

**О.В. Карпов, С.В. Демидов,
С.С. Кир'яченко**

КЛІТИННА ТА ГЕННА ІНЖЕНЕРІЯ



Міністерство освіти і науки України
Київський національний університет імені Тараса Шевченка

О.В. Карпов, С.В. Демидов, С.С. Кир'яченко

КЛІТИННА ТА ГЕННА ІНЖЕНЕРІЯ

Підручник

*Затверджено Міністерством освіти і науки України
як підручник для студентів біологічних спеціальностей
вищих навчальних закладів*

Київ
2010

УДК 575+1/62(075.8)

ББК 28.04я73+3я73

K26

*Затверджено Міністерством освіти і науки України як підручник для
студентів біологічних спеціальностей вищих навчальних закладів
(Лист М'І.4/18-Г-1761 від 22.10.2007р.)*

Рецензенти:

Блюм Я.Б., академік НАН України;

РИПДІПЧ А.Р., чл.-кор. НАН України

Карпов **О.В.**, Демидов С.В., Кир'яченко С.С.

K26 Клітинна та генна інженерія: Підручник - К.: Фітосоціоцентр, 2010. -
208 с.

ISBN 978-966-306-152-7

У підручнику у доступній формі викладеш практично всі ключові аспекти клітинної та генної інженерії - історію розвитку цих напрямків науки та технології, основні їх прийоми і використання їх здобутків безпосередньо у біотехнологічній практиці. Детально описуються приклади практичного використання геноінженерних прийомів створення рекомбінантних мікроорганізмів з метою отримання біологічно активних сполук - поліпептидів, малих біологічних молекул та біополімерів, а також деградації ксенобіотиків генетично модифікованими мікроорганізмами. Виходячи зі спрямування підручника на використання студентами біотехнологічного напрямку, велику увагу в ньому приділено біотехнологічним аспектам генетичної інженерії. Наводяться приклади геноінженерних підходів до створення інтенсивних технологій у рослинництві і тваринництві. Характеризується внесок генної інженерії в *ийтиш* генна діагностика та терапія людини, а також створення лікарських засобів на основі олігонуклеотидів. Вперше у навчальній літературі у доступній для студентів <юрмі розглядається такий науковий напрямок, як білкова інженерія, а також проблеми, пов'язані з потенційними загрозами від впровадження трансгенних технологій та біобезпека.

Для студентів біологічних спеціальностей вищих навчальних закладів, аспірантів і науковців відповідних спеціальностей.

УДК 575+1/62(075.8)

ББК 28.04я73+3я73

ISBN 978-966-306-152-7

© Карпов О.В., Демидов С.В.,
Кир'яченко С.С., 2010

ЗМІСТ

1. Загальні положення.....	5
2. Клітинна інженерія.....	S
2.1. Культивування еукаріотичних клітин.....	8
2.2. Стовбурові клітини. Клітинна терапія.....	15
2.3. Культури рослинних тканин та клітин.....	25
2.4. Гібридні клітини та трансплантація ядер.....	41
2.5. Методи перенесення генів за допомогою метафазних хромосом.....	45
3. Генна інженерія.....	50
3.1. Ферменти, використовувані для отримання рекомбінантних молекул ДНК.....	50
3.2. Секвенування та синтез полінуклеотидів.....	60
3.3. Прийоми та методи генної інженерії.....	72
3.3.1. Джерела генів.....	74
3.3.2. Вектори.....	81
3.3.3. Операції на ДНК та РНК.....	93
3.3.4. Внесення генетичного матеріалу до клітин-реципієнтів.....	98
3.4. Банки генів. Пошук клонів з рекомбінантними молекулами ДНК.....	100
3.4.1. Банки генів.....	100
3.4.2. Ідентифікація клонованих ДНК.....	102
4. Отримання біологічно активних сполук методами генної інженерії.....	115
4.1. Біологічно активні поліпептиди.....	115
4.2. Малі біологічні молекули.....	123
4.3. Біополімери.....	128
4.4. Деградація ксенобіотиків. Супербацила.....	130
5. Біотехнологічні аспекти генетичної інженерії.....	133
5.1. Об'єкти генетичної інженерії.....	133
5.2. Особливості експресії еукаріотичних білків в прокаріотичних клітинах.....	135
5.3. Суперпродукція і проблеми стабільності штамів.....	136

5.4. Виділення внутрішньоклітинних чужорідних білків з культур рекомбінантних мікроорганізмів.....	139
6. Генно-інженерні підходи до створення інтенсивних технологій у рослинництві.....	143
6.1. Трансформація рослин за допомогою <i>Agrobacterium</i> <i>tumefaciens</i> . Ті-плазміда.....	143
6.2. Біолістика.....	147
6.3. Застосування репортерних генів при трансформації рослинних клітин.....	148
6.4. Трансгенні рослини.....	149
7. Генно-інженерні підходи до створення інтенсивних технологій у тваринництві.....	157
8. Генна інженерія в медицині.....	165
8.1. Генна діагностика та терапія людини.....	165
8.1.1. Молекулярно-генетичний метод у генній діагностиці....	165
8.1.2. Техніка генної терапії.....	168
8.2. Генно-інженерні підходи до створення вакцин.....	180
8.2.1. Генно-інженерні вакцини.....	181
8.2.2. ДНК-вакцини.....	184
8.3. Лікувальні засоби на основі олігонуклеотидів.....	187
9. Геноміка, протеоміка, білкова інженерія.....	191
10. Потенційні загрози від впровадження трансгенних технологій та біобезпека.....	197
Література.....	208

1. ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

Сучасна біоінженерія відкриває радикально нові шляхи цілеспрямованої зміни генетичних властивостей організмів. Такі можливості з'явилися завдяки відкриттям молекулярної біології, визначенню структури і властивостей ДНК як матеріалу спадковості, генетичного коду, методів зчитування генетичної інформації (секвенування генів), а також широкого застосування ферментів, за допомогою яких можна розрізати і з'єднувати ділянки ДНК у визначений спосіб.

Більшість інформації, яка забезпечила розвиток технологій, заснованих на використанні рекомбінантної ДНК, і, отже, успіхи сучасної біоінженерії, було накопичено протягом останніх 40-50 років. Однак історія біоінженерії почалася понад 130 років тому, одночасно з дослідженнями Ч. Дарвіна і Г. Менделя. У своїх працях Ч. Дарвін зробив висновок про те, що види не є постійними й незмінними, а здатні еволюціонувати і згодом давати, таким чином, нові види. У процесі здійснюваної штучної селекції рослин і тварин відбувається аналогічне явище, хоча не природа, а селекціонер забезпечує селекційний вплив, підсилюючи саме ті особливості організмів, які треба зберегти.

Основи сучасної генетики заклали Г. Мендель. У процесі досліджень він відкрив основні закони, що керують спадковістю. По суті Г. Мендель став автором концепції гена, хоча цей термін до початку XX ст. не використовувався.

Завдання, що їх вирішує біоінженерія, виникли з потреб класичних біотехнологій. Основа вирішення їх - наявність високопродуктивних штамів мікроорганізмів. При організації виробництва нових продуктів більшість мікроорганізмів-продуцентів виявляються малопродуктивними "дикунами". Старі бродильні мікробіологічні процеси (виробництво нив а. вина, спирту) споконвіку потребували тих самих, практично однакових за своєю продуктивністю штамів, оскільки вони здійснювали той самий якісний процес - гідролітичне перетворення цукру на спирт, солодового сусла на пиво, виноградного сусла на вино тощо. При цьому завдання підвищити продуктивність у бродильному виробництві штамів не ставилося, оскільки їхня продуктивність у кінцевому підсумку визначалася кількістю розщеплених молекул, присутніх у середовищі. Це завдання постало лише після відкриття антибіотиків, коли знадобилося створити нові високоактивні штами, здатні синтезувати максимум продукту.

Протягом 70-х років XX ст. було опрацьовано методи об'єднання частин ДНК та її переміщення з одного організму в інший; загалом ці методи отримали назву технології рекомбінантних ДНК, або ж генної

інженерії. Генну інженерію, отже, можна визначити як конструювання в умовах *in vitro* функціонально активних генетичних структур (рекомбінантних ДНК) або ж інакше - як створення штучних генетичних програм.

Генна інженерія виникла на перетині багатьох біологічних наук. Її витоки, передусім, слід шукати в молекулярній генетиці. Проте становлення генної інженерії великою мірою залежало також від розвитку генетичної ензимології та хімії нуклеїнових кислот. Слід підкреслити, що ферменти, які застосовуються у генній інженерії, позбавлені видової специфічності, і тому експериментатор може поєднувати в єдине ціле фрагмент ДІЖ будь-якого походження у тій послідовності, яку він вибере. Отже, генна інженерія виявилася здатною долати встановлені природою видові бар'єри і здійснювати необмежене міжвидове схрещування.

Основи використання клітин людини й тварин у біоінженерії було закладено в 1949 р., коли вдалося виростити вірус поліомієліту в культивованих клітинах шкіри та м'язів зародка людини. Методи *клітинної інженерії* найбільше поширилися у рослинництві. До них належать мікроклональне розмноження, оздоровлення рослин від вірусів, культивування незрілих зародків та соматоклональна мінливість.

Технологія рекомбінантної ДНК, на противагу напівемпіричним підходам клітинної інженерії, спроможна реалізувати свій вагомий науковий потенціал тільки в результаті детального молекулярно-біологічного та генетичного дослідження об'єктів та їхніх господарсько-вагомих ознак.

Важливі кроки в розвитку знань, необхідних для становлення генної інженерії, зроблено в 1953 р., коли Дж. Уотсон і Ф. Крик довели, що ДНК складається з двох ланцюгів, та у 1963 р., коли М. Ніренберг розшифрував генетичний код, що виявився квазі-універсальним як для вірусів та бактерій, так і для вищих організмів, включаючи людину. Тим самим доступними для вивчення стали генетична інформація та її суть, тобто взаємозв'язок між генетичним кодом та структурою білків.

У 60-і роки ХХ ст. у результаті вдосконалення аналітичних методів, запропонованих Ф. Сенджером, і розвитку прийомів розщеплення білків виникла можливість автоматично визначати структуру білків. Було створено прилади, що дають змогу визначати амінокислотні послідовності білків. Саме тоді й було розпочато укладання атласу білків, що зберігається у комп'ютерних системах.

Велике значення мають успіхи хімії нуклеїнових кислот і, передусім, опрацювання методів *секвенування* ДНК, тобто визначення послідовності нуклеотидів у молекулах ДНК. здійснене А. Максамом і У. Плібертом, а також Ф. Сенджером у 1977 р. інший здобуток хімії, на якому базується

сучасна генна інженерія - це способи *хімічного* та *хіміко-біотехнологічного* синтезу полінуклеотидів. Основи цього синтезу було закладено у 1979 р. Г. Корана.

Стрімкий прогрес у генній інженерії тісно пов'язаний також із суттєвими вдосконаленнями таких аналітичних методів, як ультрацентрифугування, введення в молекули радіоактивних ізотопів, електрофорез у всіх його різновидах, афінна, хроматографія, а також методів мікроаналізу та визначення первинної структури біологічних макромолекул.

Датою народження генної інженерії слід вважати 1972 р., коли американські вчені на чолі з П. Бергом створили першу рекомбінантну ДНК, що складалася з фрагментів ДНК мавпячого вірусу SV40 і бактеріофага *X*, поєднаних з галактозним опероном *E. coli*.

Подальшу історію розвитку генної інженерії умовно поділяють на три етапи. *Перший* пов'язаний з доказом принципової можливості отримати рекомбінантні молекули *in vitro*. На цьому етапі було доведено потенційну можливість створення рекомбінантних молекул із використанням вихідних молекул ДНК з різноманітних видів і штамів бактерій, а також їхня життєздатність, стабільність та дієздатність. *Другий етап* був розпочатий роботами з отримання рекомбінантних молекул ДНК між хромосомними генами прокаріотів та різними плазмідами, а також доведенням їхньої стабільності та життєздатності. І, нарешті, початок *третього етапу* асоціюється з роботами, у яких у векторні молекули включали ДШС еукаріотичних генів, головним чином, тваринних.

Основні *прийоми*, які використовуються в різних напрямках біоінженерії, подібні і можуть бути об'єднані в дві групи: *методи культури клітин і тканин* та *маніпуляції з ДНК*.

Протягом останніх років генна інженерія досягла приголомшливих результатів. Складено карти цілих геномів, у тому числі повністю визначено послідовність геному людини. Завдяки генній інженерії розроблено й впроваджено нові препарати, що використовуються у багатьох галузях. Видозміна вихідних організмів дає можливість одержувати молочні й м'ясні продукти з поліпшеними органолептичними якостями і збільшеним терміном зберігання, а також із характеристиками, що полегшують механізацію виробничих процесів. Створено рослини з новими типами стійкості проти хвороб.

Отже, генну інженерію можна вважати дітищем сучасного науково-технічного прогресу. У такий спосіб біологічна наука, збагачена досягненнями ензимології й генетики, створює систему взаємопов'язаних галузей біоінженерії.

2. КЛІТИННА ІНЖЕНЕРІЯ

Важливий розділ біоінженерії становить клітинна інженерія. Культури клітин вищих організмів використовуються для виробництва біологічно активних речовин, вакцин, моноклональних антитіл, застосовуються при виведенні нових сортів рослин тощо. Культури рослинних клітин - це зручна модель для вивчення системи хазяїн-паразит (вірус, бактерія, гриб, нематода, комаха), а також для пошуку важливих для господарства речовин (токсинів, гербіцидів, регуляторів росту тощо). Чисті культури рослинних клітин застосовуються також у біосинтетичних та біотрансформуючих реакціях.

Завдання, що стоїть перед клітинною інженерією на перспективу, можна сформулювати як створення в умовах *in vitro* тривимірної системи клітинних структур та їхніх похідних, здатних анатомічно та функціонально замішувати *in vivo* пошкоджені та втрачені тканини й органи живих організмів. З цього визначення зрозуміло, що область застосування здобутків цього напрямку - насамперед медицина, зокрема реконструктивна та відновлювальна хірургія.

2.1. Культивування еукаріотичних клітин

Організм тварин складається з різноманітних типів спеціалізованих диференційованих клітин. Так, наприклад, у людини (як і в більшості ссавців) ідентифіковано понад 200 типів клітин, які, в свою чергу, можуть бути розподілені на ще більшу кількість функціонально й морфологічно спеціалізованих типів клітин. За сучасними уявленнями вся різноманітність фенотипів соматичних спеціалізованих клітин базується на тому, що в кожному конкретному клітинному типі функціонує властивий лише цьому типу набір експресованих генів.

Одним з головних завдань, що вирішується з використанням культур еукаріотичних клітин є напрацювання великих кількостей різноманітних вірусів для подальшого використання їх з метою діагностики вірусних захворювань та створення відповідних вакцин. Виявилося можливим вирощувати віруси у трансформованих клітинах, що підтримуються у культурі протягом невизначено довгого часу. Створено лінії клітин, що використовуються з цією метою в усьому світі. Приклади таких ліній - це клітини *HeLa* (карцинома шийки матки людини) (Рис. 1), *BHK-21* (нирка ембріонів хом'яка) та *Vero* (нирка зеленої мавпи). Завдяки застосуванню методу клітинних культур віруси почали виділяти в досить чистому вигляді. Не становить великих труднощів виробництво (у спеціальних ферментерах) сотень і навіть тисяч літрів культуральної рідини, що містить вірус.

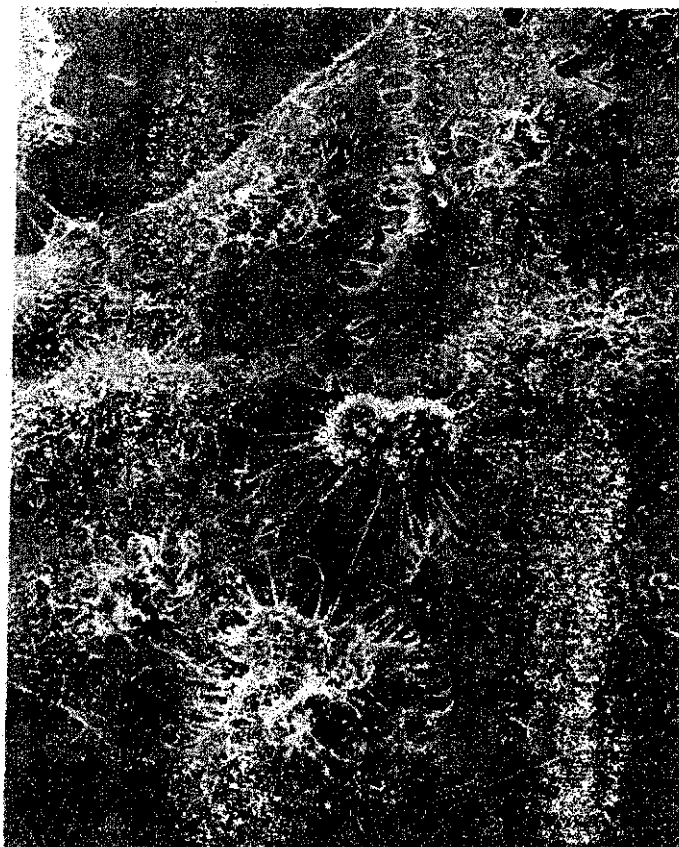


Рис. 1. Клітини культури *HeLa* під мікроскопом

Для промислового виробництва біологічно активних речовин вважається перспективним використання культури клітин відповідних органів людини та тварин (Рис.2). На перший погляд, вирішній цю проблему досить не складно. Клітини тварин і людини вирощують на спеціальних середовищах у вигляді моношару на склі. Для вирощування суспензійних культур використовують найрізноманітніші посудини - хемостати, ферментери, флакони. Нині існують добре відпрацьовані методи переведення клітин у культуру. Залишається лише вид щити з тканин організму клітини, що синтезують ту чи іншу цінну речовину, перенести їх на відповідне живильне середовище, наростити потрібну біомасу та отримати бажаний продукт.

