых ответственна за транскрипцию генов, кодирующих разные типы клеточных РНК. Наилучшим образом процесс транскрипции, а также его ферментативное оснащение изучены у прокариот. Бактериальные РНК-полимеразы – это сложные белки, состоящие из нескольких разных субъединиц. Наиболее изученный фермент – *холофермент* РНК-полимераза *E. coli*, который содержит пять разных полипептидных субъединиц – две α -цепи, одну β - и одну β' -цепи, σ - и ω -цепи. Альтернативная форма фермента, называемая *кором*, или *миниферментом*, лишена σ -субъединицы. Кор-фермент катализирует большинство реакций транскрипции ДНК в РНК, однако не может инициировать синтез РНК в нужном месте, поскольку не

способен узнавать промоторные сайты. Точное связывание и инициация в промоторах происходят только после добавления к кор-ферменту σ -субъединицы и образования холофермента.

Как и другие матричные процессы, транскрипция включает три стадии – инициацию, элонгацию и терминацию.

Инициация транскрипции. Для этого процесса необходимы холофермент, специальная последовательность нуклеотидов в ДНК (промотор) и набор нуклеозидтрифосфатов. Транскрипция иницируется при образовании стабильного комплекса между холоферментом и специфической последовательностью, называемой промотором и располагающейся в начале всех транскрипционных единиц. Промотор – это участок молекулы ДНК, состоящий примерно из 40 п. н. и расположенный непосредственно перед участком инициации транскрипции. В нем различают две важные и достаточно консервативные по составу последовательности. Одна из них состоит из 6 или 7 нуклеотидов (чаще ТАТААТ) и расположена на расстоянии примерно 10 нуклеотидов от первого транскрибируемого нуклеотида (+1); этот сигнал обычно обозначают как –10-последовательность, или последовательность Прибнов-Бокс – в честь ее первооткрывателя. В данном сайте РНК-полимераза связывается с ДНК. Вторая последовательность расположена на расстоянии примерно 35 нуклеотидов до сайта инициации и служит участком распознавания промотора РНК-полимеразой (рис. 1.24).



Рис. 1.24. Структура промотора *E. coli*

Когда РНК-полимераза связывается с промотором, происходит локальное расплетение двойной спирали ДНК и образуется открытый промоторный комплекс. В нем происходит копирование последовательности нуклеотидов смысловой, или (+)-цепи ДНК, имеющей направление $5' \rightarrow 3'$. При этом синтез мРНК всегда начинается с нуклеотидов А или Г. Вторая, антисмысловая цепь ДНК, служит матрицей для синтеза цепочки РНК (рис. 1.25).

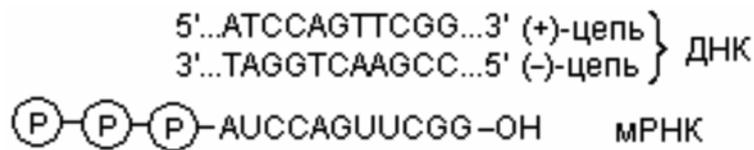


Рис. 1.25. Матричный принцип процесса транскрипции

Транскрипция аналогична репликации в том смысле, что порядок присоединения рибонуклеотидов определяется комплементарным спариванием оснований (рис. 1.25). После формирования первых нескольких фосфодиэфирных связей (обычно 5–10) σ -субъединица отделяется от иницирующего комплекса, и дальнейшая транскрипция осуществляется с помощью кор-фермента.

Элонгация транскрипции. Растущая цепь РНК остается связанной с ферментом и спаренной своим растущим концом с участком матричной цепи. Остальная часть образовавшейся цепи не связана ни с ферментом, ни с ДНК. По мере продолжения транскрипции движущийся вдоль цепи ДНК кор-фермент действует подобно застежке «молния», расплетая двойную спираль, которая замыкается позади фермента, и, таким образом, восстанавливается ее исходная дуплексная структура. «Раскрытая» ферментом область ДНК простирается всего на несколько пар нуклеотидов (рис. 1.26).

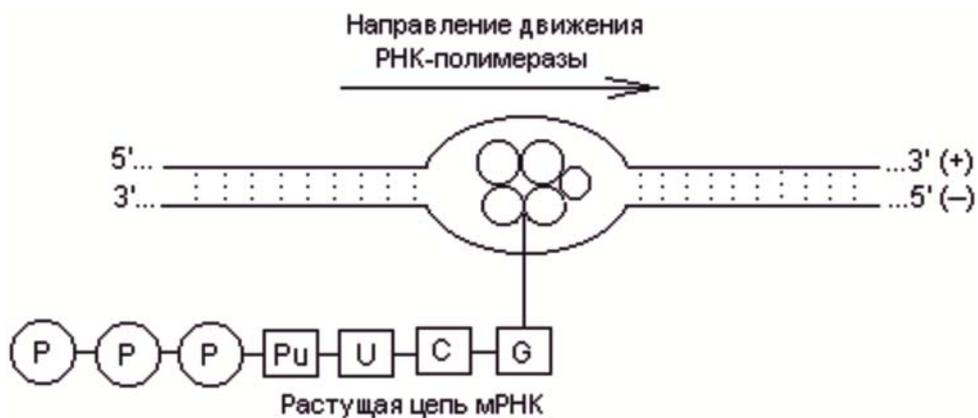


Рис. 1.26. Транскрипция ДНК:
в локальном участке «расплетенной» ДНК работает кор-фермент,
синтезируя цепь мРНК в направлении 5'-P → 3'-ОН

Наращивание РНК идет в направлении от 5'-конца к 3'-концу вдоль матричной (-) цепи, ориентированной в направлении 3' → 5', т. е. антипараллельно. Транскрипция непрерывно продолжается до тех пор, пока фермент не достигнет сайта терминации транскрипции.

Терминация транскрипции. Последовательности ДНК, являющиеся сигналами остановки транскрипции, называются транскрипционными терминаторами. Они содержат инвертированные повторы, благодаря чему 3'-концы РНК-транскриптов складываются с образованием *шпильки* разной длины (рис. 1.27).

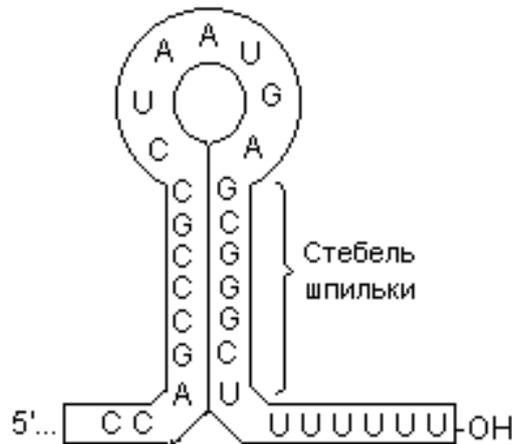


Рис. 1.27. Пример шпильки в составе мРНК, на которой заканчивается процесс транскрипции

Обнаружены два типа сигналов терминации – ρ -зависимый и ρ -независимый терминаторы (ρ – это олигомерный белок, прочно связывающийся с РНК и в этом состоянии гидролизующий АТФ до АДФ и неорганического фосфата). В одной из моделей действие ρ -белка объясняется тем, что он связывается с синтезируемой цепью РНК и перемещается вдоль нее в направлении $5' \rightarrow 3'$ к месту синтеза РНК; необходимая для его перемещения энергия выделяется при гидролизе АТФ. Если ρ -белок наталкивается на образующуюся в РНК шпильку, он останавливает полимеразу, которая могла бы продолжить транскрипцию. Механизм ρ -независимой терминации изучен хуже, в нем остается много неясного.

В большинстве случаев первичные транскрипты, образуемые описанным выше способом, не являются зрелыми молекулами РНК, а требуют процесса созревания, который называется процессингом РНК. **Процессинг** сильно отличается для прокариотических и эукариотических РНК.

У прокариот первичные транскрипты, сформированные при транскрипции генов, кодирующих белки, функционируют в качестве мРНК без последующей модификации, или процессинга. Причем трансляция мРНК часто начинается даже до завершения синтеза

3'-конца транскрипта. Совсем иная ситуация наблюдается для молекул прокариотических рРНК и тРНК. В этом случае кластеры рРНК-или тРНК-генов часто транскрибируются с образованием единой цепи РНК. Для формирования зрелых функциональных форм должны произойти специфическое надрезание первичных РНК-транскриптов и модификация. Эти молекулярные события и называют процессингом РНК, или *посттранскрипционной модификацией*. Начальное расщепление первичных транскриптов на фрагменты, содержащие либо тРНК, либо 16 S-, 23 S- или 5 S-рРНК-последовательности, осуществляет эндонуклеаза РНК-аза III. Ее мишенями служат короткие дуплексы РНК, образующиеся при внутримолекулярном спаривании оснований в последовательностях, фланкирующих каждый из РНК-сегментов. Эти комплементарные последовательности формируют шпильки, в состав которых РНК-аза вносит разрывы, после чего лишние последовательности спейсерных областей удаляются другими РНК-азами. Молекулы тРНК вначале синтезируются в виде про-тРНК, которая примерно на 20% длиннее, чем зрелая. Лишние последовательности, расположенные у 5'- и 3'-концов, удаляются рибонуклеазами Q и P. Кроме этого, для образования зрелой функциональной тРНК, по-видимому, должны произойти специфическая модификация оснований и присоединение одного, двух или всех трех нуклеотидов 3'-ССА-конца (акцепторная ветвь).

Созревание РНК у эукариот осуществляется гораздо сложнее. Во-первых, у эукариот существует ядро, которое отделено от цитоплазмы ядерной мембраной. В ядре осуществляется образование первичных транскриптов, которые имеют большую длину, чем цитоплазматическая мРНК, участвующая в трансляции. Следовательно, образованию зрелой мРНК у эукариот должно предшествовать удаление *интронов* из последовательности гяРНК-транскрипта. Этот процесс называется *сплайсингом* (от англ. *to splice* – сплестать, сращивать). После удаления последовательностей, соответствующих интронам, происходит соединение участков, которые транскрибированы с *экзонов*. Сплайсинг катализируется комплексами белков с РНК (мяРНП), которые, взаимодействуя с гяРНК, образуют *сплайсому*. Полагают, что каталитической активностью в сплайсоте обладает РНК-составляющая. Такие РНК называют *рибозимами*. Место сплайсинга в сплайсомах определяется с высокой точностью, поскольку ошибка даже в 1 нуклеотид может привести к искажению структуры белка. Для точного узнавания в составе интронов есть специфические последовательности – сигналы.

Кроме сплайсинга, мРНК у эукариот подвергается модификации: на 5'-конце синтезируется «кэп» (шапочка) – структура, представляющая собой метилированный остаток гуанозинтрифосфата, который защищает РНК от гидролиза 5'-экзонуклеазами. На 3'-конце про-мРНК синтезируется полиаденилатная последовательность длиной 150–200 нуклеотидов, которая называется «шлейф». Эти структуры принимают участие в регуляции экспрессии эукариотических генов. Процессинг рРНК и тРНК у эукариот осуществляется аналогично таковому у прокариот.

Регуляция генной экспрессии на уровне транскрипции. Каждая клетка целого организма или популяции содержит полный набор генов, свойственный для данного вида (штамма). Однако в любой момент времени в клетке функционируют (экспрессируются) не все гены, а лишь те, в продуктах которых имеется потребность. Такое распределение «обязанностей» между генами возможно благодаря существованию механизмов регуляции генной экспрессии, которые функционируют на разных уровнях. С помощью этих механизмов клетка экономит свои ресурсы: в каждый конкретный момент она синтезирует определенный ограниченный набор веществ, а не весь возможный их спектр и, кроме того, осуществляет координацию метаболических путей.

Среди нескольких уровней регуляции экспрессии генов наиболее существенной и часто используемой является регуляция синтеза ферментов, которая осуществляется на уровне транскрипции. Суть такого типа регуляции сводится к ускорению или замедлению процессов транскрипции определенных генов, что в конечном итоге отражается на скорости синтеза их продуктов. Различают позитивную и негативную регуляцию транскрипции. Негативная регуляция предусматривает торможение инициации транскрипции за счет связывания с операторной областью белков-репрессоров; позитивная регуляция, наоборот, охватывает события «включения» транскрипции, которые также обуславливаются присоединением к *оператору* специфических белков (в данном случае их называют *активаторами*).

Наилучшим образом регуляция синтеза ферментов изучена у прокариот. Их особенностью является организация генов, участвующих в одном метаболическом пути, в опероны. Это дает возможность прокариотам «включать» и «выключать» транскрипцию группы генов (входящих в оперон) одновременно. Несколько разных типов регуляции инициации транскрипции (оперонной регуляции) будут рассмотрены в данной теме на примерах двух оперонов *E. coli* – лактозном, принадлежащем к группе катаболитных оперонов, и триптофановом – анаболическом.

Регуляция инициации транскрипции у эукариот осуществляется гораздо сложнее, чем у прокариот, но основные ее закономерности соблюдаются и в этом случае.

Регуляция экспрессии лактозного оперона по типу индукции. Лактозный оперон *E. coli* содержит регуляторную область (промотор и оператор) и три структурных гена – *lacZ* (кодирует структуру β-галактозидазы), *lacY* (определяет структуру β-галактозидпермеазы) и *lacA* (структура β-галактозидтрансацетилазы) (рис. 1.28). Названные ферменты обуславливают перенос в клетку дисахарида лактозы и расщепление ее на глюкозу и галактозу. Транскрипция структурных генов лактозного оперона осуществляется согласованно: гены *lacZ*, *lacY* и *lacA* транскрибируются в одну полицистронную мРНК, которая транслируется с образованием почти одинаковых количеств каждого из ферментных белков. Недалеко от лактозного оперона на хромосоме *E. coli* располагается ген *I*, кодирующий структуру **белка-репрессора**. Этот белок в свободном состоянии имеет сродство к операторной области *lac*-оперона.

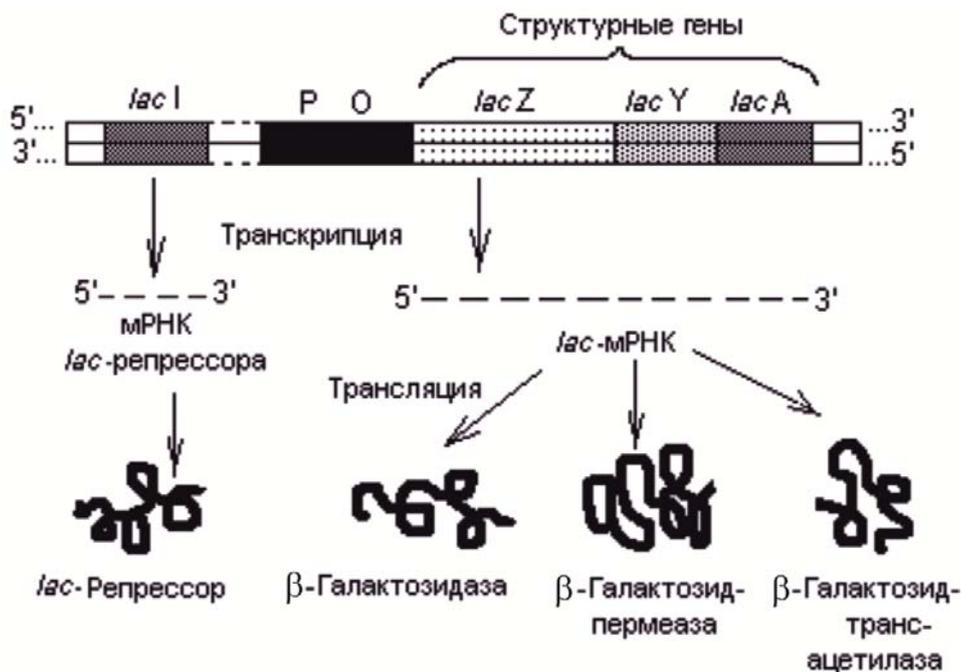


Рис. 1.28. Лактозный оперон (*lac*) *E. coli* и тесно сцепленный с ним ген *lac*-репрессора (*lacI*): P – промотор; O – оператор

Когда клетки кишечной палочки выращиваются на среде с глюкозой в качестве единственного источника углерода, они содержат очень мало белков – продуктов структурных генов лактозного оперона

(примерно по 10 молекул на клетку). В присутствии лактозы и других β -галактозидов концентрация этих белков возрастает до 10 000 и более молекул на клетку. В этом случае лактоза (β -галактозиды) служит **индуктором** синтеза названных ферментов, и это означает, что соответствующий оперон регулируется по типу индукции, т. е. кодируемые им ферменты синтезируются только в присутствии индуктора.

Механизм индукции состоит в следующем. В отсутствие индуктора свободный белок-репрессор (тетрамерная молекула) прочно связывается с операторной областью *lac*-оперона (рис. 1.29). Поскольку промоторная и операторная последовательности перекрываются, связывание репрессора с оператором становится помехой для присоединения РНК-полимеразы к промотору, что приводит к блокированию транскрипции структурных генов. Однако присутствие в клетке лактозы или иного индуктора *lac*-оперона приводит к образованию комплекса индуктора с репрессором, который утрачивает сродство к оператору и освобождает регуляторную область (рис. 1.29). Осуществляется транскрипция структурных генов, и на сформированной мРНК синтезируются соответствующие белки.

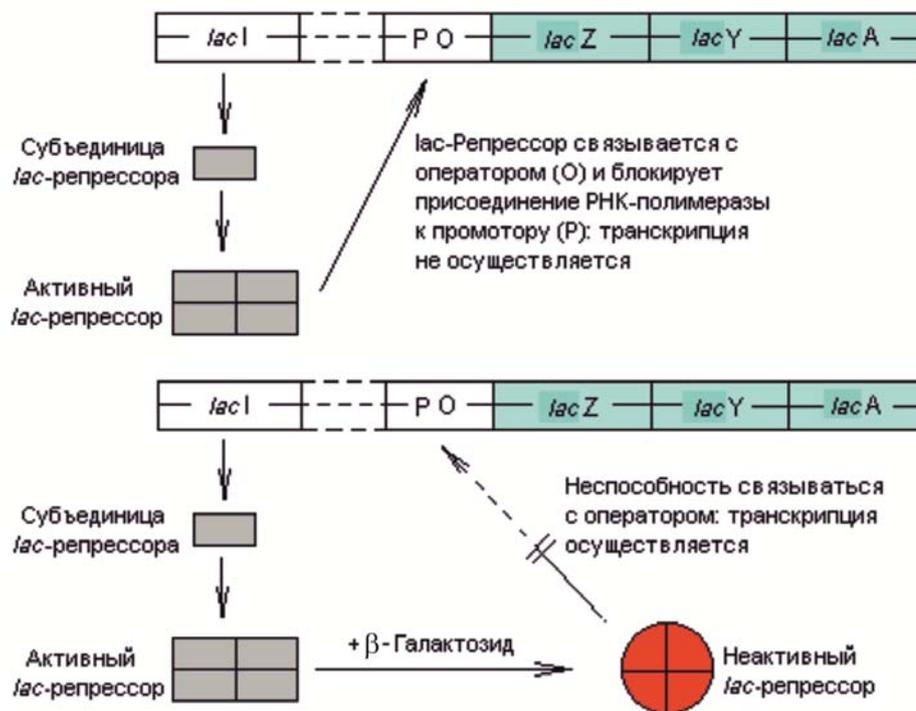


Рис. 1.29. Репрессия *lac*-оперона гомотетрамерным *lac*-репрессором (вверху) и индукция *lac*-оперона после связывания с репрессором β -галактозидного индуктора (внизу)

Таким образом, существование явления индукции позволяет клетке экономить свои ресурсы, поскольку обеспечивает транскрипцию индуцибельных генов и синтез соответствующих ферментов не постоянно, а только при наличии индуктора в среде.

У бактерий *E. coli* получены мутации, которые выражаются в уменьшении или исчезновении сродства репрессора к оператору. У таких мутантов наблюдается **конститутивный** синтез ферментов лактозного оперона, т. е. его экспрессия происходит и в отсутствие индуктора.

Регуляция синтеза ферментов по типу индукции относится к негативному контролю. Кроме этого, работа лактозного и многих других оперонов подвержена позитивной регуляции, которую можно рассмотреть на примере катаболитной репрессии.

Регуляция работы лактозного оперона по типу катаболитной репрессии. Позитивная регуляция транскрипции лактозного оперона заключается в связывании активаторного комплекса со специфической последовательностью, расположенной в самом начале *lac*-промотора. Это приводит к стимулированию процесса транскрипции *lac*-оперона, в результате чего скорость синтеза соответствующей мРНК увеличивается почти в 50 раз. Данный феномен пока не имеет окончательного объяснения, однако существует несколько гипотез, описывающих процесс стимулирования транскрипции. Согласно наиболее распространенной из них, активаторный комплекс связывается с той частью промотора, которая непосредственно прилегает к сайту присоединения РНК-полимеразы (рис. 1.30) и усиливает сродство этого фермента к промотору. Альтернативная гипотеза заключается в том, что связывание активаторного комплекса с промотором предотвращает присоединение РНК-полимеразы к расположенному поблизости слабому промотору и увеличивает тем самым вероятность связывания фермента с «правильным» промоторным сайтом.

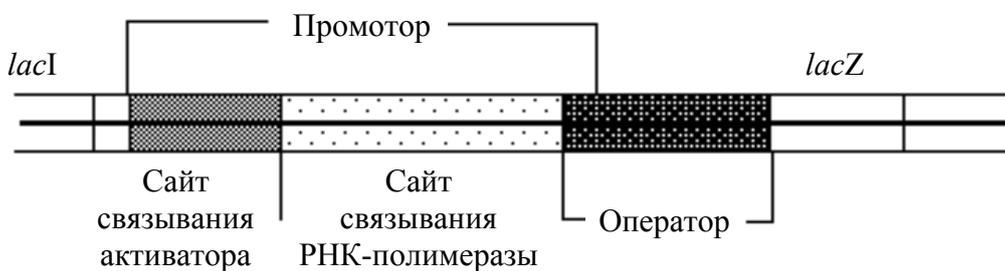


Рис. 1.30. Нуклеотидные последовательности, принимающие участие в регуляции экспрессии лактозного оперона

Функцию активатора транскрипции в данном случае выполняет комплекс циклического АМР (сАМР) с белком – активатором катаболизма (САР, от англ. *Catabolite activator protein*). Этот комплекс выполняет аналогичные функции и при регуляции экспрессии многих других катаболитных оперонов. Свободный белок САР не способен связываться со специфической последовательностью в составе промотора и требует участия сАМР.

При этом сАМР образуется из АТР (рис. 1.31) в ходе ферментативного превращения в ответ на различные клеточные события и сигналы. Это вещество-посредник принимает участие во многих процессах, и с его помощью осуществляется регуляция различных граней клеточного метаболизма. Содержание сАМР в клетке контролируется с помощью двух уравнивающих друг друга процессов – синтеза при участии аденилатциклазы (рис. 1.31) и деградации под действием фосфодиэстеразы. Глюкоза ускоряет распад сАМР и ингибирует процесс его синтеза, т. е. в присутствии глюкозы наблюдается низкий, а в отсутствие – высокий уровень сАМР в клетке.

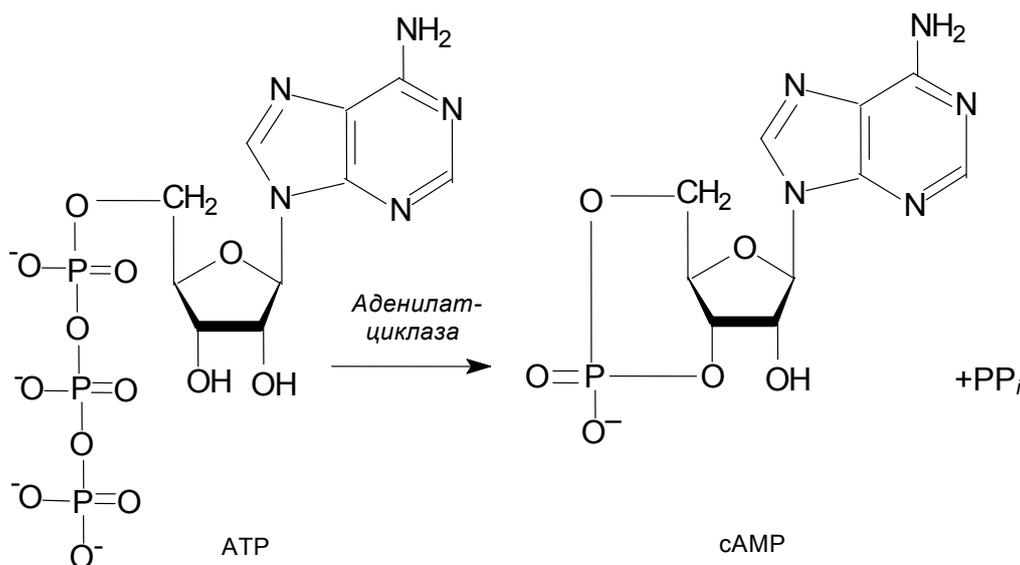


Рис. 1.31. Синтез циклического АМР (сАМР) из АТР

Таким образом, содержание сАМР и, соответственно, активаторного комплекса сАМР – САР зависит от наличия в клетке глюкозы. У бактерий, растущих на глюкозе, концентрация этих веществ очень низкая, поэтому даже в присутствии индукторов транскрипция лактозного и подобных ему оперонов не осуществляется, и в клетке не синтезируются ферменты, принимающие участие в катаболизме соот-

ветствующих сахаров (лактозы, арабинозы, галактозы и др.). Это явление и обозначают термином «катаболитная репрессия».

Регуляция работы триптофанового оперона по типу репрессии. Триптофановый оперон *E. coli* содержит в своем составе пять структурных генов (*trpE*, *trpD*, *trpC*, *trpB*, *trpA*), определяющих аминокислотные последовательности пяти ферментов, участвующих в превращении хоризмата в триптофан. Кроме этого, в состав оперона входит лидерный сегмент *trpL* и регуляторная область (перекрывающиеся последовательности промотора и оператора), принимающие участие в регуляции транскрипции структурных генов (рис. 1.32). В ином сайте нуклеоида кишечной палочки (на достаточном удалении от *trp*-оперона) расположен ген *trpR*, кодирующий структуру белка-репрессора.

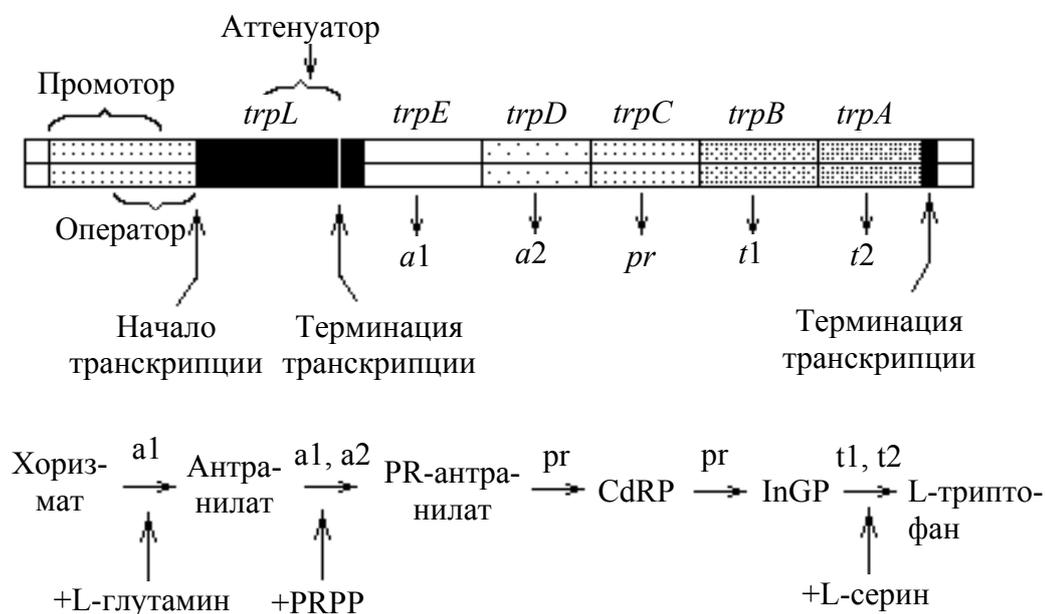


Рис. 1.32. Триптофановый оперон (*trp*-оперон) *E. coli*. Продукты структурных генов: a1 – антранилатсинтаза, компонент I; a2 – антранилатсинтаза, компонент II – фосфорибозилантранилаттрансфераза; pr – фосфорибозилантранилатизомераза-индолглицерофосфатсинтетаза; t1 – триптофансинтетаза β; t2 – триптофансинтетаза α. Промежуточные метаболиты: PR – фосфорибозил; CdRP – карбоксифениламинодезоксирибулозофосфат; InGP – индолглицерофосфат; PRPP – фосфорибозилпирофосфат

Структурные гены *trp*-оперона транскрибируются в виде полицистронной мРНК длиной 7000 нуклеотидов. Синтез мРНК инициируется на промоторе, последовательность которого перекрывается с

оператором (рис. 1.32). Транскрипция контролируется взаимодействием с оператором белка-репрессора, **эффектором** которого служит конечный продукт данного биосинтетического пути – триптофан. Когда в клетке присутствует свободный триптофан, он связывается с репрессором и оказывает аллостерическое воздействие на структуру последнего, в результате чего репрессор приобретает способность прочно связываться с оператором. В этом случае триптофан выполняет роль **корепрессора** триптофанового оперона.

Связывание комплекса триптофан – репрессор с операторной областью препятствует правильному взаимодействию РНК-полимеразы с промотором, поскольку последовательности оператора и промотора перекрываются. Транскрипция *trp*-оперона блокируется, и ферменты, участвующие в синтезе триптофана, не образуются.

В отсутствие триптофана не происходит связывания свободного белка-репрессора с оператором, и транскрипция оперона не нарушается. В данном случае происходит интенсивный синтез пяти ферментов, превращающих хоризмат в триптофан. Благодаря процессам регуляции содержание этих ферментов в клетке *E. coli* может различаться до 700 раз в зависимости от внутриклеточного уровня триптофана.

С помощью репрессии регулируется работа и других оперонов, в частности тех, которые участвуют в биосинтезе других аминокислот. Для некоторых из этих оперонов характерен еще один способ регуляции – **аттенуация**.

Аттенуация экспрессии триптофанового оперона. Этот способ регуляции экспрессии *trp*-оперона связывает между собой два процесса – транскрипцию и трансляцию. В нем задействован регуляторный сегмент ДНК, расположенный перед структурным геном *trpE*. Этот так называемый лидерный сегмент *trpL* содержит аттенуаторную последовательность длиной около 145 п. н. При наличии свободного триптофана в клетке осуществляется транскрипция аттенуаторной последовательности, после чего происходит ее преждевременная терминация и отделение *trp*-лидерной мРНК (145 нуклеотидов). При отсутствии триптофана преждевременной терминации не происходит, и транскрибируется полноразмерная триптофановая мРНК. Таким образом, в составе аттенуаторной последовательности содержится сигнал, регулирующий транскрипцию структурных генов.

Секвенс-анализ аттенуаторной последовательности позволил обнаружить в ее составе три необычных сегмента. Один из них кодирует структуру короткого полипептида, в состав которого входит 14 аминокислот, в том числе два расположенных рядом остатка триптофана;

два других сегмента содержат инвертированные повторы, способные образовывать шпильки разной структуры при спаривании комплементарных нуклеотидов. Одна из двух шпилечных структур не препятствует процессу транскрипции, а вторая опосредует р-независимую преждевременную терминацию транскрипции. Какая именно из двух шпилечных структур будет реализована, зависит от концентрации триптофана в клетке: при его отсутствии (или невысоком содержании) не может полностью синтезироваться короткий пептид, содержащий два **тандемных** повтора данной аминокислоты, и это служит сигналом для формирования шпильки, не препятствующей транскрипции. При содержании триптофана в клетке на уровне от среднего до высокого происходит синтез короткого пептида, кодируемого аттенуаторной последовательностью, и в этом случае рибосомы доходят до терминирующего кодона в лидерной мРНК, что обуславливает формирование шпилечной структуры, прерывающей дальнейший процесс транскрипции. Таким образом, аттенуация преждевременной терминации транскрипции происходит при низком содержании или почти полном отсутствии триптофана в клетке, и сигналом для этого служит особое положение рибосомы на лидерной мРНК.

Экспрессия триптофанового, а также некоторых других **анаболических** оперонов (гистидинового, треонинового, изолейциновинового) достигает максимума в отсутствие репрессии и при максимальной аттенуации терминации транскрипции.

Трансляция генетического кода. Трансляция – это процесс декодирования мРНК, в результате которого информация с языка последовательности нуклеотидов в мРНК переводится (транслируется) на язык последовательности аминокислот в полипептидной молекуле. Декодирование мРНК осуществляется в направлении $5' \rightarrow 3'$. В процессе трансляции различают следующие стадии:

- 1) активация аминокислот;
- 2) аминоацилирование тРНК;
- 3) собственно трансляция.

Активация аминокислот. Это процесс присоединения аминокислоты посредством ее карбоксильной группы к α -фосфату АТФ с помощью специфической аминоацил-тРНК-синтетазы (рис. 1.33). Реакция сопровождается высвобождением неорганического пирофосфата и образованием аминоацил-аденилата (АК-АМР). Аминоацил-аденилат обладает очень высокой реакционной способностью и ста-

билизируется благодаря прочному связыванию с ферментом. Данный процесс характеризуется высокой специфичностью: для каждой аминокислоты существует собственный фермент (ферменты).

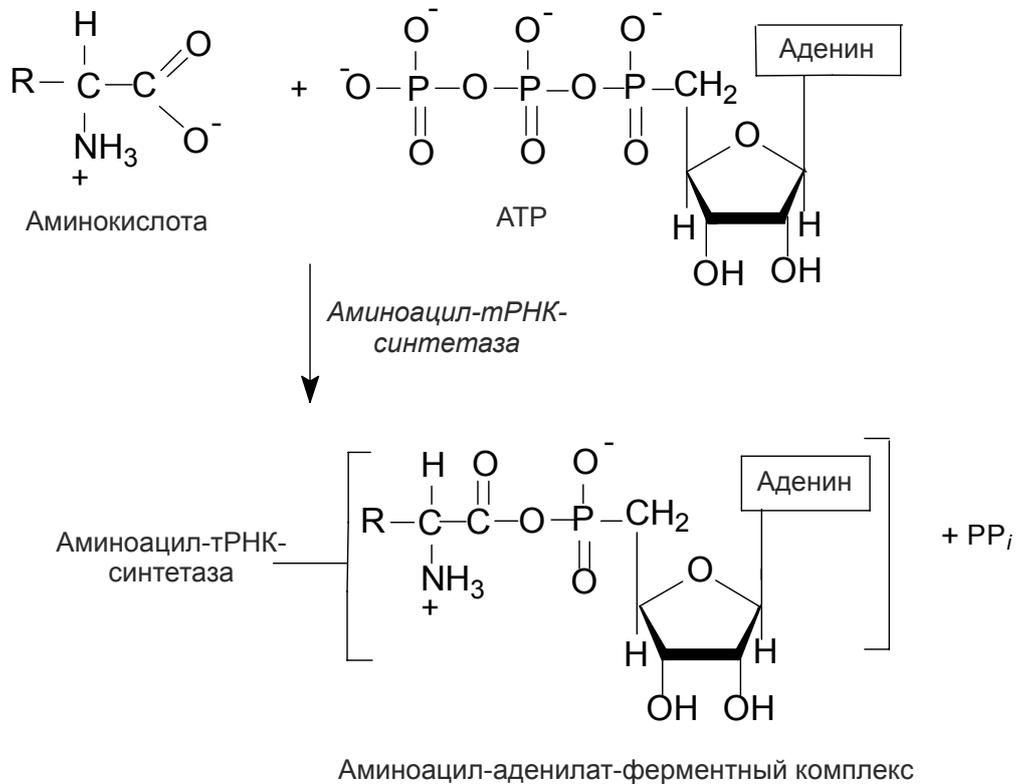


Рис. 1.33. Активация аминокислот в ходе трансляции

Аминоацилирование тРНК. Представляет собой перенос аминоацильной группы от связанного с ферментом аминоацил-аденилата на 2'- или 3'-ОН-группу концевой рибозы тРНК в акцепторной ветви (рис. 1.34).

Ключевой особенностью реакции, приводящей к аминоацилированию тРНК, является специфичность участвующих в ней ферментов. Присоединение к тРНК каждой из 20 аминокислот, встречающихся в белках, катализируется определенной аминоацил-тРНК-синтетазой. Фермент должен отличить одну аминокислоту от 19 других и перенести ее к одной или нескольким изоакцепторным тРНК из имеющихся примерно 75 других тРНК.

При этом следует подчеркнуть высокое сходство в структуре многих аминокислот (лейцин, валин и изолейцин; валин и треонин; аспарагиновая и глутаминовая кислоты и др.), а также удивительное сходство вторичной и третичной структур тРНК.

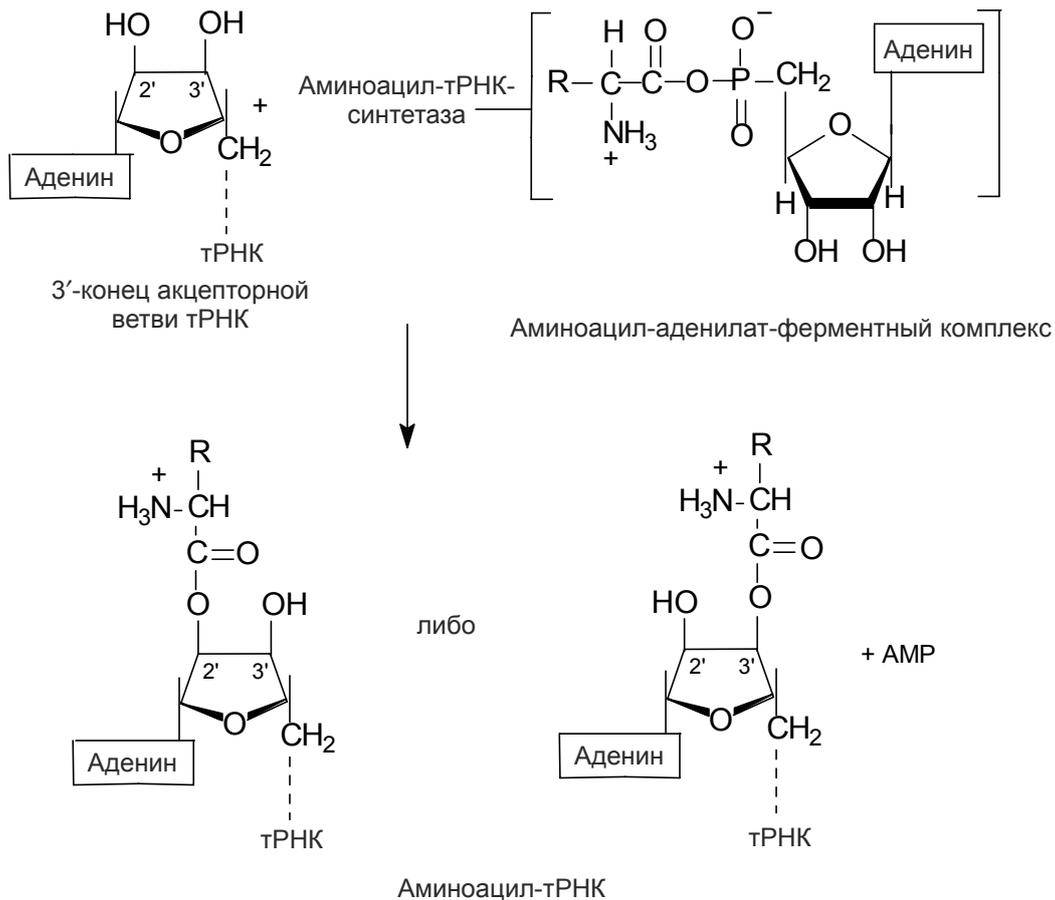


Рис. 1.34. Образование аминоксил-тРНК

Поэтому даже очень высокой специфичности, присущей данным ферментам, оказывается недостаточно, чтобы не допустить ошибок. Синтетазы могут исправлять ошибки, возникающие при присоединении. Это имеет место при гидролизе связи между аминокислотой и АМР в комплексе фермент – аминоксил-аденилат. В таком случае формирование ошибочно аминоксилированной тРНК предотвращается. Напротив, механизм, с помощью которого удалялась бы уже присоединенная к тРНК неправильная аминокислота, отсутствует. В таких случаях аминокислота занимает неправильную позицию в белке. Частота таких ошибок очень низка (например, в гемоглобине кролика 10^{-5}).

Собственно трансляция. Процесс трансляции осуществляется на рибосомах – клеточных органеллах, представляющих собой сложный комплекс из белков и молекул РНК. В течение всего процесса синтеза белка растущая полипептидная цепь, мРНК и очередная аминоксил-тРНК остаются прикрепленными к рибосоме. У прокариот и эукариот рибосомы различаются по величине и составу (рис. 1.35).

Коэффициент седиментации рибосом прокариот составляет 70 S (S – сведберг, единица измерения скорости, с которой частица оседает при центрифугировании; $1S = 10^{-13} \text{ с}$), а у эукариот для рибосом, обнаруживаемых в цитоплазме, он равен 80 S.

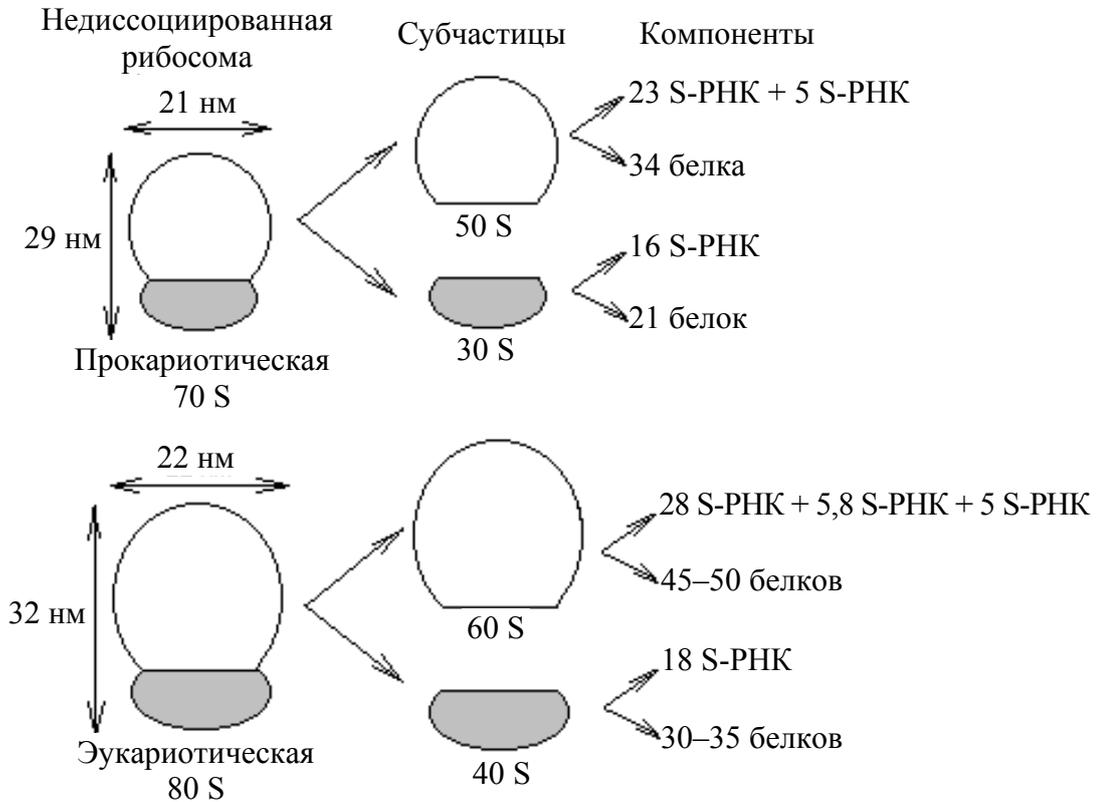


Рис. 1.35. Структура и состав рибосом прокариотических и эукариотических клеток

При определенных условиях рибосомы могут диссоциировать на большую и малую субчастицы, а каждая субчастица, в свою очередь, на составляющие молекулы белка и РНК (рис. 1.35). Все эти компоненты могут снова ассоциировать с образованием функционально активной рибосомы, если созданы соответствующие условия.

Электронно-микроскопические исследования 70 S-рибосом показали, что малая и большая субчастицы соприкасаются в нескольких точках, причем между ними образуется бороздка, необходимая для размещения мРНК во время трансляции. Для понимания процесса трансляции важны два основных в функциональном отношении участка на 70 S-рибосоме. Участок (*сайт*) А служит для присоединения аминоксил-тРНК, а с сайтом Р связывается растущая пептидная цепь.

В процессе трансляции, кроме аминоацил-тРНК и рибосом, принимает участие большое количество вспомогательных белков – факторов инициации, элонгации и терминации транскрипции.

Суть процесса трансляции состоит в последовательном декодировании мРНК в направлении $5' \rightarrow 3'$ с помощью аминоацилированных тРНК, в ходе которого происходит последовательная конденсация аминокислотных остатков, начиная с amino-N-конца полипептидной цепи в направлении к карбоксильному С-концу. Матричный принцип процесса соблюдается при узнавании комплементарных нуклеотидов в составе очередного кодона мРНК и антикодона тРНК. Наиболее полно трансляция изучена у прокариот, и механизм этого процесса будет рассмотрен на примере трансляции у *E. coli*.

Инициация трансляции. Считывание мРНК начинается с кодона AUG, который обозначает 5'-конец кодирующей последовательности и детерминирует N-концевую (первую) аминокислоту синтезируемого полипептида. Для инициации трансляции необходимо наличие 30 S-субчастицы рибосомы, которая связывается в комплекс с белками – факторами инициации (IF1, IF2, IF3), GTP и *Fmet*-тРНК. Такой полный комплекс связывается с 5'-концом кодирующей последовательности мРНК вблизи кодона AUG. Очевидно, IF2 способен отличить *Fmet*-тРНК (формил-метионин-тРНК) от *met*-тРНК, которая связывается с кодонами AUG во внутренней части мРНК, но не может начать трансляцию со стартового кодона AUG. Эта специфичность обеспечивается N-формильной группой, отсутствующей у *met*-тРНК.

Распознавание стартового кодона осуществляется следующим образом. Связывание 30 S-субчастицы с мРНК находится под строгим контролем нуклеотидной последовательности, расположенной примерно за 10 нуклеотидов до 5'-конца стартового кодона. Взаимодействию способствует комплементарное спаривание этой богатой пуринами последовательности с полипиримидиновым участком, находящимся в составе 16 S-рРНК. Процесс инициации зависит от многих условий в структуре взаимодействующих участков, в том числе от вторичной структуры того участка молекулы мРНК, в котором находится стартовый кодон AUG. Это имеет значение для процессов регуляции эффективности синтеза белка.

Итак, при инициации указанный комплекс связывается с Р-сайтом 30 S-субчастицы рибосомы, и первой аминокислотой в составе пептида будет формил-метионин. Далее присоединяется 50 S-субчастица рибосомы и формируется 70 S-иницирующий комплекс (рис. 1.36). Источ-

ником энергии для инициации синтеза белка служит расщепление GTP до GDP и неорганического фосфата.

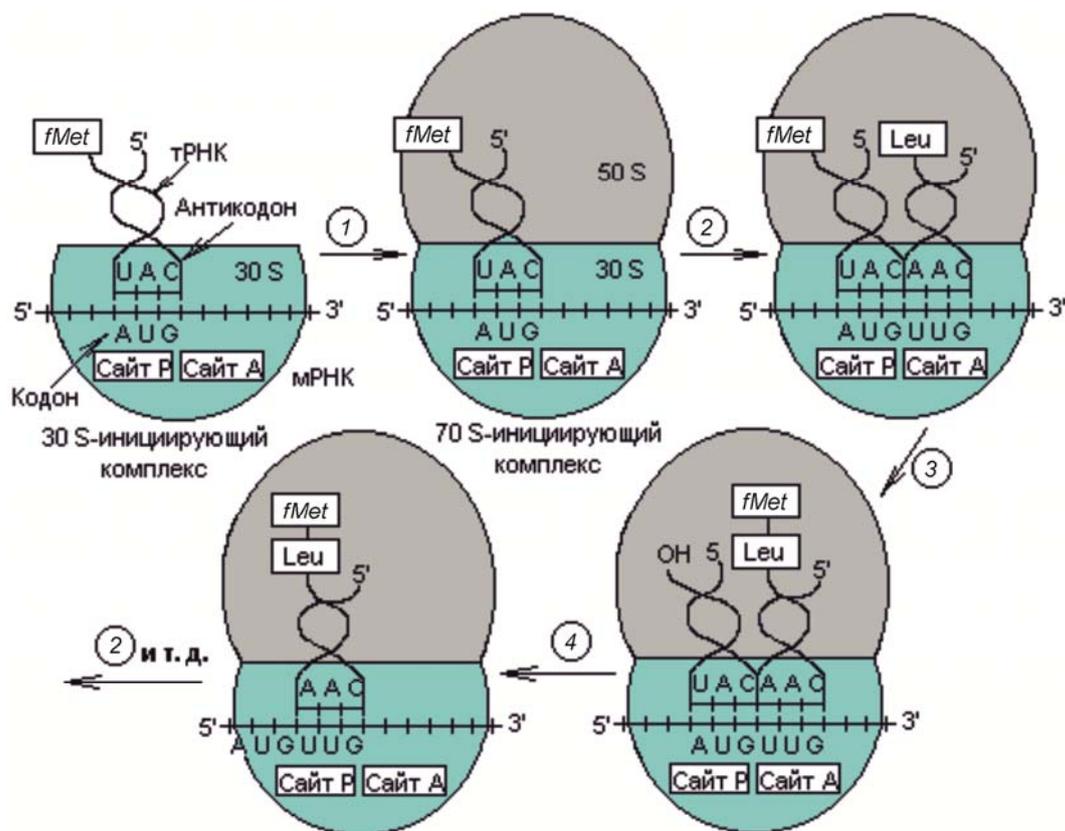


Рис. 1.36. Трансляция генетического кода:

1 – образование 70 S-инициирующего комплекса; 2 – связывание аминоксил-тРНК с участком А рибосомы; 3 – формирование пептидной связи; 4 – транслокация рибосомы (в процессе элонгации повторяются стадии 2–4)

Элонгация трансляции. Для образования первой пептидной связи необходимо, чтобы аминоксил-тРНК, соответствующая следующему кодону, заняла А-участок рибосомы. Для этого аминоксил-тРНК должна сначала связать белок EF-Tu (один из факторов элонгации) и GTP. Образовавшийся тройной комплекс (аминоксил-тРНК – [EF-Tu – GTP]) и доставляет аминоксил-тРНК к А-участку. GTP в это время гидролизуется, и комплекс (EF-Tu – GDP) отделяется от рибосомы. Когда оба участка, А и Р, заняты, пептидилтрансферазная активность 50S-субчастицы катализирует перенос группы *Fmet* с ее тРНК на аминоксил-тРНК, находящуюся в А-участке (рис. 1.37). В результате в А-участке оказывается дипептидил-тРНК, а в участке Р – свободная тРНК (рис. 1.36).

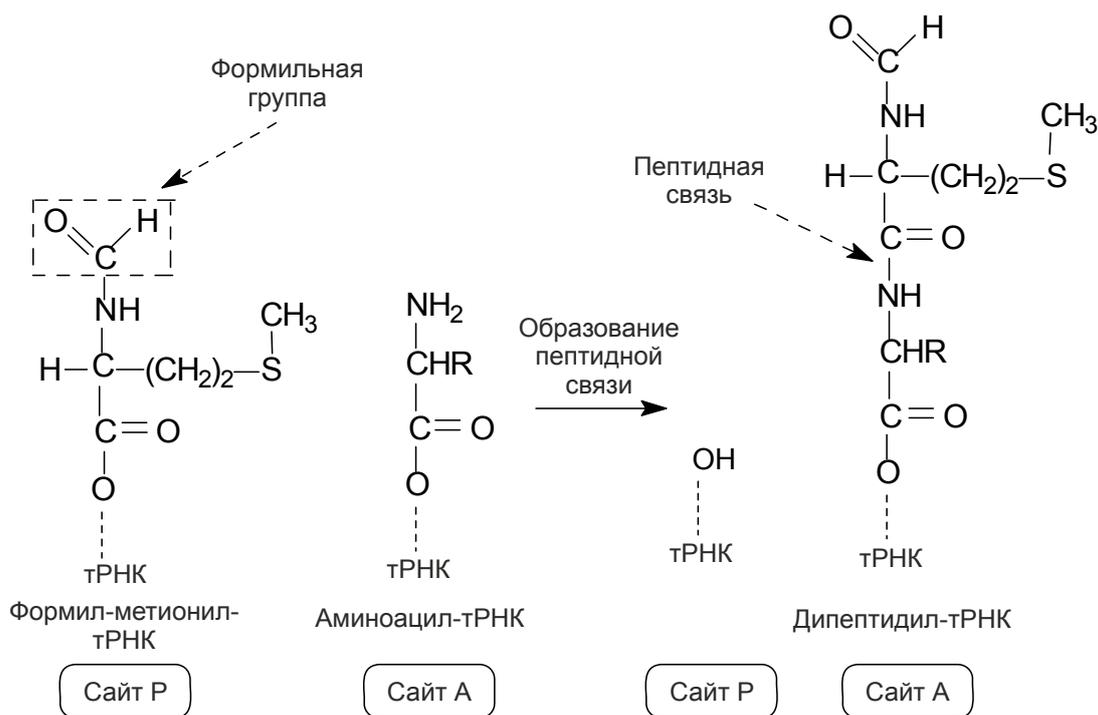


Рис. 1.37. Образование пептидной связи между первыми двумя аминокислотами на рибосомах

Пептидилтрансферазная активность рибосом связана, по-видимому, не с белковой частью 50 S-субъединицы, а с одним из РНК-компонентов – рибозимами.

Для прочтения следующего кодона и удлинения полипептидной цепи еще на одну аминокислоту вся серия реакций должна повториться. Однако прежде чем это произойдет, свободная тРНК освобождает Р-участок, образовавшаяся дипептидил-тРНК перемещается на него с А-участка (при этом не происходит взаимодействия кодона с антикодоном), а рибосома продвигается скачкообразно (на 3 нуклеотида) в сторону 3'-конца мРНК. Все эти процессы осуществляются с помощью фактора элонгации EF-G при GTP-зависимой **транслокации** рибосомы.

В результате этих трех актов освобождается участок А и экспонируется следующий кодон, что позволяет начаться следующему циклу элонгации (рис. 1.36). Следует отметить, что при образовании каждой пептидной связи расходуется энергия, равная четырем энергетическим эквивалентам (если за один эквивалент принять энергию образования фосфатной связи): два эквивалента АТФ потребляются при аминоацилировании тРНК и два эквивалента GTP – в каждом цикле элонгации.

Терминация трансляции. Процесс последовательной трансляции кодонов, в конце концов, доходит до того момента, когда в А-участке

оказывается один из трех терминирующих кодонов – UAG, UAA или UGA. В природе не существует таких тРНК, антикодоны которых соответствовали бы этим кодонам. Здесь вступают в действие факторы терминации – RF-1 и RF-2, которые катализируют отсоединение полипептидной цепи от тРНК, тРНК – от рибосомы, а 70 S-рибосомы – от мРНК.

После инициации трансляции 70 S-рибосома удаляется от сайта инициации по мере считывания каждого последующего кодона. Когда расстояние от рибосомы до сайта инициации достигнет величины 100–200 нуклеотидов, в этом сайте может произойти новая инициация. Более того, как только вторая рибосома пройдет такое же расстояние, может произойти третья инициация и т. д. Итак, одну и ту же белок-кодирующую последовательность мРНК могут одновременно транслировать несколько рибосом. Подобные мультирибосомные трансляционные комплексы называются полирибосомами, или *полисомами*.

Матричные РНК, состоящие из нескольких белок-кодирующих участков, часто транслируются последовательно: когда рибосома доходит до терминирующего кодона в первой последовательности, она отделяется от мРНК, и со следующим иницирующим участком связывается новый комплекс. Иногда этого не происходит, и транслирующая первую кодирующую последовательность рибосома, не отделяясь, перемещается вдоль мРНК, иницируя трансляцию в других сайтах.

В некоторых случаях трансляция первой кодирующей последовательности может начаться и даже завершиться еще до окончания транскрипции остальных последовательностей, как, например, в случае *lac*- или *trp*-оперонов *E. coli*.

Особенности трансляции у эукариот. Процесс трансляции эукариотической мРНК в основном аналогичен таковому для прокариот. Однако имеется ряд отличий. Во-первых, аппараты транскрипции и трансляции у эукариот разобщены во времени и в пространстве, поскольку транскрипция осуществляется в ядре, а трансляция – в цитоплазме. Во-вторых, иницирующей аминоксил-тРНК у эукариот служит не *fmet*-тРНК, а специальная иницирующая *met*-тРНК. В-третьих, на 5'- и 3'-концах эукариотических мРНК имеются особые структуры – «кэпы» и «шлейфы», принимающие участие в трансляции. Известно, что отдельные факторы инициации трансляции узнают экпированные области для связывания с мРНК и начала процесса трансляции.

Посттрансляционная модификация белков. Образующиеся в процессе трансляции полипептидные молекулы часто не являются зрелыми, биологически активными формами белка. Для того чтобы они приобрели функциональную активность, требуются различные изменения в их составе и структуре, которые принято называть посттрансляционной модификацией. К наиболее распространенным событиям такого рода относятся: расщепление и укорочение цепей; фосфорилирование, ацетилирование, гидроксилирование, карбоксилирование определенных аминокислотных остатков; соединение пептидов с полисахаридами или липидами; связывание с простетическими группами и др.

Примером укорочения пептидных цепей служит отщепление N-концевого формилметионина (или метионина), который включается во все полипептидные молекулы в процессе инициации трансляции. Это событие часто осуществляется еще на рибосомах, в начале трансляции.

Расщепление белков-предшественников часто происходит при сборке капсидов сложных бактериофагов (T4, P2, λ , T5), а также многих протеолитических белков, гормонов, нейропептидов млекопитающих. Например, инсулин синтезируется при трансляции в виде препроинсулинового полипептида и превращается в зрелый инсулин после расщепления цепи и удаления N-концевого, а также внутреннего сегмента.

Связывание пептидов с простетическими группами можно рассмотреть на примере формирования функционально активного гемоглобина. Образованные в ходе трансляции α - и β -цепи гемоглобина объединяются вначале в $\alpha_2\beta_2$ -структуру, а затем с боковыми группами аминокислот обеих субъединиц связывается гем. Похожим образом происходит модификация пируваткарбоксилазы: для приобретения этим ферментом активности с определенными боковыми цепями его аминокислот должен ковалентно связаться биотин.

Модификация аминокислотных остатков – широко распространенное явление. Карбоксилирование специфических остатков глутаминовой кислоты в белках, принимающих участие в свертываемости крови, обуславливает возможность связывания Ca^{2+} . Для образования коллагена должно произойти гидроксилирование специфических пролиновых и лизиновых остатков. Фосфорилирование и дефосфорилирование определенных остатков серина, треонина и тирозина принимают участие в регуляции метаболизма.

У некоторых белков на N-конце имеется короткая (15–35 остатков) последовательность гидрофобных аминокислотных остатков, которые называют *сигнальными последовательностями*. Эти последо-

вательности играют важную роль в транспорте белков через мембраны: они узнаются сигнал-распознающими частицами в составе мембран, которые опосредуют направленную транспортировку белков. В процессе переноса через мембрану сигнальная последовательность отщепляется сигнальной пептидазой. В результате белок приобретает функциональную активность, оказавшись в соответствующей органелле (например, лизосоме) или вне клетки. Часто процесс транспорта белков через мембраны происходит уже в ходе трансляции с участием связанных с мембранами рибосом (у эукариот это чаще всего мембраны шероховатого эндоплазматического ретикулума). Такой процесс называют *котрансляционным транспортом*.

Существование событий посттрансляционной модификации расширяет возможности клеток в регуляции метаболизма. Изменения концентрации или активности ферментов, участвующих в модификации белков, приводят к снижению или увеличению концентрации последних, а следовательно, и к изменению скорости соответствующих процессов.

2. ОСНОВЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

2.1. Принципы и инструменты генетической инженерии

Генетическая инженерия (ГИ) представляет собой комплекс молекулярно-генетических методов, позволяющих осуществлять целенаправленное конструирование организмов путем манипуляций *in vitro* с их наследственным аппаратом.

Стратегия ГИ (молекулярное клонирование) заключается в следующем:

1) из клеток или вирусов выделяют фрагменты ДНК, содержащие интересующие экспериментатора гены; можно искусственно синтезировать сегменты ДНК с определенной последовательностью нуклеотидов, в том числе гены;

2) в небольшую молекулу ДНК, способную реплицироваться в клетке хозяина (бактерии, дрожжи, растения, животные), ферментативно встраивают полученные фрагменты ДНК;

3) образующиеся при этом молекулы (гибридные ДНК) вводят одним из способов в прокариотические или эукариотические клетки, где они реплицируются, обеспечивая тиражирование в своем составе встроенных фрагментов ДНК;

4) определенными методами отбирают клоны клеток, содержащих индивидуальные типы молекул гибридных ДНК;

5) полученные клетки, продуцирующие чужеродные белки, можно использовать для производства целевых продуктов, а кроме того, можно всесторонне изучать выявленные гибридные ДНК, в частности исследовать функционирование чужеродной ДНК в гетерологичном окружении.

В основе методологии ГИ лежат основные принципы молекулярной биологии, а именно:

– во всех клетках носителем генетической информации является ДНК, которая определяет структуру белков;

– для хромосомальной ДНК любых организмов характерен единый генетический код – он универсален;

– процессы репликации ДНК, транскрипции и трансляции осуществляются в клетках всех типов с соблюдением единых закономерностей.

Созданные методами ГИ молекулы ДНК называют **рекомбинантными**, или **гибридными**. Правильнее называть их гибридными,

поскольку рекомбинантные ДНК могут возникать и при генетическом обмене *in vivo* в результате естественной гомологичной или сайт-специфической рекомбинации, но эти события не принято относить к категории ГИ. Белки, структура которых кодируется гибридными ДНК, принято называть **химерными**. Чужеродные гены, вводимые в клетки методами ГИ, часто называют **трансгенами**, а организмы, геном которых содержит чужеродный генетический материал, включенный методами ГИ, – **трансгенными организмами**.

Методы ГИ обеспечивают возможность создания принципиально новых микробных продуцентов биологически активных веществ, а также животных и растений, несущих функционально активные трансгены. Более того, появилась возможность искусственно создавать гены, кодирующие химерные полипептиды, обладающие свойствами двух или более природных белков.

Ферменты генетической инженерии. Возможность проведения различных манипуляций с ДНК *in vitro* зависит от наличия препаратов ферментов, которые обеспечивают разрезание, модификацию и лигирование (воссоединение) ДНК. В ГИ используют следующие классы ферментов: нуклеазы, фосфомоноэстеразы, полинуклеотидкиназы, лигазы, ДНК- и РНК-зависимые ДНК-полимераза и некоторые другие.

Нуклеазы. Эти ферменты расщепляют молекулы нуклеиновых кислот: одни из них действуют на ДНК, другие – на РНК, есть ферменты, способные в качестве субстратов расщеплять как ДНК, так и РНК. Среди нуклеаз различают экзонуклеазы (расщепляют полинуклеотидные субстраты, имеющие свободные концы, при этом расщепление идет либо непосредственно с концов цепей, либо вблизи от них). Эндонуклеазам свободные концы не требуются, поэтому они могут гидролизовать кольцевые молекулы ДНК. Разрезание осуществляется по внутренним фосфодиэфирным связям с образованием фрагментов разной длины. Особое значение для ГИ имеют эндонуклеазы рестрикции, которые обладают двумя важными особенностями – способностью узнавать специфические короткие нуклеотидные последовательности в ДНК и широким разнообразием этих ферментов, каждый из которых уникален в структуре узнаваемых сайтов. Большинство рестриктаз разрезает ДНК с обнажением «липких» концов (*Eco RI*), но есть также ферменты, разрезающие палиндромные последовательности с образованием «тупых» концов.

Фосфомоноэстеразы (фосфатазы). Эти ферменты способны отщеплять концевые фосфомоноэфирные группы от ДНК.

Полинуклеотидкиназа. Данный фермент кодируется геномом фага T4 *E. coli*. В ходе реакции фермент специфически фосфорилиру-

ет 5'-концевые гидроксильные группы ДНК и РНК (3'-группы не фосфорилируются). Этот фермент часто используется в ГИ для мечения 5'-конца нуклеотидной цепи с помощью радиоактивного ^{32}P . Последовательное действие фосфатазы и полинуклеотидкиназы приводит к замещению немеченого 5'-концевого фосфомоноэфира на радиоактивный без других изменений в цепи.

Лигазы. При получении гибридных молекул ДНК требуется объединение *in vitro* сегментов ДНК из различных источников. Лигазы как раз и осуществляют ковалентное сшивание фрагментов ДНК путем образования фосфодиэфирных связей между соседними нуклеотидами. Для этого в большинстве случаев требуется отжиг цепей с комплементарными «липкими» концами. Однако лигаза, кодируемая фагом Т4, способна с невысокой эффективностью лигировать «тупые» концы ДНК.

ДНК-полимеразы. Они описаны в подразд. 1.1. Из них в ГИ чаще всего используют Pol-I. С ее помощью, например, фрагменты с «липкими» концами превращают во фрагменты с «тупыми» концами.

Терминальная дезоксинуклеотидилтрансфераза. Этот фермент полимеризует нуклеотиды, не используя никаких матриц, а в остальном он похож на ДНК-полимеразы. С его помощью можно, например, к молекулам ДНК, не имеющим «липких» концов, присоединить такие концы. В частности, если большие молекулы ДНК продавливать через сито или энергично перемешивать раствор, происходят многочисленные ее разрывы с образованием «тупых» концов. Если к одному набору фрагментов присоединить poly(dT), а к другому – poly(dA) и смешать эти фрагменты, то произойдет их соединение друг с другом. Пробелы, образующиеся из-за неравной длины хвостов, могут быть заполнены Pol-I, а концы сшиты лигазой. Такой подход использовался при конструировании первой гибридной молекулы ДНК.

Кроме этого, инструментами ГИ являются векторные ДНК, которые будут рассмотрены позже совместно с технологией создания гибридных ДНК.

Получение генов. Итак, первой задачей ГИ является получение генов, которые в дальнейшем будут использоваться для создания гибридных ДНК. Эту задачу можно решать двумя принципиально различными способами – искать в составе какой-либо ДНК или синтезировать искусственно необходимый ген (например, структура продукта которого известна) либо получить весь (или почти весь) набор генов какого-нибудь организма, проанализировать его и выявить искомый ген.

В настоящее время используется три основных способа получения нужных генов:

- выделение из состава ДНК;
- химико-ферментативный синтез (*in vitro*);
- транскрипция изолированной из клетки матричной РНК с помощью обратной транскриптазы (РНК-зависимой ДНК-полимеразы, ревертазы).

Выделение генов из ДНК. Большинство методик в генетической инженерии основано на вырезании из молекул ДНК определенных фрагментов и соединении их с другими фрагментами для получения рекомбинантных (химерных) ДНК. При этом фрагментация выделенной из клеток ДНК осуществляется с помощью ферментов, которые способны расщеплять ДНК в строго определенных сайтах. В качестве таких ферментов используются эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы), общая характеристика которых дана в подразд. 1.1. В генетической инженерии используются рестриктазы, образующие в ДНК односторонние («липкие») концы (при разрезе уступом), а также те, что формируют в ДНК двухсторонние («тупые») концы (при расщеплении посередине узнаваемого участка). Примером рестриктазы первого типа (образующей «липкие» концы) является *Eco* RI, а рестриктазой второго типа является, например, *Hind* II.

Образование «липких» концов при расщеплении ДНК имеет преимущество, которое состоит в возможности реассоциации образованных фрагментов по гомополимерным «липким» концам (содержат комплементарные нуклеотиды). В таком случае появляется возможность формирования ассоциатов из фрагментов, принадлежащих разным молекулам ДНК, что и лежит в основе большинства генноинженерных манипуляций по получению рекомбинантных ДНК (рис. 2.1). Образующиеся спонтанно ассоциаты могут быть превращены в целые молекулы путем сшивания с помощью ДНК-лигаз.

Следует отметить, что в обычных условиях «липкие» концы в составе одной молекулы могут удерживаться друг относительно друга с помощью водородных связей между комплементарными основаниями. Однако комплементарные цепочки легко разделить при небольшом нагревании растворов ДНК (денатурация ДНК). При охлаждении «липкие» концы гибридизуются вновь за счет восстановления водородных связей при соблюдении принципа комплементарности (отжиг). В результате отжига набора фрагментов, полученных при воздействии на разные молекулы ДНК одной и той же рестриктазой, могут образоваться как исходные молекулы ДНК, так и их гибриды – рекомбинантные ДНК.