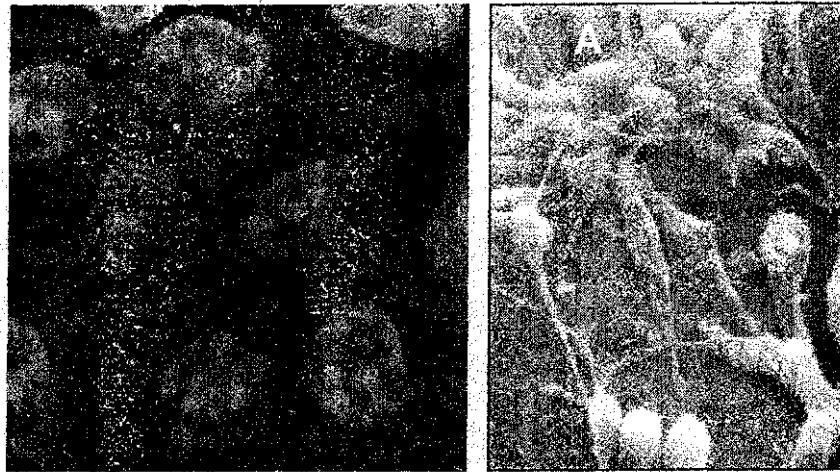


Рис. 2. Культури епітеліальних клітин (А) та фібробластів (Б) під мікроскопом.

Як правило, здатність синтезувати продукт, специфічний для даного органу або тканини, мають диференційовані клітини, тобто клітини, що спеціалізувалися у ході розвитку організму для виконання певних функцій, як, наприклад, клітини ендокринних залоз. Спроби введення таких диференційованих клітин у культуру й отримання з них постійних клітинних ліній-продуцентів фізіологічно активних речовин, нашою справою є на ряд суттєвих труднощів.

Передусім, диференційовані клітини у разі занурення їх у культуральне середовище розмножуються дуже погано або зовсім втрачають здатність ділитися. Якщо ж адаптація нормальних клітин до культивування все-таки відбувається, то вони, як правило, втрачають свої тканиноспецифічні функції, включаючи й здатність до синтезу специфічного продукту. Ті ж клітини, які зберегли свої функціональні особливості, часто проявляють ознаки злоякісної трансформації, що теж накладає суворі обмеження на практичне їх застосування.

Одна з головних властивостей клітинних культур тварин - обмежена тривалість їхнього існування. Це обмеження, на відміну від бактерій, зберігається навіть за умови постійного перенесення їх на свіже живильне середовище. Як правило, клітини тваринних ліній гинуть після 50-100 поділів. Зрозуміло, що чим молодший вік тканини, з якої отримано клітини для культивування в культурі, тим більшу кількість разів вони здатні ділитися до моменту загибелі. Що ж стосується рослинних клітин, то дані, отримані з розмноження саджанцями, свідчить про необмежену здатність рослинних клітин до поділу.

Тваринні клітини вирощують декількома способами. Ріст клітин у вигляді моношару залежить від білків, які забезпечують прикріплення клітин до підложки та вказують напрямок їхнього переміщення (Рис. 3).

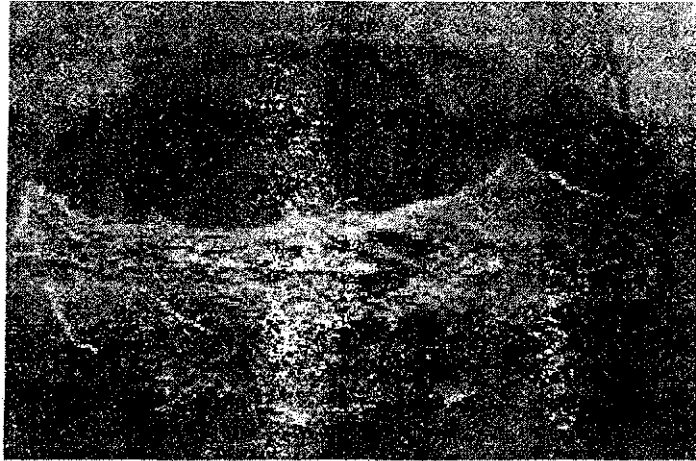


Рис. 3. Ріст субстратзалежних клітин на поверхні у вигляді моношару.

Обрані клітини вирощують в асептичних умовах на спеціальному обладнанні при повільному струшуванні з метою омивання більшої площини культуральним середовищем. При цьому клітини по чергово занурюються то в рідку фазу, то в газову, що з надлишком забезпечує їх потребу у кисні.

Під час культивування клітин повинні враховуватися різні фактори - якість посівного матеріалу та середовища, рН та температура, наявність кисню і диоксиду вуглецю, окисно-відновний потенціал, концентрації основних джерел живлення. Оптимальні показники вирощування клітин: рН від 7,2 до 7,4; температура - у межах 36-37,5°C. Контроль за розвитком клітин проводять за допомогою прямих методів, тобто шляхом підрахунку клітин.

Тваринні клітини при культивуванні *in vitro* потребують багатьох поживних речовин. До складу таких речовин повинні входити органогенні елементи (вуглець, водень, кисень, азот), зольні мікроелементи (фосфор, сірка, калій, кальцій, залізо), деякі інші мікроелементи (мідь, натрій, хлор, тощо). Вказані елементи повинні знаходитися у формі легкозасвоюваних сполук. У поживні середовища для культивування тваринних клітин необхідно додавати суміш амінокислот у якості джерела азоту, пурини та піримідини для синтезу білків і нуклеїнових кислот, глюкозу у якості

джерела вуглецю та енергії, вітаміни і мінеральні солі для підтримки необхідного осмотичного тиску та рН. Середовище також повинне містити невеликі концентрації антибіотиків для пригнічення росту бактерій та 5-10% сироватки. Остання відіграє роль фізіологічного буферу, є джерелом поживних речовин, бере участь у процесах адгезії, росту та розмноження клітин, сприяє зв'язуванню та детоксикації пірогенів, токсинів, а також продуктів метаболізму клітин. Найбільш універсальною для культивування багатьох клітин є сироватка крові корови.

Суттєвим для підтримання функціонально активного стану клітин у культурі було розроблення відтворюваних умов культивування. Створено стандартні прописи ефективних живильних середовищ, найвідоміше з яких - середовище Ігла. При цьому, якщо до складу живильного середовища вимоги з боку клітин не дуже суворі, то можливі коливання реакції середовища досить обмежені. Так, зменшення або збільшення рН на 0,2-0,4 од. призводить до загибелі клітин у культурі. У разі тривалішого культивування підвищується потреба у буферному розчині. Як правило, перевагу віддають гліцил-гліциновому, трис- та ХЕПЕС-буферам. Щодо сироватки як необхідного компонента середовища, то її вплив на функціональний стан клітин у культурі тим вищий, що молодша тварина, від якої отримано цю сироватку.

Для забезпечення стерильності як однієї з найсуворіше контрольованих умов останнім часом ітрактиується використання одноразового стерильного пластикового посуду (флаконів, чашок, піпеток). Так, поділ деяких типів клітин у культурі відбувається лише тоді, коли вони прикріплені до субстрату. У цьому разі матеріал і посуд піддають спеціальній обробці при підготовці до культивування.

Клітинну масу для культивування отримують, обробляючи подрібнені шматочки відповідного органу трипсином. Отримують окремі клітини, які з урахуванням усіх обмежень, викликаних необхідністю додержання стерильності, переносять на живильне середовище для культивування. Поодинокі еукаріотичні клітини не здатні ділитися - вони швидко гинуть. З урахуванням цієї властивості у ході культивування створюють так званий шар «клітин-годувальниць» (фідерних клітин). З цією метою призначені для клонування клітини наносять на клітини-годувальниці, які після опромінення втратили здатність до поділу, але ще на якийсь час зберегли метаболізм. Цього виявляється досить, щоб нанесені клітини, призначені для клонування, почали ділитися (Рис. 4). Однак кількість клітин, що вступили у фазу поділу, завжди менша за 100 % порівняно з кількістю клітин, внесених у живильне середовище. При додаванні у живильне середовище деяких речовин - так званих *мітогенів* - здатність клітин до поділу підвищується.

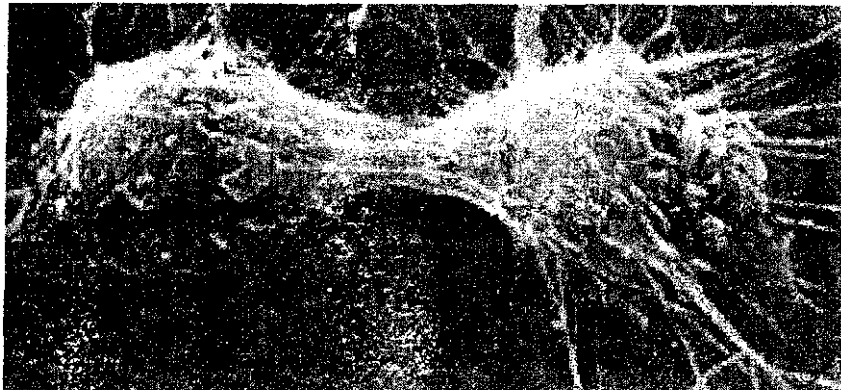


Рис. 4. Поділ пухлинних клітин у культурі.

Серед мітогенів розрізняють групу речовин (фактори росту), що містяться у сироватці крові в дуже незначних кількостях і мають властивості гормонів. Ідентифіковано такі з них, як фактор росту нервів, епідермісу, фібробластів та ін. Всі вони являють собою білки з молекулярною масою 6-130 кДа. Спектр їхньої дії ширший, ніж просто посилення мітозу.

Крім факторів росту, мітогенна дія притаманна також речовинам, що називаються *лектинами*. Загальна їхня властивість - це здатність специфічно зв'язувати залишки цукрів. Залежно від кількості ділянок, з якими вступають у взаємодію цукри, розрізняють дво- та полівалентні лектини. Головне джерело лектинів - рослини родини бобових (там лектини складають 1,5-3 % від загальної кількості білку), хоча з бактерій, безхребетних та хребетних тварин теж виділено лектини. Із насіння рицини отримано рицин, з конвалії мечоподібної - конканавалін А (КонА), із насіння квасолі - фітогемаглютинін (ФГА). При насиченні середовища, що містить лектини, моносахаридами, лектини втрачають здатність взаємодіяти з рецепторами клітинної поверхні, які містять вуглеводи. Це відбувається тому, що специфічні ділянки лектинів, з якими могли б вступати у реакцію вуглеводні рецептори клітинної стінки, вже «захоплені» раніше доданими моносахаридами.

Окрім моношарового можливе також глибинне вирощування клітин у суспензійних культурах. Поверхню вирощуваних клітин можна суттєво збільшити при використанні мікроносіїв, на поверхні яких клітини закріплюються, а потім розростаються у вигляді моношару. У якості мікроносіїв використовують сефадекси, полістирол, скляні кульки тощо.

Наразі розроблені методи вирощування клітин у вигляді об'ємно-доливних культур, коли певна частина клітинної суспензії замінюється свіжим живильним середовищем, а інша частина виконує роль інокуляту. Невизначено довгий час клітини можна вирощувати у безперервних хемостатних культурах, коли вдається досягти постійності концентрації лімітуючого субстрату та щільності клітин. У хемостатах швидкість подачі свіжого середовища та відбору культури однакова. При цьому швидкість росту, розвитку та розмноження клітин контролюється швидкістю підводу лімітуючого компоненту а кількість клітин - концентрацією останнього. У якості лімітуючого рід агента частіше за все використовують глюкозу. При вірному підборі умов вирощування у хемостатах, на відміну від періодичного культивування, вдається на порядок збільшити вихід клітин.

Щодо типу культивованих клітин, то диплоїдні клітини мають беззаперечну перевагу перед всіма іншими клітинними культурами, насамперед завдяки стабільності їх біологічних і генетичних характеристик, збереження властивостей при ласуванні, а також завдяки можливості створення банку клітин та попередньої атестації безпеки клітин, що робить їх перспективним субстратом для діагностики вірусних інфекцій і створення імунобіологічних препаратів.

Характеристичний параметр поведінки клітин у культурі становить так зване *контактне гальмування*, тобто регуляція клітинного росту, що залежить від кількості клітин на одиницю площі. Максимальна щільність клітин, доступна для нормальних клітин у культурі, сягає $10^4/\text{см}^2$; щільність злоякісних клітин на два порядки вища ($10^6/\text{см}^2$). Крім того, нормальні клітини, що ростуть на субстраті, являють собою моношарове утворення; водночас ріст пухлинних клітин характеризується «безладдям», у результаті чого виникають багатошарові утворення.

Пухлинні клітини, переведені в культуру, або ж нормальні клітини, трансформовані *in vitro*, у ряді випадків зберігають здатність синтезувати специфічні продукти. Скажімо, пухлинні клітини гіпофізу в культурі синтезують адренотропний гормон та гормон росту, клітини нейробластоми - фактор росту нервової тканини й ацетилхолінестеразу тощо. А втім, і для цих клітинних ліній не сходять з порядку денного проблема злоякісності й нестабільності прояву фенотипових ознак.

Структурною одиницею нервової системи є нейрон - нервова клітина з відростками. Біотехнологічні методи дають можливість вирощувати нейрони *in vitro* та постачати їх у потрібній кількостях для потреб медицини, адже регенерація нервової тканини не відбувається (регенерувати можуть лише відростки нервових клітин, які не втратили зв'язку з перикаріоном після пошкодження).

2.2. Стівбурові клітини. Клітинна терапія

Один з розділів регенеративної клітинної медицини, що обіцяє величезний прогрес у лікуванні багатьох важких захворювань, - це вивчення так званих *ствібурових клітин*. Стівбурова клітина - це «недозріла» клітина, здатна до самооновлення та розвитку, що призводить до виникнення спеціалізованих клітин організму.

Як відомо, мільярди клітин організму (людини або тварини), який росте, походять лише з однієї клітини (зиготи), утвореної в результаті злиття чоловічої та жіночої гамет. Ця єдина клітина містить не тільки інформацію про організм, але й схему свого послідовного розвитку. У ході ембріогенезу запліднена яйцеклітина ділиться й дає початок клітинам, що не мають інших функцій, крім передачі генетичного матеріалу наступним, клітинним поколінням. Це *ембріональні стівбурові клітини*, геном яких знаходиться в «нульовій точці»; механізми, що визначають спеціалізацію, ще не ввімкнені, з них потенційно можуть розвинути будь-які клітини.

Унікальна властивість ембріональних стівбурових клітин — *тоїтмтентність* (від лат. *lotus* - весь і *potent/a* - сила), тобто здатність дати початок багатьом різним типам клітин, а також позаембріональним тканинам (як-от плацента, ембріональні оболонки) і зародкові в цілому. У культурі ембріональні стівбурові клітини мають практично необмежений потенціал проліферації. Ця властивість ембріональних стівбурових клітин дала поштовх до інтенсивного їх вивчення й відкрила широкі перспективи практичного їх використання в біології та медицині, у першу чергу в трансплантології, імунології й геронтології.

У дорослому організмі стівбурові клітини знаходяться, головним чином, у кістковому мозку та, у дуже невеликих кількостях, у всіх органах та тканинах. Вони забезпечують відновлення пошкоджених ділянок органів і тканин. Стівбурові клітини, отримавши від регуляторних систем сигнали про якесь пошкодження, по кров'яному русі надходять до ураженого органу. Вони можуть відновити практично будь-яке пошкодження, перетворюючись на місці в необхідні організму клітини (кісткові, гладеньком'язові, печінкові, клітини серцевого м'язу або навіть нервові) і стимулюючи внутрішні резерви організму до відновлення органу або тканини.

Високодиференційовані клітини (кардіоміоцити, нейрони) практично не діляться, у той час як менш диференційовані клітини (фібробласти, гепатоцити) частково зберігають здатність до розмноження і за певних умов діляться та збільшують свою кількість. Загальна закономірність така, що коли клітина вийшла на етап диференціювання, то кількість поділів, яку вона може пройти, обмежена - явище, про яке згадувалося вище. Так, наприклад, для фібробласта кількість поділів не перевищує 50, для

стовбурової клітини крові - 10^6 . Таке явище має велике біологічне значення: у випадку, якщо відбулося пошкодження в геномі клітини, мутацію буде розтиражовано лише в обмеженій кількості клітин-нащадків і вона не відіграє великої ролі для організму в цілому.