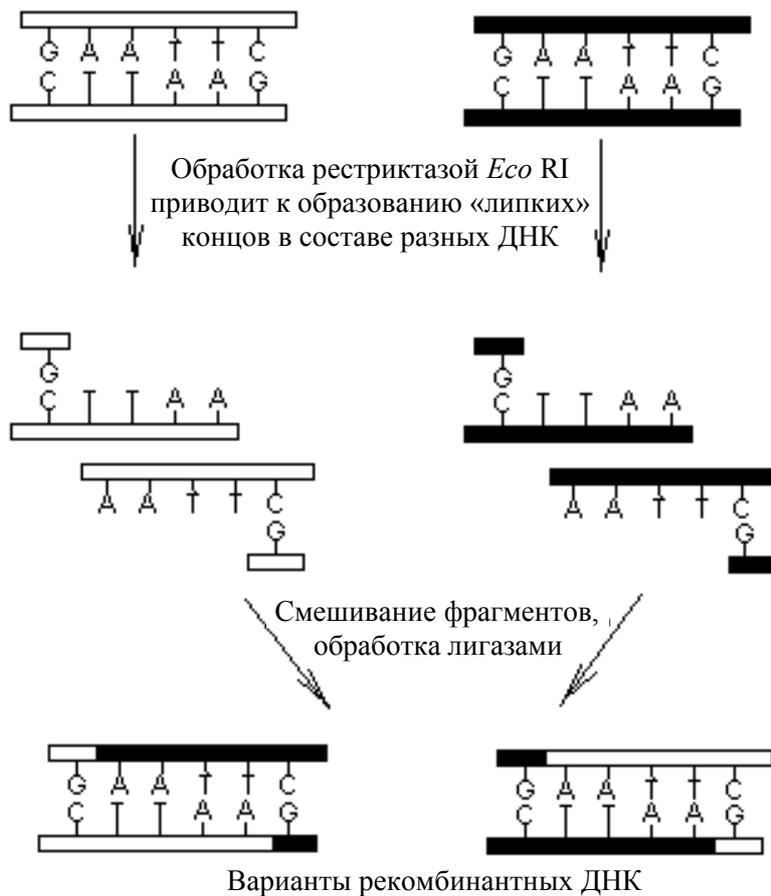


Рис. 2.1. Схема образования рекомбинантных ДНК при расщеплении разных молекул ДНК рестриктазами, обнажающими во фрагментах «липкие» концы

В 1972 г. в Стэнфорде Дж. Мерц и Р. Дэвис осуществили первый подобный эксперимент. Позднее оказалось, что не все геномы могут содержать сайты рестрикции для используемых рестриктаз. Особенно это касается небольших молекул – плазмид и профагов, которые настолько малы, что содержат лишь по несколько сайтов рестрикции для небольшого числа рестриктаз. Данное обстоятельство существенно ограничивает возможности метода, поэтому была разработана методология введения в геном фрагментов ДНК, содержащих необходимые сайты рестрикции.

Для этого используют искусственно синтезированные олигонуклеотидные ДНК с «тупыми» концами (линкеры). Линкеры синтезируют таким образом, чтобы в их составе содержались известные сайты рестрикции (предварительно требуется установить последовательность нуклеотидов в этих сайтах). ДНК для введения линкеров в ее состав расщепляют одной из рестриктаз, образующих «тупые» концы, а затем

сшивают полученные фрагменты с линкерами с помощью лигаз (рис. 2.2). Альтернативным методом получения «тупых» концов является механический разрыв крупных молекул ДНК при быстром перемешивании раствора или продавливании его через узкое отверстие. В результате этих манипуляций фрагменты ДНК приобретают сайты рестрикции внутри добавочных последовательностей (линкеров).

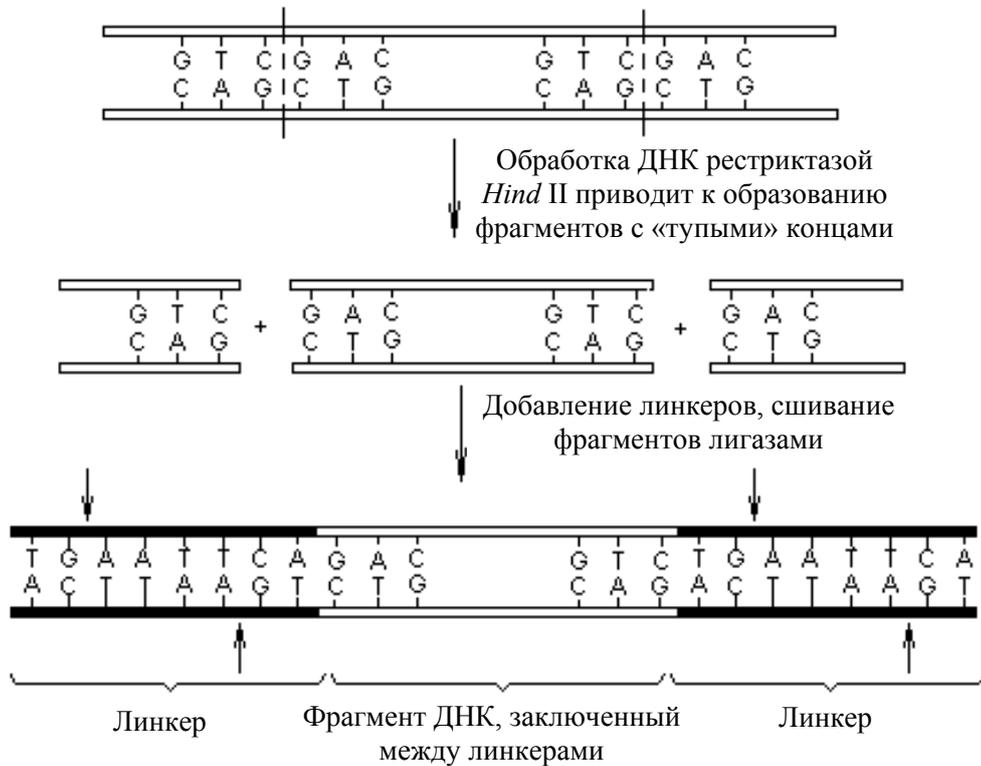


Рис. 2.2. Присоединение линкеров, содержащих сайты рестрикции (в данном случае для рестриктазы *Eco* RI обозначены стрелками), к фрагментам ДНК с «тупыми» концами

Теперь полученный фрагмент ДНК, содержащий требуемые сайты рестрикции, можно присоединить к другой молекуле ДНК (например, к вектору), обработанной такой же рестриктазой, либо превратить в кольцевую форму путем сшивания взаимно комплементарных концов.

Описанные методы выделения генов в составе фрагментов ДНК с помощью рестрикционных ферментов широко распространены, но имеют ряд недостатков. Во-первых, не всегда удается подобрать рестриктазы, позволяющие вырезать из ДНК именно тот участок, в котором содержится интересующий экспериментатора ген. Во-вторых, в составе вырезанного фрагмента ДНК могут оказаться затрудняющие дальнейшее использование гена последовательности, на-

пример интроны в эукариотических генах. В данном случае рекомбинантные ДНК не смогут экспрессироваться в прокариотических клетках, поскольку последние не обладают способностью к сплайсингу (подразд. 1.3).

Химико-ферментативный синтез генов. С помощью этого метода синтезированы, а впоследствии клонированы гены, определяющие структуру таких гормонов, как инсулин и соматостатин, а также лейкоцитарный интерферон человека. Синтез гена интерферона осуществлен в СССР в 1984 г. под руководством академика М. Н. Колосова.

Суть метода сводится к следующему: *in vitro* осуществляют химический синтез коротких (8–16 нуклеотидов) одноцепочечных фрагментов ДНК, которые затем соединяют с помощью лигаз и отжигают (дают возможность образоваться двухнитевым молекулам ДНК). Для этого метода необходимо знать последовательность нуклеотидов в гене, поскольку синтез осуществляется без матрицы. Обычно ее устанавливают исходя из аминокислотной последовательности соответствующего полипептида, однако из-за вырожденности генетического кода определить истинную нуклеотидную последовательность гена оказывается невозможным. Установить истинную структуру гена можно методом секвенирования ДНК, но для этого требуется выделить и клонировать соответствующий ген.

Этап химического синтеза олигонуклеотидов в настоящее время полностью автоматизирован. Метод основан на специфической защите 5'- или 3'-конца моно- или олигонуклеотида, предотвращающей его вступление в химические реакции. При необходимости блокирующие группы, с помощью которых осуществляют модификацию, можно удалить обработкой кислотой либо щелочью. Цикл химического синтеза ДНК включает конденсацию нуклеотидов, удаление той или иной блокирующей группы и дальнейшую конденсацию. Модификацией метода является прикрепление первого нуклеотида к твердому носителю и добавление следующих нуклеотидов по одному после промывки носителя на каждом таком этапе.

Воссоединение одноцепочечных фрагментов с помощью лигаз требует фосфорилирования 5'-концов, что осуществляется с использованием фермента полинуклеотидкиназы и АТФ. Одноцепочечные ДНК можно превратить в двухцепочечные либо в процессе отжига с комплементарной антипараллельной цепью, также синтезированной химическим путем, либо при достройке комплементарной цепи ферментом (обычно используют ДНК-полимеразу I). При сочетании химического синтеза и ферментативных этапов, на-

пример, из 66 коротких синтетических фрагментов был воссоздан ген инсулина длиной 514 п. н.

Ферментативный синтез генов. Возможны два принципиально различающихся способа ферментативного синтеза ДНК. Один из них не требует присутствия матрицы и осуществляется по программе, задаваемой экспериментатором. Такой синтез катализирует бактериальный фермент полинуклеотидилфосфорилаза, специфичный в отношении рибонуклеотидов, но способный и к полимеризации цепей ДНК с меньшей скоростью. Для такого синтеза необходим праймер, включающий не менее 3 нуклеотидов. Реакции полимеризации имеют некоторые ограничения и с трудом поддаются контролю.

Другой способ ферментативного синтеза ДНК предполагает участие матрицы, которой на первом этапе служит мРНК, выделенная из клетки. Практически все мРНК эукариот имеют на 3'-конце «шлейф» (полиаденилатную последовательность). Этот участок используют для образования затравки для комплементарной цепи ДНК: к мРНК добавляют короткие последовательности, состоящие из тимидилатов, которые в результате отжига гибридизуются с полиаденилатами (рис. 2.3). Обратная транскриптаза в присутствии набора дезоксирибонуклеотидов катализирует их присоединение к затравке в последовательности, определяемой мРНК, в результате чего образуется двухнитевый гибрид РНК-ДНК. По не выясненным пока причинам (по-видимому, из-за того, что фермент «поворачивает вспять») новосинтезированная цепь ДНК имеет на конце шпильку (рис. 2.3), которая возникает только при реакции *in vitro*. Эту шпильку используют в качестве затравки для синтеза второй цепи ДНК. На следующем этапе осуществляют деградацию РНК с помощью рибонуклеаз либо в ходе щелочного гидролиза, а оставшуюся однонитевую ДНК со шпилькой используют как матрицу для синтеза второй цепи ДНК (ДНК-полимераза I). На заключительном этапе шпильку расщепляют с помощью нуклеазы S1, которая специфически гидролизует одноцепочечные участки нуклеиновых кислот. Так образуется двухцепочечная «комплементарная» ДНК, или кДНК (в названии отражено основное ее отличие – комплементарность мРНК).

Существуют модификации описанного метода, позволяющие избежать многих его недостатков, в частности синтеза неполных копий РНК (особенно в случае длинных мРНК). Одной из таких разновидностей метода является синтез кДНК непосредственно на векторе.

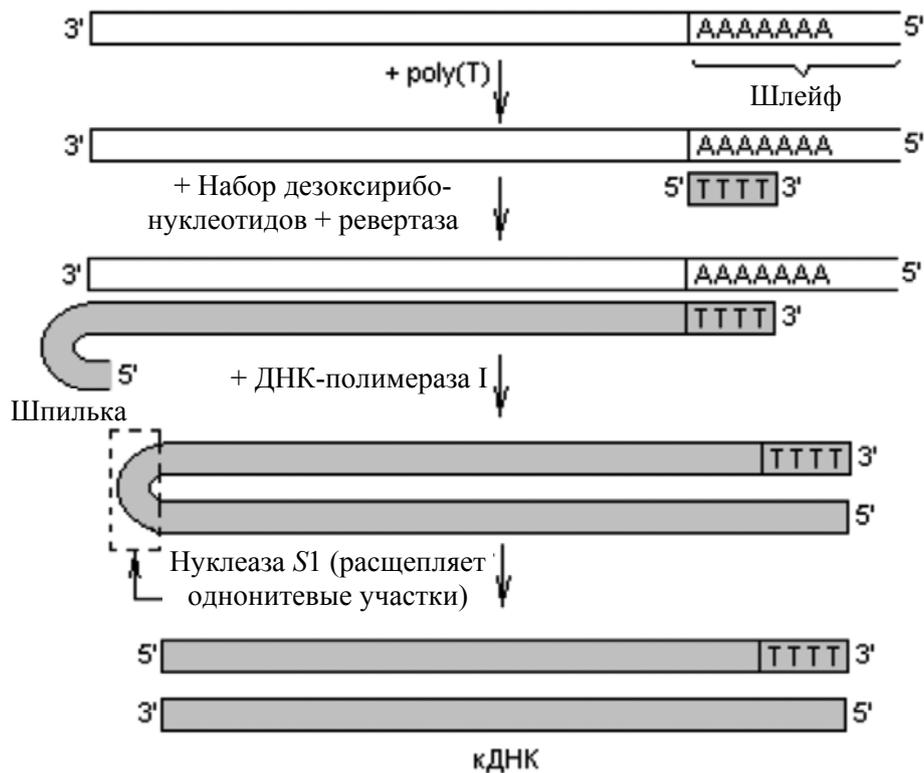


Рис. 2.3. Образование кДНК в ходе ферментативного синтеза на основе мРНК

Характеристика клонирующих векторов. Полученный тем или иным способом ген может обусловить синтез соответствующего продукта только в клетке, при условии, что он будет экспрессироваться. Кроме того, ген должен иметь возможность реплицироваться для того, чтобы все клетки в популяции имели его в своем составе и образовывали необходимое количество продукта. Все эти условия (введение генов в клетки, их репликация, транскрипция и трансляция) обеспечиваются с помощью векторных ДНК (векторов).

Векторами называют небольшие автономно реплицирующиеся молекулы ДНК, в частности плазмиды, ДНК фагов или других вирусов, либо их модификации, обеспечивающие проникновение в клетку и стабильное наследование чужеродной ДНК (генов). Векторные репликоны должны отвечать ряду требований: содержать *ori* репликации и автономно реплицироваться; стабильно наследоваться клеткой хозяина; содержаться в большом числе копий в клетке; обладать достаточной емкостью, позволяющей клонировать в их составе крупные гены; содержать «удобные» сайты рестрикции; содержать маркеры, по которым можно вести прямой отбор клеток, воспринявших клонированный сегмент ДНК и сам вектор; обладать широким кругом хозяев.

Поскольку плазмиды, как и вирусы, на основе которых конструируют векторы для клонирования, неизбежно обладают специфичностью к видам организмов, в которых способны реплицироваться, при создании векторов следует учитывать, в каких клетках хозяина будет осуществляться клонирование. Из большого количества систем «вектор – хозяин», разработанных к настоящему времени, наибольшее распространение имеют те из них, где в роли хозяина выступают бактерии *E. coli*, а в роли вектора – плазмиды или фаги кишечной палочки. Следует отметить, что обеспокоенность ученых в отношении непредсказуемых результатов клонирования эукариотических генов стимулировала поиск и создание ослабленных штаммов бактерий-хозяев. В частности, были получены «безопасные» штаммы *E. coli* К 12, отличающиеся рядом особенностей, исключающих «утечку» из лаборатории: потребность в особых факторах роста, отсутствующих в природных экологических нишах, хрупкая клеточная стенка, чувствительная к слабогипотоническим средам и др.

Плазмидные векторы. Для кишечной палочки создано большое количество векторов на основе плазмидных репликонов, среди которых особое распространение получили производные плазмиды *ColE1*, в частности *pBR322* (рис. 2.4). Этот вектор сконструирован при сочетании генетических методов *in vivo* и методологии рекомбинантной ДНК.

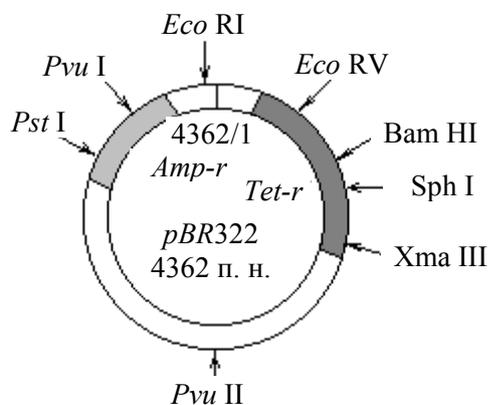


Рис. 2.4. Карта плазмиды *pBR322*.

Показаны: точка начала репликации (4362/1), гены устойчивости к ампициллину (*Amp-r*) и тетрациклину (*Tet-r*), а также сайты рестрикции для некоторых эндонуклеаз

Плазмида *pBR322* имеет длину 4362 п. н., ее нуклеотидная последовательность полностью установлена. Вектор содержит гены устойчивости к двум антибиотикам – ампициллину и тетрациклину, а также

12 единичных сайтов узнавания для рестриктаз (каждая из 12 рестриктаз может расщепить молекулу только в одном сайте).

Преимущества данного вектора состоят в следующем. Во-первых, он может присутствовать в клетках в большом числе копий на хромосому. Во-вторых, вектор содержит два селективных маркера (устойчивость к ампициллину и тетрациклину), причем внутри генов, детерминирующих устойчивость к антибиотикам, присутствуют сайты рестрикции для нескольких ферментов. Данное преимущество выражается в том, что если осуществлять встраивание чужеродного фрагмента ДНК в сайт, расположенный внутри гена устойчивости, то ген инактивируется, и клетки, наследующие плазмиду с клонированным фрагментом ДНК, можно будет обнаружить по утрате устойчивости к тому или иному антибиотику. Например, если для встраивания фрагмента ДНК пользоваться рестриктазой *Pst* I, то нарушится целостность гена, ответственного за устойчивость к ампициллину. Однако при этом сохранится устойчивость к тетрациклину, и клетки, получившие такие векторы, можно будет отобрать на среде с тетрациклином, а затем по чувствительности ко второму антибиотику выявить те из них, которые содержат клонированный фрагмент. Такой прием в генетической инженерии называется инаktivацией маркера в результате вставки.

Существуют и другие приемы отбора клеток, воспринявших векторы со встроенной ДНК. Один из них, например, заключается в способности N-концевой части β -галактозидазы комплементировать определенную мутантную β -галактозидазу бактериальной клетки. Поступают следующим образом. В вектор вводят часть *lac*-оперона *E. coli*, включающую промотор, оператор и 5'-кодирующую область гена *lacZ* (кодирует N-концевую часть β -галактозидазы, рис. 2.5). В эту область встраивают полилинкер, который не нарушает ни кодирующую рамку, ни активность N-концевой части β -галактозидазы. Полилинкер представляет собой искусственно синтезированную последовательность, содержащую несколько сайтов рестрикции для разных нуклеаз. Если в полилинкере отсутствует вставка, такой векторный ген детерминирует синтез N-концевой части β -галактозидазы, которая вместе с C-концевой частью, продуцируемой специальным штаммом *E. coli*, образует активную β -галактозидазу. Этот фермент обеспечивает голубую окраску клеток на среде с хромогенным субстратом *Xgal* и индуктором. Если в состав полилинкера вводится чужеродная ДНК, нарушается комплементация, и клетки, воспринявшие рекомбинантную ДНК, образуют неокрашенные колонии.

У векторов, сконструированных на основе плазмидных репликонов, есть недостатки, основной из которых заключается в снижении числа копий на клетку при увеличении размера гибридной плазмиды. В результате клонирование фрагментов ДНК, превышающих 10 т. п. н., становится малоэффективным. Для клонирования таких крупных фрагментов ДНК используют фаговые векторы, космиды и фазмиды.

Фаговые векторы. При использовании фаговых векторов жизнеспособным продуктом, содержащим рекомбинантную ДНК, является не популяция клеток, как в случае с плазмидными векторами, а популяция фаговых частиц. Фаговые векторы более эффективны, чем плазмидные, при клонировании крупных вставок. Самыми распространенными для кишечной палочки являются векторы, сконструированные на основе фагов λ и M13.

Геном умеренного фага λ представлен двухцепочечной ДНК размером 48,5 т. п. н., которая упакована в головку в виде линейной молекулы с односторонними комплементарными концами («липкие» концы). После проникновения в клетку «липкие» концы взаимно спариваются, молекула замыкается в кольцо и сшивается с помощью ДНК-лигазы. Места спаривания «липких» концов получили название *cos*-сайтов, они принимают участие в образовании фаговых геномов при репликации по типу катящегося кольца (подразд. 1.2, рис. 1.12). Профаг λ в лизогенных клетках находится в интегрированном с нуклеоидом состоянии (механизм и особенности этого явления описаны в подразд. 1.2).

Важными для конструирования векторов являются некоторые особенности генома фага λ . Во-первых, вся центральная часть (более $\frac{1}{3}$ генома) несутривальна для литического цикла, а нужна только для установления лизогенного состояния. Таким образом, ее можно заместить на чужеродную ДНК, и при этом фаг сохранит способность лизировать клетки. Во-вторых, для успешной упаковки ДНК в головки фага требуется, чтобы ее длина была более 38 т. п. н., но менее 52 т. п. н.

В настоящее время сконструировано большое количество разнообразных векторов на основе фага λ . Типичные из них содержат сайты рестрикции для *Eco RI*, ограничивающие участок генома, ненужный для литического цикла (рис. 2.5). При воздействии рестриктазой *Eco RI* на ДНК такого вектора образуется 3 фрагмента, среди которых можно отобрать концевые (содержат гены, необходимые для литического цикла) благодаря их сравнительно большим размерам. Эти фрагменты смешивают с чужеродной ДНК, обработанной *Eco RI*, и получают гибридные молекулы, у которых центральная часть представлена вставочным фрагментом (рис. 2.5). Затем полученные гиб-

ридные молекулы упаковывают в головки фага λ *in vitro*. Для этого используют культуры клеток *E. coli*, инфицированные мутантными штаммами фага λ , один из которых имеет повреждение в гене, ответственном за процесс упаковки ДНК в головку, а второй – в гене, ответственном за синтез отдельных белков головки. Такие фаги не способны обусловить литический цикл, но обеспечивают накопление в клетках большого количества промежуточных продуктов, необходимых для сборки фаговых частиц, – пустых головок, хвостовых отростков, ферментов, необходимых для сборки.

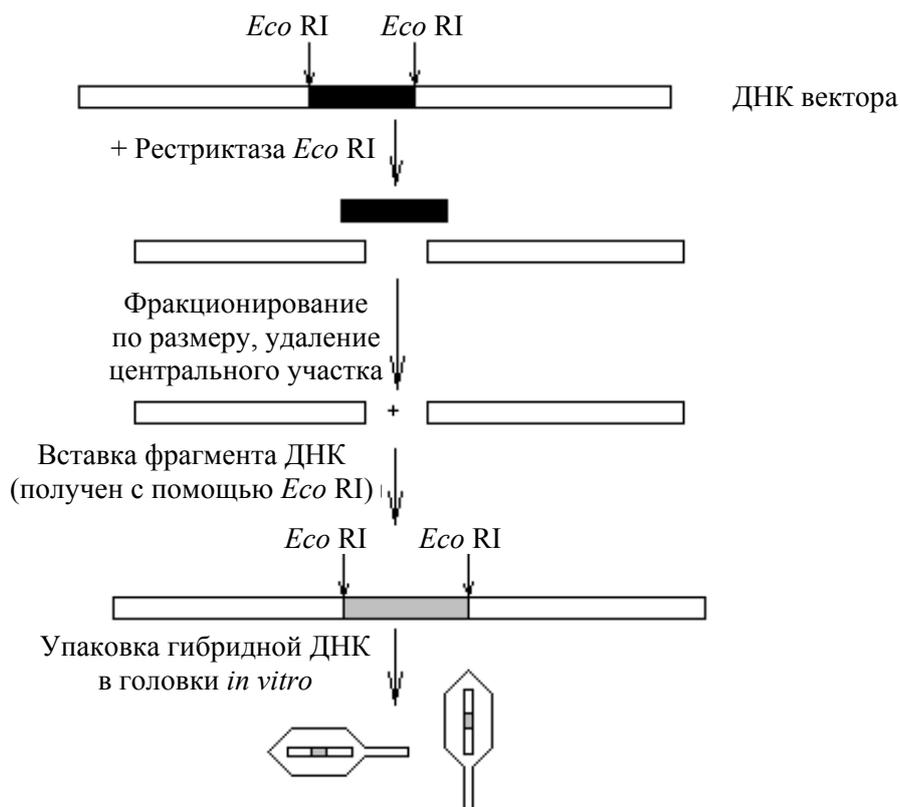


Рис. 2.5. Введение генов в состав векторов на основе фага λ

Если экстракты таких клеток смешать с векторной ДНК, содержащей вставку определенной величины, произойдет их упаковка в головки фага и сформируются зрелые фаговые частицы. На следующем этапе этими частицами инфицируют чувствительные клетки и получают потомство фагов с клонированными ДНК. В составе векторов на основе фага λ можно клонировать фрагменты длиной до 15 т. п. н.

Еще одна категория фаговых векторов для *E. coli* базируется на геноме фага M13. Этот нитчатый «мужской» фаг (адсорбируется на F-пилях) содержит одноцепочечную ДНК. Когда фаговая ДНК прони-

кает в клетки кишечной палочки, она реплицируется с образованием двухцепочечных («+»/«-») промежуточных продуктов, «+»-цепи которых затем вновь упаковываются с образованием множества фаговых частиц. Двухцепочечный промежуточный продукт (репликативная форма, РФ) накапливается в клетках в количестве 100–200 копий. Его выделяют и используют как вектор для клонирования. Особенностью фага М13 является то, что он не убивает клетки, а лишь замедляет их деление. Частицы фага непрерывно выделяются в культуральную жидкость, и их титр может достигать 10^{12} в 1 мл. При этом на газоне чувствительных бактерий фаг выявляется в виде мутных бляшек.

В состав ДНК фага для удобства введения чужеродной ДНК включают полилинкеры. Когда в РФ ДНК М13 встраивается гетерологичная последовательность, в фаговые частицы упаковывается только одна из цепей этой вставки (рис. 2.6). Одноцепочечные молекулы ДНК не применяют для конструирования векторов, поскольку их нельзя разрезать с помощью обычно используемых рестриктаз. Клонировав фрагмент в М13 в обеих ориентациях, можно получить большие количества каждой из цепей.

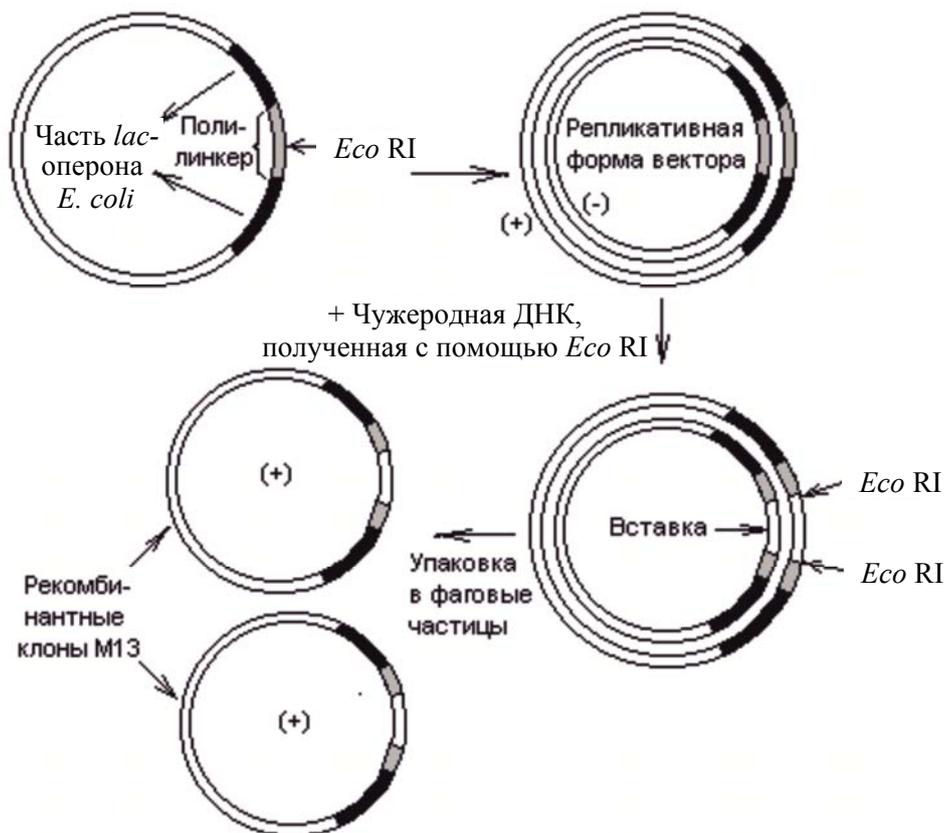


Рис. 2.6. Встраивание фрагментов ДНК в векторы на основе фага М13

Для удобства отбора рекомбинантных форм (фагов, в геном которых произошла вставка чужеродной ДНК) используют вставки в некодирующую область вектора – части *lac*-оперона *E. coli*, которая обуславливает комплементацию мутантной β -галактозидазы, и полилинкер. Когда в полилинкере отсутствует вставка, фаговые частицы на специальном мутантном штамме кишечной палочки в присутствии индуктора и хромогенного субстрата образуют голубые негативные колонии. Встраивание фрагмента ДНК в вектор в области полилинкера нарушает комплементацию, и бляшки остаются неокрашенными.

Преимуществом фаговых векторов на основе M13 является способность включать очень большие вставки, поскольку в данном случае процесс упаковки ДНК не зависит от размера фагового генома. Самое важное применение векторов – производных фага M13 состоит в получении одноцепочечных ДНК-матриц для секвенирования методом Сэнгера. Кроме того, однонитевые ДНК являются идеальной мишенью для сайт-специфического мутагенеза.

Анализ изложенного выше позволяет обнаружить преимущества плазмидных и фаговых векторов, что послужило поводом для конструирования векторов, объединяющих свойства одних и других. Это группа так называемых плазмидно-фаговых векторов, которая включает космиды и фазмиды.

Космиды. Представляют собой один из типов гибридных векторов, которые реплицируются, используя плазмидный тип репликации, но обладают способностью упаковываться *in vitro* в капсиды фага λ . Иными словами, космиды представляют собой плазмиды, содержащие *cos*-участок («липкие» концы) ДНК фага λ . Благодаря *cos*-сайтам эти векторы могут быть введены в клетку не с помощью трансформации, а путем обычной инфекции, в результате чего эффективность получения рекомбинантных клеток возрастает в 100 и более раз. В космидных векторах можно клонировать фрагменты ДНК размером 33–49 т. п. н., таким образом, эти векторы предназначены для встраивания крупных эукариотических генов, что имеет особое значение для создания клонотек эукариотических геномов.

Примером космидного вектора служит плаزمида *pBR322*, у которой в составе гена устойчивости к ампициллину клонированы *cos*-сайты фага λ . Если такой вектор расщепить рестриктазой и смешать с фрагментами чужеродной ДНК, полученными при воздействии на геном тем же рестриктирующим ферментом, может образоваться смесь конкатемеров.

Конкатемеры представляют собой длинные молекулы, в которых геномы фага λ (или замещающая их ДНК) повторяются несколько раз и отделены друг от друга *cos*-сайтами (рис. 2.7). При смешивании с белками, осуществляющими упаковку ДНК фага λ , эти конкатемеры разрезаются по *cos*-сайтам, и ДНК включается в состав капсида. Чтобы это произошло, расстояние между двумя соседними *cos*-сайтами должно составлять 38–52 т. п. н.

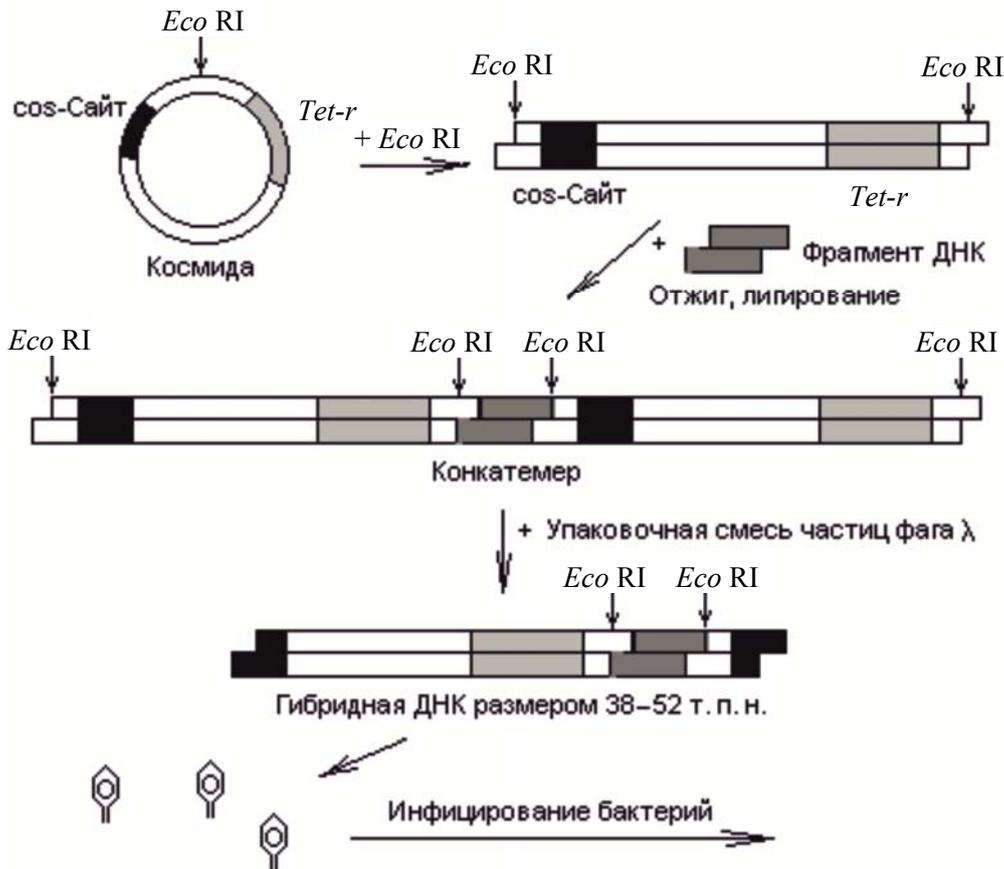


Рис. 2.7. Использование космидных векторов для клонирования

Как и в случае с λ -векторами, смесь конкатемеров может включать векторные молекулы без вставок, а также с множеством повторяющихся вставок. После инфицирования клеток рекомбинантная ДНК поддерживается в них в виде плазмиды, детерминируя в данном случае устойчивость к тетрациклину.

Фазмиды. Это тоже гибридные векторы, способные развиваться и как фаг, и как плазмида, поскольку содержат в составе все гены, необходимые для литического цикла, а также гены, нужные для репликации плазмиды. Емкость фазмид меньше, чем космид, и сопоставима с

таковой для фаговых векторов. Преимуществом фазмид является то, что размер их ДНК слишком мал, чтобы мономер мог упаковаться в капсид фага λ , в то же время слишком велик, чтобы произошла упаковка димера вектора. Поэтому негативные колонии способны формировать только рекомбинантные фазмиды, поскольку их размеры соответствуют емкости головки фага λ .

Вставка в фазмиду чужеродного фрагмента ДНК осуществляется подобно уже описанным примерам для других векторов, чаще – по сайтам рестрикции. После этого гибридные фазмиды упаковывают в капсиды *in vitro*, как описано выше. При инфицировании чувствительных клеток фазмиды обуславливают литический цикл и формируют бляшки на газоне тест-культуры. Однако если вектор содержит ген *cI*, кодирующий структуру белка-репрессора, то фазмида реплицируется как плазмида, а не как фаг. Часто в составе фазмид используют мутантные гены *cI*, определяющие структуру температурочувствительного белка-репрессора, который инактивируется при повышенной температуре. В этом случае фазмида ведет себя как плазмида при низкой температуре, а при повышении температуры на несколько градусов индуцируется к литическому циклу. Такое свойство фазмид во многих случаях оказывается очень полезным.

Свойствами фазмид обладают некоторые бактериофаги, например фаг P1, который в состоянии профага не интегрирует в хромосому, а поддерживается в виде плазмиды. Мутант фага P1*clr*100 способен индуцироваться к литическому циклу при температуре выше 32°C, т. е. ведет себя как типичная фазмида.

Выше охарактеризованы типы векторов, используемых для клонирования генов в клетках *E. coli*. Для других видов прокариот также сконструировано множество различных векторных молекул, среди которых обращают на себя внимание так называемые челночные векторы. Их особенность состоит в способности к репликации в разных клетках хозяина, что обеспечивается введением в вектор дополнительных областей начала репликации (*ori*), а также генов, требуемых для репликации и не поставляемых хозяйскими клетками. Одни из челночных векторов способны поддерживаться в клетках разных прокариот, другие – в клетках некоторых прокариот и эукариот (дрожжей, растений, животных). Использование челночных векторов обеспечивает удобство клонирования генов и анализа их продуктов, поскольку одни и те же гены получают возможность реплицироваться и экспрессироваться в разных организмах.

Одним из примеров конструирования челночных векторов является объединение части 2 мкм (двухмикронной) плазмиды дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с плазмидой *pBR322*, содержащей дрожжевой ген *HIS3* (кодирует один из ферментов биосинтеза гистидина). Оказалось, что ген *HIS3* экспрессируется и в бактериальных клетках благодаря тому, что содержит область, гомологичную соответствующему промотору *E. coli*. Такой вектор реплицируется в клетках дрожжей *S. cerevisiae* и в бактериях *E. coli* и позволяет осуществлять прямой отбор воспринявших его клеток при использовании гистидин-зависимых штаммов на синтетической среде без этой аминокислоты.

Основой векторов для клонирования генов животных чаще всего является геном вируса обезьян SV40. Общие принципы конструирования векторов в этом случае такие же, как для векторов на основе фага λ .

Для растительных клеток, которые не содержат собственных плазмид, основой векторов часто служат геномы вирусов растений, а также бактериальная плазида *pTi*, которая опосредует перенос сегментов плазмидной ДНК в геномы различных двудольных растений и индуцирует образование опухолей (корончатых галлов). Семейство плазмид *pTi* выявлено в грамотрицательных бактериях *Agrobacterium tumefaciens*.

2.2. Клонирование генов

Термин «клонирование» происходит от слова «клон», под которым подразумевается генетически однородное потомство клеток или вирусов, т. е. полученное при неполовом размножении. Простейшим примером клона является изолированная колония бактерий на плотной среде. Когда говорят о клонировании гена, имеют в виду тиражирование копии гена в составе векторной молекулы в клетках клона (или вирусных частицах в составе бляшки). При этом каждая клетка клона (каждая вирусная частица в пределах изолированной негативной колонии) будет содержать одинаковые фрагменты чужеродной ДНК. Это очень важный методологический прием, составляющий основу всей генетической инженерии. Ведь при получении генов в ходе расщепления ДНК какого-то организма и включении полученных фрагментов в состав векторов формируется очень сложная смесь молекул, в которой один ген или его сегмент составляет ничтожную часть, так что невозможно изучить ни его структуру, ни свойства продукта. Однако при введении рекомбинантных ДНК (вектор со вставкой) в клетки или вирусные частицы способность к репродукции в

каждой клетке (вирусной частице) приобретает только один тип гибридной ДНК. Выделив клон или содержимое бляшки, можно их инкубировать и получать неограниченное количество клонированных генов, а также их продуктов.

В предыдущем подразделе уже описано несколько схем клонирования фрагментов ДНК в составе разных векторов (рис. 2.5–2.7). Обобщая этот материал, следует отметить, что для клонирования генов используют самые разнообразные системы «вектор – хозяин». При этом наибольшее распространение получили системы, в которых реципиентными клетками служат бактерии *E. coli*. Рекомбинантные ДНК вводят в клетки хозяина или вирусные частицы различными способами.

Введение молекул ДНК в клетки. Среди различных способов введения гибридных ДНК, сконструированных *in vitro*, в перmissive (способные обеспечить репликацию этих молекул) клетки для получения большого числа клонов гибридов используют несколько методов. Среди них наиболее часто применяют трансформацию и трансфекцию интактных клеток и их протопластов, а также инфекцию и электропорацию, которая в последнее время стала очень популярным и распространенным приемом.

Трансформация и трансфекция клеток уже описаны в подразд. 1.2. Напомним общие закономерности.

Трансформация – это процесс, в ходе которого свободная (экзогенная) ДНК проникает в реципиентную клетку и обуславливает ее наследуемые изменения. Этот метод используют для введения в клетки плазмидных векторов. Суть его состоит в том, что клетки переводят в компетентное состояние (для *E. coli* обрабатывают клетки катионами кальция, что индуцирует фазовый переход липидов наружной мембраны, в результате чего из двухслойной она превращается в гексагональную, в условиях теплового шока это сопровождается поглощением экзогенных двухцепочечных молекул ДНК) и добавляют в суспензию раствор плазмидных ДНК (в нашем случае – векторов со вставками, химер). После этого суспензию высевают на агаризованную среду для отбора клонов, состоящих из трансформированных клеток, которые называют трансформантами. Эффективность трансформации обычно выражают количеством клонов трансформантов, приходящихся на молекулу или единицу массы донорной ДНК. Обычно она невысока и составляет 10^{-5} – 10^{-2} на донорную молекулу (иными словами, только 1 из 500–10 000 молекул ДНК обеспечивает получение клетки-трансформанта).

Трансфекция – это частный случай трансформации, обозначающий проникновение в клетку нуклеиновой кислоты вируса с последующим образованием вирусного потомства.

Из-за низкой частоты событий трансформации (трансфекции) необходим отбор клеток, воспринявших вектор, т. е. распознавание колоний трансформантов среди большинства клонов, которые представлены родительскими клетками. Для этого в составе векторов предусматривают наличие специальных маркеров. В качестве таких маркеров используют, например, гены устойчивости к антибиотикам, позволяющие производить прямую селекцию трансформированных бактерий на среде с соответствующим антибиотиком.

Векторы, сконструированные на основе вирусов, а также космиды и фазмиды имеют преимущества перед плазмидными векторами, которое состоит в том, что их с высокой эффективностью удается упаковывать в вирусные капсиды *in vitro*, а затем инфицировать ими чувствительные клетки. Метод инфекции намного эффективнее трансформации: инфекционной становится каждая десятая молекула ДНК. При этом космиды и фазмиды, попав в клетки, способны поддерживаться в них по типу плазмидной ДНК.

Как известно, первым барьером на пути молекул, стремящихся попасть в клетку, является клеточная стенка, которая имеется у большинства организмов. Клеточная стенка обычно не пропускает крупные молекулы, к числу которых относится и ДНК. Поэтому для облегчения процесса трансформации (трансфекции) и повышения его частоты можно использовать не интактные клетки, а протопласты или сферопласты. Однако и в этом случае процедуры получения протопластов и сферопластов, трансформации их молекулами ДНК, регенерации клеточной стенки и отбора колоний трансформантов многоэтапны, а результат зависит от многих параметров. Все это приводит к тому, что данные методики отличаются низкой воспроизводимостью и достаточно трудоемки.

В 1982 г. Т. Вонг и Е. Нейман разработали метод **электропорации** для введения химерных ДНК в клетки. Суть его состоит в том, что кратковременное воздействие (обычно 5–20 мс) электрического поля высокой напряженности (1–15 кВ/см) на плазматическую мембрану приводит к образованию в ней пор (электропробою). Время существования и размер пор достаточны, чтобы макромолекулы (ДНК) могли войти в клетку в результате действия осмотических сил. В оптимальных условиях электропорации количество трансформантов может достигать 80% выживших клеток.

Электропорация – физический, а не химический метод, находящий широкое применение для введения ДНК в разные типы клеток – культивируемые клетки животных, простейших, дрожжей, бактерий, а также в протопласты растений.

Еще одна задача процедуры клонирования состоит в отборе клонов, воспринявших именно рекомбинантную ДНК, а не просто векторные молекулы, которые обязательно присутствуют в смеси, полученной при включении фрагментов ДНК в состав векторов. Для решения этой проблемы используют уже описанные приемы, например инактивацию маркера в процессе вставки. Более прогрессивным способом отбора клонов бактерий или фагов, содержащих векторы со вставками, служит комплементационный анализ с использованием мутантных генов β -галактозидазы (см. выше). Применение этого метода позволяет отличать клоны бактерий (бляшки фагов), содержащие рекомбинантную ДНК, по цвету при высеве на среду определенного состава. Еще одним подобным примером служит использование гена *mel* для конструирования плазмидных векторов. Этот ген определяет структуру фермента тирозиназы, катализирующей превращение тирозина в меланин (темная окраска колоний). При вставках фрагментов ДНК в кодирующую область гена *mel* происходит его инактивация, и трансформированные колонии утрачивают окраску. Существуют и другие приемы для быстрого поиска среди трансформированных или инфицированных клонов тех из них, которые восприняли рекомбинантную ДНК.

Для трансформации крупных клеток животных и протопластов растений часто используют такой метод, как *микроинъекция* ДНК. Эту процедуру осуществляют под микроскопом с помощью специального устройства – микроманипулятора, обеспечивающего удержание реципиентной клетки и введение в ее ядро капилляра с раствором гибридных ДНК. Кроме этого, недавно разработано пневматическое устройство (*генная пушка*, или генный дробовик – *gene gun*), с помощью которого можно осуществлять бомбардирование клеток или культур тканей микрошариками из золота или вольфрама диаметром 1 мкм, на поверхность которых нанесены гибридные ДНК. Данный метод получил название «метод *биолистики*» (биологической баллистики).

Кроме того, специально для трансформации растительных клеток, имеющих, как известно, мощные ригидные клеточные стенки и не поддающихся обычным методам введения ДНК, разработан метод *агробактериальной трансформации*. Его суть состоит в следующем:

in vitro с использованием всех описанных выше закономерностей конструируют гибридную плазмиду широкого круга хозяев с нужной вставкой. В состав такой векторной плазмиды обязательно включают сайт *ori*, позволяющий ей реплицироваться в клетках *E. coli* и *Agrobacterium* sp., и, кроме того, две области так называемой Т-ДНК, происходящих из *Ti*-плазмиды агробактерий. Между двумя плечами Т-ДНК встраивают гены, которые хотят перенести в клетки растений. Как показано, именно Т-ДНК в ходе сложного механизма в виде односторонней ДНК вырезается из *Ti*-плазмиды агробактерий и переносится в растение. Этот процесс имеет место в природе при индукции опухолей у растений, за образование которых как раз и отвечает *Ti*-плазида агробактерий.

В бактериях *E. coli* осуществляют клонирование необходимых генов и отбор клеток с желаемой конструкцией. Затем отобранные гибридные ДНК переносят в клетки высококовирулентных для растений *Agrobacterium tumefaciens*, в которых уже содержится специально сконструированная *Ti*-плазида, не содержащая Т-ДНК. Когда такими агробактериями инфицируют растения, *vir*-участок *Ti*-плазмиды обуславливает события вырезания Т-нити вместе со вставкой из вектора и перенос ее в клетки растения.

Данная технология введения гибридных ДНК в клетки растений весьма эффективна, но ее ограничением является круг хозяев агробактерий, который, впрочем, можно расширить, используя для трансформации специально отобранные штаммы этих бактерий с широким кругом хозяев.

2.3. Создание и скрининг клонотек

В большинстве случаев для изучения структуры и свойств определенного гена какого-либо организма требуется осуществить предварительный этап – создать банк генов данного организма. Банком генов, или библиотекой генома (клонотекой), называют совокупность клонов бактерий или фаговых частиц, в которой содержится, по меньшей мере, по одному экземпляру каждой последовательности генома исследуемого организма. Необходимое количество клонов в клонотеке определяется отношением размера генома к размерам клонируемых фрагментов ДНК. Например, если гаплоидный геном *Saccharomyces cerevisiae* содержит $1,4 \cdot 10^4$ т. п. н., а емкость используемого для клонирования вектора составляет 15 т. п. н., то весь геном этих дрожжей может быть представлен $1,4 \cdot 10^4 / 15 \approx 1 \cdot 10^3$ рекомби-

нантными клонами. Однако реально для создания клонотеки в данном случае требуется 4000–5000 клонов, среди которых искомый ген или сегмент генома может быть обнаружен с вероятностью 99%. Такая избыточность клонотеки объясняется тем, что лигирование отдельных фрагментов чужеродной ДНК с векторами происходит случайно, и какие-то участки генома могут быть представлены в небольшой выборке несколько раз, а другие – ни одного раза. Полная библиотека генома человека размещается в составе примерно 900 000 клонов.

Наиболее часто используются два типа клонотек – геномные библиотеки и библиотеки кДНК. Геномные библиотеки представляют собой собрание генов и последовательностей ДНК какого-то организма. Их получают обычно с помощью векторов, сконструированных на основе бактериофага λ или космид. Эти векторы характеризуются большой емкостью, что позволяет уменьшить число клонов в клонотеке.

Библиотека кДНК (комплементарных ДНК) представлена набором клонов, содержащих двухнитевые ДНК-копии всех мРНК клетки. Для создания этих клонотек чаще используют плазмидные или фаговые (на основе фага λ) векторы.

Оба типа клонотек, однако, можно сравнить с хаотическим собранием книг, которые превращаются в библиотеку лишь после составления каталога, позволяющего систематизировать все собрание. Иными словами, следующим необходимым этапом является идентификация генов в клонотеке генома. Решить эту задачу можно несколькими способами: анализируя саму вставочную полинуклеотидную последовательность либо продукты ее экспрессии в клетках хозяина. В первом случае стратегия скрининга рекомбинантных клонов основана на использовании зондов, комплементарных определенным участкам генов или кДНК. Во втором случае скрининг основан на изменении фенотипа клеток, воспринявших определенный фрагмент ДНК, под влиянием вновь синтезированного белка либо просто на свойствах самого белка. Рассмотрим некоторые способы идентификации генов в клонотеках.

Идентификация генов по изменению фенотипа клеток. Этот метод чаще используется при «самоклонировании», т. е. при переносе генов на многокопийных плазмидах в тот же микроорганизм, из генома которого были выделены эти гены. Например, требуется обнаружить в клонотеке *E. coli* клоны, содержащие гены, ответственные за биосинтез аланина. Для этого требуется перенести векторы с клонированными фрагментами ДНК в мутантные штаммы *E. coli*, зависящие по аланину. Отбор потомства следует вести на синтетической среде без аланина, где способны сформировать колонии лишь те бак-

терии, которые восприняли комплементирующей соответствующую мутацию ген. Подобная процедура носит название «тест на комплементацию» и требует наличия штаммов с хорошо охарактеризованными мутациями искомым генов.

Иммунологический скрининг продуктов генов. Если фрагменты ДНК клонировались в составе экспрессируемых векторов, обеспечивающих транскрипцию и трансляцию чужеродных генов, то возможен отбор нужных клонов с помощью иммунологических тестов. Для этого колонии бактерий на плотной среде (чашка-реплика) подвергают лизису параами хлороформа, а затем методом реплик переносят содержимое на поливиниловую пластинку, на которой адсорбированы антитела к искомому белку. Промывают пластинку таким образом, чтобы на ней остались только связанные с антителами белки (в мягких условиях). Затем пластинку обрабатывают мечеными изотопами йода (^{125}I) антителами к тому же белку. Таким образом, на пластине формируется комплекс антигена (искомый белок) и двух молекул антител, одна из которых мечена радиоактивным изотопом. Обнаружить местоположение такого комплекса можно радиоавтографически. Сопоставляя положение меченого комплекса и колоний на чашке, можно выявить клон, содержащий ответственный за синтез искомого белка ген.

Скрининг клонотеки с помощью зондов. Этот метод основан на гибридизации комплементарных участков нуклеиновой кислоты. В подразд. 2.2 описана процедура получения кДНК. Для поиска нужной кДНК в клонотеке поступают следующим образом. Отбирают изолированную колонию, содержащую вектор со вставкой, и инкубируют ее для получения большого количества гомогенной культуры. Выделяют из клеток плазмидную ДНК и подвергают ее денатурации, в результате чего цепи расходятся. Иммуобилизуют денатурированную ДНК на нитроцеллюлозном фильтре. Пропускают через фильтр смесь мРНК, выделенных из тех же клеток, чьи гены пытаются обнаружить. При этом на фильтре задерживаются лишь те мРНК, которые комплементарны гомогенной кДНК. Связавшуюся мРНК элюируют с фильтра и вносят в бесклеточную систему трансляции, где синтезируется соответствующий белок. Этот белок можно идентифицировать иммунологическим методом или с помощью хроматографического анализа. Если это удастся осуществить, в руках исследователя оказывается идентифицированный клон, клетки которого содержат кДНК, служащую зондом для поиска индивидуального гена или мРНК.

Этот кДНК-зонд можно использовать для быстрого и очень эффективного скрининга любой клонотеки. Схема такого эксперимента

представлена на рис. 2.8. Изолированные колонии микроорганизмов или бляшки вирусов на газоне чувствительных клеток переносят методом реплик на нитроцеллюлозный фильтр, помещенный на поверхность плотной среды в чашке Петри. Клетки разрушают (обычно щелочным лизисом с помощью NaOH) и подвергают ДНК денатурации. При определенных условиях (80°C, вакуум) ДНК прочно прикрепляется к нитроцеллюлозному фильтру. Фильтр выдерживают в растворе, содержащем денатурированный ^{32}P -меченный зонд. В этих условиях комплементарные последовательности ДНК образуют дуплексы. При радиоавтографическом анализе в том месте фильтра, где содержалась комплементарная зонду ДНК, обнаруживается потемнение. Ищут соответствие этой зоны той или иной колонии на чашке-матрице (либо бляшке).

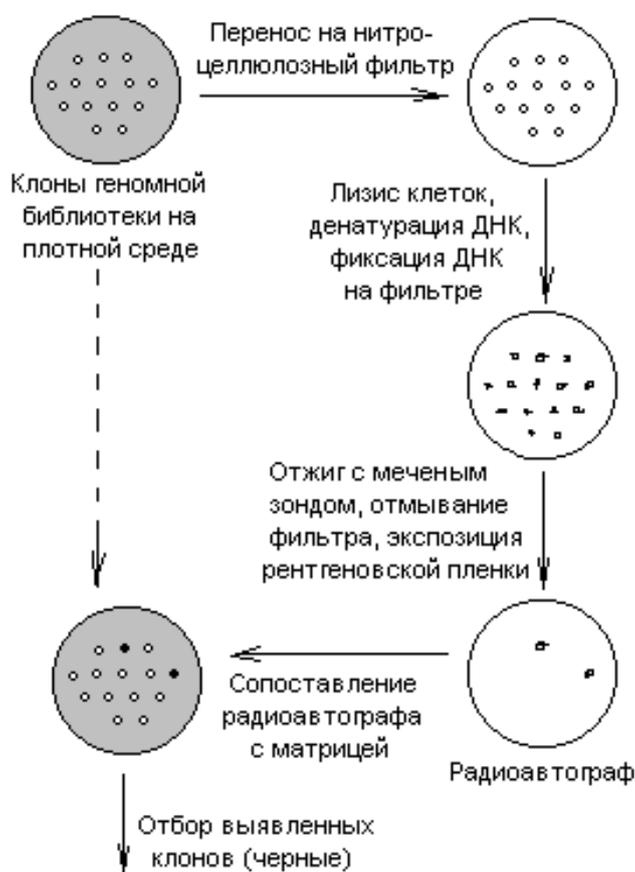


Рис. 2.8. Схема процесса скрининга клонотеки с помощью зондов

В качестве зондов для скрининга клонотек вместо кДНК можно использовать мРНК или химически синтезированные олигонуклеотидные зонды. В последнем случае требуется информация о последовательности нуклеотидов в гене или последовательности аминокислот

в искомом белке. Исходя из аминокислотной последовательности участка полипептида длиной 5–6 аминокислотных остатков, предсказывают все возможные последовательности мРНК, которые могут кодировать этот участок. Из-за вырожденности генетического кода вариантов обычно бывает много.

Синтезируют соответствующий набор комплементарных олигонуклеотидов *in vitro*. Эти нуклеотиды затем можно использовать непосредственно для скрининга смеси кДНК или геномной библиотеки. Кроме этого, данные олигонуклеотиды можно применять вместо олиготимидилатов в качестве затравок для обратной транскриптазы, чтобы синтезировать кДНК, существенно обогащенную искомыми последовательностями. В данном случае процессу обратной транскрипции будут подвергаться преимущественно те мРНК, которые содержат комплементарные затравкам последовательности рибонуклеотидов.

2.4. Характеристика продуктов клонирования

После отбора клеток, содержащих клонированные фрагменты ДНК, необходимо охарактеризовать эти фрагменты, убедившись в следующем:

- гибридная ДНК содержит нужный сегмент;
- нужный сегмент ДНК вошел в состав вставки целиком;
- сегмент полностью соответствует геномной ДНК, из которой происходит;
- нужная последовательность является функциональной.

Чтобы получить возможность убедиться в этом, следует вначале отделить гибридную ДНК (векторные плазмиды со вставками или фаговые ДНК) от хромосомальной ДНК бактерий, от РНК и белков.

Для этого из клеток экстрагируют ДНК, используя такие методы, при которых небольшие кольцевые плазмидные ДНК сохраняют целостность, а крупные хромосомальные ДНК разрываются на линейные фрагменты. Фаговую ДНК получают в свободном от клеточной ДНК состоянии путем очистки фаговых частиц и последующего выделения из них ДНК. От РНК и белков освобождают ферментативным расщеплением.

Определение размера вставки. Размер вставки определяют с помощью нескольких подходов.

Определение размера гибридной ДНК методом гель-электрофореза. После вычитания из полученного размера самого вектора, ко-

торый обычно бывает известен, можно определить размер вставки. Чтобы получить точные данные, кольцевые рекомбинантные молекулы превращают в линейные, поскольку электрофоретическая подвижность кольцевых структур зависит от степени их сверхспирализации. Обычно подвижность двухцепочечного фрагмента в электрическом поле обратно пропорциональна логарифму его размера. Используя в качестве маркеров фрагменты известной длины, легко определить размер интересующего нас фрагмента с помощью линейки. Для проведения такого анализа обычно достаточно 1 мкг ДНК. Для визуализации полос, содержащих фрагменты разной длины, гель окрашивают бромистым этидием, и в УФ-свете становятся различимы полосы ДНК, содержащие всего 50 нг ДНК (рис. 2.9).

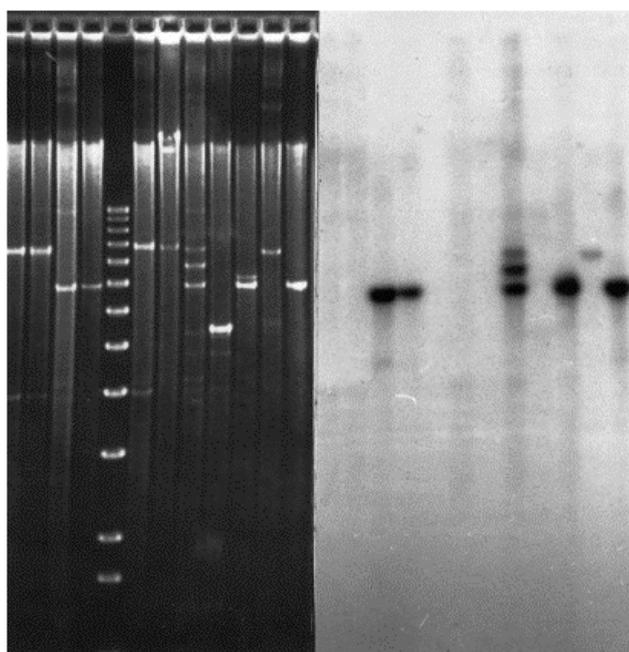


Рис. 2.9. Фото геля, в котором видны окрашенные бромистым этидием фрагменты ДНК (слева); радиоавтограф геля (справа)

Стандартные электрофоретические методы непригодны для молекул, размер которых превышает 15 т. п. н., поскольку крупные молекулы мигрируют в геле слишком медленно и скорость миграции уже не зависит от их размера. Для разделения таких молекул используют пульс-гель-электрофорез. В этом методе вместо постоянного однонаправленного электрического поля используется поле, ориентация которого многократно меняется. При этом даже очень

большие молекулы разделяются по размерам, что объясняется, по-видимому, механизмом их прохождения через поры геля. Предполагается, что молекулы вытягиваются в направлении поля, а затем при изменении этого направления переориентируются. Время переориентации зависит от длины цепи и угла между направлениями поля; они и определяют конечное расстояние, на которое перемещается молекула.

Измерение длины с помощью электронной микроскопии. Используются специальным приспособлением к микроскопу, которое позволяет определить длину денатурированной молекулы ДНК.

Вырезание вставки с помощью рестриктаз. Применяют те же рестриктазы, которые использовались при клонировании. Определяют размеры фрагментов с помощью гель-электрофореза. Если клонирование осуществлялось с лигированием «тупых» концов, то можно разрезать векторную молекулу по сайтам, находящимся в участках, фланкирующих вставку, и тоже определить размеры фрагментов в гель-электрофорезе. Потом можно вычесть размеры фланкирующих областей, которые обычно бывают известны (положение сайтов рестрикции в векторах известно при их конструировании). Наконец, можно крупную молекулу разрезать на множество фрагментов, определить их размер и из суммы вычесть размер самого вектора.

Картирование сайтов для эндонуклеаз рестрикции. С помощью эндонуклеаз II типа можно разрезать сложные геномы или длинные сегменты ДНК на воспроизводимые наборы мелких единиц. Эти единицы можно разделить по размерам с помощью, например, электрофореза в полужидком геле на основе агарозы (для относительно крупных фрагментов) или полиакриламида (для более мелких). При определении фрагментов, которые получаются при расщеплении ДНК несколькими рестриктазами по отдельности и в разных комбинациях, часто удается установить порядок расположения сегментов в исходной молекуле, т. е. построить физическую карту ДНК, где указано положение каждого сегмента. Для сложных геномов или больших молекул, которые дают при рестрикции сложные наборы фрагментов, используют специальные компьютерные программы.

Определение положения нужного сегмента во вставке. После построения рестрикционной карты вставки установить точную локализацию нужного сегмента не составляет труда. Для этого нужен только подходящий меченый зонд, аналогичный ДНК- или РНК-

зонду, используемому для отбора клона в начале клонирования. Если такой зонд имеется, то интересующий нас фрагмент можно обнаружить при отжиге зонда с фрагментами после их денатурации. Чтобы выявить гибрид, нужно использовать меченый зонд. Чаще всего его метят радиоактивным фосфором (^{32}P).

Гибридизация меченого зонда с фрагментами ДНК, находящимися в геле, происходит очень неэффективно, поэтому почти во всех случаях ДНК перед гибридизацией переносят с геля на более подходящую твердую подложку (обычно на нитроцеллюлозный фильтр или нейлон). Этот метод носит название «*блоттинг*». Блоттинг ДНК назван блоттингом по Саузерну, или саузерн-блоттингом (по имени изобретателя); соответствующие методики для РНК и белков получили название нозерн-блоттинга и вестерн-блоттинга.

Суть метода состоит в следующем. Исследуемую ДНК расщепляют рестриктазами на фрагменты, которые разделяют по размеру в ходе электрофореза в агарозном геле. Затем гель помещают на нитроцеллюлозный фильтр и пропускают через него соответствующий буферный раствор в направлении, перпендикулярном направлению электрофореза. При этом фрагменты ДНК элюируются из геля и связываются с нитроцеллюлозным фильтром, на котором в результате получается реплика геля (на ней фрагменты сохраняют свое взаимное расположение). Далее инкубируют подложку в растворе, содержащем ^{32}P -зонд, при такой ионной силе и температуре, которые обеспечивают образование водородных связей между зондом и комплементарным фрагментом ДНК. После радиоавтографии выявляется набор полос, соответствующих фрагментам ДНК, гибридизующихся с зондом (комплементарных ему), т. е. содержащих искомым сегмент.

Кроме этого, положение искомой последовательности в клонированном сегменте можно определить с помощью электронной микроскопии. Для этого зонд и рекомбинантную ДНК смешивают, денатурируют и отжигают, а затем готовят препарат для микроскопирования. Комплементарные участки зонда и исследуемой молекулы образуют дуплексы, которые на микрофотографиях выглядят как относительно толстые нити, а некомплементарные участки остаются одиночными и имеют вид более тонких нитей.

Определение последовательности нуклеотидов в ДНК (секвенирование). Определение последовательности нуклеотидов в ДНК является одной из важных, а часто и обязательных стадий изучения генома. Секвенированию подвергают очищенные (однородные) фраг-

менты односторонней ДНК длиной 100–200 нуклеотидов. Получить такие фрагменты можно в ходе следующих операций: методом клонирования добиваются однородности рекомбинантных ДНК в составе одного клона; выделяют векторную ДНК из клеток; с помощью рестрикционных ферментов расщепляют клонированный сегмент ДНК на фрагменты указанной величины; при повышении температуры добиваются денатурации ДНК, получая односторонние молекулы. Есть и более простой способ подготовки ДНК (пригоден для метода Сэнгера) – клонирование односторонних фрагментов ДНК в составе векторов на основе фага M13.

Широко применяются два метода секвенирования – метод химического расщепления Максама и Гилберта и метод обрыва цепи Сэнгера. Наиболее современным и менее трудоемким считается метод обрыва цепи Сэнгера, который разработан в 1977 г. Ф. Сэнгером как усовершенствованный метод, пришедший на смену ранее предложенному Ф. Сэнгером и Д. Коулсоном (1975 г.) «плюс-минус»-методу.

Секвенирование ДНК методом обрыва цепи. Иначе этот метод называется дидезокси-методом Сэнгера. В методе происходит ферментативное копирование при помощи Pol-I исходного одноцепочечного сегмента ДНК с точки, задаваемой положением 3'-конца праймера. Метод основан на использовании специфических терминаторов синтеза ДНК – 2',3'-дидезоксирибонуклеозидтрифосфатов. Эти молекулы нормально включаются в растущие цепи ДНК через свои 5'-трифосфатные группы, однако не образуют фосфодиэфирную связь со следующим дезоксирибонуклеозидтрифосфатом (dNTP). Когда в реакционную смесь для синтеза ДНК наряду с четырьмя нормальными dNTP вводят небольшое количество какого-либо ddNTP (например, ddATP), синтезируется набор цепей, специфически терминированных данным ddNTP. Если с одним и тем же фрагментом ДНК поставить четыре отдельные реакции, каждую с одним из ddNTP, то в любой из реакций образуется смесь вновь синтезированных молекул разной длины. При этом получается, что все синтезированные в такой системе цепи ДНК будут иметь одинаковый 5'-конец (он обусловлен использованием одной и той же затравки) и одинаковые нуклеотиды на 3'-конце. Теперь такие продукты можно разделить с помощью электрофореза в геле и определить по относительной длине образованных цепочек ДНК последовательность нуклеотидов в них (рис. 2.10).

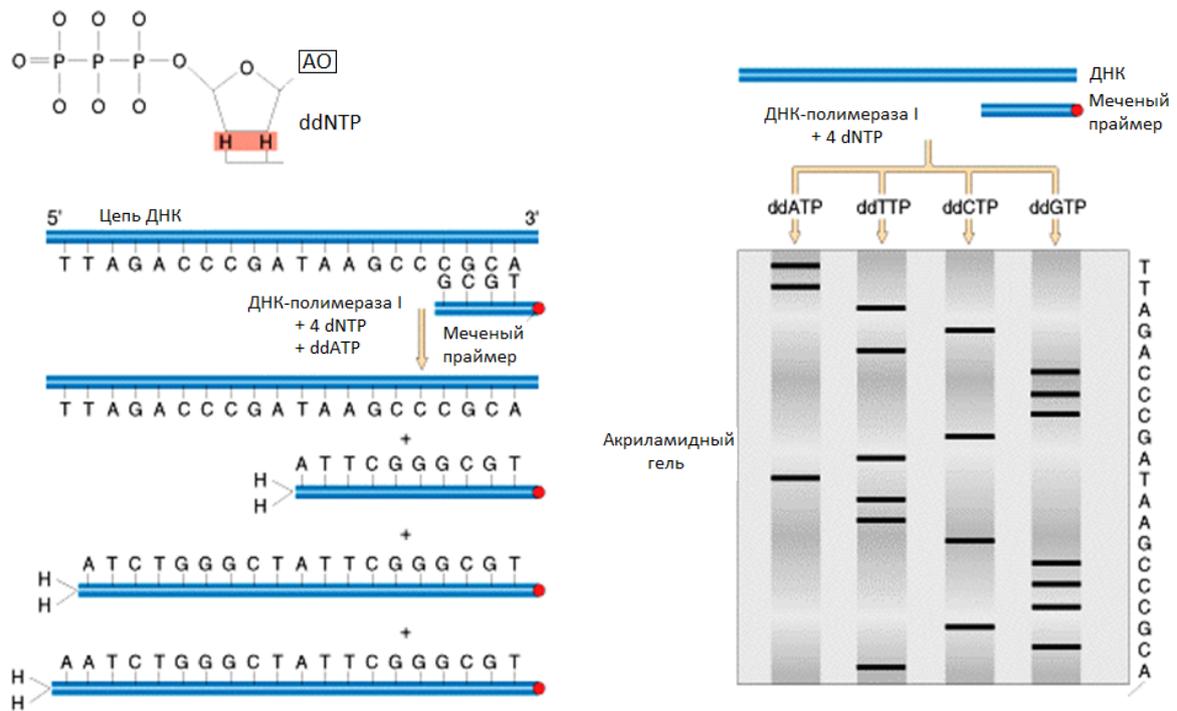


Рис. 2.10. Схема процесса секвенирования методом обрыва цепи

Последовательность этапов в методе следующая:

- 1) получают одностранные фрагменты ДНК, последовательность нуклеотидов в которых требуется определить (ДНК-матрицы);
- 2) синтезируют набор ddNTP;
- 3) синтезируют короткий фрагмент меченой ДНК, комплементарный 3'-концу матрицы (затравка);
- 4) готовят четыре реакционные смеси для синтеза ДНК, в состав каждой из которых входит какой-либо один ddNTP и соответствующий dNTP в строго определенном соотношении, а также три других dNTP;
- 5) в каждой из реакционных смесей дают осуществиться синтезу ДНК. Если соотношение ddNTP : dNTP выбрано правильно, образуется набор меченых молекул, длины которых равны расстояниям от остатков данного ddNTP до начала цепи;
- 6) денатурируют полученные смеси ДНК, добиваясь образования одностранных молекул;
- 7) разделяют фрагменты по размеру методом электрофореза в геле (в пористом агарозном или полиакриламидном геле под действием электрического поля молекулы движутся со скоростью, обратно пропорциональной их величине);
- 8) проводят радиоавтографию и по картине распределения меченых фрагментов устанавливают нуклеотидную последовательность.