Ембріональні стовбурові клітини відрізняються від інших (дорослих) клітин тим, що теоретично для них кількість поділів їх невичерпна й клітини можуть ділитися безперервно, причому без переродження у злоякісні пухлини. Таким чином, друга важлива властивість ембріональних стовбурових клітин - фактичне безсмертя (*імортальність*). Ці клітини мають так званий мінімальний фенотип і мінімум рецепторів та програм для взаємодії з мікрооточенням. Свої унікальні генетичні властивості вони зберігають завдяки виключенню програм спеціалізації і обмеженням у рамках певних клітинних ліній.

Усі спеціалізовані клітини дорослого організму походять з ембріональних стовбурових клітин. Стовбурові клітини - це «недоторкнений запас» інформації ембріогенезу, яку неможливо звести тільки до генів, оскільки кожен етап розвитку не запрограмований автоматично, а залежить від сигналів мікрооточення. Вважається, що всі нормальні органи і тканини людини зберігають «релікти» зародкової тканини у вигляді мікрівкрапель стовбурових клітин.

У 1999 році журнал "Science" визнав відкриття ембріональних стовбурових клітин людини третьою за важливістю подією в біології ХХ сторіччя (після відкриття подвійної спіралі ДНК та здійснення програми «Геном людини»). Дійсно, вчені вперше отримали прототип тієї «клітини-праматері», яку в процесі відбору еволюція обрала для відтворення виду в кожному новому поколінні. Фактично ембріональні стовбурові клітини - це сховище, яке зберігає тривимірні карти зародків і коди для створення спеціалізованих ліній клітин.

Вивчення ембріогенезу людини обмежене біоетикою, оскільки ранні зародки людини не можуть бути засобом у руках вченого. Оскільки розвиток інших ссавців має свої особливості, ембріональні стовбурові клітини дають єдину експериментальну можливість для вивчення аномалій органогенезу людини (Рис. 5).

Запас стовбурових клітин дорослого організму дуже невеликий. Тому в більшості випадків оновити втрачені клітини організм самостійно вже не в змозі: або вогнище ураження завелике, або організм ослаблений, або ж вступають в дію вікові фактори. Зараз проводяться роботи по лікуванню за допомогою екзогенно введених стовбурових клітин таких захворювань, як цироз, інсульт, параліч, діабет та ряд патологій нервової системи. Досягнення в цій галузі клітинної медицини роблять можливості терапевтичного використання стовбурових клітин практично безмежними.

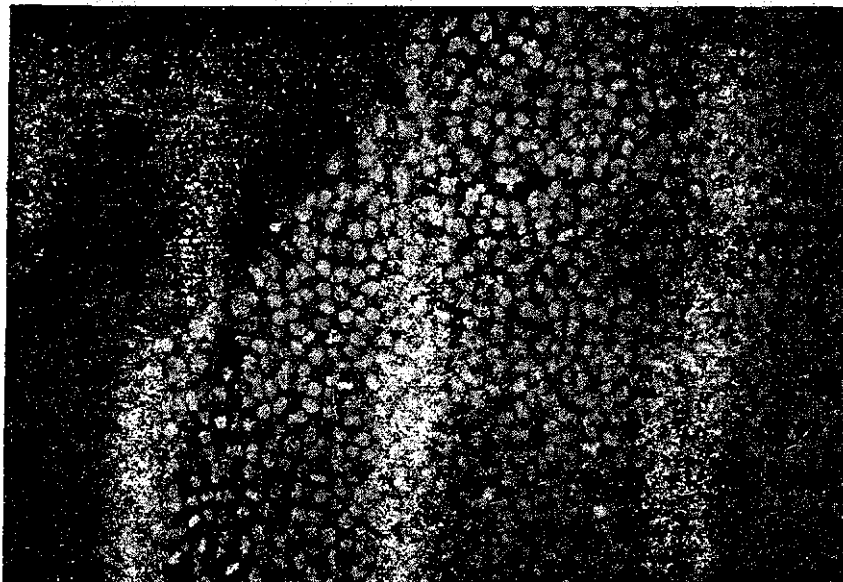


Рис. 5. Культура ембріональних стовбурових клітин людини під мікроскопом

Слід, однак, зазначити, що можливості ембріональних стовбурових клітин як нової лабораторної сировини надзвичайно обмежені. Протягом перших днів поділу ембріон росте і перетворюється на кульку з однакових неспеціалізованих клітин. Через 5-6 діб після запліднення людський ембріон складається із 100-150 клітин, які тільки починають спеціалізуватись. Він являє собою сферичну структуру, названу бластоцистом, який має зовнішній шар клітин та порожнину, де утворюється внутрішня клітинна маса (Рис. 6).

Із зовнішнього шару розвивається плацента та інші підтримувальні структури, а з внутрішньої клітинної маси - органи та тканини плоду. Саме з внутрішньої клітинної маси відбирають клітини та переносять у чашки Петрі з клітинами-годувальницями. Через декілька днів у чашці утворюється колонія клітин, які відносять до ембріональних стовбурових, якщо вони відповідають двом умовам: дають позитивний результат на стандартні тести і мають здатність до самопідтримання.

У лабораторних умовах можна спонукати отримані стовбурові клітини до розмноження та утворювати цілий ряд спеціалізованих клітин. Таке розмноження стало можливим завдяки двом технологічним новинкам: використанню так званого лейкомічного інгібіторного фактору (LIF), що

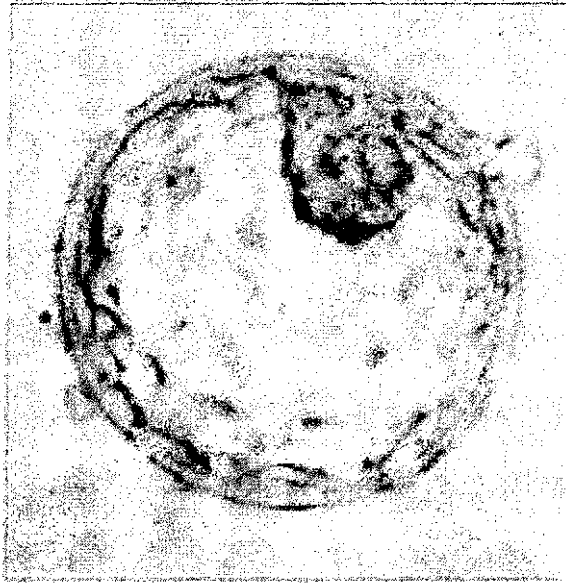


Рис. 6. Бластоцист людини

блокує диференціацію клітин, та застосуванню при вирощуванні шару згаданих вище допоміжних (фідерних) «годувальних» клітин мезенхімного походження (найчастіше з цією метою використовуються фетальні фібробласти перших трьох пасажів). Зараз ведуть розробку методів перетворення таких клітин на певну тканину з метою подальшої трансплантації. Раніше спроби вирощування диференційованих клітин людини і тварин в умовах двовимірної первинної культури на пластинці завжди призводили, до незворотної дедиференціації і втрати корисних функцій гепатоцитами, нейронами, м'язовими клітинами. Лише недавно встановили, що соматичні клітини людини стабільно підтримують фенотип при щільності клітин у шарі культури і млрд/мл і при наявності ядра з мезенхімних клітин. Таку побудову функціональних одиниць органу можна отримати лише при використанні ембріональних стовбурових клітин (Рис.7).

Першим і головним джерелом сировини для отримання лабораторних соматичних клітин залишаються клопи ембріональних стовбурових клітин, виділені з бластоциста людини. Частина клонів, що найшвидше ростуть, переводять у лінію ембріональних стовбурових клітин. Потім починається багатоетапне диференціювання клітин у нейрони, кардіоміоцити, клітини кровотворення, епітелій тонкої кишки або епітелій ендокринних залоз та інші клітинні типи.

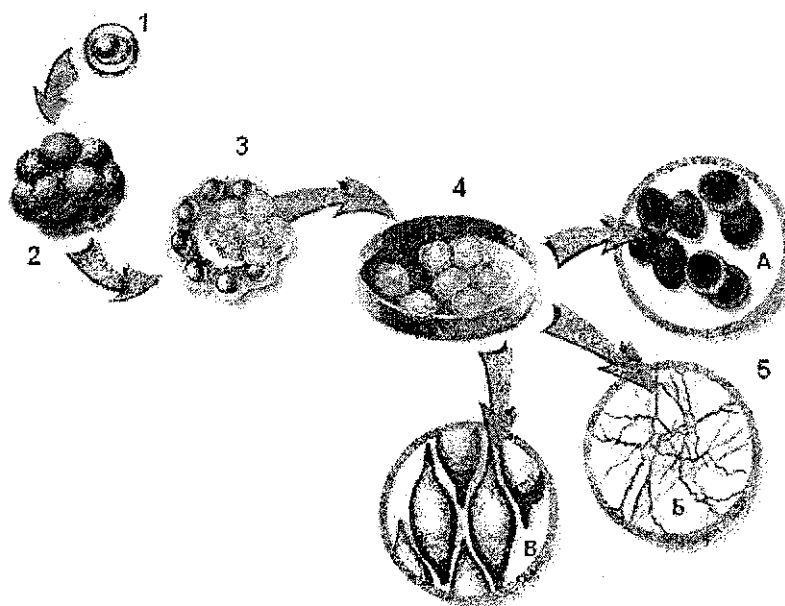


Рис. 7. Загальна схема культивування стовбурових клітин.

1. Яйцеклітина, переведена в умови *in Vitro*; 2. Стадія бластоцисти (5-7 днів); 3. Внутрішня маса стовбурових клітин; 4. Культивовані недиференційовані стовбурові клітини; 5. Спеціалізовані клітини: А - клітини крові; Б - нервові клітини; В - м'язові клітини.

Друге джерело ембріональних стовбурових клітин - це статевий зачаток плодів (фетусів) 4-5-го тижня розвитку або статеві клітини.

Ще одне джерело - стовбурові клітини, що містяться в пуповинній крові, належать до гемопоетичних стовбурових клітин (клітин-попередників кровотворення), які походять з мезодерми. Ці клітини не тотипотентні, але мають риси плюрипотентності, тобто вони шгзькоаференційовані та менш імунореактивні в порівнянні зі спеціалізованими клітинами дорослого організму. Тому при пересадці пуповинної крові реакція несумісності за лейкоцитарними антигенами людини (HLA-система), яка є однією з головних причин реакції трансплантату проти хазяїна, трапляється значно рідше, ніж при пересадці кісткового мозку.

Отримання стовбурових клітин у цьому випадку складається з двох послідовних етапів - отримання та виділення. Пуповинну кров беруть після народження дитини. Для цього використовують контейнери зі

спеціальними консервантами та антикоагулянтами. Наступний етап - виділення стовбурових клітин за допомогою різних методів.

Короткочасне зберігання пуповинної крові не повинне перевищувати трьох діб. Довготривале зберігання виділених клітин здійснюється методом кріоконсервування, тобто клітини заморожують у присутності різних кріопротекторів та зберігають у спеціальних сховищах у парах рідкого азоту при температурі -196°C . Вважають, що зберігання стовбурових клітин пуповинної крові без втрати їхніх властивостей може відбуватися протягом не менш 30 років.

Ембріональні стовбурові клітини виділяють також з тератоканциноми (пухлинної лінії) людини та миші *in vitro*. Однак суттєвий недолік деяких ліній таких клітин - швидка втрата ними тотипотентності. До того ж вони проявляють змішану диференціацію клітин у культурі і мають обмеження щодо використання у клініці.

Відомий ще один різновид стовбурових клітин — так звані стромальні клітини кісткового мозку. Порівняно з гемопоетичними клітинами, стромальних стовбурових клітин у кістковому мозку зовсім небагато, і вони являють собою складніші системи-довгожителі, які оновлюються досить рідко. Як показали останні дослідження, стромальні клітини, так само як і попередники клітин крові, постійно циркулюють у кровотоку ссавців.

У відновленні пошкоджених тканин беруть участь два види стовбурових клітин - спеціалізовані тканинні й універсальні стромальні клітини кісткового мозку. При цьому, якщо тканинні стовбурові клітини використовуються для відновлення пошкоджених ділянок тільки у даному місці і для певного виду тканини (кісткові - для кісток, м'язові - для м'язів, тощо), то стромальні стовбурові клітини кісткового мозку універсальні. Вони потрапляють з кровотоком до пошкодженого органу або тканини й на місці під впливом різних сигнальних речовин перетворюються на потрібні спеціалізовані клітини, які заміщують загиблі клітини.

Стромальні стовбурові клітини кісткового мозку, як і інші стовбурові клітини, здатні перетворюватися на багато інших клітин організму - хрящові (хондроцити), жирові (адипоцити), кісткові (остеоласти). При цьому здатність до таких перетворень у них зберігається і при вирощуванні колонії з однієї-єдиної стромальної клітини. Таким чином, існує принципова можливість виростити велику кількість стромальних клітин, а потім за допомогою спеціальних сигнальних речовин спрямувати їх для відновлення пошкоджених тканин (Рис. 8.).

На шляху до впровадження в трансплантологічну практику технології ембріональних стовбурових клітин зараз існує ряд перешкод, і перша з них - проблема джерела самих цих клітин. На сьогодні головне джерело їх - абортівний матеріал і залишок від матеріалу, застосовуваного при штуч-

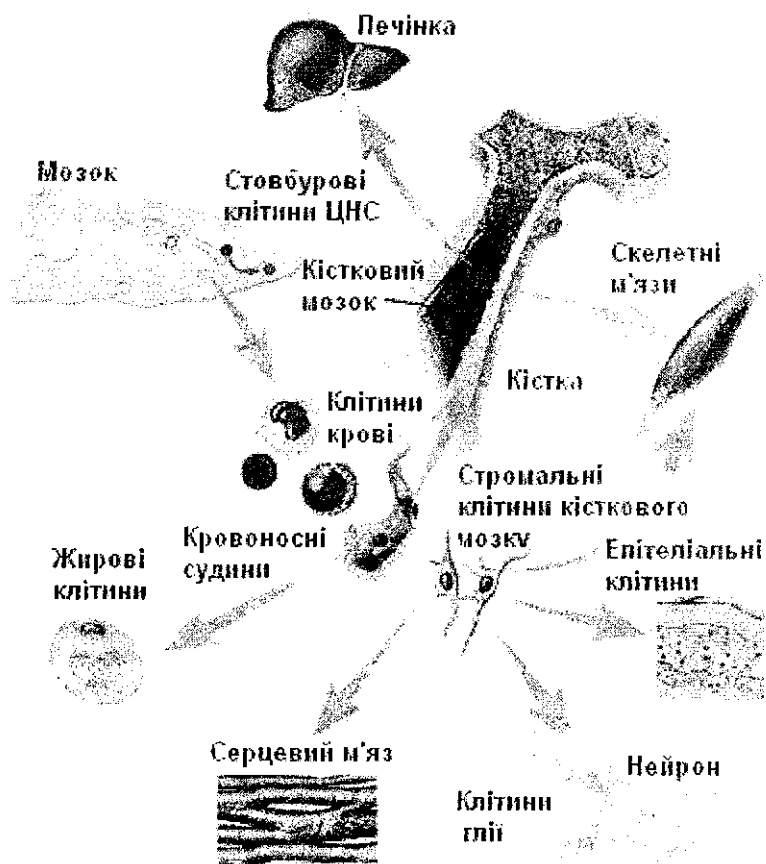


Рис. 8. Шляхи перетворень стромальних стовбурових клітин кісткового мозку

ному заплідненні. Церква, релігійні общини, різні громадські організації, виходячи з біоетичних міркувань, закликають разом з абортами заборонити й дослідження ембріональних стовбурових клітин. У зв'язку з цим у багатьох країнах проекти, що стосуються ембріональних стовбурових клітин, сьогодні заморожено. Другий варіант передбачає безкінечне клонування клітинної лінії нащадків єдиної ембріональної стовбурової клітини, яка вже є в розпорядженні дослідників і яка, як зазначалося вище, здатна до необмеженої кількості поділів. Однак генетичні мутації, що виникають час від часу в ембріональних стовбурових клітинах, передаватимуться дочірнім клітинам і накопичуватимуться в наступних клітинних поколіннях.

Після отримання ембріональних стовбурових клітин постає друга проблема: як спрямувати їх по шляху диференціювання. Потенційно з клітин-попередників можна виростити будь-яку тканину і, в принципі, будь-який людський орган. Питання полягає у тому, як створити відповідні умови і підібрати поєднання індукторів, щоб розвиток ембріональних стовбурових клітин пішов у потрібному напрямку. Роботи з вирощування органів вже ведуться, і досягнуто певних успіхів.

Після того, як трансплантат «вирощено», виникає проблема імунологічної сумісності тканин трансплантата й реципієнта. Кожен організм індивідуальний і має набір генетичних маркерів, за якими імунна система розпізнає їх. Вирішити проблему антигенної несумісності тканин можна двома способами: або вводячи гени майбутнього реципієнта в культуру ембріональних стовбурових клітин на етапі вирощування органа (що досі залишається нездійсненим), або пригнічуючи імунну систему реципієнта за допомогою імуносупресорів. Останній метод має велику кількість негативних наслідків у зв'язку з ризиком розвитку інфекційних ускладнень та пухлиноутворення і не гарантує приживлення трансплантата. Існує й третій варіант - пересадка трансплантата, який гарантовано не контактуватиме з імунною системою реципієнта, наприклад, при нейротрансплантації, яка успішно здійснюється при хворобі Паркінсона (перешкодою для імунної системи служить гематоенцефалічний бар'єр).