Наиболее современной модификацией метода Сэнгера является использование клонированных в векторах на основе фага М13 однонитевых фрагментов ДНК. Место генома М13, в которое встраивается чужеродная ДНК, точно известно. Поэтому получены 8–10-членные олигонуклеотиды, комплементарные участку ДНК векторов М13, непосредственно прилегающему к клонированной последовательности. Эти нуклеотиды и служат затравками в полимеразных реакциях, т. е. появляется возможность использования одной и той же синтетической затравки для секвенирования любых вставок в данный вектор. При оптимальных условиях с помощью данного метода можно в одном эксперименте определить строение фрагмента, включающего сотни нуклеотидов.

Однако для секвенирования очень длинных фрагментов ДНК (более 5 т. п. н.) описанный подход неприменим, поскольку число М13-векторов, содержащих перекрывающиеся субклонированные последовательности, значительно увеличивается. Для решения этой задачи были разработаны методы секвенирования двухцепочечных плазмидных ДНК, не требующие субклонирования. Плазмидную ДНК со вставкой выделяют и отжигают с синтетическим олигонуклеотидным праймером, который гибридизуется с последовательностью в одной из цепей векторной ДНК, находящейся вблизи вставки. Затем осуществляют дидеокси-секвенирование, позволяющее идентифицировать первые 250–350 нуклеотидов вставки. Исходя из этих данных синтезируют второй олигонуклеотидный праймер, комплементарный сегменту вставки, отстоящему примерно на 300 нуклеотидов от места связывания первого праймера, и секвенируют следующие 250–350 нуклеотидов. Аналогичным образом синтезируют третий праймер и определяют последовательность следующих 250–350 нуклеотидов. Эту процедуру, называемую праймер-опосредованной прогулкой, продолжают до тех пор, пока не секвенируют весь фрагмент. Аналогичным образом секвенируют вторую цепь, начиная с праймера, который гибридизуется с этой цепью вблизи вставки.

2.5. Экспрессия трансгенов

Одним из наиболее значимых достижений генетической инженерии является клонирование эукариотических генов, что дает возможность осуществлять синтез микробными клетками важнейших для народного хозяйства белков – ферментов, гормонов, иммуномодуляторов и др. Эукариотические организмы – доноры генетического материала

характеризуются гораздо менее высоким уровнем продукции природных белков, чем генноинженерные штаммы-продуценты. Поэтому получение практически ценных белков для изучения их структуры и свойств, а также для использования в хозяйственных целях осуществляют чаще с использованием гибридных микробных штаммов, а не культур клеток растений и животных или их органов и тканей. Названным способом получены такие ценные белки, как гормон роста человека и некоторых животных, инсулин, фактор роста эпидермиса человека, фактор некроза опухолей человека и мыши, α -, β - и γ -интерфероны, медиатор нервной системы соматостатин, гормон кальцитонин, миоглобин, гормоноподобные сигнальные белки интерлейкины, фактор свертывания крови, отсутствующий у больных гемофилией, обратная транскриптаза вируса лейкоза мышей, урокиназа, трипсин, некоторые онкобелки, вакцины против некоторых вирусов.

Когда ген в составе векторной молекулы переносится из клеток одного организма в клетки другого, возникают проблемы с его экспрессией: транскрипция и трансляция мРНК могут не осуществляться вовсе либо происходить с низкой частотой. Это является следствием специфичности ферментов, катализирующих процессы транскрипции и трансляции, к определенным последовательностям ДНК (мРНК), структура которых бывает уникальной у различных таксономических групп организмов. Чаще всего проблемы экспрессии наблюдаются при клонировании эукариотических генов в клетках прокариот, в частности потому, что сигналы инициации транскрипции высших эукариот не распознаются РНК-полимеразами бактерий.

Для достижения эффективной экспрессии клонированных генов используют несколько подходов:

1) увеличение числа копий гена в клетке (амплификация гена): если изучаемый ген находится в клетке в высокой дозе, он обычно обуславливает повышенный уровень своего белкового продукта;

2) подстановку перед структурной частью чужеродного гена сильного промотора, распознаваемого РНК-полимеразой клетки хозяина, что обеспечивает эффективную транскрипцию трансгена;

3) подстановку перед геном чужеродного белка регуляторного элемента, обеспечивающего эффективную инициацию трансляции;

4) стабилизацию образующейся мРНК и белкового продукта.

Перечисленные методы достижения высокого уровня экспрессии генов наилучшим образом разработаны для бактерий *E. coli*. Поскольку наличие такой методологии является определяющим условием конструирования новых продуцентов, кишечная палочка рассматрива-

ется как один из самых перспективных организмов, используемых для этой цели.

Амплификация генов. Для усиления экспрессии генов можно увеличить их количество в клетке. Осуществляют это двумя способами – увеличением числа копий рекомбинантных плазмид или числа копий гена в составе плазмиды.

Наиболее прост первый способ. Уже указывалось, что для конструирования векторов предпочтительнее использовать мультикопийные плазмиды, находящиеся под нестрогим контролем репликации. В этом случае число копий плазмид составляет 10–200. Данный показатель можно увеличить до нескольких тысяч, если подавить синтез белков бактериальной клетки или использовать мутантные плазмиды. Применение таких векторов позволяет значительно увеличить дозу целевого гена, а значит, и выход белкового продукта. Для конструирования многокопийных плазмидных векторов используют либо плазмиды с ослабленным контролем репликации, либо с термочувствительными мутациями по функциям репликации. Из векторов первого типа широкое распространение получила плазида *ColE1* и ее производные, которые в обычных условиях находятся в клетке в количестве 20–60 копий. В частности, при клонировании бактериальных генов в известной нам *pBR322* (производная *ColE1*) уровень синтеза белков возрастает в 25–100 раз. По-видимому, это обусловлено тем, что данный вектор в клетках *E. coli* имеет большую копийность, чем сама *ColE1*. Интересным свойством плазмид этого класса является то, что в присутствии ингибитора белкового синтеза – хлорамфеникола копийность их может увеличиться до $3 \cdot 10^3$ молекул на клетку (около половины суммарной клеточной ДНК). Однако достичь пропорционального увеличения продукции химерного белка не удастся, т. к. обработка хлорамфениколом ингибирует белковый синтез в клетках. После удаления из среды хлорамфеникола белковый синтез и деление клеток возобновляются и кратковременно увеличивается продукция белка, пока копийность гибридной плазмиды постепенно не снизится.

При использовании термочувствительных мутантов плазмид синтез белка не ингибируется, что приводит к сверхпродукции белков, детерминированных генами плазмиды. Например, мутантный фактор устойчивости к антибиотикам *R1* использован для конструирования миниплазмид *pKN402* и *pKN410*, обладающих способностью к безудержной репликации при температуре выше 35°C. В результате амплификации в течение 2–3 ч количество плазмидной ДНК может достигнуть 75% суммарной ДНК клетки.

Следует, однако, учитывать, что чрезмерная амплификация плазмид может приводить к снижению жизнеспособности штамма-продуцента из-за высокой токсичности некоторых чужеродных белков для бактерий, а также из-за увеличения времени генерации клеток.

Копийность генов в составе векторных молекул также обеспечивают, создавая опероны с повторяющимися идентичными цистронами чужеродных генов. Сочетание перечисленных методов позволяет повысить дозу гена в клетке до тысяч копий на нуклеоид и увеличить уровень синтеза соответствующих белков (в ряде случаев на 1–2 порядка).

Достижение высокого уровня транскрипции чужеродных генов. Для того чтобы эукариотические гены транскрибировались в прокариотических клетках, их обычно подставляют под контроль сильных промоторов (обеспечивают высокую частоту событий инициации транскрипции) прокариот. Наиболее часто для этих целей используют сильные промоторы кишечной палочки: лактозного оперона – *PlacUV5*, триптофанового оперона – *P_{trp}*; гибридные промоторы, например *P_{trp-lacUV5}* (*P_{tac}*), промоторы фага λ – *P_R*, *P_L*, а также других фагов (*T5*, *T7*, ϕ X174). Выделение этих промоторов и включение их в состав векторов осуществляют в ходе генноинженерных манипуляций. На силу промотора существенно влияют последовательности –35 и –10, а также расстояние между ними. Например, мутация *UV5* усиливает транскрипцию с промотора лактозного оперона. Секвенирование показало, что мутация затрагивает область –10, которая в промоторе дикого типа *Plac* имеет структуру TATGTT, а в промоторе *PlacUV5* изменена так, что соответствует наиболее часто встречающейся последовательности TATAAT. В одном из исследований показано, что трансформация *E. coli* плазмидой *pMB9*, несущей ген *araC* *E. coli*, приводит к 4-кратному увеличению синтеза белка AraC в клетках. Если же этот ген дополнительно поместить под контроль промотора *PlacUV5*, то продукция белка возрастает уже в 50 раз. У промотора *P_{trp}*, в отличие от *PlacUV5*, «идеальной» является область –35. Г. Бойер с соавторами в 1982 г. сконструировали гибридный промотор, названный ими *P_{tac}* (*P_{trp-lacUV5}*), который оказался в 5–10 раз более эффективным, чем *PlacUV5*. В ряде лабораторий были созданы векторные плазмиды экспрессии, у которых сильные промоторы тандемно повторены, что привело к усилению транскрипции соответствующих генов.

Еще более совершенной является методология использования регулируемых промоторов, которые иницируют процесс эффективной транскрипции лишь в определенных условиях. Такими промоторами являются, например, *P_R* и *P_L* фага λ . Их используют в клетках, содер-

жащих температурочувствительный *cI*-репрессор, ген которого может быть расположен на векторе или совместимой с ним плазмиде. В таких клетках экспрессия чужеродного гена под контролем *PR* или *PL* будет происходить лишь после инактивации репрессора повышением температуры ферментации. При этом можно добиться в *E. coli* продукции различных белков, превышающей нормальный уровень в десятки раз.

Использование прокариотических регуляторных элементов, расположенных на многокопийных плазмидах, позволяет достигать уровня синтеза мРНК чужеродного гена до 25% от всей РНК бактериальной клетки.

Достижение высокого уровня трансляции чужеродных генов. Еще одним условием эффективной экспрессии клонированных генов является наличие перед геном чужеродного белка оптимального сайта инициации трансляции мРНК. На частоту событий трансляции наибольшее влияние оказывает структура участков мРНК, обеспечивающих ее связывание с рибосомой и тРНК. Показано, что олигонуклеотидная последовательность, расположенная на 5'-конце и непосредственно примыкающая к стартовому кодону, обеспечивает комплементарное спаривание с нуклеотидами антикодоновой петли тРНК. В то же время среди нуклеотидов мРНК, участвующих во взаимодействии с рибосомой, достоверно установлена роль пурин-богатого участка на расстоянии 3–15 нуклеотидов от стартового кодона (последовательность Шайна – Дальгарно, или SD-последовательность). Длина SD-последовательности, а также ее расположение относительно стартового кодона существенно сказываются на связывании рибосом с мРНК, а значит, и на частоте событий инициации трансляции.

Известно три основных подхода к конструированию векторов, обеспечивающих трансляцию чужеродной ДНК в бактериальных клетках. Одним из наиболее распространенных является метод конструирования гибридных участков связывания рибосом. Суть его заключается в том, что структурная часть чужеродного гена (с собственным стартовым кодоном и несколькими нуклеотидами перед ним) включается между SD-последовательностью и стартовым кодоном прокариотического гена. Такой метод имеет преимущество, состоящее в образовании полноразмерного чужеродного белка. Однако существенным недостатком метода является трудность достижения оптимального удаления стартового кодона от SD-последовательности, что, как указывалось, очень важно для инициации трансляции. Поэтому применяют другой подход, в котором чужеродный структурный ген, лишенный собственных регуляторных областей, внедряют в состав

хорошо экспрессируемого бактериального гена. Для этих целей чаще всего используют *lac*-промотор с соответствующей последовательностью Шайна – Дальгарно. Сайт внедрения должен быть достаточно удален от места инициации трансляции, чтобы новая нуклеотидная последовательность не мешала эффективной инициации транскрипции и трансляции бактериального гена. При экспрессии векторов такого типа образуется гибридный белок, в котором N-концевая часть представлена аминокислотами прокариотического пептида. Поэтому для выделения эукариотической полипептидной цепи требуется дополнительная химическая или ферментативная обработка.

Наконец, третий подход к конструированию векторов, обеспечивающих эффективную трансляцию, использует принцип «перекрывания» генов. В этом случае чужеродный ген встраивают в концевую часть прокариотического гена таким образом, чтобы SD-последовательность второго гена располагалась непосредственно в кодирующей области первого. При этом терминирующий трансляцию кодон первого гена является частью иницирующего кодона второго гена. Этот метод разработан в 1985 г. в СССР. Он позволяет достигать 100%-ной инициации трансляции второго гена, поскольку рибосомы, транслировавшие первую часть полицистронной мРНК, не отсоединяются от нее, а происходит реинициация трансляции второго гена. Таким образом, применение векторов с частично перекрывающимися генами в оперонах позволяет обеспечить эффективность инициации трансляции чужеродного гена не ниже, чем у исходного прокариотического цистрона.

Стабилизация мРНК и белкового продукта чужеродного гена. На стабильность мРНК в клетке влияют ее первичная и вторичная структура. Сохранение шпилечных структур на 3'-конце после терминирования транскрипции, по-видимому, значительно увеличивает период полужизни мРНК. Для других мРНК доказано, что их стабильность во многом определяется структурой некодирующей 5'-области. Изменяя эти элементы при конструировании гибридных генов, добиваются повышения стабильности мРНК.

Стабильность мРНК в клетках бактерий можно повысить также введением мутаций, инактивирующих РНК-азы. Кроме этого, на стабильность мРНК влияет полинуклеотидфосфорилаза (Pnp). Известны мутанты *E. coli* по генам *pnp*, в которых время полужизни мРНК, определяющей чужеродные белки, увеличивается в 1,5 раза.

Серьезным препятствием при получении штаммов-сверхпродуцентов может стать протеолиз чужеродных белков в клетке. Ведь набор клеточных пептидаз как раз и предназначен в основном для быст-

рой деградации полипептидов с «аномальной» структурой, которые возникают, например, в результате ошибок трансляции. Для стабилизации чужеродных белков в качестве реципиентов можно использовать штаммы, дефектные по системе деградации белков (*lon-*, *htpR-* или *deg-*мутанты). Можно также вводить в бактериальную клетку ген *pin* бактериофага T4, который контролирует синтез ингибиторов протеаз, или другие гены с похожими функциями.

Значительное влияние на активность протеаз клетки оказывают условия культивирования бактерий, и прежде всего состав питательных сред. В частности, известно, что протеолиз увеличивается при дефиците аминокислот, фосфатов, сульфатов. Недостаток аммония, а также культивирование при повышенной температуре приводят к сверхпродукции протеаз. Известно, что катионы цинка ингибируют действие протеаз *E. coli*. Поэтому введением в питательную среду определенного количества Zn^{2+} можно добиться значительного увеличения уровня чужеродного белка, синтезируемого в клетках этих бактерий.

Сочетание всех перечисленных факторов может обеспечивать в клетках *E. coli* удивительно высокий выход целевых белков, превышающий 50% суммарного содержания белка в бактерии.

2.6. Методы молекулярного маркирования

Под *молекулярными маркерами* понимают фрагменты ДНК, которые могут быть использованы в качестве генетических различий при идентификации особей или их генов, так же как в судебной практике используют отпечатки пальцев для идентификации индивидуумов. Не зря процесс исследования особей или индивидуумов на молекулярном уровне носит название «*молекулярный фингерпринтинг*». Возможность использования молекулярных маркеров основана на том, что у отдельных особей даже одного вида существует определенная генетическая вариабельность, иными словами, многие последовательности ДНК являются полиморфными, т. е. отличаются у индивидуумов. Методы молекулярного маркирования как раз и используют эту генетическую вариабельность для идентификации особей и их генов.

Первыми молекулярными маркерами, используемыми в методах генетической инженерии, стали фрагменты, образованные при расщеплении ДНК рестрикционными ферментами. Выявление различий в длине фрагментов, полученных из ДНК различных особей одного вида или их генов после расщепления рестриктазами, дало начало *методу определения полиморфизма длин рестрикционных*

фрагментов (ПДРФ, или RFLP от англ. *restriction fragment length polymorphism*).

Метод ПДРФ (RFLP). Данный метод разработан в начале 1980-х гг. и основан на различиях в расстояниях между сайтами рестрикции в ДНК. Метод заключается в том, что последовательность ДНК, содержащая мутацию, может приобретать или, наоборот, утрачивать сайты рестрикции для тех или иных рестриктаз. В результате для определенных последовательностей ДНК каждого из индивидуумов (или особей) характерен свой, уникальный набор фрагментов рестрикции, так же как для каждого человека характерен свой собственный рисунок отпечатков пальцев. Это можно выявить при разделении полученных фрагментов электрофорезом и гибридизацией с радиоактивным зондом. Сопоставление радиоавтографов для нормального и мутантного генов в этом случае позволяет обнаружить разницу в количестве и положении «полос» (рис. 2.9) и дать ответ на вопрос о принадлежности ДНК тому или иному индивидууму (или особи). Подобная практика широко используется в судебной экспертизе при доказательстве отцовства, идентификации останков, характеристике улик и др. В микробиологии метод применим при идентификации микроорганизмов.

Для данного метода требуется достаточно большое количество ДНК, что часто неосуществимо (если, например, идентификация осуществляется по мелким предметам – волосам, кусочкам ткани, кожи, слюне и др.). Поэтому данный метод часто не может обойтись без еще одного, чрезвычайно перспективного и весьма часто используемого метода – ПЦР (PCR).

Метод ПЦР (полимеразной цепной реакции). Этот метод разработан К. Маллисом и сотрудниками в 1985 г. и представляет собой ферментативную амплификацию сегментов ДНК или РНК, позволяющую многократно воспроизводить интересующий экспериментатора фрагмент ДНК (РНК) без помощи рестриктаз, векторов или клеток хозяина. Метод осуществляется *in vitro* и полностью автоматизирован. Для PCR-реакции необходимы два олигонуклеотида-праймера длиной около 20 нуклеотидов, комплементарных двум участкам на 3'-концах амплифицируемого фрагмента ДНК (рис. 2.11), набор дезоксирибонуклеозидтрифосфатов и термостабильная ДНК-полимераза. Праймеры синтезируют химическим способом, выяснив предварительно структуру комплементарных участков, с которыми они должны спариваться. Термостабильный фермент выделяют из термофильных бактерий *Thermus aquaticus*.

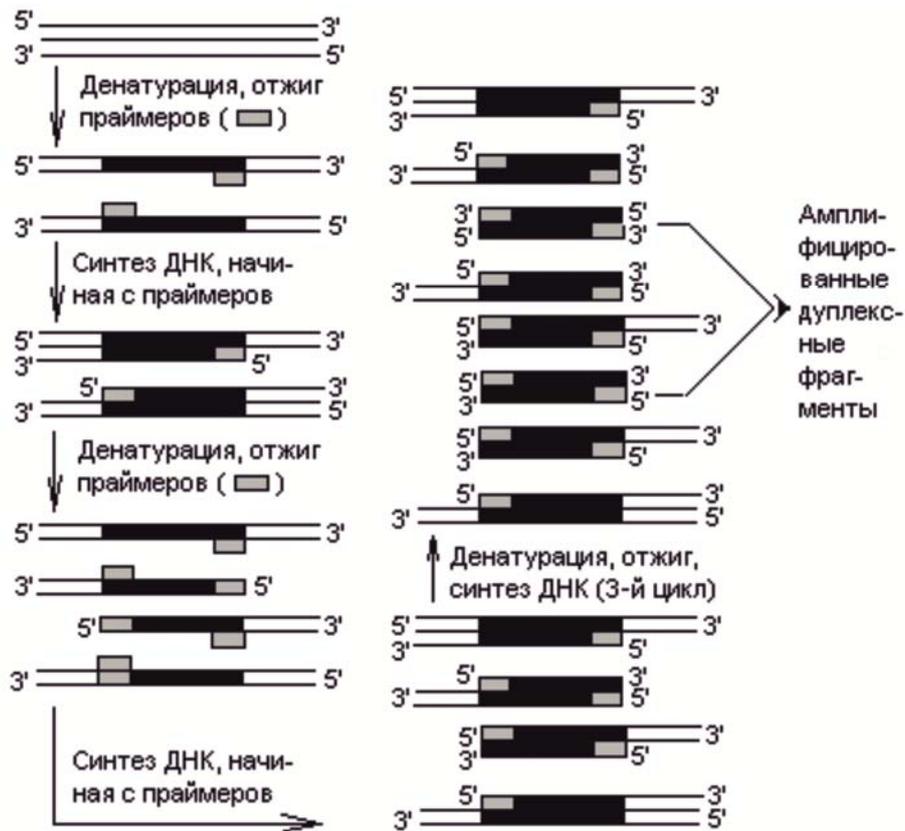


Рис. 2.11. Схема событий полимеразной цепной реакции

На первой стадии двухнитевую ДНК, выделенную из клеток, нагревают до 90°C для денатурации (разделения цепей), затем смесь охлаждают, чтобы произошла гибридизация праймеров с комплементарными участками (отжиг). Далее устанавливают температуру, при которой происходит полимеризация цепей ($70\text{--}75^{\circ}\text{C}$, в этом интервале фермент наиболее активен). После этого все события цикла повторяют, начиная с денатурации ДНК. Процесс осуществляется в термоста-амплификаторе, работу которого контролирует компьютер.

Данный циклический процесс повторяют с той же реакционной смесью 20–60-кратно. После третьего цикла амплификации начинают накапливаться двухнитевые фрагменты ДНК, равные по длине расстоянию между двумя праймерами (рис. 2.11). В каждом последующем цикле количество синтезированных фрагментов удваивается, т. е. за n циклов образуется 2^n копий дуплексных сегментов с длиной, ограниченной праймерами.

Практическое применение метода PCR имеет несколько аспектов. Во-первых, с помощью амплификации определенных последовательностей ДНК, уникальных для определенных геномов или даже целых ге-

нов, можно обнаружить данные сегменты даже при условии, что изначально они присутствуют в клетках в очень малых дозах (числе копий). Например, начальные этапы вирусных инфекций характеризуются низким содержанием нуклеиновых кислот вирусов, но их можно обнаружить с помощью PCR-метода с последующей идентификацией при использовании зондов, комплементарных искомым последовательностям.

Такие методы в настоящее время широко используют для детекции вирусов кори и краснухи, а также холерного вибриона. Чувствительность метода такова, что амплифицировать в ПЦР и обнаружить целевую последовательность можно даже в том случае, если она встречается однажды в образце из 10^5 клеток. Размноженный *in vitro* фрагмент получают в количествах, достаточных для его прямого секвенирования. Поскольку при этом не требуется промежуточный этап клонирования фрагмента ДНК в молекулярных векторах, ПЦР иногда называют бесклеточным молекулярным клонированием.

Еще одним приложением метода является диагностирование наследственных заболеваний. Для многих наследственных заболеваний в настоящее время уже выявлены гены, а также их локусы, мутации в которых приводят к тяжелым болезням. Поскольку эти мутации передаются в поколениях индивидуумов, для ответа на вопрос, будет ли будущий новорожденный нести ту или иную мутацию, требуется выявить ее у плода (пренатальная диагностика). Для этого приблизительно на 16-й неделе беременности производят отбор амниотической (околоплодной) жидкости, из которой можно выделить клетки плода в ходе центрифугирования. Из клеток извлекают ДНК. Получить препаративные количества фрагментов ДНК, предположительно содержащих мутации, можно двумя путями – клонированием соответствующих фрагментов или их амплификацией методом PCR. Второй способ гораздо проще и дешевле. После того как искомый фрагмент ДНК получен в достаточном количестве, можно осуществить его секвенирование и сопоставить нуклеотидные последовательности нормального и анализируемого генов. Существует и более простой способ выявления мутаций во фрагментах ДНК – *блот-гибридизация*.

Детекция молекулярных маркеров с помощью ПЦР. ПЦР-анализ широко применяется для характеристики индивидуальной генетической variability. Среди этих методов наиболее известны такие, как метод определения полиморфизма длин амплифицированных фрагментов (ПДАФ, или AFLP), а также метод SNP (Single nucleotide polymorphism), который нашел применение в фармакогеномике.

2.7. Направленный мутагенез и белковая инженерия

Методы генетической инженерии, в частности клонирование индивидуальных генов или их частей, а также секвенирование ДНК, позволили значительно усовершенствовать методологию мутагенеза, устранив основные недостатки классических способов индукции мутаций в геномах. Классический генетический анализ предполагает воздействие мутагенного фактора *in vivo* на целый геном, в результате чего в нем возникают случайные мутации, зачастую множественные, что сильно осложняет идентификацию мутантов. Выявление мутантных особей осуществляют по измененным фенотипическим признакам, а природу мутации можно определить после секвенирования ДНК. Современный направленный мутагенез, по сути, предполагает обратные действия: вначале клонируют интересующий ген или его сегмент, определяют его структуру в ходе секвенирования, а на ее основе – аминокислотную последовательность белка. Потом *in vitro* вносят **требуемые** изменения в состав гена. Поскольку в данном случае мутагенезу подвергают только строго определенный локус, а весь геном не изменяется, такой мутагенез называют еще **локализованным**. Последствия вызванной мутации определяют после введения мутантного гена в исходный организм.

Самый простой вариант локализованного мутагенеза состоит в обработке клонированного фрагмента ДНК одним из мутагенных факторов (**статистический и сегмент-направленный мутагенез**), однако результатом такого воздействия будут тоже случайные изменения в структуре фрагмента. Более надежные и чаще применяемые методы направленного мутагенеза осуществляются без использования мутагенных факторов, введением predetermined мутаций в заранее запланированное место (точку, сайт) изучаемого фрагмента ДНК (**сайт-специфический мутагенез**). Кроме этого, для получения делеций и инсерций пользуются и классическими методами генетической инженерии, например использованием рестриктаз.

Среди типов мутаций в направленном мутагенезе преобладают делеции, вставки и замены нуклеотидов.

Получение делеций и инсерций с помощью рестриктаз.

Делеции. Эти типы мутаций при локализованном мутагенезе легче всего получить с помощью эндонуклеаз. Используют как рестриктирующие, так и неспецифические эндонуклеазы. Наиболее простой случай использования рестриктаз состоит в расщеплении какого-либо генома с помощью рестриктазы, вносящей несколько разрывов с образованием «липких» концов. Полученные фрагменты вновь замыкают в

кольцо с помощью ДНК-лигазы, что может привести к образованию молекул, не содержащих один из сегментов ДНК. При таком подходе формируются протяженные делеции, и его используют, как правило, в предварительных экспериментах, чтобы определить функции относительно больших участков клонированной ДНК.

Небольшие делеции получают следующим образом. Клонированный фрагмент расщепляют в составе вектора в подходящем сайте с помощью рестриктазы (рис. 2.12).

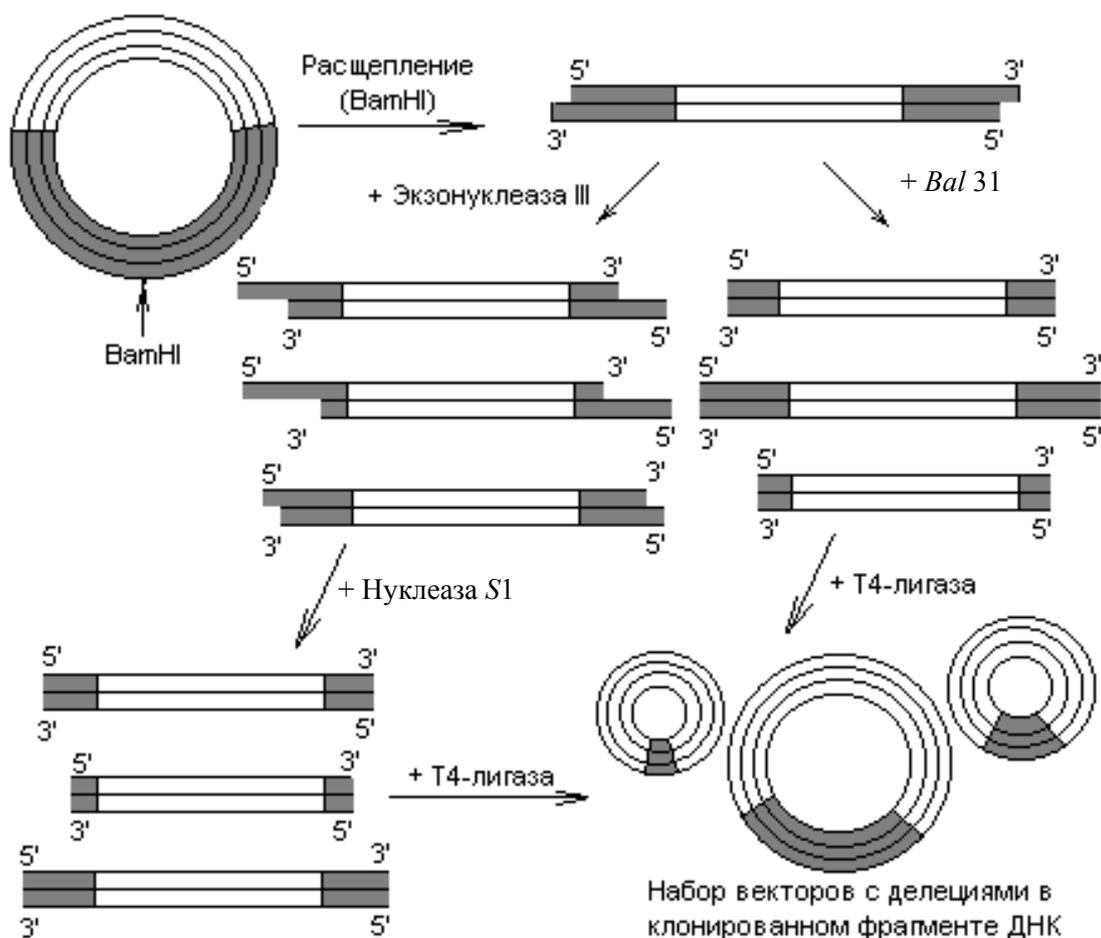


Рис. 2.12. Получение делеций в клонированных фрагментах ДНК с помощью рестрикционных ферментов (темным цветом выделена чужеродная ДНК, светлым – ДНК вектора)

Образовавшуюся линейную молекулу обрабатывают экзонуклеазой III, которая гидролизует в составе ДНК одну цепь, начиная с 3'-конца. В результате получается набор молекул с одноцепочечными 5'-хвостами разной протяженности. Эти хвосты гидролизуют нуклеазой S1, специфичной к одноцепочечной ДНК, и в ДНК формируются

делеции. Можно также применять экзонуклеазу *Bal 31*, которая катализирует деградацию обеих цепей, начиная с концов линейных молекул ДНК. Ход нуклеазных реакций регулируют, варьируя время инкубации, температуру и концентрацию фермента, индуцируя образование делеций разной длины. Полученные делеционные варианты линейных ДНК часто перед циклизацией снабжают линкерами, чтобы в районе делеции присутствовали рестрикционные сайты. Существуют и другие модификации описанных методов.

Вставки (инсерции). Для получения инсерций клонированную ДНК расщепляют рестриктазой или неспецифической эндонуклеазой, а затем лигируют образующиеся фрагменты в присутствии сегмента, который хотят вставить в ДНК. Чаще всего в качестве таких сегментов используют синтезированные химическим путем полилинкеры.

Инсерции, как и делеции, способны нарушить целостность гена или структуру его регуляторных областей, в результате чего будет синтезироваться дефектный белок (в случае протяженных делеций или сдвига рамки считывания, как правило, неактивный) либо будут наблюдаться изменения процесса транскрипции интересующего гена. Таким способом чаще получают регуляторные мутанты и конструируют экспрессируемые векторы.

Статистический (случайный) мутагенез *in vitro*. Этот тип мутагенеза используется для более глубокого анализа организации гена (белка). Он является направленным лишь в том смысле, что воздействию мутагена подвергается определенный ген в составе вектора, но не его локус (сайт).

Проще всего большое разнообразие мутаций можно получить при общем мутагенезе гибридной ДНК, содержащей целевой ген. Основным недостатком данного подхода является то, что мутагенез затрагивает все генетические локусы обрабатываемой молекулы ДНК. Поэтому при увеличении глубины мутагенеза, т. е. при введении нескольких мутаций на молекулу, наряду с искомыми могут возникать мутации по жизненно важным функциям вирусной или плазмидной ДНК, которые могут перестать реплицироваться в клетках. При этом генетические локусы плазмид, важные для репликации, устроены проще и имеют небольшой размер по сравнению с фаговыми. Поэтому они повреждаются с относительно невысокой частотой. Вирусные геномы при мутагенезе чаще теряют жизнеспособность.

Найдены оптимальные условия мутагенеза плазмидных ДНК *in vitro*. Так, высокую эффективность мутагенеза обеспечивают гидроксилламин и *O*-метилгидроксиламин. Эти мутагены обладают высокой

специфичностью и взаимодействуют в основном с цитозином и на два порядка менее эффективно с аденином, причем действуют в участках с локальной денатурацией двуспиральной структуры ДНК. Поэтому воздействие этих мутагенов сочетают с повышением температуры, приводящим к большей «разрыхленности» двуспиральной ДНК.

Сегмент-направленный мутагенез *in vitro*. Статистический мутагенез плазмидных ДНК методически гораздо проще, чем направленный. При желании мутагенной обработке можно подвергать изолированные фрагменты ДНК и затем вводить их в изучаемый геном. Это одна из разновидностей сегмент-направленного мутагенеза. При таком подходе обычно расщепляют интересующий ген рестриктазами, фракционируют полученные фрагменты в ходе гель-электрофореза, вырезают интересующие сегменты и обрабатывают их мутагеном.

Другими, более перспективными подходами являются те, в которых не используют мутагенные вещества. Обычно в результате такой разновидности сегмент-направленного мутагенеза получаются **точечные мутации**, представляющие собой замену нуклеотидов. Для их получения можно использовать несколько подходов: дезаминирование цитозина, включение аналогов нуклеотидов, неправильное включение нуклеотидов при репарации пробела и др.

Первый способ основан на том, что остатки цитозина в одноцепочечной ДНК можно дезаминировать с образованием урацила с помощью обработки ионами бисульфита.

Но для этого необходимо получить одноцепочечные бреши в ДНК в результате разрыва одной цепи. Одноцепочечные участки в ДНК получают обычно вблизи сайтов рестрикции, например, при действии экзонуклеазы III (при импульсной обработке в присутствии бромистого этидия, который из-за интеркаляции между цепями ДНК затрудняет расщепление ферментом обеих цепей). Есть и более совершенные способы получения одноцепочечных участков в ДНК.

После обработки бисульфитом одноцепочечные бреши застраивают с помощью ДНК-полимеразы и лигируют концы. В сайтах, где вместо цитидилата при дезаминировании образовался уридилат, комплементарное положение займет аденилат, а при репликации такой молекулы произойдет замена пары GC на пару AT. Азотистая кислота дает более широкий спектр транзиций: она дезаминирует цитозин до урацила, аденин до гипоксантина и гуанин до ксантина. Спаривание урацила с аденином приводит к транзиции GC → TA. Особенности спаривания гипоксантина таковы, что он может вызывать транзицию AT → GC. Ксантин не обуславливает мутаций. Он является «бес-

смысленным» основанием, которое не комплементарно обоим пиридинам, следовательно, его появление в ДНК должно оказывать летальное действие.

Другой подход при индукции замен состоит в образовании в ДНК небольшого однонитевого пробела, который затем застраивают в присутствии ДНК-полимеразы, dATP, dGTP, dCTP и N-4-гидроксицитозинтрифосфата вместо dTTP. Гидроксицитозинтрифосфат включается в цепь вместо тимидилата, но при репликации ДНК спаривается одинаково хорошо и с аденилатом, и с гуанилатом. В результате включения гуанилата после дополнительного раунда репликации в данном сайте произойдет замена AT → GC (рис. 2.13). Поскольку в данном методе замена нуклеотидов осуществляется внутри сайта рестрикции, появляется возможность легко различить векторы с исходной последовательностью и мутантные. Для этого достаточно обработать их используемой в эксперименте рестриктазой: мутантные молекулы не подвергнутся расщеплению.



Рис. 2.13. Получение замен нуклеотидов в процессе локализованного мутагенеза

Похожий метод основан на использовании только трех из четырех возможных нуклеотидов при заполнении однонитевой брешы ДНК-полимеразой. В большинстве случаев фермент останавливается в том месте молекулы, где встречается комплементарный отсутствующему нуклеотид. Однако изредка ДНК-полимераза ошибается и включает

один из трех присутствующих нуклеотидов. Это приводит к образованию кольцевых молекул, в составе которых присутствуют неспаренные некоплементарные азотистые основания. При введении таких векторов в клетки бактерий в части молекул произойдет репарация такого повреждения. В результате в половине молекул после репликации восстановится исходная последовательность, а в другой половине закрепится мутация. Отличить мутантные молекулы можно описанным выше способом.

Таким образом, сегмент-направленный статистический (случайный) мутагенез можно осуществлять альтернативными методами. Получающийся при этом широкий спектр мутантов позволяет проводить исследование структурно-функциональной организации изучаемого локуса. Недостатки данного подхода состоят в том, что с его помощью сложно получить мутант со строго определенными заменами нуклеотидов и нельзя ввести в ДНК заранее запланированные делеции и вставки. Эти возможности обеспечивает сайт-специфический (олигонуклеотид-направленный) мутагенез.

Сайт-специфический мутагенез. Охарактеризованные методы локализованного мутагенеза отличаются тем, что сайты, где происходят мутации, выбираются случайно. В то же время техника сайт-специфического мутагенеза позволяет вводить мутации в точно определенный участок гена. Это осуществляется с использованием синтетических (полученных химическим синтезом) олигонуклеотидов с заданной последовательностью. Метод привлекателен тем, что не требует присутствия удобных сайтов рестрикции. В основу метода положено образование гетеродуплексов между синтетическим олигонуклеотидом, содержащим мутацию, и комплементарной однонитевой ДНК в составе вектора.

Поступают следующим образом. Синтезируют небольшой олигонуклеотид (8–20 мономеров), комплементарный той части гена, в которой хотят получить мутацию. В составе олигонуклеотида в центральной области допускают одну или несколько нуклеотидных замен. Клонировать исследуемый ген или его фрагмент в составе вектора на основе фага M13, чтобы получить кольцевые одноцепочечные рекомбинантные ДНК. Производят смешивание и отжиг рекомбинантных векторов с олигонуклеотидами. Происходит гибридизация олигонуклеотида с комплементарной областью, при этом некоплементарные нуклеотиды остаются неспаренными. Олигонуклеотид выполняет роль праймера в полимеразной реакции с участием ДНК-полимеразы *in vitro*. Кольцо замыкают лигазами. Полученная кольцевая молекула

вводится в клетки *E. coli*, где происходит частичная репарация мутантных участков и репликация. Частота мутаций обычно варьирует от 1 до 50%.

Отбор клеток, содержащих мутантные молекулы ДНК, можно производить несколькими способами, среди которых преимущественно имеет метод с использованием радиоактивно меченого олигонуклеотида, который применяется для мутагенеза. В данном случае этот нуклеотид служит зондом. Принцип использования такого зонда основан на том, что он полностью комплементарен мутантной ДНК и частично комплементарен ДНК дикого типа. Можно подобрать такие условия гибридизации (в первую очередь, температуру), при которых гибридизация меченого зонда будет стабильной только с мутантной последовательностью ДНК, что можно выявить на радиоавтографе.

Метод сайт-специфического мутагенеза особенно ценен тем, что позволяет изолировать мутации без контроля их фенотипического проявления. Этот метод открывает новые возможности исследования функций регуляторных элементов генов, позволяет изменять «силу» промоторов, оптимизировать сайты связывания с рибосомами и т. д. Одним из основных применений данной методологии является **белковая инженерия**.

Белковая инженерия. Этим словосочетанием обозначают комплекс методических приемов, которые позволяют создавать «неприродные» варианты белков и изучать их свойства. Чаще всего реконструируют молекулу белка путем направленного введения соответствующих мутаций в структурный ген и, следовательно, желаемых аминокислотных замен в первичную структуру белка. Кроме этого, с помощью белковой инженерии можно получать химерные белки, обладающие свойствами двух и более отдельных белков.

Накопление данных о первичной структуре белков (чаще по данным сиквенс-анализа), кристаллографических данных о трехмерной структуре белка, развитие методов моделирования белков по их аминокислотной последовательности позволяет со все большей определенностью создавать новые формы изучаемых белков. Рассмотрим некоторые работы, дающие представление об огромных возможностях данного направления молекулярной биологии и генетической инженерии.

Получение новых форм белков олигонуклеотид-направленным мутагенезом. Показательным примером конструирования более активных белков являются эксперименты А. Фершта и сотрудников с ферментом тирозил-тРНК-синтетазой из бактерий *Bacillus stearothermophilus*. Анализ последствий замен аминокислот в активном центре

этого фермента позволил заключить, что удаление групп, образующих с субстратом слабые водородные связи, может улучшить его сродство к субстрату. При этом обнаружено, что треонин-51 (занимает положение 51 в составе пептида) образует длинную и слабую водородную связь с кислородом кольца рибозы при связывании тирозиладенилата. В то же время обнаружено, что у бактерий *E. coli* такое же положение занимает пролин. Сайт-специфический мутагенез гена, определяющего структуру тирозил-тРНК-синтетазы *B. stearothermophilus*, позволил обеспечить замену *thr-51* → *pro-51* в пептиде. В результате резко улучшилось связывание АТР в активном центре фермента, а его каталитическая активность возросла в 25 раз.

Другим, не менее значимым примером реконструкции белка, имеющим практическое значение, является модификация субтилизина из *Bacillus amyloliquefaciens*, осуществленная Д. А. Эстеллом и соавторами. Субтилизины представляют собой сериновые протеиназы, секретируемые бациллами во внешнюю среду. Эти ферменты выпускаются биотехнологической промышленностью в крупных масштабах и широко используются в составе моющих средств. Недостатком субтилизинов является резкое уменьшение протеолитической активности под действием окислителей, в том числе содержащихся в стиральных порошках. Задача реконструкции молекулы субтилизина ВРН заключалась в стабилизации его к химическому окислению. В предварительных экспериментах было установлено, что в присутствии перекиси водорода субтилизин быстро снижает активность за счет окисления остатка метионина-222, превращающегося в соответствующий сульфоксид. Методами сайт-специфического мутагенеза была обеспечена замена этого остатка метионина на все остальные 19 белковых аминокислот. Плазмиды с мутантными генами вводили в штаммы с делециями в соответствующих генах и анализировали свойства продуцируемых субтилизинов. Достаточно стабильными к действию перекиси оказались мутанты с серином и аланином-222. Самым активным оказался мутант, содержащий остаток цистеина-222: его удельная активность на 38% превышала активность штамма дикого типа.

Создание белков с гибридными свойствами. В генетической инженерии большое внимание уделяют клонированию и изучению генов интерферона. Это обусловлено тем, что интерфероны представляют собой семейство белков, которые обладают широким спектром защитных функций, в частности такими, как подавление развития вирусных инфекций, ингибирование онкогенной пролиферации клеток, модулирование иммунного ответа организма. В зависимости от типа

клеток, которые их продуцируют, первичной структуры, физико-химических и других свойств интерфероны человека классифицируют на три группы – α , β и γ .

Для всех трех типов интерферона человека в настоящее время методами генетической инженерии созданы многочисленные суперпродукты, что позволяет получать эти белки в большом количестве и практически в индивидуальном состоянии (чего нельзя добиться при выделении интерферонов из природных источников). Особый интерес представляет группа α -интерферонов, т. к. их индивидуальные подтипы различаются по уровню противовирусной активности для разных вирусов. Поэтому была проведена серия экспериментов по созданию гибридных генов, кодирующих химерные (гибридные) α -интерфероны, в целях выявления функционально важных районов белковой молекулы. Гибридные гены экспрессировали в *E. coli*, выделяли синтезированные химерные белки и изучали их антивирусные свойства. Оказалось, что некоторые из них имеют существенно большую активность по сравнению с родительскими интерферонами.

Новые типы лечебных препаратов можно получить, если создать белок, обладающий биологическими активностями, свойственными двум или более неродственным белкам. В частности, М. Сено с соавторами (1986 г.) создали гибридный ген, который кодировал химерный белок, состоящий из 135 аминокислот человеческого γ -интерферона на N-конце (делеция 11 аминокислот с C-конца) и из 134 аминокислот интерлейкина-2 человека на C-конце (полная последовательность). Интерлейкины широко используют для терапии злокачественных новообразований и иммунных заболеваний. Иммунный интерферон соединили с интерлейкином через сегмент из 4 аминокислотных остатков. В клетках *E. coli* гибридный ген эффективно экспрессировался под контролем промотора p_{trp} . Выделенный химерный белок обладал активностями обоих родительских белков, и оба белка в составе химеры практически полностью сохраняли свою биологическую активность.

В числе других достижений белковой инженерии можно назвать исследования по выяснению трансформирующей активности онкобелков; изменение термостабильности ферментов, например получение термолабильного ренина и термостабильной α -амилазы; увеличение эффективности связывания инсулина соответствующим рецептором плазматической мембраны за счет замены гистидина на аспарат в положении 10 β -цепи гормона, а также множество других примеров. Большое количество продуктов белковой инженерии уже нашло практическое применение в производственных процессах.

3. КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

3.1. Принципы клеточной инженерии

Под клеточной инженерией понимают методы конструирования клеток нового типа на основе их *культивирования, гибридизации и реконструкции*. При гибридизации искусственно объединяют целые клетки с образованием гибридного генома. Клеточная реконструкция связана с созданием жизнеспособных клеток из отдельных фрагментов разных клеток (ядра, цитоплазмы, хромосом и др.).

Важное и перспективное направление клеточной инженерии – это выведение новых и улучшение существующих сортов растений и штаммов микроорганизмов, а также применение гибридной технологии к животным клеткам. Улучшение существующих сортов растений и штаммов микроорганизмов путем введения в их клетки ядерных или цитоплазматических генов как аспект применения клеточной инженерии в значительной мере дублирует генетическую инженерию. Например, признак устойчивости к гербициду атразину получили у культурных растений семейства крестоцветных в ходе переноса соответствующих цитоплазматических (хлоропластных) генов от сурепки при слиянии протопластов. О получении гибридных микроорганизмов при слиянии их протопластов уже говорилось.

Клеточная инженерия представляет собой эффективный способ модификации биологических объектов, позволяющий создавать новые ценные продуценты как на организменном, так и на тканевом и клеточном уровнях. Современная клеточная инженерия позволила обратиться на пользу человеку способности раковых клеток к неограниченному росту, превратив их в гибридомы – живые фабрики важнейших продуктов, в первую очередь моноклональных антител. В сопоставлении с генетической инженерией можно указать на более крупномасштабный характер транспорта информации между живыми организмами с применением клеточной инженерии. В клеточной инженерии в клетку вводят целые геномы (ядерный, хлоропластный, митохондриальный), в то время как генетическая инженерия в основном нацелена на передачу индивидуальных генов. Вместе с тем клеточная инженерия уступает генетической по уровню «интеллектуальной проработки» экспериментов: генноинженерные разработки позволяют прицельно передать от донора к реципиенту строго определенный ген, в то время как применение клеточной инженерии связано со значитель-

ной неопределенностью в судьбе хромосом, ядер в целом, цитоплазмы и ее органелл как в процессе слияния клеток, так и при последующем культивировании клеток-гибридов. Поэтому большинство разработок в области клеточной инженерии приходится на скрининг клеточной популяции для выявления клеток с желаемыми свойствами.

3.2. Клеточная инженерия растений

Культивирование клеток и тканей растений. Культуры клеток и тканей растений имеют ряд преимуществ перед традиционным растительным сырьем (дикорастущими или возделываемыми на плантациях растениями): они не зависят от внешних условий, условия их выращивания могут быть оптимизированы и стандартизированы, а процессы автоматизированы и компьютеризированы, кроме того, появляется возможность выращивания исчезающих видов растений. Примером может служить массовое клональное размножение плодово-овощных и декоративных растений. Кроме того, при таком способе культивирования расширяются возможности селекционной работы: можно получать клоны клеток, а затем и растения с запрограммированными свойствами. Помимо ценности для фундаментальных исследований, метод культуры тканей растений отличается широким использованием в сельском хозяйстве и промышленном производстве.

Культивирование клеток и тканей растений производят на специальных питательных средах, которые содержат все необходимые для их роста макро- и микроэлементы, углеводы, витамины и фитогормоны. Поскольку подобные питательные среды подходят и для роста микроорганизмов, культивирование осуществляют в условиях строгой асептики. В целом культура клеток и тканей растений аналогична культуре бактерий или других микроорганизмов. Применяются два основных способа культивирования – на твердых (агаризованных) и в жидких питательных средах.

Культура изолированных тканей растений на плотной среде обычно представлена *каллусными* и реже *опухолевыми* тканями. Каллусная ткань в естественных условиях (в природе) образуется в результате повреждения органов целого растения (эта ткань защищает место поранения, накапливает питательные вещества для анатомической регенерации или (и) регенерации утраченного органа), а в лабораторных условиях – при культивировании *эксплантов*. Эксплантом могут служить изолированные зародыши семян, верхушки или средние части стеблей, сегменты листьев и др. Предназначенные для куль-

тивирования экспланты стерилизуют химическими методами, а затем помещают на (или в) питательную среду.

Возникновение каллуса связано с неорганизованным делением (**пролиферацией**) дифференцированных клеток. В результате возникает совокупность **дедифференцированных** клеток – каллус. Обязательным условием процесса дедифференциации (утраты свойств, характерных для определенных тканей – листовой, корневой и др.) клеток первичного экспланта для большинства видов растений является присутствие в питательной среде двух групп фитогормонов – ауксинов и цитокининов. **Ауксины** (индолилуксусная кислота, нафтилуксусная кислота и др.) инициируют процесс дедифференциации клеток, а **цитокинины** (инетин, 6-бензиламинопурин, зеатин и др.) вызывают деление дедифференцированных клеток. Дедифференциация растительных клеток является важнейшим этапом получения активно делящихся культур. Дело в том, что глубоко специализированные (дифференцированные) клетки растений утрачивают способность к делению. Для того чтобы они ее вновь приобрели, необходимо вернуть их в меристематическое состояние, т. е. дедифференцировать.

Обычно через 4–6 недель на эксплантах появляется первичный каллус, который можно переносить на свежую питательную среду (субкультивировать). Таким образом получают длительную пересадочную каллусную культуру из любых живых тканей растения. Различно дифференцированные клетки переходят *in vitro* к сложному процессу дедифференциации, теряют присущую им структурную организацию и специфические функции и индуцируются к делению, образуя первичный каллус. В процессе субкультивирования формируется штамм, характеризующийся индивидуальными генетическими и физиологическими особенностями.

Растительные **опухоли** имеют опосредованное бактериями или вирусами происхождение. Превращение растительных клеток в опухолевые связано с проникновением в них *Ti*-плазмиды. Культуры опухолевых клеток при поверхностном и глубинном выращивании внешне мало отличаются от культур каллусных клеток. Значительным физиологическим различием между ними является гормон-независимость опухолевых клеток, позволяющая им делиться и расти на питательных средах без добавок фитогормонов или их аналогов. Опухолевые клетки также лишены способности давать начало нормально организованным структурам – корням или побегам в процессе органогенеза. В некоторых случаях они образуют **тератомы** – уродливые органоподобные структуры, нормальное развитие которых дальше не происходит.

Если каллусные или опухолевые ткани поместить в жидкую среду, можно получить суспензионную культуру, или суспензию клеток растений. Для такой суспензии очень важно перемешивание или встряхивание, которые обеспечивают аэрацию клеток, а также предотвращают образование крупных клеточных агрегатов. Из суспензии клеток снова можно получить каллусную или опухолевую культуры. Для этого суспензионную культуру необходимо профильтровать или осадить центрифугированием и перенести на плотную среду. Для глубинного культивирования растительных клеток применимы все способы глубинного культивирования микроорганизмов.

В суспензионной культуре клеток обнаружены традиционные для растений вещества вторичного метаболизма, а также выявлены новые, необычные соединения: алкалоиды, терпеноиды, гликозиды, полифенолы, полисахариды, эфирные масла, пигменты, пептиды. Например, с помощью промышленного культивирования суспензий растительных клеток производят некоторые ценные лекарственные препараты (сердечные гликозиды), продуцентами которых являются клетки соответствующих видов растений. Культивируемые в суспензии клетки могут применяться так же, как мультиферментные системы, способные к широкому спектру биотрансформаций веществ (окисление, восстановление, метилирование, гидроксילирование и др.).

Большой интерес вызывает **культивирование одиночных клеток растений**, которые применяются в клеточной селекции для отбора гибридных клеток и их клонирования (с последующим получением трансгенных растений), а также для генетических и физиологических исследований. Источниками отдельных (одиночных) клеток растений являются клеточные суспензии, мацерация тканей растений, а также изолированные протопласты после регенерации клеточной стенки. Заставить отдельные клетки растений делиться очень сложно. Растительные клетки, как правило, хорошо делятся только тогда, когда их содержание в каком-то объеме среды достаточно велико. Это связывают с присутствием так называемого **кондиционирующего фактора**, который выделяется в среду делящимися клетками. Природа его до конца не выяснена. Методы культивирования одиночных клеток растений основаны как раз на использовании эффекта кондиционирования. Для этого одиночные клетки культивируют в присутствии ткани «няньки», которая может представлять собой интенсивно делящуюся каллусную или суспензионную культуру, отделенную от клетки фильтром, или «кормящий слой», «подложку», полученные из инактивированных радиацией, но не убитых клеток суспензии.

Протопласты растений получают из клеток паренхимы листа, из каллусных и суспензионных культур. Для этого в гипертонической среде клетки обрабатывают целлюлолитическими и пектолитическими ферментами. Протопласты растений существуют непродолжительное время – сразу же после удаления ферментов на поверхности мембраны регенерируется клеточная стенка, клетка начинает делиться и образует клон. Протопласты растений – ценный объект для проведения генетических манипуляций. В них можно инъецировать рекомбинантную ДНК, эффективно проводить агробактериальную трансформацию. Можно сливать протопласты разных видов растений с целью получения так называемых соматических гибридов, многие из которых невозможно получить с помощью традиционных методов селекции.

Ценность методов культивирования тканей и клеток растений определяется тем обстоятельством, что с помощью специальных методов (изменения состава среды и условий культивирования) можно индуцировать процесс вторичной дифференциации, в результате которого удается регенерировать из каллуса или суспензии целое растение. Растения обладают уникальной способностью восстанавливать целый организм из отдельных фрагментов (например, черенков), органов, почек, клеток. В основе этого процесса лежит способность отдельной соматической клетки реализовывать программу развития, заложенную в ДНК, и давать начало целому организму (*тотипотентность* растительных клеток).

Тотипотентность – это неограниченная способность дифференциации: во все типы клеток, тканей и органов. Это важнейшее свойство эмбриональных стволовых клеток.

В ходе развития растения клетки отдельных органов приобретают свойства, характерные для соответствующих тканей. Однако несмотря на это, многие из них все-таки способны при определенных условиях редифференцироваться и давать начало новым органам или целым организмам. При культивировании клеток растений *in vitro* появляется возможность в значительно большей степени реализовать их тотипотентность, чем в составе целого растения. Это связано с тем, что в культуре *in vitro* по сравнению с целым растением не действует жесткая программа развития организма, отсутствует тесная взаимосвязь и взаимозависимость клеток отдельных органов и тканей. Можно целенаправленно управлять процессами дифференциации клеток.

Гибридизация и клеточная селекция растений. Основой клеточной инженерии является гибридизация соматических клеток – слияние неполовых клеток с образованием единого целого. Соматиче-

ская гибридизация имеет более широкие возможности для скрещивания филогенетически отдаленных организмов, чем половое скрещивание, при котором Природа допускает лишь строго определенные сочетания родительских форм.

Суть этого способа гибридизации заключается в том, что в качестве родительских используются не половые клетки (гаметы), а клетки тела (сомы) растений, из которых изолируют протопласты. И в отличие от полового скрещивания, где имеет место одностороннее исключение протоплазмы, при соматической гибридизации в образовавшемся гибриде оба партнера имеют более или менее равный цитоплазматический статус. Слияние протопластов способствует объединению двух различных цитоплазм. В большинстве исследований слияние протопластов высших растений приводит к образованию либо гибрида, либо цибрида. Цибридное растение содержит цитоплазму обоих партнеров, ядро одного партнера, поскольку в данном случае слияния ядер не происходит и одно ядро дегенерирует.

Спонтанному слиянию протопластов препятствует наличие поверхностного заряда на природных мембранах. Деполяризацию мембран обычно осуществляют электрическим или магнитным полем, часто отрицательный заряд на мембране нейтрализуют с помощью катионов, в частности Ca^{2+} , что способствует слиянию протопластов. Эффективными фузогенными агентами служат полиэтиленгликоль, поливиниловый спирт, нитрат натрия.

Для скрининга полученных гибридных клеток используют различные подходы:

- учет фенотипических признаков;
- создание селективных условий, в которых выживают только гибриды, объединившие геномы родительских клеток.

Следует отметить, что для отбора клеток с определенным фенотипом у растений, так же как и для микроорганизмов, возможно использование селективных сред. Например, если поместить растительные клетки на питательную среду, в которую добавлен антибиотик, то на ней будут расти только растительные клетки, обладающие устойчивостью к этому антибиотику. Манипулируя большим количеством генотипов (миллионы клеток, многие из которых способны дать начало целому растению, в пределах одной чашки Петри), можно эффективно отбирать отдельные редкие гибриды или мутанты, представляющие селекционный интерес.

Таким образом, клеточная селекция выступает самостоятельным и достаточно эффективным направлением сельскохозяйственной био-

технологии. Для селекции мутантов можно индуцировать генетическую изменчивость в популяции. При этом условия культивирования изолированных клеток сами по себе являются мощным мутагенным фактором. Изменчивость каллусных культур можно усилить с помощью традиционных мутагенов – радиации, УФ, химических мутагенов.

На практике клеточную селекцию используют для отбора мутантов и гибридов, устойчивых к гербицидам, стрессовым воздействиям (засолению, повышенной и пониженной температуре), аналогам аминокислот (так получают **растения-регенеранты**, продуцирующие в десятки и сотни раз больше незаменимых аминокислот, чем обычные формы). Растение-регенерант – это растение, которое образуется в процессе регенерации из культуры клеток или тканей, например из каллуса.

Клеточная селекция также является одним из важных этапов создания генноинженерных растительных организмов.

Клеточная реконструкция. Таким словосочетанием обозначают приемы введения в протопласты растений изолированных органелл других клеток. Показана, в частности, возможность введения в протопласты растений ядер и хлоропластов других растений. При этом ядра часто гибридизовались, в результате чего возникали особи с гибридными свойствами, а чужеродные хлоропласты наследовались реконструированными клетками. Эти работы привели авторов к заключению, что перенос хлоропластов может использоваться для выведения новых форм хозяйственно важных сортов растений. Включение, например, высокоэффективных хлоропластов может способствовать активации фотосинтеза и повышению продуктивности растения.

3.3. Клеточная инженерия животных

Культивирование клеток и тканей животных. Список животных клеток и тканей, которые в настоящее время удается культивировать *in vitro*, достаточно велик: элементы соединительной ткани (фибробласты), скелетные ткани (кости и хрящи), сердечные и гладкие мышцы, эпителиальные ткани (печень, легкие, кожа, мочевого пузыря, почки), клетки нервной системы (нейроны), эндокринные клетки (надпочечники, гипофиз), различные типы опухолевых клеток и др.

В настоящее время словосочетание «культура ткани» превратилось в общее понятие, включающее в себя как органную культуру (культуру органов), в которой небольшие фрагменты ткани или целые эмбриональные органы эксплантируются с сохранением тканевой архитектуры, так и культуру клеток, когда ткани диспергируются меха-

нически, ферментативно или путем спонтанной миграции клеток из экспланта, и клетки размножаются в виде суспензии или монослоя, прикрепившихся к субстрату клеток. Различия между органной и клеточной культурами состоят в следующем: органная культура сохраняет межклеточные взаимодействия, в течение долгого периода поддерживает гистологическую и биохимическую дифференциацию и после эксплантации, как правило, остается в нерастущем состоянии в течение нескольких дней или даже недель. Эти культуры не способны к размножению. Культуры клеток, напротив, лишены структурной организации, теряют характерную гистиотипическую архитектуру и связанные с ней биохимические признаки. Клетки в культурах размножаются, что обеспечивает получение большой их массы, и могут быть сохранены путем замораживания.

Клетки большинства культур размножаются в форме монослоя, прикрепившись к стеклу или пластиковому субстрату. Некоторые культуры, главным образом трансформированные клетки, кроветворные клетки и асцитные опухоли, могут размножаться в суспензиях.

Источниками культуры тканей животных могут быть как эмбриональные ткани, которые характеризуются лучшей выживаемостью и более активным ростом, так и соответствующие взрослые ткани (у них более высоко содержание неделящихся специализированных клеток). Начало культурам тканей могут давать нормальные и опухолевые ткани. Нормальные ткани, как правило, дают начало культурам с ограниченным временем жизни, тогда как культуры клеток, полученные из опухолей, способны пролиферировать неограниченно долгое время.

Пролиферация (от лат. *proles* – отпрыск, потомство и *fero* – несу) – увеличение числа клеток (или только геномов) путем митоза, приводящее к росту ткани. В раннем эмбриогенезе происходит непрерывно, по мере дифференциации периоды между делениями удлиняются. Некоторые дифференцированные клетки, например нервные, не способны к пролиферации.

Нормальные клетки растут обычно как недифференцированные **стволовые клетки** или клетки-предшественники, и наступление дифференциации в такой культуре часто сопровождается полным прекращением пролиферации клеток. В культурах, полученных из опухолей, возможна, по крайней мере, частичная дифференциация при сохранении способности к пролиферации.

Стволовая клетка – недифференцированная клетка, способная к самообновлению и дифференциации в специализированные клетки.

Стволовые клетки образуются в костном мозге и других органах. Они используются организмом для устранения повреждений и восстановления поврежденных тканей, что имеет место в результате травм, болезней, некоторых системных нарушений клеток мышечной, костной, нервной или другой ткани. Получив сигнал о травме, организм вводит стволовые клетки в кровеносное русло, направляет к «неполадке» и превращает их в необходимые в данный момент клетки – костные, мышечные, печеночные и даже нервные. Иными словами, стволовые клетки – это клетки, еще не получившие специализацию или, говоря профессиональным языком, не прошедшие дифференциацию. Поэтому они могут дифференцироваться в «нужные» в данный момент организму клетки. Запас стволовых клеток в организме не безграничен и быстро теряется с возрастом. Доля стволовых клеток, способных к дифференциации, в костном мозге в момент рождения человека – одна на 10 тысяч кроветворных клеток. У подростков она уже в 10 раз меньше, к 50 годам – одна на полмиллиона, в 70 лет – лишь одна на миллион.

К счастью, стволовые клетки могут быть внесены в организм искусственно. В последние годы опубликовано много работ, подтверждающих, что стволовые клетки, попадая на поврежденные участки самых разных органов, превращаются в клетки именно того типа, который необходим, чтобы залечить повреждение. В пораженном инфарктом сердце они преобразуются в клетки сердечной мышцы – миоциты, в пораженном инсультом головном мозге – в нейроны и глиальные клетки. Стволовые клетки могут превращаться в клетки печени, костного мозга и т. д.

Основы науки о стволовых клетках были заложены около 30 лет тому назад советскими учеными А. Я. Фриденштейном и И. Л. Чертковым. В 1999 г. эти клетки «переоткрыли» американские ученые, затем последовало лавинообразное возрастание интенсивности работ в этой области. Такого прорыва в медицине не было со времен открытия пенициллина, т. к. человечество приблизилось к получению «лекарства» от физических травм, паралича, цирроза, инсульта, инфаркта, болезни Паркинсона, инсулин-зависимого диабета, болезни Альцгеймера, последствий травм спинного мозга и многих других болезней, ранее считавшихся неизлечимыми. В далекой перспективе – полное восстановление или замена поврежденных органов, причем без иммунного отторжения, возникающего при трансплантации, поскольку такие клетки являются для организма родными.

Различают несколько типов стволовых клеток в зависимости от степени их дифференциации. Оплодотворенная яйцеклетка называет-

ся *тотипотентной*, т. е. способной дать начало всему организму. В ходе развития она делится на несколько одинаковых тотипотентных клеток, которые иногда расходятся и дают начало монозиготным (однояйцевым) близнецам.

На ранней стадии эмбрионального развития образуется бластоцист – полый шар, стенки которого состоят из клеток. Клетки внешних слоев дают начало плаценте, а внутренних – тканям организма. Каждая из внутренних клеток способна дать начало большинству тканей, но не целому организму, поскольку в них блокирована информация о плаценте. Такие клетки называются *плюрипотентными*. По мере дальнейшего развития эмбриона специализация клеток усиливается, и стволовые клетки уменьшают свой потенциал к превращениям. Теперь они могут давать начало лишь нескольким тканям. Такие клетки называются *полипотентными*.

Таким образом, эмбриональные стволовые клетки – это плюрипотентные клетки из внутреннего слоя бластоциста, развившиеся в первые дни после оплодотворения. Из них можно получить любой орган и любую ткань взрослого организма. Эмбриональные стволовые клетки впервые культивировал в 1998 г. американский ученый Дж. Ф. Томсон, который обнаружил, что из стволовых клеток, пересаженных мыши, формируются разнообразные ткани. Ожидается, что с помощью стволовых клеток с использованием технологии клонирования, схожей с технологией клонирования овечки Долли, можно будет выращивать на заказ человеческие органы или части органов (например, сердечные клапаны), которые не будут отторгаться организмом реципиента. Теоретически такие возможности предсказывались давно, но только теперь, в связи с прорывом в методологии культивирования тканей животных, начинают рассматривать их практическое использование.

Вопрос о том, где можно брать эмбриональные стволовые клетки, требует этической проработки. Потенциальных возможностей две – абортивный материал при естественном и искусственном оплодотворении. Известно, что при каждой успешной беременности, которая приводит к рождению живого ребенка, теряется несколько эмбрионов. Потеря некоторых из них вызвана генетическими аномалиями развития, а других – внешними физическими факторами или физиологическим либо психологическим состоянием матери. Очевидно, природа предопределила появление «лишних» эмбрионов почти в каждой беременности.

Другим источником стволовых *полипотентных* клеток являются некоторые ткани, например найденные в бороздках мозга (с их помо-

щью лечили повреждения сетчатки глаз крыс); в костном мозге (при введении в сердце крысы они дифференцировались в новую ткань сердечной мышцы); в волосяных фолликулах взрослого организма (давали начало клеткам кожи, использованным для трансплантации); в протоках поджелудочной железы (с их помощью излечен инсулин-зависимый диабет у мышей); в крови из пупочного канатика (показали хорошие результаты при лечении лейкемии и инсульта у крыс); откачанный жир (из его полипотентных стволовых клеток удалось вырастить хрящевую, мышечную и жировую ткани с использованием разных питательных сред). Исследование стволовых клеток из выпавших детских зубов показало, что они могут превращаться в клетки будущих зубов, одонтобласты, а также нервные и жировые ткани.

Как видно, использование неэмбриональных стволовых клеток довольно перспективно. Однако есть ограничения, которые заставляют исследователей обратить внимание именно на эмбриональные стволовые клетки. Во-первых, стволовые клетки взрослого человека не плюрипотентны, а полипотентны, т. е. из них можно получить не любые органы и ткани организма, а только определенные. Во-вторых, в процессе развития организма его клетки подвержены различным генетическим нарушениям: соматические мутации, влияние вирусов и многое другое. Такие нарушения могут быть незаметны в стволовых клетках, однако могут сказываться на функции органов и тканей. Согласно К. Н. Янковскому, длина ДНК в организме человека в тысячу раз превышает расстояние от Земли до Солнца (2 набора по $1,5 \text{ м}$ в $5 \cdot 10^{13}$ клетках, т. е. 10^{14} м). От материнского наш геном отличают 100 новых генеративных мутаций. «Папину» половину нашего генома от «маминой» отличают 2 000 000 «старых» мутаций (многим мутациям более 1 млн. лет).

Гибридизация клеток животных. Наиболее перспективным направлением клеточной инженерии в настоящее время является получение *гибридом*. Основная цель – «обессмертить» клетку, продуцирующую ценные вещества, путем слияния с раковой клеткой и клонирования полученной гибридной линии.

Гибридома – это гибридная клеточная линия, полученная при слиянии нормальных и миеломных клеток. Обладает способностью к неограниченному росту и синтезу моноклональных антител. **Миеломная клетка** – это клетка злокачественной опухоли иммунной системы.

Гибридомы получены на основе клеток – представителей различных царств живого. Слияние клеток растений, обычно медленно растущих в культуре, с клетками растительных опухолей позволяет по-

лучить клоны быстрорастущих клеток – продуцентов нужных соединений. Но наиболее многообразны и широко востребованы применения гибридной технологии к животным клеткам, где с ее помощью получают неограниченно размножающиеся продуценты гормонов и белковых факторов крови. Наибольшее практическое значение имеют гибридомы – продукты слияния клеток злокачественных опухолей иммунной системы (миелом) с нормальными клетками той же системы – лимфоцитами.