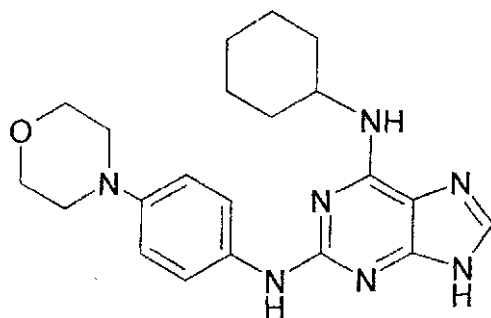
Крім того, ембріональним стовбуровим клітинам притаманна ще одна негативна властивість - викликати ріст пухлин при підсадці мишам з дефектною імунною системою. І хоча робота антигенів тканинної сумісності в ембріональній тканині значно загальмована (що, відповідно, даватиме менш виражену реакцію відторгнення при трансплантації), однак вважається, що вводити ембріональні стовбурові клітини слід лише після диференціювання їх у спеціалізовані тканини.

Можливо, замість того щоб витрачати зусилля на виділення, культивування та введення в організм стовбурових клітин хворого, варто мобілізувати приховані можливості самого організму. З'являється все більше даних про те, що стовбурові клітини, аналогічно до клітин злоякісних пухлин, сприймають хімічні сигнали, які направляють їх до тих місць, де виникли пошкодження. Так, в лабораторних дослідках показано, що за сигналом білку IGF-1 (інсуліноподібний фактор росту 1) мишачі стовбурові клітини направляються в тривалі «подорожі» по організму тварини. Тому зараз досконало вивчають роль хімічних сигналів та можливість практичного використання їх для запуску процесів регенерації за допомогою стовбурових клітин.

Останнім часом увагу дослідників привернули клітини дещо іншого типу - так звані *регіональні стовбурові клітини*, знайдені майже в усіх

органах. Визначають і виділяють такі клітини за певними маркерами, а також використовують особливості росту їх в культурі і здатність до диференціювання. Встановлено, що багато з них здатні диференціюватися не тільки у клітини того органу, у якому вони знаходяться, але й у клітини інших органів і тканин. До основних властивостей регіональних стовбурових клітин відносять плюрипотентність та обмежений (у порівнянні з ембріональними стовбурними клітинами) потенціал до поділу та диференціювання. Основні переваги регіональних стовбурових клітин перед ембріональними полягають у тому, що їх при необхідності можна використати як аутогенний клітинний матеріал. Тому не виникає ніяких імунологічних проблем, а також етичних перешкод щодо їх використання.

Зовсім недавно відкрито новий механізм дедиференціювання й отримання стовбурових клітин з дорослих соматичних клітин за допомогою хімічної речовини - міореверсину. Використання цієї речовини вже дозволило дедиференціювати міобласти скелету. Зараз цей напрямок досліджень вважається надзвичайно перспективним, оскільки обіцяє надати можливість одержати стовбурові плюрипотентні клітини практично з будь-якої людської тканини з наступним їх диференціюванням у клітини потрібного органу.



2-(4-морфоліноаніліно)-6-циклогексиламіно-пурин (міореверсин)

Слід відмітити, що стовбурові клітини й клітинна медицина - це загалом перспектива майбутнього, можливо, досить віддаленого. На шляху впровадження їх лежить велика кількість невирішених питань не тільки наукового та методичного, але й етичного характеру. Є тільки невеликий перелік захворювань, при якому лікування стовбурними клітинами показане й існує достатній клінічний досвід, що дає змогу досягти дійсно хороших результатів, не піддаючи хворого небезпеці.

У 1988 р. у Франції виконано першу трансплантацію з використанням пуповинної крові. Відтоді в світі було проведено біля тисячі пересадок

гемопоетичних стовбурових клітин, з них 60 % - з приводу злоякісних захворювань крові, 6 % - з приводу нейробластоми і 34 % - з приводу незлоякісних захворювань.

У випадках важких пошкоджень організму не досить своїх власних стромальних клітин. Йому можна допомогти, вводячи стромальні клітини іззовні. Так, зокрема, показано, що введення стромальних клітин кісткового мозку у зону пошкодження серцевого м'яза (зону інфаркту) практично повністю знімає явища післяінфарктної серцевої недостатності у експериментальних тварин. Подібна клітинна терапія для відновлення пошкоджень серцевого м'яза надзвичайно перспективна, оскільки для неї використовують власні стовбурові стромальні клітини організму. Вони не підлягають відторгненню; крім того, при введенні дорослих стовбурових клітин виключено вірогідність злоякісного їх переродження.

У цьому плані ведуться успішні клінічні дослідження й інших стовбурових клітин. Так, недавно показано, що введення власних стовбурових клітин м'язової тканини (міобластів), отриманих з м'язів стегна пацієнта-інфарктника, безпосередньо в зону інфаркту значно покращило здатність серця до скорочень.

Стромальні клітини під впливом певних факторів можуть перетворюватися навіть у нервові клітини (нейрони). Ці поки що лабораторні дослідження дають надію на лікування хворих з важкими ураженнями спинного й головного мозку, тим більш, що, як показано у багатьох дослідженнях, при введенні власних стромальних клітин кісткового мозку у спинномозковий канал людини вони рівномірно розподіляються по всіх відділах головного мозку, не порушуючи його структури. Недавно за допомогою використання стромальних клітин кісткового мозку вдалося відновити рушійну активність кінцівок у мишей, у яких попередньо штучно викликали інсульт. Тому зараз розгорнуто роботи щодо вирішення проблеми перетворення стромальних клітин у нейрони.

Стромальні клітини можна перетворити і на клітини печінки. Встановлено, що при пошкодженні печінки нові печінкові клітини (гепатоцити) та їхні попередники формуються головним чином з донорських стромальних клітин кісткового мозку.

Терапія стромальними клітинами вже з успіхом випробується в ортопедії при лікуванні складних переломів кісток.

Зараз у всьому світі проводять величезну кількість досліджень у галузі клітинних технологій. Наслідки цих досліджень можуть дати дуже багато. Клінічні випробування дають результати, про які при деяких захворюваннях лікарі й мріяти не могли, а хворим не полишали будь-якої надії.

Зрозуміло, що багато людей вже зараз хочуть скористуватися цими можливостями. Наприклад, після пологів у новонароджених немовлят

багатьох батьків у США і Європі вже з 1992 р. збирають та зберігають стовбурові клітини пуповинної крові. Такі клітини в принципі можуть стати своєрідною страховкою від багатьох хвороб на час довгого та щасливого життя. Пацієнти звертаються до клінік, які обіцяють «вилікувати всі хвороби» стовбурними клітинами, відвідують косметологів, які "омолоджують" клієнтів стовбурними клітинами. Але завжди слід брати до уваги, що:

1. клінічного досвіду використання стовбурових клітин надзвичайно мало (за виключенням банків кісткового мозку та гематологічних центрів);
2. не вирішено ряд питань щодо віддалених наслідків такої терапії;
3. при дії стовбурових клітин на організм існує ризик канцерогенезу;
4. при терапії стовбурними клітинами існує загроза інфікування, оскільки не завжди ЕІДОМО, де, як і від кого отримано "клітинний препарат" та чи тестувався він на інфекційну безпеку;
5. існує ризик імуногенності клітинного препарату.

На даному етапі дослідження стовбурових клітин вже породило багато питань, і, на жаль, не на всі з них отримано відповіді. Але результати перших спроб застосування дорослих стовбурових клітин для лікування серцево-судинних хвороб досить обнадійливі. Тому слід сподіватися, що бурхливий прогрес у цій новій і надзвичайно перспективній галузі медичної технології забезпечить успішне подолання вказаних проблем. А регенеративній терапії на рівні клітин та органів пророкують велике майбутнє.

2.3. Культури рослинних тканин та клітин

У 1934-1939 рр. Ф. Уайт, Р. Коте та П. Нобко відкрили явище необмеженого росту в лабораторних умовах кореневої системи рослин і рослинних клітин у культурі, а також органогенез в умовах *in vitro*. При цьому встановили, що інокульовані корені ніколи не містять вірусу. У 1949 р. було встановлено, що апікальна меристема (невелике місце на кінці стебла, що не перевищує 0,1 мм і складається з недиференційованих клітин; це місце постійно росте і утворює органи рослин) практично не містить вірусів. Було виявлено, що насіння, отримане від зараженої рослини, також не містить вірусів. Ці факти, що пізніше привели до використання культур паростків меристеми для усунення вірусів, стали основою сучасної технології отримання безвірусних рослин.

Метод культур тканин або мікророзмноження *in vitro* винятково зручний для швидкого розмноження і зберігання здорових рослин. З цієї метою відбирають відповідні рослини і піддають їх стерилізації з наступним перенесенням на відповідне живильне середовище. Можливість використати методи клонального мікророзмноження в стерильній культурі показано зараз для 440 видів рослин, які належать до 82 родин.

Кількість відібраних для культивування *троспан-експлантів* залежить від виду й фази розвитку рослини, органу, з якого взято експлант, пори року. Подальше культивування рослинних культур здійснюють із застосуванням спеціальних мікропористих поліпропіленових мембран, оброблених спеціальною поверхнево-активною речовиною, щоб покращити проходження поживних речовин. Ця методика суттєво прискорює ріст рослин порівняно з класичною методикою, що використовує агаризоване середовище. Раніше для виведення нового сорту було потрібно 10–30 років, тепер же, завдяки вживанню методів культивування тканин цей час скорочено до декількох місяців.

Мікроклональне розмноження - це безстатеве вегетативне розмноження, в результаті якого одержують генетично ідентичні форми, яке забезпечує збереження генетично однорідного посадкового матеріалу. У виробничих умовах цей метод широко застосовується, в тому числі і в Україні, зокрема для оздоровлення та швидкого клонального розмноження такого матеріалу.

У порівнянні з традиційними методами розмноження, які використовуються в сільськогосподарській практиці, мікроклональне розмноження в культурі дає ряд переваг:

Коефіцієнт розмноження вищий, ніж при звичайних методах розмноження. Так, з однієї рослини гербери методом традиційної селекції за рік можна одержати 50-100 рослин, а при розмноженні через культуру - до 1 млн; з однієї верхівки яблуні за 8 місяців культивування можна одержати 60 тис. рослин;

Можна підтримувати ріст цілий рік;

Тисячі рослин можуть рости на невеликій лабораторній площі;

Разом із розмноженням часто гтоовадять оздоровлення рослин від вірусів і патогенів;

Цим методом можна отримувати рослини, які важко або зовсім не розмножуються вегетативно, як, наприклад, пальма.

Мікроклональне розмноження добре проводиться з картоплею, капустою, часником, томатом, цукровим буряком; серед ягідних культур найбільших успіхів досягають для суниці, серед декоративних культур - для ірису, гіацинту, фрезії, гладіолусу, лілії, орхідей, гвоздики, нарцисів, тюльпанів, гербери.

Культура клітин рослин з лабораторного об'єкту перетворилася на теоретичну і технологічну основу нової галузі промисловості - біотехнології рослин. З огляду на те, що тільки рослини є джерелом багатьох важливих речовин, а запаси рослинної сировини в природі виснажуються, неважко уявити місце клітинних технологій у майбутньому.

Річ у тім, що культивовані культури, як правило, здатні до синтезу вторинних сполук, притаманних тому виду рослин, з яких вони виділені.

Цим методом можна отримати алкалоїди, глікозиди, фенольні сполуки, ефірні олії, фітогормони, такі, наприклад, як дигітонін, хінін, кодеїн, аймалін, вінбластин, вінкриєтин, берберин.

У залежності від використовуваних рослинних клітин і тканин, а також способів культивування розрізняють наступні основні типи структур: калюсні, суспензійні, протопластів, меристематичні, пиляків.

Калюсні структури. У культурі тканин певного виду рослин у результаті поділу диференційованих клітин виникають недиференційовані вакуолізовані клітини, що ростуть хаотично, утворюючи клітинну масу - так званий *калюс* (в перекладі з латинської - мозоля). Ця тканина формується не тільки в пробірці, але й у природних умовах при пораненні рослин і сприяє їх загоюванню. Складається вона з більш-менш однорідних паренхімних клітин, початок яким дає меристема рани. Калюс утворюється на живильних середовищах, що містять мінеральні й органічні поживні речовини, вітаміни, цукроспирти, ауксини, а іноді й цитокиніни (Рис. 9).

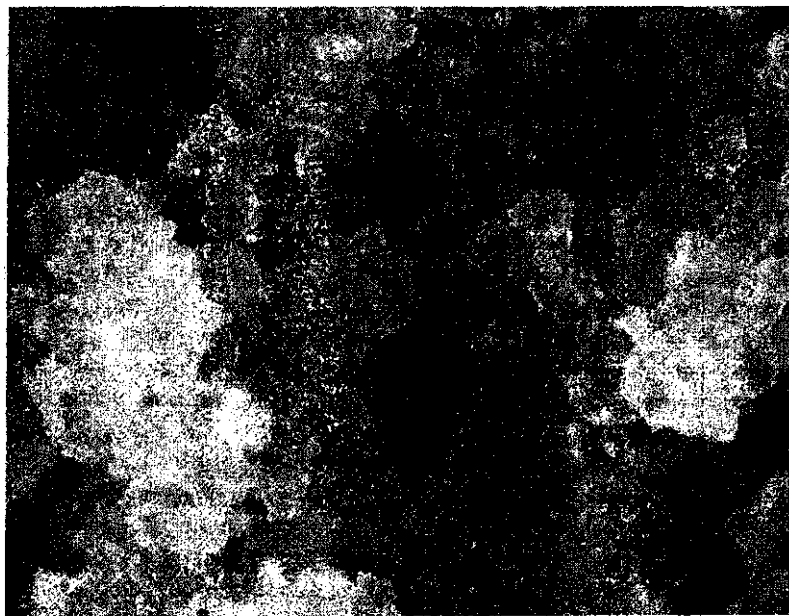


Рис. 9. Клітини калюсу під мікроскопом

Для калюсних структур вихідним матеріалом є калюс. Елементи калюсу мало диференційовані, однак поблизу його поверхні спостерігається ріст, обумовлений активністю меристематичних клітин. У подальшому в

калюсі можливе диференціювання його елементів та утворення *флоеми*, *кешами* та інших тканин. Зовнішні клітини калюса набувають структури корку.

Для культивування на відібраному органі роблять надріз, на всій поверхні якого розвивається тканина, що складається з клітин, які ростуть хаотично. Ця утворена тканина й культивується в заданих умовах.

Культивування калюсу на твердих середовищах здійснюють на різному механізованому устаткуванні. Апарат для культивування клітин являє собою вертикальну ємність пиліцидричної форми з конічним дном, сорочкою і зміювиками для охолодження культури, розділену усередині перфорованими пластинами. Процес отримання клітин у такий спосіб потребує використання досить великих площ, не гарантує стерильності, і до того ж має відносно низьку продуктивність. У залежності від виду рослини і поставленої мети попередньо необхідно встановити склад поживних середовищ та концентрації фітогормонів, потрібних для оптимального росту. Калюси можуть дуже відрізнятися на вигляд. Вони бувають рихлі або щільні. Забарвлення калюсу дає змогу судити про утворення вторинних речовин. Якщо калюс тримати у повній темряві, він білувато-жовтий. На світлі він утворює хлорофіл і стає зеленим. Червоне світло вказує на наявність *антоціану* та *бетаціану*. Щоб послабити або усунути ці впливи, у живильне середовище додають піблшнітіролідон, глутатіон . або аскорбінову кислоту. Коричневі клітини утворюються перед відмиранням, тому таку тканину необхідно помістити у свіже середовище.

При довгочасному культивуванні калюси можуть втрачати свій морфогенетичний потенціал. Після декількох змін живильних середовищ і при додаванні ростових гормонів калюс диференціює і регенерує, утворює осьові пагони, корені і, нарешті, повністю всю рослину, здатну до розмноження та вирощування в ґрунті. Однак здебільшого калюси використовуються як вихідний матеріал для клітинного або суспензійного культивування.

Рослини, регенеровані з калюсу, часто відрізняються від своїх батьків за кількістю хромосом. Зміни, що спостерігаються в ізолюваній культурі, можуть виникати внаслідок мутацій специфічних генів та хромосомних перебудов. Для селекції генетична мінливість клітин калюсу може становити певний інтерес. Так, на основі регенерації в культурі тканин і органів рослин отримано високопродуктивні сорти соняшнику. На жаль, у таких найважливіших сільськогосподарських культур, як зернові та бобові, активувати морфогенез на живильних середовищах поки що вдається досить рідко, хоча останнім часом у цьому напрямку з'явилися певні досягнення.