При попадании в организм животного или человека чужеродного агента – бактерий, вирусов, «чужих» клеток или просто сложных органических соединений – лимфоциты мобилизуются для обезвреживания введенного агента. Имеется несколько популяций лимфоцитов, функции которых различаются. Существуют так называемые Т-лимфоциты, среди которых выделяются Т-киллеры («убийцы»), непосредственно атакующие чужеродный агент с целью его инактивации, и В-лимфоциты, основная функция которых состоит в продукции иммунных белков (иммуноглобулинов), узнающих чужеродный агент. В-лимфоциты вырабатывают иммунные белки, представляющие собой антитела к чужеродному агенту – антигену.

Ни Т-, ни В-лимфоциты не могут воспроизводиться в культуре. Однако слияние Т-лимфоцита-киллера с опухолевой клеткой дает клон неограниченно размножающихся клеток, отслеживающих определенный антиген – тот, к которому был специфичен взятый для гибридизации Т-лимфоцит. Подобные Т-киллерные гибридные клоны используют в борьбе с раковыми клетками в организме больного.

При слиянии В-лимфоцита с миеломной клеткой получают В-гибридные клоны, широко применяемые как продуценты антител, специфических к тому же антигену, что и антитела, синтезируемые породившим клон В-лимфоцитом, т. е. **моноклональных антител**. Моноклональные антитела однородны по своим свойствам, они обладают одинаковым сродством к антигену и связываются с одной единственной антигенной детерминантой молекулы-мишени (**эпитопом**). В этом состоит важное преимущество моноклональных антител – продуктов В-гибридом перед антителами, получаемыми без применения клеточной инженерии, путем иммунизации лабораторного животного избранным антигеном – **поликлональными антителами**. Поликлональные антитела выделяют из сыворотки крови иммунизированного животного или получают в результате непосредственного взаимодействия антигена с популяцией лимфоцитов в культуре ткани. В итоге получается смесь антител (поликлональный препарат), раз-

личных по специфичности и сродству к одному и тому же антигену, что объясняется участием в выработке антител различных клонов В-лимфоцитов и наличием у антигена нескольких эпитопов, каждый из которых соответствует особому типу антител. Основными недостатками поликлональных антител являются следующие: содержание отдельных антител в поликлональном препарате варьирует от одной партии к другой; их нельзя применять, если необходимо различить две сходные мишени, т. е. когда патогенная (мишень) и непатогенная (**не**-мишень) формы различаются единственной детерминантой. Наоборот, моноклональные антитела избирательно связываются лишь с одной антигенной детерминантой, что имеет большое практическое значение для распознавания и лечения заболеваний, вызываемых чужеродными агентами – бактериями, грибами, вирусами, токсинами, аллергенами и собственными трансформированными (раковыми) клетками. Моноклональные антитела также успешно и широко применяют в аналитических целях для изучения клеточных органелл и биомолекул, тестирования лекарственных препаратов, оценки и мониторинга разных онкологических заболеваний, идентификации и контроля патогенных микроорганизмов, для иммунологического скрининга продуктов генов.

Общая схема получения гибридом на основе миеломных клеток и иммунных лимфоцитов включает следующие этапы.

1. Получение мутантных опухолевых клеток, погибающих при последующей селекции гибридомных клеток. Стандартным подходом является выведение линий миеломных клеток, не способных к синтезу ферментов запасных путей биосинтеза пуринов и пиримидинов из гипоксантина и тимидина соответственно. Отбор таких мутантов опухолевых клеток проводят с применением токсических аналогов гипоксантина и тимидина. В среде, содержащей эти аналоги, выживают только мутантные клетки, которые лишены ферментов, необходимых для запасных путей биосинтеза нуклеотидов.

2. Получение лимфоцитов – продуцентов антител к заданным антигенам. Животное (мышь, реже крысу, кролика) иммунизируют введением антигена в брюшную полость, внутривенно или подкожно. Для получения человеческих антител прибегают к иммунизации лимфоцитов человека в культуре ткани.

3. Слияние лимфоцитов с опухолевыми клетками. Фузогенным фактором служит полиэтиленгликоль, вирус Сендай, мощное электрическое поле. Предварительно клетки обрабатывают проназой, нейраминидазой.

4. Скрининг гибридных клеток. Применяют селективную среду ГАТ, содержащую аминоптерин, блокирующий синтез нуклеотидов по основным путям, и предшественники запасных путей биосинтеза – гипоксантин и тимидин. На этой среде родительские миеломные клетки погибают как генетически дефектные по ферментам запасных путей биосинтеза нуклеотидов. Родители-лимфоциты, не слившиеся с миеломными клетками, тоже погибают, поскольку они не способны расти вне организма в заданных условиях. Выживают только гибридные клетки, сочетающие в себе способность к неограниченному росту и синтезу нуклеотидов по запасным путям.

5. Проверка способности гибридных клеток продуцировать моноклональные антитела к заданному антигену. Для этого используют иммуносорбентный анализ. Образец культуральной жидкости с гибридными клетками каждого из полученных типов вводят в реакцию с соответствующим антигеном, прочно закрепленным на носителе (например, на пластиковой планшете с лунками). Антигеном в данном случае может являться образец, в котором хотят обнаружить специфическую молекулу или микроорганизм. Планшетку промывают, чтобы удалить несвязавшиеся молекулы *первого антитела* (они продуцируются гибридами). Для распознавания комплекса антиген – антитело к используемым антителам получают *вторые антитела* путем иммунизации этим иммуноглобулином лабораторного животного (например, иммуноглобулин мыши вводят в организм козы). Эти вторые антитела ковалентно связывают с каким-либо ферментом (например, с щелочной фосфатазой, уреазой или пероксидазой). Если вырабатываемые гибридомой антитела действительно связывают данный антиген, то добавление к ним вторых антител с пришитым ферментом ведет к образованию комплекса антиген – моноклональное антитело – антитело к моноклональному антителу – фермент. Последующее добавление неокрашенного субстрата, соответствующего ферменту, запускает ферментативную реакцию, протекание которой регистрируется по образованию окрашенного продукта.

Существуют разновидности этого метода, в частности радиоиммунный и иммунофлуоресцентный анализ. Здесь антитела к иммуноглобулинам несут не фермент, а радиоактивную или флуоресцирующую метку.

6. Тестирование гибридом. Лунки исходной планшеты, в которой проводился иммуносорбентный анализ и которые дали положительную реакцию с изменением цвета (в иммуноферментном анализе), могут содержать смесь слившихся клеток. Чтобы получить линии, про-

исходящие от одной клетки (клоны) и отличающиеся стабильностью по признаку образования антител, клеточную суспензию из таких лунок разводят культуральной средой и высевают в другие лунки. После культивирования полученных клонов среды вновь тестируют, определяя, какая из клеточных линий (гибридом) продуцирует моноклональные антитела, распознающие антиген-мишень. Эта процедура называется *клонированием гибридомных клеток*. Каждый клон, стабильно продуцирующий моноклональное антитело, можно поддерживать в культуре практически бесконечно. Кроме того, образцы можно заморозить в жидком азоте и использовать их в дальнейшем как источник клеток.

В настоящее время получен целый ряд моноклональных антител, которые используются для обнаружения различных соединений и патогенных микроорганизмов.

Альтернативой гибридомной технологии получения моноклональных антител являются генноинженерные методы их получения.

4. ПРИМЕНЕНИЕ ДОСТИЖЕНИЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

4.1. Конструирование и применение ГМ-микроорганизмов

Методами генетической инженерии удается усилить полезные для самых разных сфер народного хозяйства свойства микроорганизмов, а также сконструировать новые формы, не существующие в окружающей среде. Это очень важное условие применения микроорганизмов в промышленности, поскольку производства, основанные на использовании микроорганизмов, оказываются рентабельными лишь при условии применения высокопродуктивных штаммов-продуцентов. Кроме высокой продуктивности микроорганизмы должны обладать и другими полезными свойствами, обеспечивающими ведение технологического процесса. Сюда относятся скорость роста, устойчивость к повышенной температуре и кислотности среды, фагоустойчивость, стабильность наследования признаков, способность усваивать дешевые и доступные субстраты и др.

Рассмотрим отдельные сферы применения усовершенствованных микроорганизмов в народном хозяйстве.

Получение с помощью микроорганизмов низкомолекулярных коммерческих продуктов.

Производство аминокислот. Аминокислоты (АК) широко применяются в пищевой промышленности как усилители вкуса и аромата (аланин, аспартат, глутамат), как пищевые добавки и антиоксиданты; в сельском хозяйстве в качестве кормовых добавок; в медицине для терапии послеоперационных больных, при лечении язв, бронхитов и др.; в химической промышленности в качестве исходных веществ при синтезе полимеров и производстве косметических средств.

Ежегодно в мире производится более 800 000 т аминокислот, большую часть которых составляет *L*-глутаминовая кислота, которая используется для получения широко известного усилителя вкуса и аромата – глутамата натрия.

Стоит отметить, что лидирующие позиции в получении высокопродуктивных штаммов бактерий, синтезирующих избыточные количества аминокислот, долгое время принадлежали российской школе генетиков, возглавляемой вначале Сосом Исааковичем Алиханьяном, а позже – Вадимом Георгиевичем Дебабовым. Эти работы начаты во ВНИИ Генетика в 60-е гг. XX в., а в 80-е гг. получены патенты на про-

дуценты треонина, которые были проданы в Японию – страну, где впервые стали получать АК методом микробной ферментации. Конечно, поначалу селекционная работа с бактериями целиком основывалась на классических методах – индуцированном мутагенезе *in vivo* и последовательном насыщении генома бактерий определенными мутациями. Стоит остановиться на этих достижениях более подробно.

Первыми объектами для селекции служили бактерии *Corynebacterium* и *Brevibacterium* spp. – неспорулирующие грамположительные почвенные бактерии, отличительной особенностью которых является природная способность продуцировать избыточные количества глутаминовой кислоты. Основным направлением работы с коринебактериями являлось получение мутантов и совмещение мутаций в одной клетке. Основными типами мутаций являлись следующие:

- регуляторные мутации, которые обеспечивают генетическую дерепрессию или десенсибилизацию ферментов биосинтетического пути. Их отбирают по признаку устойчивости к структурным аналогам АК, а иногда и среди ревертантов ауксотрофных мутантов. Аналогоустойчивость сопровождается также нарушением транспорта АК в клетку;

- мутации по неспособности к образованию метаболита – ингибитора синтеза нужной АК;

- мутации, приводящие к блокированию синтеза метаболита, расходуемого общим с нужной АК предшественником;

- мутации по неспособности к дальнейшему метаболическому превращению АК (их отбирают по ауксотрофности).

Стратегия традиционной селекции состояла в следующем: индуцировали мутации в геномах бактерий, отбирали перспективные мутантные бактерии, определяли биохимическую природу мутаций, совмещали мутации в одной клетке, пользуясь системами генетического обмена. Необходимо подчеркнуть, что подобный подход позволил получить продуценты практически всех протеиногенных АК с уровнем продуктивности 15–100 г/л, что дало возможность организовать в бывшем СССР крупнотоннажное производство ряда АК (лизин, глутамат, треонин и др.).

В то же время в середине 70-х гг. накопились серьезные достижения молекулярной генетики и генетической инженерии, которые создали реальные предпосылки для замены традиционных методов и объектов селекции продуцентов АК методами конструирования штаммов. Объектом этих работ стала кишечная палочка как наиболее изученный на то время микроорганизм: для этой бактерии известны

молекулярные механизмы репликации ДНК, транскрипции и трансляции, регуляции активности разных генов, лучше всего разработаны приемы генетического обмена и трансформации. Рассмотрим эти методы на примере триумфального процесса получения продуцентов треонина во ВНИИГенетика.

У штамма дикого типа *E. coli* К 12 среди мутантов, устойчивых к аналогу треонина, был отобран штамм MG442, у которого продукция треонина (3 г/л на среде с 3% глюкозы) была обусловлена по меньшей мере тремя мутациями:

1) *thrA442*, которая делает гомосериндегидрогеназу не чувствительной к ингибированию треонином;

2) *ilvA442* в гене *ilvA*, кодирующем треониндезаминазу – первый фермент на пути превращения треонина в изолейцин. Этот мутантный блок является неполным (*leaky*-мутация) и приводит к резкому снижению сродства треониндезаминазы к треонину. Мутация снижала превращение треонина в изолейцин и ослабляла мультивалентную репрессию треонинового оперона;

3) *relA* (реверсия), обеспечивающей восстановление строгого контроля синтеза РНК.

Затем треониновый оперон из штамма MG442 был клонирован в составе мультикопийного вектора *pBR322* и возвращен в родительский штамм MG442 (амплификация генов), в который предварительно с помощью трансдукции ввели мутацию в гене *thrC*, сделав этот штамм ауксотрофным по треонину, и в гене *ilvA* (ауксотрофность по изолейцину). Это обеспечивало стабильное наследование плазмиды клетками на синтетической среде без треонина, а также супрессию ауксотрофности по изолейцину (за счет сверхпродукции треонина). Полученный штамм накапливал в культуральной жидкости (КЖ) до 20 г/л треонина, что почти в 2 раза лучше достижения того времени (1981 г.).

В дальнейшем этот штамм был существенно усовершенствован:

– отобран вариант со слизистым характером колоний с повреждениями в гене *lon*, что выражалось в стабилизации ферментов, обеспечивающих сверхсинтез треонина;

– получены мутации, активирующие процесс аммонирования (усвоения неорганического аммония);

– с помощью конъюгации в него введены расположенные на плазмиде гены, контролирующие усвоение сахарозы и, следовательно, дешевого субстрата – мелассы. В дальнейшем было установлено, что детерминанты усвоения сахарозы расположены в транспозоне *Tn2555*, и была проведена его интеграция в хромосому реципиента;

– усовершенствованы условия ферментации, что привело к созданию рекордного процесса биосинтеза *L*-треонина, при котором за 30–40 ч ферментации накапливается до 70 г/л треонина с конверсией сахара в целевой продукт, превышающей 40%.

Гомосерин является предшественником треонина и метионина. Это соединение находит применение в фармацевтической промышленности, а также в производстве лизина микробным синтезом, поскольку промышленные продуценты лизина – это штаммы коринебактерий, ауксотрофные по гомосерину.

Для получения штамма – сверхпродуцента гомосерина требуется активная работа генов, кодирующих только аспартокиназу и гомосериндегидрогеназу, а последующее превращение гомосерина в треонин должно быть заблокировано. Поэтому гибридная плаزمиды, несущая весь треониновый оперон, была подвергнута интенсивному мутагенезу *in vitro* гидроксиламином. После трансформации штамма *E. coli*, несущего мутацию в гене *thrB*, были отобраны клетки, продуцирующие гомосерин в большом количестве, – пример эффективности локализованного мутагенеза.

Производство витаминов. Другой пример успешного использования методологии генетической инженерии для создания промышленного продуцента первичного метаболита – это конструирование продуцента витамина В₂ (рибофлавина) на базе *Bacillus subtilis*. Сконструирован специальный вектор для клонирования генов в бациллах. Семь генов, ответственных за биосинтез рибофлавина, сгруппированы у *Bacillus subtilis* в одном участке ДНК размером 6,3 кДа. Мутации, дерепрессирующие активность рибофлавинового оперона, были получены путем селекции штаммов, устойчивых к аналогам рибофлавина. Клонирование мутантного рибофлавинового оперона на плазмидном векторе с последующей селекцией привело к созданию штамма *Bacillus subtilis*, способного за 25–35 ч ферментации в условиях аэрации продуцировать в КЖ 3,5–4,5 г/л витамина В₂. В качестве источника углерода используется сахароза или меласса. Для сравнения гриб *Erethothecium ashbyi*, который использовался в СССР для промышленного получения рибофлавина, за 70 ч ферментации образует всего 2 г/л витамина В₂.

Еще один пример касается получения витамина С (*L*-аскорбиновой кислоты). В настоящее время для крупномасштабного получения витамина С используют трудоемкий процесс, включающий одну микробиологическую стадию и несколько химических; исходный субстрат – *D*-глюкоза (рис. 4.1).

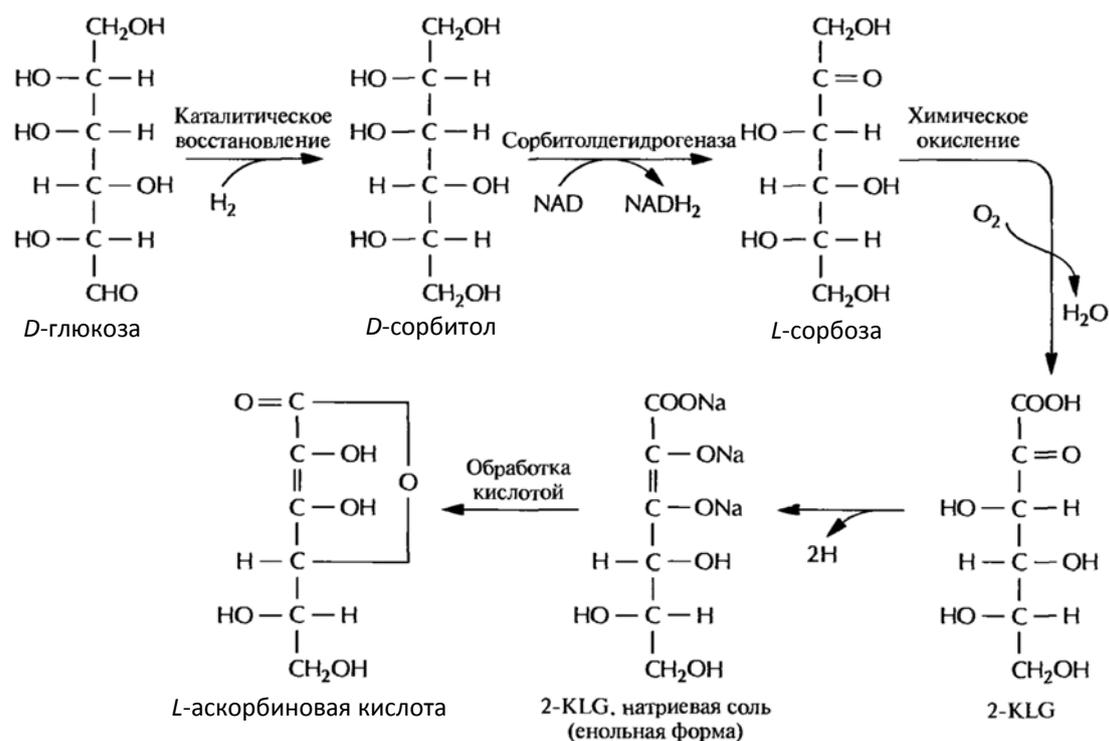


Рис. 4.1. Промышленное получение аскорбиновой кислоты:
 D-глюкоза → каталитическое восстановление до D-сорбитола → окисление с помощью сорбитолдегидрогеназы (клетки *Acetobacter suboxydans*) в L-сорбозу → химическое окисление в 2-кето-L-гулоновую кислоту (2-КЛГ) → перевод в натриевую соль 2-КЛГ → обработка кислотой до образования L-аскорбиновой кислоты

Оказалось, что 2-КЛГ можно получить и другим путем: бактерии *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Erwinia* могут превращать глюкозу в 2,5-дикето-D-глюконовую кислоту, а другие (*Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Arthrobacter*) – преобразовывать это соединение в 2-КЛГ.

Можно было бы усовершенствовать существующую технологию совместным культивированием названных бактерий, но это не всегда возможно, т. к. они растут при разных рН, температуре и т. п. Последовательное культивирование не позволит сделать процесс непрерывным. Наилучший выход – создание гибридного штамма, сочетающего в себе гены обеих бактерий. Выяснено, что *Erwinia herbicola* осуществляет превращение глюкозы в 2,5-дикето-D-глюконовую кислоту в ходе нескольких стадий (разные ферменты), а *Corynebacterium* sp. превращают 2,5-дикето-D-глюконовую кислоту в 2-КЛГ в одну стадию (рис. 4.2). Поэтому проще перенести ген 2,5-дикето-D-глюконовой кислоты-редуктазы *Corynebacterium* sp. в эрвинии и создать новый микроорганизм.

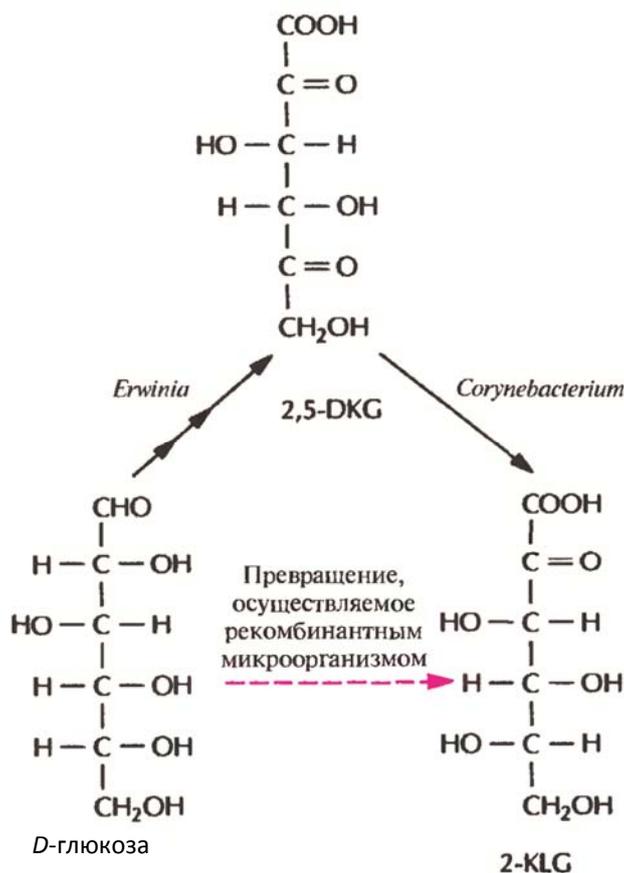


Рис. 4.2. Микробный синтез 2-КЛГ

Из *Corynebacterium* sp. выделили и очистили 2,5-дикето-*D*-глюконовой кислоты-редуктазу и определили последовательность ее первых 40 N-концевых аминокислот. Исходя из этих данных синтезировали два 43-нуклеотидных гибридизационных зонда, соответствующих разным частям белковой молекулы. Зонды использовали для скрининга банка генов *Corynebacterium* sp. Выделили клон, содержащий ген 2,5-дикето-*D*-глюконовой кислоты-редуктазы, и секвенировали ген. Нуклеотидные последовательности, расположенные до стартового кодона ATG, вырезали и заменяли их сигналами транскрипции и трансляции, функционирующими в *E. coli*, поскольку регуляторные последовательности грамположительных микроорганизмов типа *Corynebacterium* spp. не функционируют в клетках кишечной палочки. Полученную конструкцию вводили в *E. coli* (при этом синтезировалась активная редуктаза), а затем переклонировали в векторе с широким кругом хозяев и трансформировали им *Erwinia herbicola*.

Трансформированные клетки эрвиний активно превращали *D*-глюкозу непосредственно в 2-КЛГ. Полученный гибрид приобрел

способность синтезировать конечный продукт комбинированного метаболического пути. Позже была увеличена коммерческая ценность редуктазы путем аминокислотных замен, повышающих ее каталитическую активность и термостабильность.

Исходя из аминокислотной последовательности этого фермента была воссоздана его вторичная структура, состоящая из восьми параллельных β -слоев, перемежающихся восьмью α -спиралями, которые соединялись с β -слоями петлями разной длины (рис. 4.3).

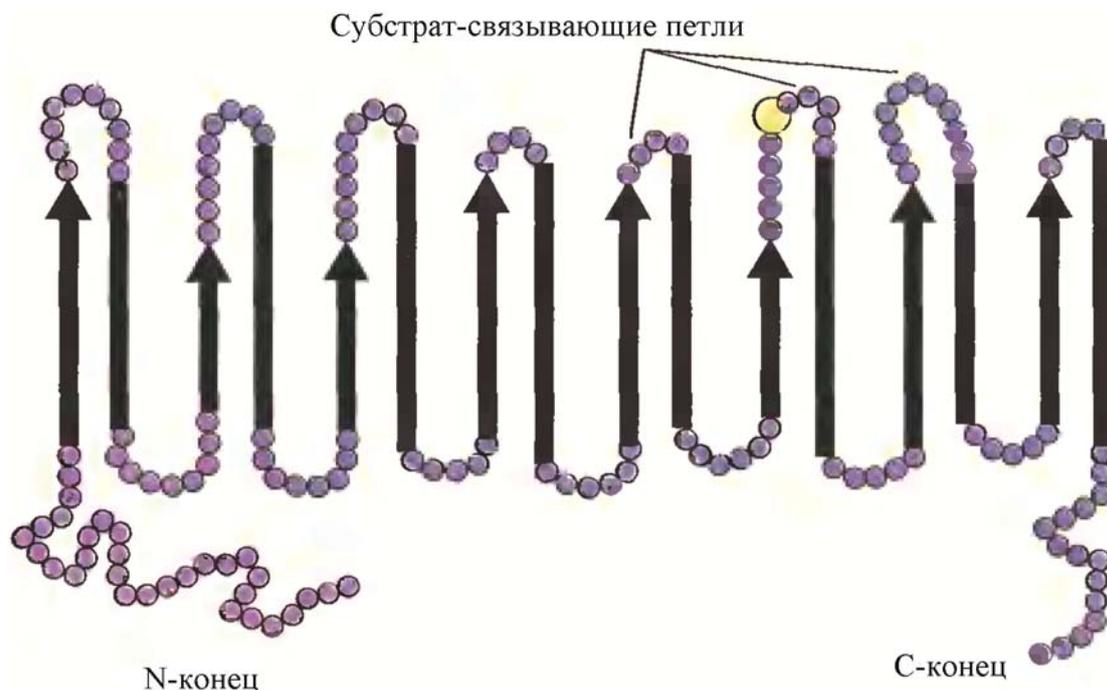


Рис. 4.3. Структура 2,5-дикето-*D*-глюконовой кислоты-редуктазы, воссозданная исходя из ее аминокислотной последовательности (стрелки – β -слои; полоски – α -спиральные участки; кружки – аминокислотные остатки; желтый кружок – 192-й аминокислотный остаток)

Такой характер укладки полипептидной цепи был установлен для 17 других ферментов с уже известной кристаллической структурой, и по аналогии с ними были идентифицированы три петли, предположительно участвующие в связывании субстрата. С помощью олигонуклеотид-направленного мутагенеза было получено 12 мутантных белков, каждый из которых содержал одну аминокислотную замену в одной из петель. Двенадцатая мутантная форма, у которой остаток глутамина в положении 192 был заменен на аргинин, была примерно в 2 раза более активной. Замена глициновых остатков в положениях 55

и 57 на аланиновые позволила получить более термостабильный фермент по сравнению с нативной формой (пример белковой инженерии).

Получение этанола и фруктозы. Как известно, рентабельность тех или иных биотехнологических производств во многом зависит от стоимости сырья, что диктует использование таких недорогих возобновляемых источников углерода и энергии, как крахмал и целлюлоза. Их много в зерне и картофеле, которые часто служат сырьем для получения этанола и фруктозы.

Одной из дорогостоящих стадий получения названных продуктов в данном случае становится «осахаривание» – гидролиз поли- и олигосахаридов до глюкозы. В случае использования крахмала желированное дробленое зерно обрабатывают последовательно α -амилазой (гидролизует доступные α -1,4-связи в крахмале с образованием олигосахаридов) и глюкоамилазой (гидролизует олигосахариды до глюкозы, ее основная функция – расщепление поперечных сшивок в декстринах). Полученная глюкоза может затем сбраживаться дрожжами в этанол или изомеризовать во фруктозу с помощью глюкоизомеразы. Таким образом, стоимость производства этанола и фруктозы в основном определяется стоимостью ферментов, которые обычно используются однократно.

Рассмотрим пути повышения эффективности названных процессов с помощью молекулярной биотехнологии.

Из клеток грибов *Aspergillus awamori* выделили полноразмерную кДНК глюкоамилазы и встроили в одну из плазмид дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* под контроль промотора дрожжевого гена енолазы. В результате отобран штамм дрожжей с глюкоамилазной активностью, способный в лабораторных условиях превращать растворимый крахмал в этанол. Для усовершенствования этого штамма проделаны следующие манипуляции:

- из промотора енолазы удалили область отрицательного контроля транскрипции;

- дрожжевую гибридную плазмиду изменили, удалив сайт инициации репликации и встроив сегмент ДНК, гомологичный участку хромосомы дрожжей, превратив ее тем самым в интегрирующий вектор, который встраивается в хромосому и стабильно поддерживается в клетке;

- полученную плазмиду перенесли в другой штамм дрожжей, устойчивый к высокой концентрации этанола.

Все эти события позволили увеличить выход этанола из растворимого крахмала в 3 раза по сравнению с природными амилолитическими дрожжами *Saccharomyces diastaticus*.

Изомеризация глюкозы во фруктозу – обратимая реакция, конечное содержание образующейся фруктозы находится в прямой зависимости от температуры, которая в большинстве производственных процессов составляет примерно 60°C. Повысив температурный оптимум и термостабильность изомеразы, можно увеличить выход фруктозы.

Из термофильных бактерий *Thermus thermophilus* выделена глюкоизомераза, которая активна и стабильна при 95°C. Поскольку природный штамм термофилов продуцирует ее в малых количествах, ген глюкоизомеразы клонировали на плазмидном векторе под контролем разных промоторов и осуществили его экспрессию в бактериях *E. coli* и *B. brevis*. В клетках *B. brevis* удалось добиться превышения в 1000 раз исходной активности фермента.

Еще одна возможность увеличения активности термостабильной глюкоизомеразы состоит в повышении ее субстратной специфичности. В одном из таких экспериментов исследовался фермент (глюкоизомераза – это, по сути, ксилозо/глюкоизомераза с двумя активностями: превращение *D*-ксилозы в *D*-ксилулозу и *D*-глюкозы в *D*-фруктозу) бактерий *Clostridium thermosulfurogenes*. С помощью сайт-специфического мутагенеза заменяли нуклеотиды в составе соответствующего гена. Выбор сайтов для модификации основывался на данных об участии соответствующих АК в связывании субстрата. Замена триптофага-139 на фенилаланин или валина-186 на треонин приводила к повышению активности фермента в отношении глюкозы в 1,7 и 2,6 раза соответственно и к ее уменьшению по отношению к ксилозе в 2 и 7 раз. При одновременной замене двух АК каталитическая активность в отношении глюкозы повысилась в 5,7 раза, а в отношении ксилозы снизилась в 4,5 раза. Это пример белковой инженерии; полученный продуцент можно использовать для промышленного производства фермента.

Получение с помощью микроорганизмов лекарственных препаратов.

Производство антибиотиков. Среди вторичных метаболитов, получаемых с помощью микроорганизмов, в биотехнологических производствах лидируют антибиотики. Ежегодно в мире производится 100 000 т антибиотиков на сумму около 5 млрд. долларов, при этом более 100 млн. долларов приходится на долю антибиотиков, вносимых в корм скоту в качестве добавок или ускорителей роста.

Под **первичными метаболитами** понимают продукты обмена (углеводы, белки (в т. ч. ферменты), аминокислоты, нуклеиновые кислоты и их составляющие, липиды, витамины, кофакторы), которые

образуются **во всех** живых организмах в процессе роста и развития и являются **жизненно необходимыми** для клеток веществами.

В противоположность первичным различают **вторичные метаболиты** – продукты вторичного обмена, вещества, не являющиеся обязательными для роста или функционирования клетки, но синтезирующиеся в определенной фазе роста клетки или организма (для микробных культур – в стационарной фазе). Вторичные метаболиты обычно участвуют в защите клеток или организмов от тех или иных воздействий. К их числу относят антибиотики, фенолы, алкалоиды, терпеноиды, стероиды, токсины и др. Наибольшее число вторичных метаболитов образуется растениями, для микроорганизмов самыми распространенными вторичными метаболитами являются антибиотики.

В настоящее время известно более 6000 антибиотиков (АБ), выделенных из разных микроорганизмов. Они обладают разной специфичностью действия (различные мишени в клетках разных микроорганизмов) и разными механизмами действия. Непрерывно ведется поиск новых АБ в связи с тем, что их широкое использование вызывает быстрое распространение АБ-устойчивых патогенных микроорганизмов. По разным оценкам, каждый год ученые обнаруживают от 100 до 200 новых АБ, но применение находят только те из них, которые имеют большую терапевтическую ценность и экономический интерес. На их долю приходится 1–2% всех обнаруживаемых АБ. Большой эффект здесь может дать технология рекомбинантных ДНК. Во-первых, с ее помощью можно создавать новые АБ с уникальной структурой, оказывающие более мощное воздействие на определенные микроорганизмы и обладающие минимальными побочными эффектами. Во-вторых, генноинженерные подходы могут использоваться для увеличения выхода АБ и, соответственно, снижения стоимости их производства.

Рассмотрим некоторые достижения в данной области биотехнологии. С помощью генной инженерии можно не только создавать новые АБ, но и увеличивать эффективность синтеза уже известных. Лимитирующим фактором в промышленном производстве АБ с помощью *Streptomyces* spp. (эти бактерии синтезируют подавляющее большинство основных АБ) часто является количество доступного клеткам кислорода. Вследствие плохой растворимости кислорода в воде и высокой плотности культуры *Streptomyces* spp. его часто оказывается недостаточно, поэтому рост и метаболизм замедляются и выход АБ снижается. Для решения этой проблемы усовершенствуют реакторы, а также создают генноинженерные штаммы стрептомицетов, более эффективно использующих молекулярный кислород.

Известно, что некоторые дышащие микроорганизмы для выживания в условиях недостатка O_2 прибегают к синтезу гемоглобин-подобного продукта, способного аккумулировать кислород и доставлять его в клетки. В частности, аэробные бактерии *Vitreoscilla* sp. синтезируют гомодимерный гемсодержащий белок, функционально подобный гемоглобину. Ген *Vitreoscilla* sp., кодирующий данный белок, клонировали в плазмидном векторе для стрептомицетов и трансформировали бактерии *Streptomyces coelicolor*. Ген экспрессировался, и на долю химерного белка приходилось примерно 0,1% всех клеточных белков *Streptomyces coelicolor*. Трансформированные клетки, растущие при низком содержании растворенного кислорода (примерно 5% от насыщающей концентрации), синтезировали в 10 раз больше антибиотика актинородина на 1 г сухой клеточной массы и имели большую скорость роста, чем нетрансформированные.

Еще один пример демонстрирует возможности генетической инженерии для создания новых, не существующих (или до сих пор неизвестных) в природе путей биосинтеза АБ. Так, исходным материалом при химическом синтезе некоторых цефалоспоринов – антибиотиков с незначительным побочным эффектом, активных против множества бактерий, – является 7-аминоцефалоспоровая кислота (7АСА), которая в свою очередь синтезируется из АБ цефалоспорина С. К сожалению, природные микроорганизмы, способные синтезировать 7АСА, до сих пор не выявлены. Зато сконструирован новый биосинтетический путь посредством включения специфических генов в плазмиду гриба *Acremonium chrysogenum*, который обычно синтезирует только цефалоспорин С. Один из этих генов был представлен кДНК гриба *Fusarium solani*, которая кодировала оксидазу D-аминокислот, а другой ген происходил из геномной ДНК *Pseudomonas diminuta* и кодировал цефалоспоринацилазу. В плазмиде гены находились под контролем промотора *Acremonium chrysogenum*. На первом этапе нового биосинтетического пути цефалоспорин С превращается в 7-β-(5-карбокسي-5-оксопентанамид)-цефалоспоровую кислоту (кето-AD-7АСА) при помощи оксидазы D-аминокислот. Часть этого продукта, вступая в реакцию с пероксидом водорода, одним из побочных продуктов, превращается в 7-β-(4-карбоксібутанамид)-цефалоспоровую кислоту (GL-7АСА). И цефалоспорин С, и кето-AD-7АСА, и GL-7АСА могут подвергаться гидролизу цефалоспоринацилазой с образованием 7АСА, однако только 5% цефалоспорина С напрямую гидролизуются до 7АСА. Следовательно, для образования 7АСА с высоким выходом необходимы оба фермента (рис. 4.4).

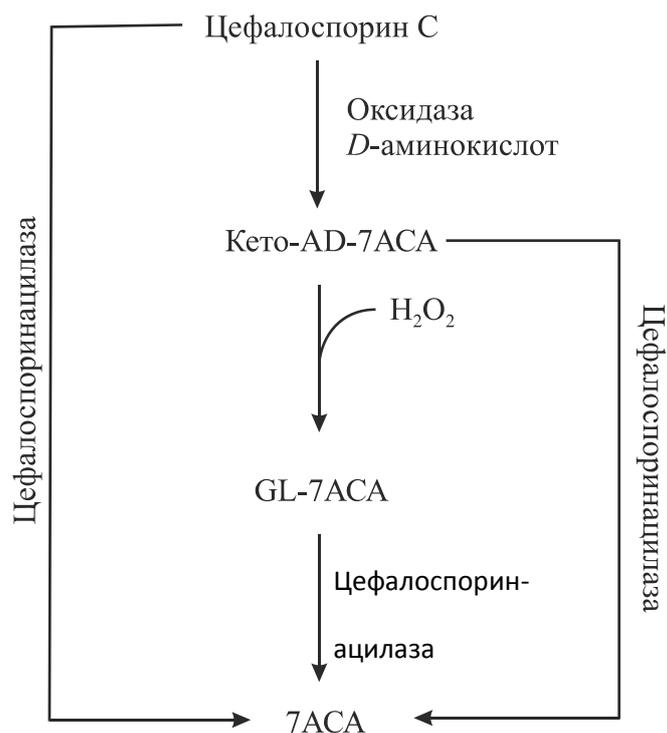


Рис. 4.4. Генетически сконструированный путь биосинтеза 7АСА из цефалоспорина С

С помощью технологии рекомбинантных ДНК можно получать новые антибиотики с уникальными свойствами, манипулируя генами, участвующими в биосинтезе уже известных АБ. В одном из таких экспериментов в бактериях *Streptomyces* sp. объединили два немного различающихся пути биосинтеза антибиотика, введя в него плазмиду с клонированными на ней генами, определяющими альтернативный путь синтеза подобных (родственных) АБ. В результате трансформированные бактерии синтезировали новый АБ – медерродин А. Это явление объясняют тем, что один из промежуточных продуктов одного биосинтетического пути становился субстратом для фермента другого пути.

Получение интерферонов. Об интерферонах человека уже шла речь в теме «Белковая инженерия». Напомним, что интерфероны – группа белков с рядом общих свойств, главным из которых является способность при контакте с клетками вызывать в них устойчивость к вирусной инфекции. Интерфероны позвоночных, в т. ч. человека, разделяют на три группы – α -, или лейкоцитарные, β -, или фибробластные, и γ -, или иммунные. Они различаются структурой молекул, рядом биологических свойств и типом клеток, которые их продуцируют в организме.

При выделении кДНК интерферонов пришлось преодолеть трудности, связанные с недостаточным содержанием соответствующих мРНК и белков. Процедура выделения кДНК состояла в следующем:

- из лейкоцитов человека выделили мРНК и фракционировали ее по размерам; провели обратную транскрипцию и встроили в сайт *Pst* плазмиды *pBR322*;

- полученным вектором трансформировали *E. coli*. Отобрали 6000 клонов и разделили их на 12 групп;

- каждую группу клонов гибридизовали с неочищенным препаратом мРНК (интерферонной);

- из гибридов, содержащих мРНК и клонированную ДНК, выделили мРНК и провели ее трансляцию в бесклеточной системе синтеза белка;

- определили интерферонную противовирусную активность каждой смеси, полученной в результате трансляции. Группы, проявившие интерферонную активность, содержали клон с кДНК, гибридизовавшийся с мРНК (интерферонной);

- позитивные группы разбили на 8 подгрупп, содержащих по 64 клон, и вновь провели тестирование. Повторяли такую процедуру до тех пор, пока не идентифицировали клон, содержащий полноразмерную мРНК (интерферонную) человека.

Когда необходимо получить большое количество интерферона, соответствующую кДНК субклонировать в экспрессирующем векторе *E. coli*, который позволяет достичь высокого уровня экспрессии.

Получение человеческого инсулина. Инсулин представляет собой гормон, секретируемый клетками поджелудочной железы в кровь и участвующий в углеводном обмене. Процесс синтеза инсулина в клетках осуществляется в ходе нескольких стадий: вначале на рибосомах образуется препроинсулин, который содержит сигнальный пептид, направляющий пептидную цепь внутрь эндоплазматического ретикула. Там отщепляется сигнальный пептид и замыкаются дисульфидные мостики – формируется проинсулин. Последний поступает в аппарат Гольджи и депонируется в клеточных везикулах, где в ходе отщепления С-пептида (33 аминокислотных остатка) образуется зрелый инсулин. Молекулы зрелого инсулина состоят из А- и В-цепей, соединенных дисульфидными мостиками.

Чистый инсулин необходим в большом количестве для лечения диабета. До недавнего времени гормон приходилось получать дорогостоящим и трудоемким способом из поджелудочной железы живот-

ных. Этот инсулин вызывал ответную реакцию – образование антител. В настоящее время инсулин человека получают с помощью сверхсинтеза бактериями, сконструированными методами генетической инженерии. Инсулин стал первым коммерческим генноинженерным продуктом, продуцируемым бактериями, разрешенным к широкому применению в терапии диабета.

Ген инсулина млекопитающих содержит интрон, поэтому для клонирования нельзя было использовать сам ген, т. к. бактерии не способны к сплайсингу. Оставалось две возможности – использовать кДНК, полученную копированием проинсулиновой мРНК, либо синтезировать кодирующие последовательности химическим путем. На самом деле осуществлены оба эксперимента, при этом клонирование в бактериях проинсулиновой кДНК приводило к образованию предшественника гормона, который не мог превратиться в клетках *E. coli* в зрелый инсулин, поскольку в них не осуществляется необходимый специфический посттрансляционный процессинг. Для получения инсулина нужна была дополнительная стадия ферментативного расщепления проинсулина *in vitro*. В другом, более результативном эксперименте нуклеотидные последовательности, кодирующие A- и B-цепи инсулина, синтезировали химически. Для этого вначале определили последовательность аминокислот в A- и B-цепях инсулина и предсказали последовательность нуклеотидов во фрагментах ДНК на основании генетического кода. A-фрагмент содержал 69 п. н.: 60 п. н. – кодирующая часть, плюс стартовый (ATG) и терминирующий (TGA) кодоны. Фрагмент B содержал 96 п. н. (рис. 4.5).

Стартовые метиониновые кодоны вводили в состав фрагментов гена инсулина для того, чтобы можно было отделить цепи инсулина от прокариотических аминокислотных последовательностей (N-участок β -галактозидазы).

Для экспрессии клонированных генов инсулина в клетках кишечной палочки осуществляли встраивание каждого синтезированного фрагмента в плазмидный вектор под контроль β -галактозидазного промотора. Данный регуляторный элемент выбран неслучайно. Уже упоминалось, что эукариотические белки, накапливаясь в клетках прокариот в больших количествах, тормозят их рост в основном из-за токсичности, а также деградируются протеазами. В таких случаях полезным может оказаться выращивание бактериальных клеток до высокой плотности, после чего их индуцируют к синтезу продукта.

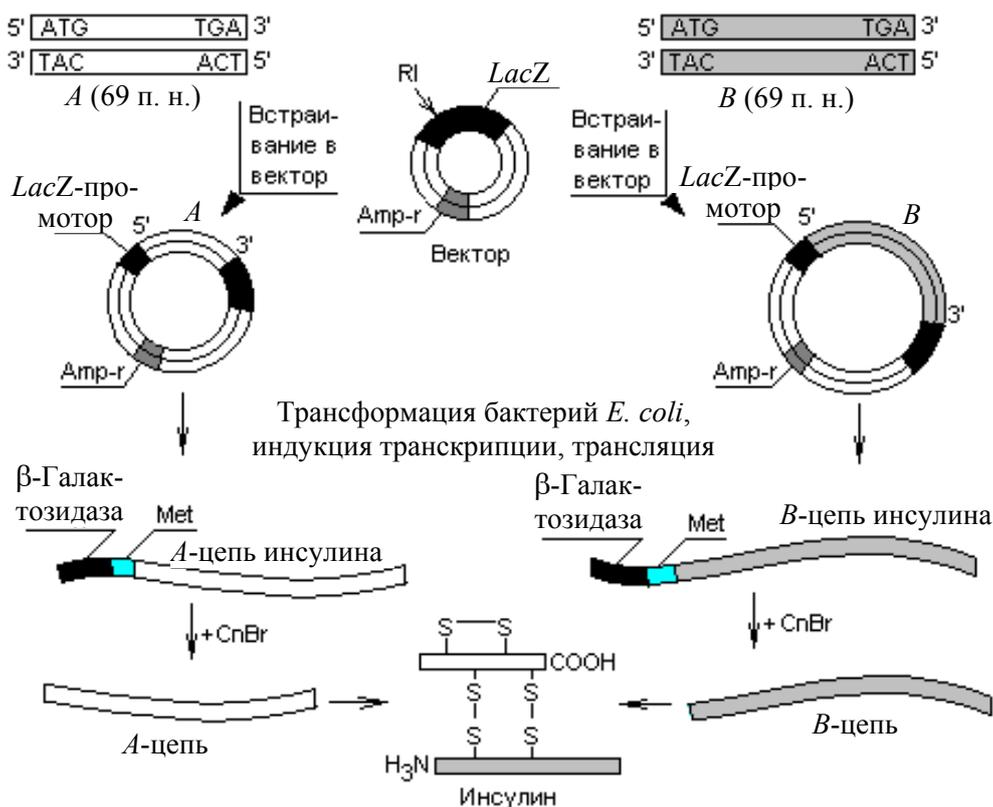


Рис. 4.5. Схема процесса образования человеческого инсулина бактериями *E. coli*: RI – рестриктаза типа I; CnBr – цианогенбромид

Известно, что лактозный оперон *E. coli* регулируется по типу индукции, т. е. инкубирование клеток с рекомбинантными ДНК в отсутствие индуктора позволяет им быстро достичь необходимой плотности популяции (инсулиновые гены не транскрибируются), а когда в культуральную жидкость вносят индуктор (изопропилтиогалактозид), клетки начинают массово синтезировать цепи инсулина.

Итак, компетентные клетки *E. coli* трансформировали гибридными векторами и отбирали потомство на среде с ампициллином (рис. 4.5). В трансформированных бактериях синтезировались предшественники A- и B-цепей инсулина. С помощью цианогенбромида, разрушающего метионин и с меньшей эффективностью триптофан, от предшественников отщепляли короткий β -галактозидный участок вместе с одним остатком метионина (эти белки не содержат других остатков метионина и триптофана).

После очистки A- и B-цепи смешивали в условиях, способствующих образованию прочных бисульфидных связей, в результате чего получался чистый человеческий инсулин.

Разработка методов генетической инженерии изменила структуру и содержание современной промышленной микробиологии. Во-первых, значительно возросла продуктивность микроорганизмов, используемых для синтеза биологически активных веществ (сайт-специфический мутагенез в области регуляторных элементов генов, амплификация генов, введение в геном новых кодирующих последовательностей и т. п.). Во-вторых, появилась возможность менять питательные потребности продуцентов, придавать им устойчивость к определенным факторам окружающей среды, повышать их конкурентоспособность, скорость роста и др. Наконец, изменилась сама логика промышленной микробиологии: ранее для обнаруженного вновь продуцента какого-либо метаболита создавались методы и средства его биотехнологической эксплуатации, теперь появилась возможность воспользоваться только геном или группой генов нового штамма и перенести их в адаптированный для производства соответствующей категории веществ, хорошо изученный микроорганизм.

Производство моноклональных антител с помощью *E. coli*. Гибридомы, подобно большинству других клеточных культур животных, растут относительно медленно, не достигают высокой плотности, требуют сложных и дорогих сред. Поэтому получаемые таким способом моноклональные антитела слишком дороги, чтобы их можно было массово использовать. Удешевить продукт можно, создав «биореакторы» – генетически модифицированные бактерии, животные, растения.

Последовательность операций при создании бактериальных продуцентов моноклональных антител:

1. Из *B*-лимфоцитов, вырабатывающих антитела мыши или человека, выделяют мРНК.
2. К мРНК синтезируют кДНК.
3. Проводят раздельную ПЦР-амплификацию кДНК, кодирующих *H*- и *L*-цепи.
4. С помощью рестриктаз встраивают фрагменты кДНК в вектор на основе фага λ (фрагменты *H*- и *L*-цепей различаются по величине) – клонирование множества фрагментов *H*- и *L*-цепей.
5. Объединяют фрагменты кДНК *H*- и *L*-цепей в одном векторе. Получают комбинаторную библиотеку, содержащую все возможные сочетания фрагментов *H*- и *L*-цепей с экспрессией соединенного фрагмента в одном векторе. На этом этапе в одном векторе образуется широкий спектр генов различных антител. Некоторые из них кодируют уникальные сайты связывания, получить которые методом гибридомной технологии было бы невозможно. Пул антител млекопитающих

включает 10^6 – 10^8 разных антител. Фаговая библиотека содержит примерно столько же клонов. Поэтому можно ожидать, что одна комбинаторная библиотека будет вырабатывать такое же количество разных антител, как любое млекопитающее. Кроме того, один раз создав библиотеку, можно комбинировать *H*- и *L*-цепи и получать фрагменты АТ (участки связывания), распознающие необычные эпитопы. Еще большего разнообразия добиваются с помощью сайт-специфического мутагенеза.

6. Скрининг бляшек для выявления антиген-связывающей активности (например, с помощью ферментного иммуносорбентного анализа). Синтез *H*- и *L*-цепей происходит во время литического цикла фага λ .

7. Вырезание из вектора части плазмидной ДНК, фланкирующей вставку, и трансформация этой ДНК клеток *E. coli*.

4.2. Создание и использование генетически модифицированных растений

После разработки методики трансформации растений исследователи стали пытаться вводить различные растительные и бактериальные гены в клетки самых разных растений. При этом использовали специально подобранные растительные промоторы (например, промотор гена малой субъединицы рибулозодифосфат карбоксилазы).

Для отбора трансформированных растений используют маркеры. Однако трансгенные растения, предназначенные для культивирования в окружающей среде и употребления в пищу, не должны содержать маркерных генов, поскольку последние могут обуславливать синтез аллергенов или токсичных веществ, а гены устойчивости к антибиотикам могут попасть в геномы патогенных микроорганизмов.

Поэтому были разработаны приемы получения трансгенных растений без каких-либо маркеров.

1. Растение котрансформируют двумя разными ДНК (одна – с маркером, вторая – с интересующим экспериментатора геном). Какая-то часть трансформированных растений может получить оба гена, которые, однако, интегрированы в разные сайты хромосомальной ДНК. После отбора трансформантов маркерный ген можно удалить из трансгенного растения с помощью обычного скрещивания.

2. Селективный маркерный ген встраивают между растительными мобильными элементами (*Ds*-элементами) и такую конструкцию вводят в Т-ДНК вместе с геном транспозазы, которая вырезает участок ДНК между *Ds*-элементами и перемещает его в другой хромосомальный сайт (рис. 4.6). В процессе встраивания Т-ДНК в ДНК растения-

хозяина в 90% случаев селективный маркер, находящийся между двумя *Ds*-элементами, оказывается в другом сайте хромосомальной ДНК, при этом с вероятностью 50% этот сайт находится далеко от исходного. В таком случае селективный маркер может быть удален при скрещивании.



Рис. 4.6. Схематическое представление Т-ДНК, входящей в состав вектора:
Л и П – левая и правая фланкирующие последовательности

Основными целями создания трансгенных растений являются:

- расширение спектра сортов;
- получение высокоурожайных растений, устойчивых к насекомым-вредителям, микроорганизмам, гербицидам, неблагоприятным условиям;
- замедление старения растений;
- изменение качества и пищевой ценности растительных продуктов;
- использование растений в качестве «биореакторов» для производства биологически активных веществ.

Выведение устойчивых к различным факторам растений.

Для получения растений, *устойчивых к насекомым-вредителям*, применяли следующие подходы.

1. Использование *протоксина Bacillus thuringiensis*. Это безопасное средство защиты, поскольку, попадая в окружающую среду, он теряет активность. Задача сводится к созданию трансгенного растения, синтезирующего активную форму бактериального инсектицида в количестве, достаточном для защиты растения от вредителя.

Перенесли гены *Bacillus thuringiensis*, ответственные за синтез инсектицидных белков, в растения табака, хлопка, томатов и обнаружили, что они практически не экспрессируются в растениях. Решали возникшую проблему так:

- подстраивали гены под сильный растительный промотор;
- исследовали разные протоксины, продуцируемые различными штаммами бацилл, сопоставляя их аминокислотные последовательности. Установили, что N-концевые участки консервативны, а С-концевые – переменны, а также что вся инсектицидная активность токсина обеспечивается первыми 646 N-концевыми аминокислотами;

– участок гена протоксина, кодирующий высококонсервативную последовательность, клонировали, экспрессировали в бактериях. Установили, что по отношению к насекомым отряда чешуекрылых он столь же активен, как и нативный белок;

– укороченным геном трансформировали растения томата, где ген включался в хромосомальную ДНК – растения проявляли устойчивость к вредителям, но не столь выраженно, чтобы можно было обойтись без дополнительных обработок;

– усовершенствовали ген: химический синтез с заменой кодонов на привычные растению, усовершенствованные сигналы транскрипции и трансляции – растения синтезировали в 100 раз больше токсина по сравнению с таковыми, содержащими ген дикого типа.

2. Ген протоксина вводили не в хромосомальную, а в хлоропластную ДНК. Такой подход обеспечивает следующие преимущества: во-первых, вводимый ген не надо модифицировать, т. к. транскрипционный и трансляционный аппараты хлоропластов – прокариотического типа; во-вторых, на одну клетку приходится много хлоропластов, что повышает дозу гена в растении; В-третьих, хлоропласты передаются только через яйцеклетку, а не через пыльцу, так что растения наследуют хлоропластную ДНК по материнской линии и нет риска нежелательного переноса трансгенов с пыльцой на другие растения.

Одна из форм гена протоксина уже введена и экспрессируется в таких растениях, как томат, табак, картофель, рис, кукуруза, яблоня, баклажан, люцерна, орех, тополь, ель, клюква и хлопок. В США получено разрешение на коммерческое использование *Bt*-картофеля, устойчивого к колорадскому жуку, а также *Bt*-хлопка и кукурузы, которые занимают основную долю в общем объеме генетически модифицированных растений этих культур, выращиваемых на полях США.

Кроме генов протоксина для создания устойчивых к насекомым растений используют растительные гены ингибиторов протеиназ. Это часть защитной системы самого растения: эти белки, попадая в организм растения, препятствуют гидролизу растительных белков. Проведены эксперименты по выделению растительных генов ингибиторов протеиназ. Они снабжены сильными промоторами и возвращены в растения, которые приобрели устойчивость к насекомым-вредителям.

Точно так же поступают с геном ингибитора α -амилазы (из фасоли), геном холестеролоксидазы (из бактерий; фермент катализирует окисление стероидов с образованием перекиси водорода и активен против личинок хлопкового долгоносика, у которых разрушает мембраны эпителиальных клеток средней кишки).

Растения, устойчивые к вирусам. Вирусы растений часто причиняют значительный ущерб растениям и существенно снижают урожай. Чтобы не прибегать к обработке культур химическими препаратами, селекционеры попытались перенести природные гены устойчивости к вирусам от одной линии растений к другой. Однако устойчивые растения часто вновь становятся чувствительными, а устойчивость к одному вирусу не гарантирует устойчивости к другим.

Природный иммунитет к вирусным инфекциям обуславливается разными причинами: блокированием проникновения вируса в растение, предотвращением его распространения и др. Чтобы получить устойчивые к вирусам растения, проводили их «иммунизацию» вирусными генами, кодирующими белки капсида, другими вирусными белками или антисмысловыми последовательностями вирусного генома.

Если в трансгенном растении экспрессируется ген, кодирующий белок капсида вируса, который обычно инфицирует это растение, то способность вируса проникать в растение и распространяться в нем значительно снижается. Лежащий в основе механизм точно не установлен (есть предположения, что вирусный белок блокирует процесс «раздевания» вирионов либо, взаимодействуя с вирусной РНК, ингибирует ее трансляцию и/или взаимодействие с некими структурами клетки), однако ясно, что противовирусное действие начинает проявляться на ранних стадиях репликации вируса, так что вирусные частицы не образуются. Это снижает вероятность возникновения спонтанных вирусных мутантов, способных к репликации в присутствии вирусного белка капсида. С помощью этого подхода были получены устойчивые к различным вирусам трансгенные растения множества разных культур: тыква, табак, рис, томат, люцерна, огурец, картофель. Более того, обнаружилось, что ген белка капсида одного вируса иногда обеспечивает устойчивость к широкому кругу неродственных вирусов.

Молекула РНК, комплементарная транскрипту нормального гена (мРНК), называется антисмысловой, а сама РНК, участвующая в трансляции, – смысловой. Антисмысловая РНК образует дуплекс с мРНК, блокируя трансляцию, так что в ее присутствии синтез белкового продукта соответствующего гена уменьшается. Кроме того, дуплекс антисмысловая РНК – мРНК быстро деградируется, что уменьшает содержание вирусной мРНК в клетке. Поэтому еще одним способом выведения устойчивых к вирусам сортов растений является введение в растение гена, обеспечивающего синтез антисмысловых РНК, комплементарных мРНК вирусных белков капсидов. Эта методология обеспечивает лишь частичную (неполную) защиту от вирусных инфекций.

Защита растений от патогенных вирусов может осуществляться также при участии противовирусных белков, синтезируемых самим растением. Например, в клеточной стенке фитолакки американской присутствуют три разных противовирусных белка. Если их выделить из водных экстрактов измельченных тканей растения и нанести на листья других растений, последние тоже окажутся устойчивыми к нескольким вирусам. Выделенную из фитолакки кДНК вводили в геном табака и картофеля с помощью бинарных векторов на основе *Ti*-плазмид. Трансформанты приобретали некоторую (неполную) устойчивость к вирусам.

Растения, устойчивые к грибам и бактериям. Получены трансгенные растения, синтезирующие в большом количестве хитиназу (гидролизует β -1,4-связи в молекулах N-ацетилглюкозамина – основного компонента клеточной стенки грибов), а также β -глюканазу (это собственные защитные белки растения). Такие растения приобрели высокую устойчивость к грибным заболеваниям.

Фитопатогенные бактерии *Erwinia carotovora* наносят ущерб растениеводству (особенно страдает картофель). Выделены трансгенные растения картофеля, активно экспрессирующие ген лизоцима фага T4. При этом лизоцим секретировался в апопласт (межклеточное пространство), где как раз и распространяется *Erwinia carotovora*. Растения приобрели устойчивость к фитопатогенным эрвиниям.

Растения, противостоящие неблагоприятным воздействиям и старению. В отличие от животных, растения не могут защитить себя от неблагоприятных воздействий (высокая освещенность, УФ, высокие температуры, концентрация солей и др.). Поэтому в процессе эволюции у них выработались механизмы устойчивости к этим факторам.

1. **Окислительный стресс.** Наиболее распространенным радикалом кислорода, представляющим опасность для растений, является супероксид-анион. Фермент супероксид-дисмутаза нейтрализует это соединение, превращая его в пероксид водорода, который в свою очередь превращается в воду любой из множества клеточных пероксидаз или каталаз. В одном из экспериментов получены трансформированные растения табака, несущие ген супероксид-дисмутаза под контролем сильного промотора. Они синтезировали этот фермент и были устойчивы к повреждающему действию радикалов кислорода. У растений появлялось еще одно преимущество – устойчивость к гербициду метилвиологену и к световому воздействию. Супероксид-дисмутаза способствует также сохранению срезанных цветов при транспортировке (их увядание тоже происходит в результате образования радикалов кислорода).

2. *Солевой стресс*. Многие растения произрастают в условиях, где часто бывают засухи или сильно засолена почва. Чтобы приспособиться к этим условиям, они синтезируют нетоксичные вещества – осмопротекторы. Эти вещества способствуют поглощению и удержанию воды, а также препятствуют разрушению макромолекул под действием высоких концентраций солей. Осмопротекторами являются сахара, спирты, пролин, четвертичные соединения аммиака, бетаин. Наиболее простой (одна стадия) синтез бетаина осуществляется в клетках кишечной палочки. Ген холиндегидрогеназы *E. coli* клонировали на *Ti*-плазмиде и трансформировали растения табака. Полученные трансгенные растения были на 80% более устойчивы к высоким концентрациям солей (300 ммоль), чем исходные, за счет накопления в тканях бетаина.

3. *Созревание плодов*. Серьезной проблемой при транспортировке плодов фруктов и овощей является их преждевременное созревание и размягчение. Установлено, что при созревании плодов в растениях активируются гены, кодирующие ферменты целлюлазу и полигалактуроназу. А если подавить экспрессию хотя бы одного из них, то созревание может начаться позже. Для инактивации указанных генов созданы трансгенные растения, в которых синтезировались антисмысловые РНК-версии этих генов. При введении гена, кодирующего антисмысловую полигалактуроназную РНК, в растения томата и количество соответствующей мРНК, и активность фермента уменьшались на 90%. Такие генетически модифицированные томаты известны как FLAVR SAVR. В 1994 г. Департамент по контролю за качеством пищевых продуктов США пришел к выводу, что эти томаты столь же безопасны, как и полученные обычным скрещиванием, а потому при их продаже нет необходимости указывать их происхождение.

Регулятор роста растений этилен инициирует экспрессию множества генов, ответственных за созревание и старение плодов. Обработка растений химическими препаратами, блокирующими синтез этилена, задерживает и созревание плода, и старение. Таким образом, преждевременное созревание плода можно предотвратить подавлением способности растения синтезировать этилен. Созданы трансгенные растения, синтезирующие антисмысловые версии мРНК ферментов, необходимых для синтеза растением этилена. У них уровень этилена был гораздо ниже нормы, а потому плоды имели длительный срок хранения.

Генноинженерные методы позволяют не только ускорять процесс получения растений с улучшенными свойствами, но и создавать сорта

с новыми признаками, которые невозможно было бы передать растениям с помощью традиционных методов селекции. Например, в лабораторных условиях уже получены такие культуры с улучшенными пищевыми качествами, как кукуруза и горох. При этом был изменен аминокислотный состав некоторых запасных белков их семян. Кроме того, созданы сорта масличных культур (пищевых и непищевых) с измененным жирнокислотным составом плодов, а также предпринята попытка улучшить вкус фруктов за счет введения в растение гена монеллина, кодирующего структуру белка, имеющего сладкий вкус (в 100 000 раз более сладкий, чем сахароза).

Созданы трансгенные растения риса с улучшенными питательными свойствами за счет включения провитамина А в состав зерна (вводили гены, кодирующие 3 фермента биосинтетического пути β -каротина). Получили окрашенные в золотистый цвет зерна с повышенным содержанием каротина.

Получены и испытываются трансгенные растения хлопка с окрашенным волокном (ведутся работы по увеличению прочности, несминаемости волокна с разной окраской, не дающего усадки при стирке).

Недавно созданы трансгенные растения табака, в листьях которых содержится в десятки раз меньше никотина, чем обычно. Полагают, что курение сигарет из такого табака будет менее вредным.

Растения, используемые в качестве «биореакторов», превосходят микроорганизмы по многим параметрам: их культивирование обходится более дешево, легче экспрессируются эукариотические гены, белки более стабильны и др. Получены продуценты следующих важных терапевтических средств:

- эритропоэтина (для лечения анемии) – табак;
- энкефалинов (для помощи при передозировке наркотиков) – арабидопсис;
- сывороточного альбумина (для лечения цирроза печени, ожогов, травм) – табак;
- α -, β -глобина (при кровопотерях) – табак;
- эпидермального фактора роста (для заживления ран) – табак;
- α -, β -интерферона (для лечения гепатитов А и В) – рис, репа;
- соматотропина (при отставании в росте) – табак;
- лактоферрина (при бактериальных инфекциях) – картофель.

Съедобные вакцины. Получение таких вакцин – новый подход для создания мукозных (от лат. «слизистый», т. е. предназначенный для защиты слизистых оболочек) вакцин. Он состоит в получении

трансгенных растений, продуцирующих протективные антигенные белки инфекционных агентов. Важной их особенностью является дешевизна и безопасность (отсутствует возбудитель заболевания), простота хранения и применения.

В частности, созданы трансгенные растения табака, экспрессирующие поверхностный антиген вируса гепатита В. Созданы трансгенные картофель, люпин и салат, продуцирующие антиген гепатита В. Таким же образом созданы съедобные вакцины против холеры (картофель), энтеротоксигенной кишечной палочки (табак, картофель, кукуруза), вируса папилломы человека (картофель), вируса кори (салат) и др.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

A – аденин;
ADP – аденозиндифосфат;
АК – аминокислота;
AMP – аденозинмонофосфат;
АТР – аденозинтрифосфат;
С – цитозин;
сAMP – циклический аденозинмонофосфат;
САР – белок – активатор катаболизма;
CDP – цитидиндифосфат;
CMP – цитидинмонофосфат;
СТР – цитидинтрифосфат;
G – гуанин;
GDP – гуанозиндифосфат;
GMP – гуанозинмонофосфат;
GTP – гуанозинтрифосфат;
ori – сайт начала репликации (*origin*);
Pol – ДНК-полимераза;
S – единица Сведберга;
Tn – транспозон;
U – урацил;
UDP – уридиндифосфат;
UMP – уридинмонофосфат;
UTP – уридинтрифосфат;
АБ – антибиотик;
ГИ – генетическая инженерия;
гяРНК – гетерогенная ядерная РНК;
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;
кб – килобаза;
мРНК – матричная РНК;
мяРНК – малая ядерная РНК;
ПЦР – полимеразная цепная реакция;
РНК – рибонуклеиновая кислота;
рРНК – рибосомная РНК;
т. п. н. – тысяча пар нуклеотидов;
тРНК – транспортная РНК;
УФ – ультрафиолет.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белясова, Н. А. Биохимия и молекулярная биология: учеб. пособие для студентов специальности «Биотехнология» / Н. А. Белясова. – Минск: БГТУ, 2002. – 360 с.
2. Глик, Б. Молекулярная биология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. – 589 с.
3. Щелкунов, С. Н. Генетическая инженерия: учеб.-справ. пособие / С. Н. Щелкунов. – 2-е изд., испр. и доп. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2004. – 496 с.
4. Сингер, М. Гены и геномы: в 2 т. / М. Сингер, П. Берг. – М.: Мир, 1998. – Т. 1 – 373 с.; Т. 2 – 391 с.
5. Биотехнология. Биобезопасность. Биоэтика / под ред. А. П. Ермишина. – Минск: Тэхналогія, 2005. – 430 с.
6. Генетика промышленных микроорганизмов и биотехнология / под ред. В. Г. Дебабова. – М.: Наука, 1990. – 277 с.
7. Инге-Вечтомов, С. Г. Генетика с основами селекции / С. Г. Инге-Вечтомов. – М.: Высш. шк., 1989. – 591 с.
8. Бейли, Дж. Основы биохимической инженерии: в 2 т. / Дж. Бейли, Д. Оллис. – М.: Мир, 1989. – Т. 1 – 692 с.; Т. 2 – 590 с.
9. Степанов, В. М. Молекулярная биология. Структура и функции белков / В. М. Степанов. – М.: Высш. шк., 1996. – 335 с.
10. Уотсон, Дж. Рекомбинантные ДНК. Краткий курс / Дж. Уотсон, Дж. Туз, Д. Курц. – М.: Мир, 1986. – 288 с.
11. Айала, Ф. Современная генетика: в 3 т. / Ф. Айала, Дж. Кайгер. – М.: Мир, 1988. – Т. 1 – 295 с.; Т. 2 – 369 с.; Т. 3 – 335 с.
12. Молекулярная биология клетки: в 5 т. / Б. Албертс [и др.]. – М.: Мир, 1986–1987. – Т. 1 – 223 с.; Т. 2 – 312 с.; Т. 3 – 296 с.; Т. 4 – 197 с.; Т. 5 – 231 с.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
1. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ И МЕХАНИЗМЫ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ.....	8
1.1. Организация генетического аппарата клетки	8
1.2. Репликация нуклеиновых кислот	27
1.2. Сохранение постоянства и изменчивость геномов	38
1.3. Экспрессия генов.....	60
2. ОСНОВЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ	81
2.1. Принципы и инструменты генетической инженерии	81
2.2. Клонирование генов	98
2.3. Создание и скрининг клонотек	103
2.4. Характеристика продуктов клонирования	106
2.5. Экспрессия трансгенов	112
2.6. Методы молекулярного маркирования	128
2.7. Направленный мутагенез и белковая инженерия	122
3. КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ	131
3.1. Принципы клеточной инженерии	131
3.2. Клеточная инженерия растений	132
3.3. Клеточная инженерия животных.....	137
4. ПРИМЕНЕНИЕ ДОСТИЖЕНИЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ.....	146
4.1. Конструирование и применение ГМ-микроорганизмов.....	146
4.2. Создание и использование генетически модифицированных растений	162
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	170
ЛИТЕРАТУРА	171

Учебное издание

Белясова Наталья Александровна

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

Электронный курс лекций

Редактор *О. А. Семенец*
Компьютерная верстка *Д. В. Чернушевич*
Корректор *О. А. Семенец*

Издатель:

УО «Белорусский государственный технологический университет».

ЛИ № 02330/0549423 от 08.04.2009.

ЛП № 02330/0150477 от 16.01.2009.

Ул. Свердлова, 13а, 220006, г. Минск.