Суспензійна культура. Клітини рослин можна культивувати і в рідких живильних середовищах (суспензійні культури), що дає змогу впливати на

метаболізм і ріст популяцій за допомогою екзогенних факторів. У цьому разі використовують лінії клітин рослин, які відповідають таким умовам: схильність до розмноження в дезінтегрованому стані, морфологічна "вирівняність", задовільна швидкість розмноження, збереження шляхів метаболізму. Такі клітинні лінії уподібнюються одноклітинним мікроорганізмам і можуть називатися "суспензійними культурами" у разі вирощування їх на рідких живильних середовищах. При цьому склад і реологічні характеристики середовищ належать до головних факторів, що визначають перебування поодиноких або агрегованих клітин у стані зависі. Щодо морфологічної "вирівняності" клітин, то йдеться про їхню округлу або сферичну форму, ущільнену цитоплазму та порівняно невеликі розміри (у середньому 10-50 мкм). Поодинокі рослинні клітини в цьому разі нагадують одноклітинні еукаріотичні мікроорганізми; їхні ростові характеристики (фази розмноження) у деякому наближенні теж збігаються (lag-фаза, log-фаза, const-фаза), хоча часові інтервали поміж фазами для рослинних клітин довші.

Для суспензійних культур вихідним матеріалом можуть бути як ізольовані цілі клітини відібраного органу рослини, так і подрібнений калюс. Утворені клітини вміщують у рідке живильне середовище, та культивують при постійному перемішуванні. Ріст суспензійної культури відбувається у багатьох випадках суттєво швидше, ніж калюсної культури, оскільки скупчення клітин поглинають поживні речовини значно більшою загальною поверхнею, а у калюса це відбувається лише у тій його частині, яка лежить на субстраті. При цьому відбувається поділ клітин, нові клітини не відділяються, і їхні скупчення збільшуються. За допомогою особливих прийомів суспензійну культуру можна перенести на тверде живильне середовище. Тут з клітин або комплексів клітин може утворитися здатний до життя калюс. У суспензії можуть виникнути також і зародки, які після перенесення їх на агар утворюють нову рослину.

Швидкість розмноження рослинних клітин невелика. Час подвоєння їхньої кількості становить 1-3 доби, і тому за даним показником вони суттєво поступаються, наприклад, бактерійним та дріжджовим клітинам, час подвоєння яких у глибинних умовах не перевищує для більшості видів 20-30 хв. Проте, переводячи культуру рослинних клітин на хемостатне (безперервне) вирощування, можна досягти високої їх продуктивності за біомасою або за вторинними метаболітами. Початкові клітинні суспензії зазвичай отримують з калюсних тканин, підданих обробці пектиназою та полігалактуроназою. При цьому умови вирощування підтримують або в періодичному, або в безперервному режимі.

Вирощуючи клітини в суспензійних культурах, важливо зберегти притаманні їм особливості обміну. Більш того, регулюючи обмін, можна досягти помітного підвищення виходу потрібних продуктів. За цих умов

увагу приділяють типові диференціації, або станові спеціалізації вихідних клітин, оскільки від нього залежить видоспецифічність первинного та вторинного метаболізму.

Суспензійні культури зазвичай вирощують у відповідних місткостях після фільтрації первинної суспензії через стерильні металеві, нейлонові або марлеві сита, щоб звільнитись від великих агрегатів клітин. Для культивування рослинних клітин в суспензії використовують колби Ерленмейера ємністю 250 мл. Рослинні клітини вирощують в апаратах роллерного типу з частотою обертання 100 об/хв. Для крупномасштабного культивування рослинних клітин використовують спеціальні металеві або скляні ферментери (біореактори) різної конструкції ємністю від 0,1 до 60 м³ та більше. Вирощування проводять на протязі 70 діб, здійснюючи мікробіологічний, біохімічний та візуальний контроль.

Аерацію культуральної рідини здійснюють стерильним повітрям через барботер. Повітря стерилізують, як правило, шляхом фільтрації на двох-трьох послідовно розташованих фільтрах. В процесі культивування клітин регулюють температуру (25-37°C), активну кислотність середовища і окислювально-відновний потенціал.

Основну увагу при нарощуванні біомаси в ферментерах приділяють процесу піногасіння. Основна причина появи великої кількості піни - висока в'язкість живильного середовища, обумовлена значним нагромадженням біомаси. Для боротьби з піною у ферментерах використовують різні поверхнево-активні речовини: рослинні олії (соєву, союшгаикову), мінеральні олії (вазелинову, парафінову), спирти, жирні кислоти. Іноді з цією метою використовують спеціально синтезовані речовини (силікони, діазобутилкарбаміл тощо).

Як успішний приклад здійснення промислового вирощування рослинних клітин у глибинних умовах можна навести здійснений в Японії крупномасштабний процес вирощування вербозілля (*Lysimachia*) в умовах занурення, з метою отримання вторинного метаболіту - *шиконіну*, цінного фармацевтичного препарату та барвника.

Культура протопластів. В умовах *in vitro* вдається злити (поєднати) соматичні клітини рослин різних видів. З цією метою в клітинній інженерії рослин широко використовують *протопласти*. Протопласти - це клітини, позбавлені клітинної оболонки механічно або за допомогою ферментів. Така "гола" клітина надалі готенційно спроможна відновити клітинну оболонку, ділитися й утворювати клітинні агрегати, з яких надалі можна отримувати *рослини-регенеранти*. Відсутність клітинної стінки дає змогу виконати ряд генетичних маніпуляцій, пов'язаних з реконструюванням генома, а також одержати популяції гібридних клітин у результаті злиття протопластів, виділених з клітин мутантного походження (Рис. 10).

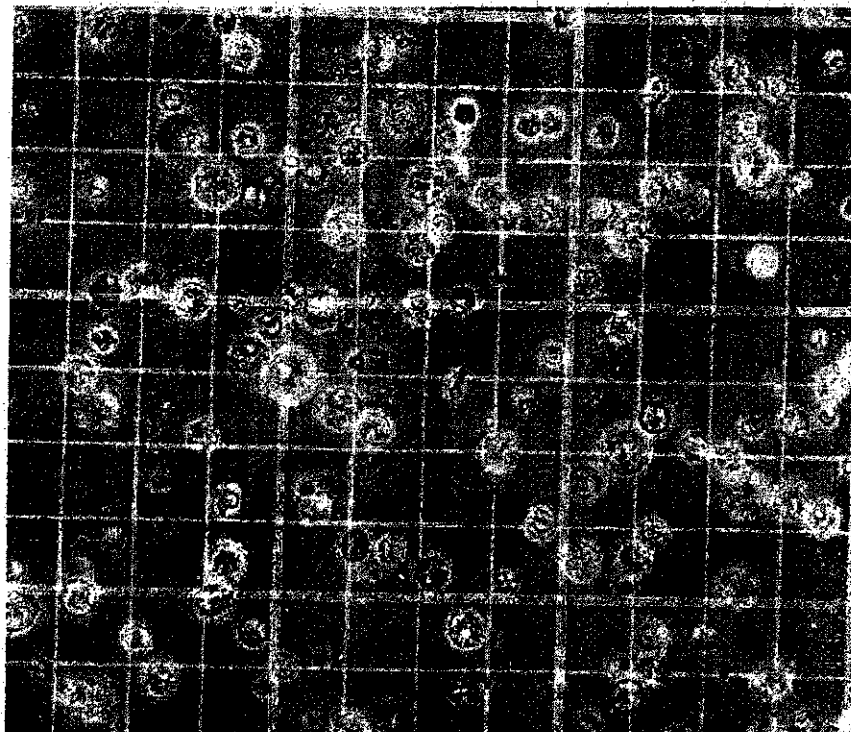


Рис. 10. Протопласти під мікроскопом

Протопласти рослин уперше отримали в 1971 р. у лабораторії А. Такебе. Для руйнування клітинної стінки звичайно застосовують ферментні препарати трьох видів - *целюлозу*, *гемоцелюлазу* та *пектиназу*. Щоб отримати життєздатні протопласти, необхідний також осмотичний стабілізатор. Такими стабілізаторами бувають цукри (глюкоза, сахароза, ксилоза, сорбіт, маніт) або розчини деяких солей. Крім осмотичних параметрів середовища, мають бути також підібрані рН, освітлення, температура та інші фактори.

Культури протопластів отримують, головним чином, з виготовленої суспензії, отриманої з мезофілу, обробляючи її ферментами, що руйнують клітинні стінки. В результаті може відбутися приєднання чужих органел, а також чужої ДНК, яка вбудовується в генетичний матеріал ядра; результатом може стати синтез (експресія) певних продуктів. Оскільки поверхні протопластів мають від'ємний заряд, необхідно нейтралізувати відштовхування їх один від одного, після чого вони поєднуються.

Як вже вказано, для отримання протопластів рослинні клітини заздалегідь звільняють від оболонок. Цього можна досягти за допомогою плазмолізу і подальшого нарізування тканини. Згідно із цим методом, рослинні тканини знаходяться у гіпертонічному середовищі до тих пір, поки протоплазма повністю не відокремиться від клітинної стінки, після чого клітини нарізають гострим лезом. Протоплазма, що при цьому в деяких випадках стискається, залишається непошкодженою. Коли нарізану у такий спосіб тканину знову занурюють у розбавлене середовище, протоплазма набухає і виходить за межі зруйнованої клітинної камери, внаслідок чого утворюється ізольований протопласт.

Найбільш поширеним є вищезазначений метод перетравлення клітинних стінок за допомогою суміші целюлаз, пектиназ та геміцелюлаз. Ці ферменти одержують в промислових масштабах із джгутикових або грибів у вигляді препаратів різного ступеню чистоти. Зрозуміло, що травлення клітинних стінок веде до руйнації живих протопластів. Частково це відбувається внаслідок того, що препарати ферментів забруднені протеазами і пероксидазами. Проте, ступінь пошкодження протопластів залежить не тільки від забруднення ферментних препаратів, їх концентрації і часу обробки, але і від видів рослин і типів тканин, які гідролізуються. Перспективним є отримання протопластів за допомогою плазмолізу в розчині сахарози, що сприяє їх подальшому відновленню.

Після припинення дії ферментів у протопластів знову починає утворюватися клітинна стінка. Вона виникає скоріше ніж за добу, після чого клітини починають ділитися і регенерують нові рослини. За цих умов досить важко досягти поділу утворюваних клітин, а ще важче отримати цілу рослину. Виділяють низку факторів, які визначають проліферативну здатність клітин, що виникають з ізольованих протопластів: 1) видова специфічність та фізіологічний стан тканини рослин; 2) спосіб і умови виділення протопластів; 3) щільність висіву протопластів; 4) склад живильного середовища (це стосується не лише гормональних і вітамінних домішок, а й концентрації мінеральних солей та рН).

Подальшу регенерацію рослин з протопластів здійснюють або через ембріогенез, або через розвиток калюсу. Для цього протопласти культивують у середовищі, в якому вони можуть ділитися і формувати калюс, здатний до регенерації з утворенням цілої рослини. З використанням культури клітин і тканин вдається швидко розмножити новий сорт (якщо культуру у виробництві розмножують вегетативно) або лінію для виробництва гібридного насіння у городніх, декоративних та інших рослин (Рис. 11).

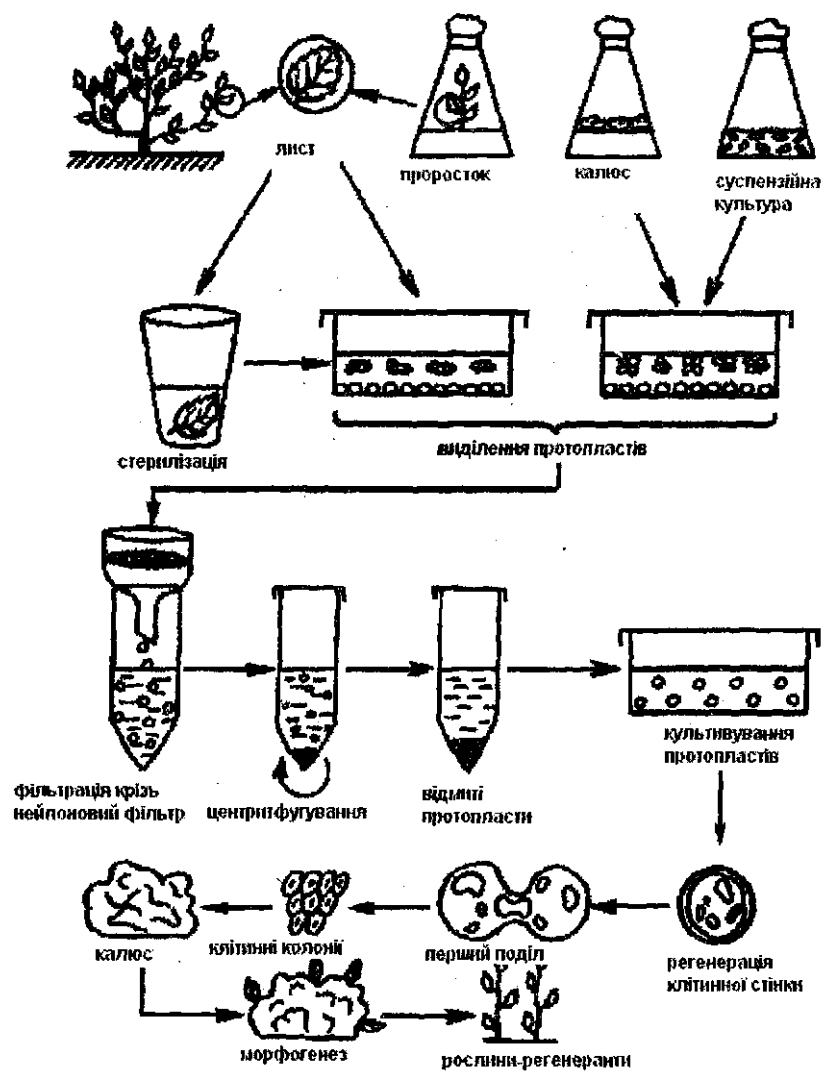


Рис. 11. Схема отримання рослин-регенерантів з протопластів

Освоєння техніки регенерації рослин з протопластів дає змогу зробити більш дієвою селекцію на рівні клітин. Якщо клітини обробити мутагеном і піддати дії якихось несприятливих умов, виживуть тільки мутанти, стійкі проти цих умов. Несприятливими факторами можуть бути токсичні

речовини (пестициди та гербіциди), збудники захворювань, низький вміст у ґрунті факторів росту або засоленість ґрунтів тощо.

У багатьох випадках вдавалося злиття протопластів різних батьківських рослин і подальша регенерація через культуру калюсу нової рослини із заданими властивостями (Рис. 12).

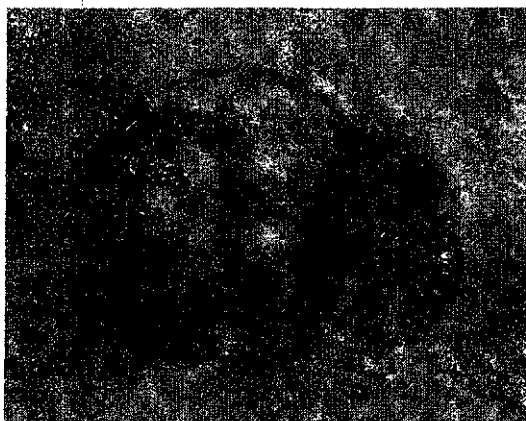


Рис. 12. Злиття протопластів

Виявилося, що у такий спосіб можна схрещувати представників різних видів. Шляхом злиття протопластів виростили, наприклад, гібрид картоплі й томату - "томофель". Цей спосіб має комерційне значення при виведенні нових сортів соєвих бобів, цитрусових, цукрової тростини, кукурудзи, пшениці й картоплі. Отримано також гібрид двох видів дурману, що містить на 25% більше алкалоїду тропану у порівнянні з батьківськими рослинами.

Меристематична культура. Для меристематичної культури використовують меристему - ростову тканину, яка довго зберігає здатність до поділу та утворення нових клітин і відрізняється високою метаболічною активністю. Для культивування ізолюють конуси наростання пагонів, коренів, а також пазушні бруньки. Меристематичні культури більш відомі у садівництві, оскільки вони дають можливість отримувати безвірусні клони. З цього можна зробити висновок, що розподіл вірусів у різних частинах рослини нерівномірний, а меристема їх позбавлена. З безвірусної меристеми у великій кількості можуть регенерувати генетично тотожні безвірусні рослини. Цей спосіб використовують для виведення сортів картоплі, винограду, декоративних рослин, а також у лісоводстві.

За допомогою культивування меристеми, що гарантує безвірусність рослини, виведено нові сорти гвоздики, хризантеми, гербери та інших

декоративних рослин. Створено й нові сорти екзотичних орхідних рослин, виробництво клонів яких вже поставлено на промислову основу. Деякі сорти суниці, малини, цитрусових виведено з використанням техніки клонування. Раніш для виведення нового сорту необхідно було 10-30 років, зараз же, завдяки використанню методів культивування тканин, цей період скорочено до Декількох місяців.

Культура пиляків. На живильних середовищах при високій інтенсивності освітлення нині вирощують рослини - гаплоїди з клітин пилку. У таких рослин вдвічі менше хромосом, ніж у звичайних соматичних клітинах стовбуру, листя або коренів батьківської рослини. Для отримання гаплоїдних рослин використовують культуру пиляків. Як правило, рослина дигоюїчна, тобто в її клітинах міститься два гомологічних набори хромосом. Тільки зародкові клітини є гаплоїдні. Для отримання гаплоїдної культури найпридатніші нестиглі пиляки, у яких пилкові зерна (клітини) знаходяться ще в стадії, яка передує першому поділові мікроспор на вегетативні та генеративні зерна. Після переносу стерильних пиляків на живильне середовище пилкові клітини починають ділитися. Розвивається проміжний калюс або ж одразу утворюється гаплоїдний зародок, що пізніш диференціює в гаплоїдну рослину. Такі гаплоїдні рослини стерильні, але вони можуть перейти в диплоїди після дії колхіцину або злиття протопластів. З них при подвоєнні хромосом під впливом колхіцину або закису азоту під тиском отримують дигаплоїди (якщо головний хромосомний набір збільшено вдвічі) або ж тетраплоїди (коли цей набір зростає в чотири рази). Утворені рослини *гомозиготні* та стійко забезпечують прояв притаманних їм властивостей протягом багатьох поколінь. При цьому нові цінні ознаки у них не зникають, якщо, звичайно, в них не виникає мутацій. Так утворюються плодючі гомозиготні чисті лінії рослин, що мають велике значення для селекції, оскільки в наступних поколіннях завжди зустрічаються ті само задані ознаки. Завдяки цьому методом виведено нові сорти зернових і тютюну, а також отримано численні лікарські рослини з поліпшеними властивостями. Гомозиготні лінії культур рослинних клітин часто використовують у селекції на *гетерозис* - достовірне підвищення продуктивності, якості або ж іншого показника порівняно з батьківською формою, що бере участь у гібридизації.

Для культивування рослинних клітин використовують різноманітний набір поживних середовищ, як рідких, так і твердих (агаризованих). Культуру клітин для отримання деяких лікарських препаратів вирощують на середовищах, що містять солі, сахарозу, вітаміни (тіамін, нікотинову кислоту, піридоксин), агар-агар, кінетин, індол-3-оцтову кислоту, амінокислоти тощо).

Клітини деяких сільськогосподарських рослин вирощують у рідких поживних середовищах Мурасіга-Скуга (МС), Шенке-Хільдебрандта (ШХ),

Уайта. Вони виявилися ефективними для вирощування різних рослин. МС та ШХ вважають середовищами з високим вмістом солей (у порівнянні з низькосольовим середовищем Уайта). Середовище ШХ відрізняється від інших надзвичайно високим, десятиразовим, вмістом мезоінозиту.

Компоненти середовищ для вирощування калюсних і суспензійних культур можна розділити на шість груп що зазвичай відтворює порядок при виготовленні вихідних концентрованих розчинів:

Основні неорганічні поживні речовини (мікроелементи) -

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; Fe_2SO_4 ; $\text{MgSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; MoSO_4 ; KCl ; KJ та ін.;

Джерело заліза $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$;

Органічні добавки (вітаміни, амінокислоти, нікотинова кислота, тіамін, хлористоводнева кислота);

Джерела вуглецю (сахароза);

Регулятори росту рослин гібереліни, ауксини, цитокініни).

Зміна складу поживного середовища і інших параметрів культивування приводить до зміни не тільки кількісного, але і якісного складу продуктів біосинтезу рослини, у результаті чого можуть бути отримані зовсім нові біологічно активні сполуки з ігошщипово іншим механізмом дії.

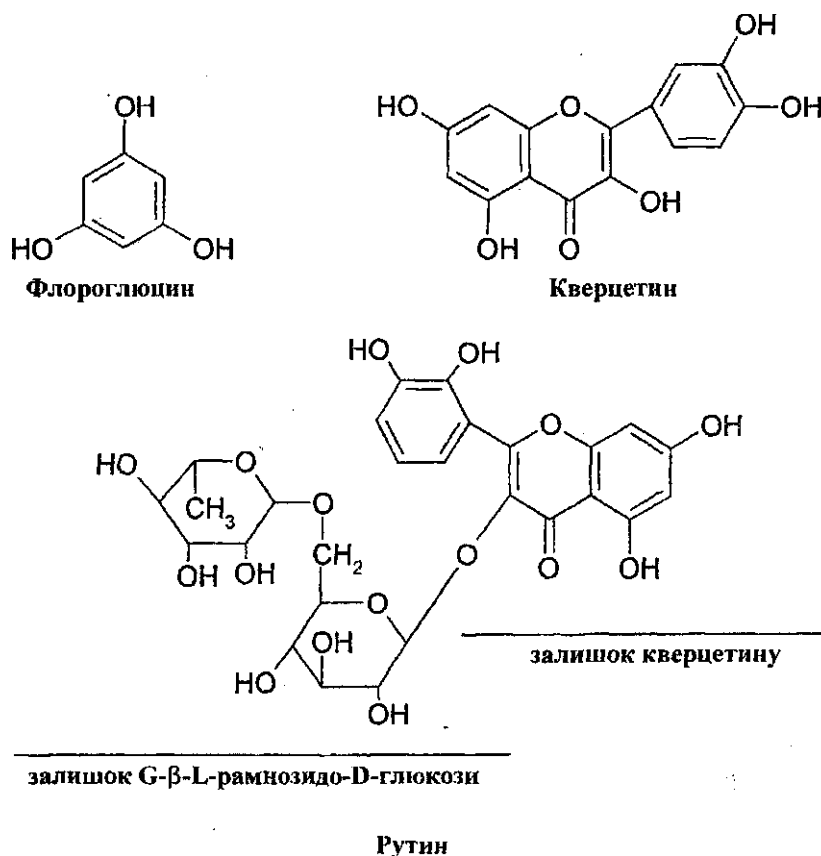
Щодо живильного середовища, яке використовується саме при кло-нальному мікророзмноженні, то його властивості визначаються поставле-ною метою культивування рослинного матеріалу, оскільки від заданих умов залежать властивості кінцевого продукту. Оскільки ізольовані рослин-ні клітини і тканини переважно гетеротрофні, у середовищі має міститися органічно зв'язаний вуглець, джерелом якого звичайно служать глюкоза або сахароза. Азот додають у формі нітратів, що утилізуються клітинами за допомогою нітратредуктази. Необхідні компоненти середовища - це також вітаміни, особливо групи В (B^1 , B_2 , B_6), інозит, а також амінокислоти та органічні солі. До безумовно необхідних мікроелементів належать бор, марганець, йод, мідь, кобальт, молібден. Так, нестача марганцю перешкоджає синтезу білків, зменшує кількість РНК і призводить до збільшення вмісту вільних амінокислот. Залізо має значення для поділу ядра і для діяльності дихальних ферментів. Нарешті, у живильному середовищі необхідна присутність ряду фітогормонів.

Маніпулюючи концентраціями різних речовин у живильних середо-вищах, кислотністю середовищ, температурою, освітленістю і вологістю в камерах для культивування, можна одержати рослини й речовини з необхідними властивостями.

Відібраний для подальшого культивування матеріал стерилізується різними речовинами. При цьому необхідно проводити стерилізацію протягом певного часу, щоб, з одного боку, її тривалість забезпечила знищення мікроорганізмів, з іншого - не пошкодила б самі рослини

клітини. Підготовка матеріалу до культивування завершується багаторазовим обмиванням стерильною водою, після чого його вмішують у стерильну робочу банку на живильне середовище і вирощують обов'язково в стерильних умовах.

Мікрокультивування *in vitro* забезпечує швидке вегетативне розмноження багатьох видів рослин. При цьому важливе значення має стан *ювенільності* (від англійського *juvenile* - юнацький, юний), який зазвичай розтягується на кілька років і характеризується порівняною легкістю вегетативного розмноження. Для дерев відомо також явище *реювенільності*, коли деякі тканини дорослої рослини проявляють властивості паростків. Реювенілізовані тканини використовують для розмноження окремих видів покритонасінних (наприклад, евкаліптів) та голонасінних дерев (різні види сосни). Реювенілізація може прискорюватись під впливом окремих фенольних сполук (флороглюцин, кверцетин, рутин).



Ці сполуки впливають на регуляторні процеси, викликані впливом цитокінінів.

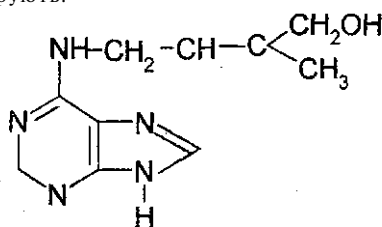
Дуже перспективними визнаються роботи, пов'язані з виробництвом лікарських і технічних речовин на основі культивування рослинних тканин; це особливо стосується речовин, яких не вдається синтезувати. Так, подібним способом вже одержують з клітинних барбарису ізохіноліновий алкалоїд барберин, а з женшеню - гінсеносид.

Виращувані на штучних живильних середовищах клітини й тканини рослин стали основою різноманітних технологій у сільському господарстві. Одні з них спрямовані на отримання рослин, тотожних початковій формі; йдеться про оздоровлення та клональне мікророзмноження на основі меристемних культур, створення штучного насіння, кріозбереження генофонду при глибокому заморозуванні меристем і пилку. Інші методи застосовують для створення рослин, генетично відмінних від початкових, для полегшення й прискорення традиційного селекційного процесу або для створення генетичної різноманітності й пошуку та відбору генотипів з цінними ознаками.

Соматичні клітини рослин *тотипотентні*, тобто від клітин, ізольованих з різних рослинних тканин, можна регенерувати цілу рослину. Регенерації повноцінних рослин з калюсу досягають двома способами: диференціацією пагонів та коренів при зміні співвідношення гормонів *ауксинів* та *цитокінінів*, а також утворенням так званих *ембріоїдів*.

Якщо до живильного середовища додати гормони в певних співвідношеннях, можна викликати ріст паростків та кореневої системи. Ауксини стимулюють ріст коренів, цитокініни - утворення конуса росту та паростків. Для утворення і коренів, і паростків, ауксини та цитокініни мають додаватися в певних співвідношеннях. Якщо співвідношення ауксини/цитокініни високе, утворюються корені, якщо низьке - паростки.

Цитокініни, або кініни, стимулюють поділ клітин. Вони утворюються в коренях і звідти мігрують.

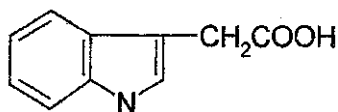


Цитокінін (зеатин)

Ще одна важлива властивість цитокінінів - їх здатність затримувати старіння що є особливо цінним для зелених листових овочів. Цитокініни

сприяють утриманню в клітинах ряду речовин, зокрема амінокислот, які можуть бути спрямовані на ресинтез білків, необхідних для росту рослин і оновлення їх тканин. Завдяки цьому сповільнюється старіння і пожовтіння, тобто листові овочі не так швидко втрачають свій товарний вигляд. Наразі робляться спроби використовувати один з синтетичних цитокінінів - бензиладенін, як інгібітор старіння багатьох зелених овочів, наприклад салату, брокколи і селери.

Речовини, які стимулюють розтягування клітин рослин, відомі під загальною назвою *ауксини*. Ауксини виробляються і накопичуються у високих концентраціях у верхівкових меристемах (ростових конусах пагонів і кореня), тобто в тих місцях, де клітини особливо швидко діляться. Під назвою *ауксин* об'єднано ряд речовин-регуляторів росту. Найважливіші з них названі гетероауксинами та являють собою (3-індолілоцтову кислоту (ЮК):



β-індолілоцтова кислота

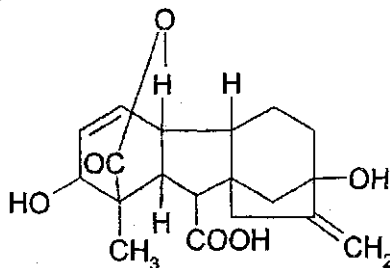
У великих кількостях ЮК утворюється мікроорганізмами, дріжджами та деякими грибами. Проте цей природний ауксин застосовується в сільському господарстві значно рідше, ніж такі синтетичні ауксини, як індолілмасляна кислота, р-нафтилоцтова кислота і 2,4-дихлорфенолоцтова кислота (2,4Д). Річ у тому, що ЮК під дією ферментів рослини безперервно руйнується, тоді як синтетичні сполуки не схильні до ферментативного руйнування, і тому їх малі дози здатні викликати помітний і тривалий ефект. У високих концентраціях 2,4Д може застосовуватися, як гербіцид селективної дії.

Близько до групи гетероауксинів стоять *гербіциди* - похідні феноксіоцтової кислоти. У культурі клітин, тканин та органів рослин найчастіше застосовують 2,4-дихлорфеноксіоцтову, 2,4,6-трихлорфеноксіоцтову та 2-метил-4-хлорфеноксіоцтову кислоти. Натрієві та амонійні солі цих кислот, а також їхні ефіри розчинні у воді. Крім того, застосовуються етаноламінові солі.

Дуже слабкі концентрації гербіциду сприятливо позначаються на проростанні насіння, а також на цвітінні рослин. Їх, в основному, застосовують для прискорення проростання ячменю при виготовленні солоду та для підвищення врожайності винограду.

Прискорений ріст рослин, і зокрема з клітин калюсу, відбувається під дією продуктів обміну речовин гриба *Gibberelia fujukuroi*. Ці речовини (терпеноїди), виділені у чистому вигляді, отримали назву *гіберелінів*.

Гібереліни широко розповсюджені у рослинах і регулюють цілий ряд функцій. Ідентифіковано понад 13 молекулярних форм гіберелінів, дуже схожих за хімічною будовою, але вони значно відрізняються за своєю біологічною активністю. Серед синтетичних гіберелінів найчастіше застосовується гіберелова кислота:

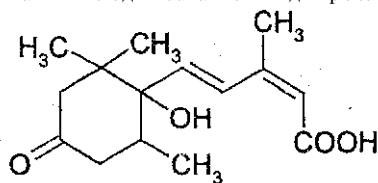


Гіберелова кислота

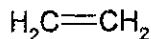
Важливий фізіологічний ефект гіберелінів - прискорення ростових процесів у рослин. Однак гібереліни здатні стимулювати не тільки ріст рослин, але їхнє цвітіння. Гібереліни також застосовують головним чином для прискорення проростання ячменю у виготовленні солоду та для підвищення врожайності винограду.

Пізніше відкрили ряд сполук, що сильно стимулюють поділ рослинних клітин. Йдеться про цитокініни, згадані вище. Найактивніший з них - кінетин. Дуже активною сполукою виявилася також дифеніл сечовина, виділена з кокосового молока.

До рослинних гормонів відносять також абсцизову кислоту (АБК), яка застосовується з метою зменшення інтенсивності транспірації та підвищення стійкості рослин до посухи і вважається гормоном стресу, а також етилен, який у практиці використовується для прискорення дозрівання плодів багатьох видів рослин:



Абсцизова кислота



Етилен

В даний час синтезовано багато речовин, які також здатні регулювати процеси росту рослин, оскільки за своєю структурою вони подібні до нативних фітогормонів. До них, зокрема, відносяться індомасляна,

індопіровиноградна, жасминова, надетилоцтова кислоти, кислотні аналоги ауксинів та інші сполуки (потейтин, емністим С, тримай-1).

Дія ростових речовин проявляється при їхніх дуже низьких концентраціях. Так, 1 г ауксину вистачає для 10^{13} рослин. Ростові речовини рослин за активністю на одиницю маси не поступаються тваринним гормонам.

Інший шлях утворення рослин з клітин калюсу - утворення ембріодів - вперше простежили в 1959 р. у моркви; з часом його стали застосовувати при виробництві життєздатних рослин різних видів.

Ізольовані клітини зберігають здатність синтезувати речовини, притаманні батьківській рослині - вітаміни, гормони, алкалоїди, кумарини, стероїди тощо. Це важливо для використання таких речовин у промисловості.

Меристемні культури використовують для вегетативного розмноження рослин. До такого методу вдаються, коли виникають труднощі при статевому розмноженні сорту, коли отримано вдалий гібрид, але його властивості неможливо зберегти, розмножуючи статевим шляхом, а також для розмноження соматичних мутантів - так званих *somatis*. Для розмноження дерев беруть клітини молодого листа з верхівки дерева, не ушкоджуючи меристеми верхівкової бруньки (інакше дерево неодмінно загине).

Рослини, отримані в результаті клітинної селекції, стійкі проти збудників картопляної гнилі, фітофтори, до гербіцидів тощо.

Щоб збільшити кількість незамінних амінокислот у рослинах, отримують мутанти на клітинному рівні, стійкі проти токсичних аналогів амінокислот. Так, клітини моркви, стійкі проти аналогу метіоніну - етіоніну - синтезували у 20 разів більше метіоніну, ніж вихідні клітини; клітини, стійкі проти 5-метилтриптофану, продукують у 30 разів більше триптофану, а стійкі проти аміноетилцистеїну - у 50 разів більше лізину.

В умовах *in vitro* іноді долається несумісність досить віддалених видів і навіть родів рослин. Проте буває й так, що схрестити рослини, які належать до двох різних видів або родів, вдається, але отримане від гібридизації насіння не проростає - позначається вплив несумісності. Це явище, наприклад, спостерігається при схрещуванні пшениці та жита.

2.4. Гібридні клітини та трансплантація ядер

Ще у ХІХ ст. відзначили той факт, що деякі клітини, як патологічних (пухлини, патологічні ділянки, утворені при коровій віспі), так і нормальних тканин (м'язові волокна), можуть містити більш як одне ядро. Причиною цього буває, з одного боку, ділення ядер без одночасного поділу клітин, а з другого - злиття кількох клітин і утворення багатоядерної клітини (синцитію). Таке злиття відбувається не тільки серед

диференційованих клітин у багатоклітинних організмах, але й між клітинами в культурі. При цьому зливатися одна з однією можуть як клітини різного тину, що належать до того самого виду (наприклад фібробласти та лімфобласти миші), так і клітини тварин різних видів (приміром миша/людина, хом'як/курка, комар/людина тощо).

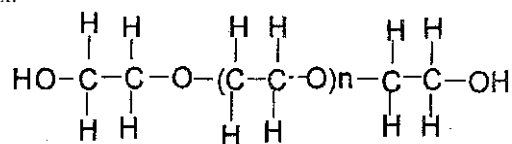
Гібридна клітина - це клітина, яка утворилася при злитті двох або більшої кількості соматичних клітин. Процес штучного злиття двох або декількох клітин, тобто поєднання в єдиній цитоплазмі двох або декількох ядерних матеріалів від різних клітин, отримав назву *гібридної технології*, а отримані клітини були названі гібридними, або *гібридомами*. Якщо для злиття клітин взято дві клітини від однієї і тієї ж рослини або тварини, то гібридні клітини називають *гомокаріонами*. Вони містять ядра тільки одного батьківського типу клітин. Якщо ж клітини отримані від різних видів рослин або тварин, то вони називаються *гетерокаріонами*. Гетерокаріони містять ядра обох батьківських видів.

При злитті відбувається поєднання клітинних мембран, цитоплазми і, що головне, хромосомних наборів клітин. При цьому утворені клітини успадковують і поєднують в собі властивості обох батьківських клітин, у тому числі і здатність до розподілу і специфічності різних біосинтезів.

Гетерокаріони, що утворилися, можуть або загинути, проіснувавши в культурі певний час, або вижити і дати початок двом одноядерним гібридним клітинам, які називаються *синкаріонами*. Наразі замість терміну «синкаріон» використовують термін «гібридна клітина».

У довгоживучих проліферуючих синкаріонах часто відбувається редукція числа хромосом. При цьому, якщо у внутрішньовидових гібридах звичайно зберігаються всі або велика частина батьківських хромосом, то в міжвидових синкаріонах, як правило, має місце втрата хромосом при розподілі. Наприклад, в синкаріоні миша-людина з часом елімінуються хромосоми людини, а не миші.

Поліетиленгліколь (ПЕГ) - нетоксичний водорозчинний синтетичний полімер, що володіє здатністю вибірково осаджувати специфічні білки, не денатуруючи їх.



Поліетиленгліколь

ПЕГ викликає аглютинацію рослинних протопластів, а при подальшому поступовому розведенні ростовим середовищем - інтенсивне злиття

цих клітин. З особливим успіхом для злиття клітин використовується ПЕГ з молекулярною масою від 1500 до 7500. Можливо, завдяки тому, що у водному розчині ПЕГ несе невеликий негативний заряд, молекули цього розміру є достатньо великими для того, щоб між клітинами виникали електростатичні зв'язки. Двохвалентні іони, присутні у середовищі, утворюють містки між ПЕГ та негативно зарядженими вуглеводами, що знаходяться на поверхні клітини, посилюючи у такий спосіб аглютинацію клітин.

До інших аглютинуючих агентів, здатність яких викликати злиття клітин була досліджена спеціально, відносяться лектини рослин (фітогемаглютинін, кояканавалін А) і антитіла.

Метод отримання і культивування гібридних клітин став одним із найважливіших інструментів, який використовують у клітинній біології, генетиці, біології пухлин, біології репродукції, онкології і вірусології. Зараз гібридна технологія з успіхом застосовується в імунобіології та діагностичній медицині. Цей метод використовують також для вирішення практичних питань охорони здоров'я, оскільки за продуктами експресії генома батьківської клітини, що залишається у геномі гібриду, визначають ознаки спадкових захворювань. За допомогою методу гібридизації соматичних клітин вдається реактивувати онкогенний вірус. При злитті клітин-вірусоносіїв з нормальними клітинами, чутливими до пухлинотворного вірусу, в утворених гібридах відбувається реактивація цього вірусу, який розмножується в кількостях, доступних для його виявлення. Цей методичний прийом використовують для визначення онкогенного вірусу у пухлинних клітинах. Так, питання щодо злоякісності або доброякісності гібриду, отриманого з пухлинної та нормальної клітини, вирішують залежно від наявності або відсутності у гібридній клітині певних хромосом.

Ще одним, найпоширенішим напрямком робіт з гібридизації соматичних клітин стало створення гібридом, отримуваних злиттям пухлинних клітин та клітин імунної системи, здатних секретувати імуноглобулін. Такі гібридами характеризуються поєднанням здатності до тривалого розмноження в культурі зі здатністю до біосинтезу моноклональних антитіл.

Відомо, що гени, характерні для одних клітин (наприклад, для нервової системи), можуть експресуватися в гібридах, причому це відбивається на фенотипі клітин. Таким чином, метод гібридизації клітин можна використовувати для виправлення фенотипу клітин, які мають генетичні дефекти. Так, використовуючи гібридомні технології, вважається можливим лікувати деякі генетичні дефекти людини (хвороб Тей-Сакса та Сандхофа).

В опрацюванні методів пересадки ядер ссавців суттєву роль відіграло використання *цитохалазину В*. Ця синтезована грибами речовина сприяє унікальному розміщенню положення ядра, коли воно залишається з'єднаним

з клітиною тонкою ниткою цитоплазми. При центрифугуванні ця "пуповина" розривається з утворенням *енуклейованих* (без'ядрових) клітин - *цитопластів*. Інший компонент, який при цьому утворюється, це - ядра, що відокремилися (*каріопласти*). Такі утворення, що їх називають також *міні-клітинами*, оточені тонким шаром цитоплазми та плазматичної мембрани.

Цитопласти здатні синтезувати білки, а також підтримувати репродукцію деяких вірусів. Вони містять усі види органел, притаманні нормальній клітині, зберігають здатність прикріплюватися до субстрату й утворювати складчасту мембрану, характерну для цілих **ПШТИН**; здатні пересуватися та здійснювати піноцитоз.

Щодо каріопластів, то вони утримують навколо себе шар цитоплазми (близько 10 % від усього об'єму). Він містить компоненти ендоплазматичного ретикулуму, деяку кількість мітохондрій та рибосом. Центріолі у каріопластів, на відміну від цитопластів, відсутні.

Для трансплантації ядер і реконструювання клітин раніше отримані цитопласти у вигляді моношару піддають контактowi з вірусом Сендай, попередньо інактивованим УФ опроміненням. При створенні гібридів до моношару цитопластів додають суспендовані у буферному розчині каріопласти. Цю операцію здійснюють таким чином, щоб на один цитопласт припадало близько 100 каріопластів. Для доброї адсорбції каріопластів на вкритих вірусними частинками цитопластах проводять інкубацію компонентів протягом певного часу при температурі 4 °С. Після цього, для проведення кінцевого етапу - злиття цитопластів і каріопластів - суміш інкубують при температурі 37 °С. Отримані гібридні конструкції далі очищають від каріопластів, що не злилися, відмиваючи їх живильним середовищем. Цитопласти, що не злилися з ядрами, знищують, додаючи середовище, придатне для культивування лише клітин-донорів каріопластів. На такому середовищі цитопласти без ядер гинуть, після чого їх легко відокремити від гібридних клітин за допомогою центрифугування.

Ефективність реконструювання клітин за рахунок злиття каріопластів та цитопластів залежить від ряду факторів, поки що не досить визначених фізіологічних факторів. Вважають, що лише приблизно 9 % реконструйованих клітин можуть далі рости і ділитися. У гібридних клітинах одразу ж після злиття починаються морфологічні зміни. Через кілька днів реконструйовані гібридні клітини майже зовсім не відрізняються від вихідних батьківських, використаних як донори ядер.

Як вже вказувалося, у рослинництві гібридизація соматичних клітин злиттям ізольованих протопластів - ще один біотехнологічний спосіб перетворення рослин поза бар'єрами статевого схрещування.

У природі статева несумісність між рослинами часто заважає потенційно корисним схрещуванням. Культура протопластів дає змогу отримувати

вати гібриди нестатевим шляхом, злиттям соматичних клітин. У результаті регенерації рослин з гібридних протопластів можна отримувати зовсім нові типи їх. Прикладом можуть бути культивовані соматичні гібриди картоплі з томатом, які несуть певні ознаками обох батьківських форм.

Протопласти несуть електричний заряд, а тому вони не здатні зливатися спонтанно. Для злиття їх необхідний вплив так званих факторів злиття (*фузигенних факторів*) (певна величина рН середовища, концентрація катіонів, хімічні речовини, які викликають агрегацію протопластів - поліетиленгліколь, полівініловий спирт та фізичні фактори - змінне електричне поле). Під їхнім впливом здійснюють злиття протопластів найвіддаленіших форм: сої з ячменем, кукурудзи з рапсом, сої з морквою, а також рослинних протопластів з тваринними чи бактеріальними.

Методом злиття протопластів можна переносити гени стійкості проти хвороб або якісь інші гени в один прийом, що при звичайній гібридизації можливе або тільки через десятиріччя, або взагалі неможливе внаслідок філогенетичної віддаленості, коли клітини зовсім не схрещуються. Скажімо, селекційну картоплю гібридували злиттям протопластів з дикою картоплею, стійкою проти деяких вірусних захворювань.

2.5. Методи перенесення генів за допомогою метафазних хромосом

Мітоз, або непрямий поділ - основний спосіб розмноження еукаріотичних клітин, що обумовлює можливість збільшення їхньої біомаси, ріст і регенерацію. Мітоз складається з чотирьох фаз - *профази*, *метафази*, *анафази* та *телофази*. З огляду на тему даного розділу, слід, відзначити, що хромосоми найбільше компактизуються з відповідним вкороченням їхньої довжини та вишикуванням їх по екватору клітини саме на етапі метафази (Рис. 13).

Можливість перенесення чужорідної генетичної інформації у соматичні клітини тварин за допомогою метафазних хромосом вперше доведена у 1973 р. американськими вченими Дж. Мак-Брайдом та А. Озером. Метод ізольованих хромосом нині широко використовують у біології та її різноманітних прикладних відгалуженнях - від вивчення механізмів генної регуляції до проблем медицини й сільського господарства.

Перенесення генетичного матеріалу в реципієнтні клітини - процес багатоетапний. Для отримання великої кількості мітотичних клітин їх затримують на стадії мітозу (цей етап має назву „синхронізація клітин“). Після цього виділяють метафазні хромосоми, суспензією яких обробляють реципієнтні клітини. Наступна стадія - виділення, розмноження та аналіз клітин-трансформантів. Такий аналіз проводять з метою ідентифікації озна-

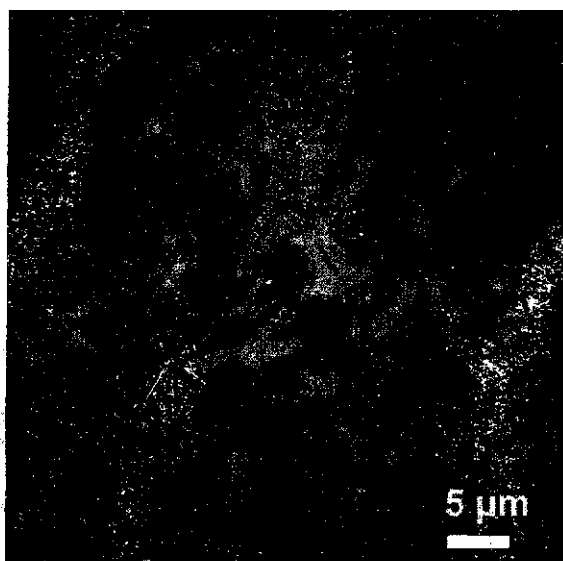


Рис. 13. Метафазні хромосоми людини

ки донорського генома у трансформантах. Джерелом метафазних хромосом (донорські клітини) найчастіше виступають фібробласти первинних культур або фібробластоподібні клітини перешеплюваних ліній клітин жаби, китайського хом'ячка, миші, щура або людини. Слід відзначити, що генотип цих клітин належить до дикого типу. На відміну від них, еукаріотичні клітини, куди переноситься генетичний матеріал (реципієнтні клітини), належать до мутантних ліній. У таких клітинах не спрацьовує ряд певних ферментів (як-от тимідинкінази). Про те, чи відбулося перенесення частини генома з донорської клітини у реципієнтну, судять за визначенням згаданих ферментативних активностей, раніш відсутніх, та у зв'язку з цим - за здатністю рости на відповідних селективних середовищах. Це, з одного боку, підтверджує факт переносу, а з другого стає підходом до вивчення морфології та біохімії хромосом.

Для досягнення успіху в перенесенні генів за допомогою метафазних хромосом, передовсім необхідно отримати у моношаровій культурі велику кількість мітотичних клітин. З цією метою використовують прийом синхронізації клітин за допомогою введення в середовище *колхіцину* або *колцеміду*. Завдяки ним клітини затримуються на стадії мітозу, і у клітинній популяції їх кількість клітин, затриманих на стадії метафази, сягає 94-97 %. До того ж такі клітини моношарової культури бувають слабо прикріплені до субстрату, що полегшує відокремлення їх від інших клітин.

Для виконання наступної операції - руйнування клітинної мембрани - метафайл клітини вміщують у гіпотонічний розчин. Висока ефективність руйнування клітинних мембран досягається використанням гомогенізаторів або багаторазовим пропусканням клітинної суспензії через шприц з тонкою голкою.

Для масового виділення однотипних хромосом поєднують фракціонування у градієнті щільності та подальшого сортування отриманої фракції методом проточної цитометрії. Останню здійснюють за допомогою спеціальних приладів - проточних цитофлуориметрів (Рис. 14).

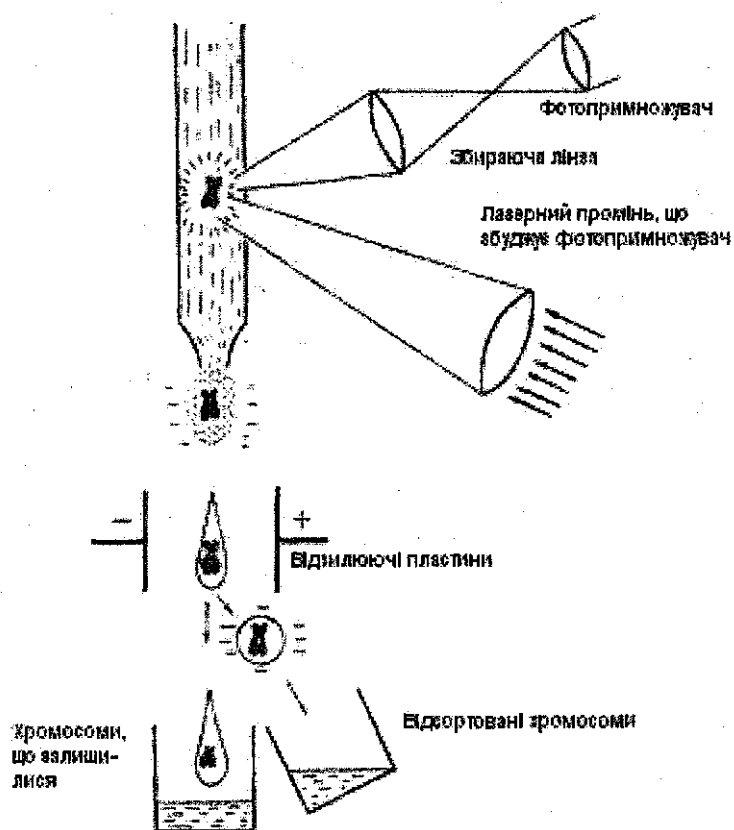


Рис. 14. Принцип сортування хромосом у проточних цитофлуориметрах за допомогою лазера. Хромосоми пофарбовані флуоресцюючим барвником. Флуоресценція збуджується лазерним променем і вимірюється для кожної хромосоми окремо. Дані вимірювань використовують для сортування хромосом.

Цей метод може бути використаний у двох різних цілях:

1) для ідентифікації і кількісного аналізу великої кількості хромосом на протязі дуже короткого часу;

2) для препаративного розділення хромосом.

Метод має дві переваги перед стандартними методами аналізу хромосом: по-перше, він є повністю автоматичним, завдяки чому виключається елемент суб'єктивності; по-друге, він є надзвичайно швидким.

Важливо, що цей метод дає змогу препаративно розділяти хромосоми, а за наявності специфічних зондів можна виявляти присутність окремих потрібних генів.

Далі клітини-реципієнти на стадії логарифмічного росту обробляють суспензією очищених метафазних хромосом, отриманих у такий спосіб. При цьому співвідношення кількості доданих хромосом до кількості хромосом, що містяться в геномі реципієнтних клітин, становить 1:1. Донорські хромосоми потрапляють до клітин-реципієнтів завдяки фагоцитозу.

Розрізняють два види трансформованого фенотипу. У разі стабільного фенотипу перенесена ознака при рості трансформантів на неселективному середовищі зберігається протягом декількох тижнів або навіть місяців. На відміну від цього, нестабільний фенотип при вирощуванні трансформованих клітин на неселективному середовищі втрачається. При більш-менш тривалому культивуванні клітини з нестабільним трансформованим фенотипом поступово переходять у стабільні трансформанти. Щодо процесу формування стабільного трансформованого фенотипу, то він, як нині вважають, полягає у включенні донорського генетичного матеріалу у хромосоми реципієнтних клітин з одночасним зменшенням обсягу перенесеного у реципієнтні клітини генетичного матеріалу.

Практичного значення для біотехнології такі дослідження набули, головним чином, у випадку рослин, де отримали назву *хромосомної інженерії*.

У клітинах кожного диттоїдного організму містяться пари гомологічних хромосом. Такий організм називають *дисоміком*. Якщо ж у будь-якій парі хромосом залишається одна гомологічна хромосома, то утворюється *моносомік*. При додаванні третьої гомологічної хромосоми виникає *трисомік*, а при відсутності в геномі однієї пари гомологічних хромосом виникає *нулісомік*. Такі маніпуляції з хромосомами дають можливість замінювати одну або обидві гомологічні хромосоми, наприклад, одного сорту пшениці, на таку ж пару хромосом, але з іншого сорту. У такий спосіб селекціонер може замінити одну ознаку, слабо виражену в даного сорту, на тотожну, але більш сильно виражену з іншого сорту. Так наближаються до створення «ідеального» сорту, у якого всі корисні ознаки будуть виражатися макси-

мально. Таку ж мету переслідує й методика заміни окремих хромосом на хромосоми іншого виду, близького за своїм походженням. Інший прийом полягає у введенні в геном певного виду або сорту якоїсь додаткової пари хромосом іншого виду рослин, що визначають розвиток ознаки, відсутньої в першого виду. Якщо таке введення пари додаткових хромосом вдається здійснити, то отримані форми називають *доповненими лініями*.

Контрольні запитання до 2 розділу

Які завдання можна вирішувати за допомогою методу культивування клітин *in vitro*?

Як отримують клітинні лінії, які необхідні умови для культивування клітин?

Що таке стовбурові клітини, джерела їх отримання?

Які типи стовбурових клітин розрізняють та їх характеристики?

Опишіть напрямки застосування стовбурових клітин у медицині та які можливі ризики?

Що таке мікророзмноження рослин, його переваги?

Яка роль фітогормонів у клональному мікророзмноженні рослин?

Як отримують калюсну тканину і які можливості її використання в біотехнології?

Отримання та використання клітинної суспензійної культури.

Які особливості отримання і культивування протопластів?

Соматична гібридизація, роль фузігенних факторів.

Яким чином можна отримати безвірусний посадковий матеріал?

Опишіть можливості використання гаплоїдних рослин у селекційному процесі.

Трансплантація ядер. Що таке цитопласти, каріопласти, міні-клітини?

Підходи до переносу генів у соматичні клітини за допомогою метафазних хромосом.

3. ГЕННА ІНЖЕНЕРІЯ

Генна (генетична) інженерія - це напрям досліджень в молекулярній біології і генетиці, кінцевою метою яких є отримання за допомогою лабораторних прийомів організмів з новими комбінаціями спадкових властивостей, у тому числі з такими, що не зустрічаються у природі. В основі генної інженерії лежить обумовлена останніми досягненнями молекулярної біології і генетики можливість цілеспрямованого маніпулювання з фрагментами нуклеїнових кислот.

Генна інженерія значно розширює можливості селекції мікроорганізмів, рослин та тварин. Слід однак підкреслити, що генна інженерія не відмінняє вже існуючі методи селекції, вона тільки розширює можливості селекції.

Методи генної інженерії дають змогу вирішувати такі завдання:

- змінювати й посилювати функції окремих генів-продуцентів, тобто покращувати якість штаму, не вводячи Нової генетичної інформації, а модифікуючи його власну;

- виділяти певний ген та отримувати мутації, що примножують кількість копій даного гена, посилюючи таким чином синтез продукту;

- отримувати мутації промоторів, що визначають активність генів, а також вводити енхансери (підсилювачі генів);

- розширювати спектр субстратів, які використовує організм-продуцент;

- створювати штами мікроорганізмів, здатні утилізувати ксенобіонти (біологічно активні речовини, створені людиною), а також продукти переробки нафти та інші забруднювачі довкілля;

- вносити до мікроорганізмів, нездатних до спарювання, статеві плазміди, що забезпечують спарювання, використовуючи тим самим рекомбінацію для покращання властивостей штамів;

- вносити в даний організм гени інших груп організмів (наприклад, гени людини у клітини *Escherichia coli*) і отримувати продукти цих генів.

3.1. Ферменти, використовувані для отримання рекомбінантних молекул ДНК

Для здійснення генно-інженерних робіт необхідний ряд ферментів, серед яких насамперед слід назвати *рестрикційні ендонуклеази* (або ж скорочено, *рестрактази*), що здійснюють *рестрикцію* - розщеплення молекули ДНК по певних послідовностях нуклеотидів. Вони належать до фермент. типу сайт-специфічних ендонуклеаз, що розщеплюють дволанцюгові ДНК.

: 0

Рестриктази було відкрито при дослідженні молекулярних основ феномену хазайської специфічності, знайденого на початку 50-х років ХХ ст. при вивченні ефективності посіву фатів при зміні хазяїна. Ці дослідження визначили склад та особливості функціонування штамоспецифічної системи.

Систему рестрикції та модифікації ДНК, що лежить в основі штамоспецифічності бактерій, утворюють пари специфічних для певного штаму ферментів - фермент, що модифікує ДНК (метилаза цитозинових або аденінових залишків ДНК), та фермент, що розщеплює ДНК (ендодезоксирибонуклеаза - рестриктаза). Ці ферменти впізнають у ДНК ідентичні короткі послідовності нуклеотидів. Метилаза, модифікуючи певні азотисті основи в межах впізнаваної ділянки, захищає внутрішньоклітинну ДНК від дії рестриктази. Потрапляючи у мікробну клітину, якій притаманна система хазайської специфічності, не модифікована відповідним чином ДНК розщеплюється внутрішньоклітинною специфічною ендонуклеазою, яка призводить до інактивації цієї ДНК.

Перша рестриктаза була виділена у 1970 р. На даний час з різних штамів мікроорганізмів виділено чисельні ферменти рестрикції-модифікації, які розрізняються між собою структурною організацією, потребами до кофакторів, і, головне, особливостями субстратної специфічності. Номенклатуру цих ферментів визначають за правилами, що включають:

1) назву роду та виду мікроорганізму; їх позначають трьома латинськими літерами - першою літерою - назву роду, а наступними двома літерами - назву виду (наприклад, *Escherichia coli* - *Eco*, *Bacillus amyloliquefacient* - *Bam*);

2) за позначенням роду та виду йде назва штаму (наприклад *EcoB* і *EcoK* - *E. coli*, *штами B* і *K*; *Hinc* і *Hind* — *Haemophilus influenzae*, *штами c* і *d*). Якщо система рестрикції-модифікації контролюється генами вірусу або плазмиди, вказується символ нехромосомного елемента, наприклад *EcoR*;

3) у разі, якщо один штам містить кілька різних систем рестрикції-модифікації, то їх позначають римськими цифрами, які виражають послідовність відкриття відповідних рестриктаз у клітинах бактерій одного виду, наприклад *Hind I*, *Hind II*, *Hind III*.

Основні прояви специфічності, характерні для всіх рестриктаз такі: послідовність нуклеотидів, що упізнається; місце розщеплення; залежність дії від характеру метилювання основ у межах впізнаваної послідовності.

Рестрикційні ендонуклеази всіх типів (а їх налічується чотири) відрізняються винятково високою субстратною специфічністю - кожна впізнає послідовність нуклеотидів певної довжини й складу. Головна різниця між ними полягає в характері розщеплення субстрату. З огляду на

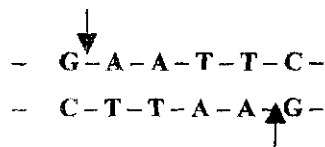
цю особливість для цілей генної інженерії найідеальнішими виявилися рестриктази II типу.

Як правило, рестриктази знаходять лише в бактеріях. Крім того, є повідомлення про виявлення таких ферментів у деяких штаммах дріжджів та хлорелоподібних зелених водоростей. Проте у представників інших, іноді віддалених таксонів прокаріотичних мікроорганізмів відзначено наявність рестриктаз з ідентичною субстратною специфічністю. Це явище отримало назву *ізошизомерії*.

Більшість рестриктаз II типу являють собою білки, побудовані з одного або кількох ідентичних поліпептидних ланцюгів, з відносно невеликою молекулярною масою. Деякі рестриктази існують у розчинах у формі мономера, для інших встановлено субдиничну організацію.

Послідовності нуклеотидів, що служать субстратом для рестриктаз, відрізняються великою різноманітністю щодо первинної структури. Водночас для них характерні деякі загальні риси. Згідно з сучасною класифікацією, такі послідовності поділяють на 37 типів. Більша частина їх впізнає короткі тетра- та гексануклеотидні послідовності, яким притаманна обертова симетрія другого порядку (тобто вони являють собою *паліндроми* - обернені повтори). Виходячи з теорії ймовірності, рестриктази, що впізнають тетрануклеотиди, вносять у будь-яку молекулу ДНК більше розривів, ніж ті, що впізнають гексануклеотиди. Гексануклеотидного сайту рестрикції може взагалі не бути в деяких ДНК, наприклад, у ДНК ряду вірусів.

Важлива функціональна особливість рестриктаз - спосіб розщеплення ДНК у ділянці, що ними розпізнається. Ця властивість також характеризується великою різноманітністю варіантів. Більшість специфічних ендонуклеаз розщеплюють ДНК в середині ділянки впізнавання. При розщепленні дволанцюгової ДНК можуть утворюватися кінці різних структурних типів. Якщо розрив відбувається всередині розпізнаваної послідовності, то утворюються фрагменти з повністю спареними (*тупими*) кінцями (як у разі рестриктази *Hind II*). Якщо ж розщеплення ДНК відбувається збоку від осі симетрії, утворюються одностанцюгові кінці з виступами, що отримали назву *липких кінців*, тобто здатних спарюватися з комплементарним кінцем, що утворюється на протилежному ланцюгу в результаті їх розриву. Кількість нуклеотидів в одностанцюговому кінці може варіювати від 5 до і. Так, рестриктаза *EcoRI* специфічна щодо послідовності шести нуклеотидних залишків у подеійній спіралі такого типу:



Ця рестриктаза розщеплює кожний ланцюг між залишками А та G за зв'язками, що відмічені стрілками. У результаті утворюються два фрагменти:



При цьому кожен з них містить коротку одноланцюгову послідовність, згаданий липкий кінець, оскільки ці дві послідовності комплементарні й тому тяжіють до зв'язування одна з одною за рахунок водневих зв'язків між парними основами.

При розщепленні рестриктазою *EcoRI* кільцевої ДНК вірусу *SV40* утворюються лінійні молекули. Далі така ДНК часто знову замикається у кільце завдяки спарюванню основ на протилежних кінцях.

Наразі відомо близько 500 рестриктаз та 120 сайтів, що розщеплюються ними. Нижче перераховано рестриктази, які найчастіше використовуються, відповідні сайти впізнавання та фосфодієфірні зв'язки, що гідролізуються цими рестриктазами.

Мікроорганізм	Скорочення	Послідовність 5' -> 3' 3' -> 5'
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	<i>BamIII</i>	- G ^ G - A - T - C - C - - C - C - T - A - G A G -
<i>Brevibacterium albidum</i>	<i>BaUI</i>	- T - G - G - C - C - A - - A - C - C - G - G - T - ■ f
<i>Escherichia coli</i> RYH	<i>EcoRI</i>	- G - A - A - T - T - C - - C - T - T - A - A ^ G - 1 t
<i>Haemophilus aegyptius</i>	<i>HaellI</i>	- G - G - C - C - - C - C * G - G - 1
<i>Haemophilus parainfluezae</i>	<i>HpaI</i>	- G - T - T - A - A - C - - C - A - A j t T - T - G - 1

<i>Haemophilus Influezae Rd</i>	<i>Hindul</i>	- A ^ - A - G - C - T - T - - T - T - C - G - A ^ - A -
<i>Providencia stuartii 164</i>	<i>Pstl</i>	- C - T - G - C - A - G - - G ^ - C - G - T - C -

Як вказано вище, рестриктази розщеплюють молекулу ДНК у відповідних сайтах упізнання, в результаті чого утворюються фрагменти з розмірами від декількох сотень до декількох тисяч нуклеотидів. Такі фрагменти легко розділяють за допомогою електрофорезу в агарозному гелі. При цьому швидкість міграції фрагментів залежить від їхньої довжини: короткі фрагменти пересуваються значно швидше, ніж довгі. При міграції у таких гелях отримані фрагменти ДНК не деградують, і їх можна елювати у вигляді біологічно активних дволанцюгових молекул. При фарбуванні цих гелів барвниками, що зв'язуються з ДНК, виявляється набір смуг на доріжці. Кожна з таких смуг відповідає рестрикційному фрагменту, молекулярну масу якого можна визначити, проводячи калібрування за контрольними молекулами ДНК з відомими молекулярними масами.

За допомогою рестриктаз стало можливим створювати *рестрикційні карти*. Перша була складена у 1971 р. у США А. Натансом з використанням рестриктази *Hind II*, яка розщеплювала кільцеву ДНК вірусу *SV40* на 11 специфічних фрагментів. Порядок їх взаєморозташування у нативній молекулі ДНК встановили, досліджуючи набори фрагментів, утворених при розщепленні. Перший розрив перетворював кільцеву молекулу на лінійну, яка далі розщеплювалася на все менші фрагменти. Досліджуючи спочатку набори фрагментів, що перекриваються, проміжного розміру, а після цього - продукти повного розщеплення, отримали рестрикційну карту кільцевої вірусної ДНК, куди нанесли сайти розщеплення рестриктазою. Повторення таких експериментів з іншими рестрикційними ферментами дало змогу отримати детальнішу карту, зрізними сайтами рестрикції.

Природно, що різні рестриктази дають різні рестрикційні карти тієї само ДНК (вірусної або плазмідної). Найзручніші у практичному плані рестриктази, які впізнають лише невелику кількість сайтів і тому дають невелику кількість фрагментів (Рис. 15).

Володіючи цією інформацією, можна ідентифікувати у кільцевій вірусній ДНК біологічно важливі ділянки. Так, проводячи короточасне радіоактивне мічення вірусної ДНК у ході реплікації й далі розієпивши її за допомогою рестриктази *Hind II*, той же А. Натане довів, що реплікація

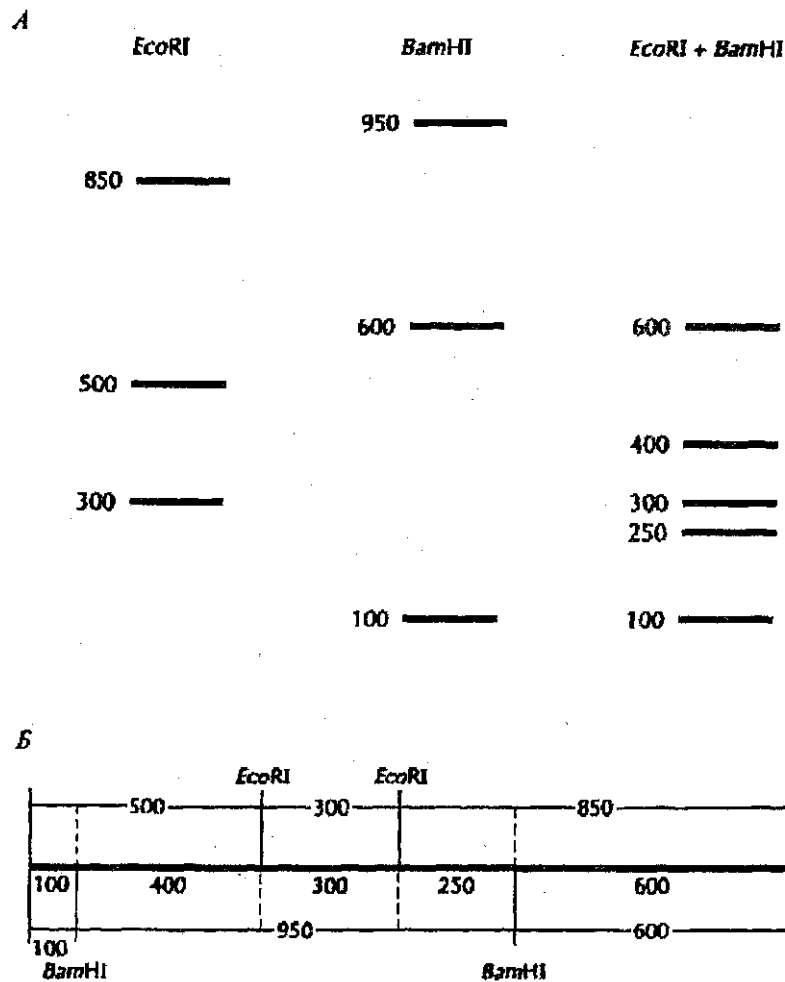


Рис. 15. Картування сайтів рестрикції. *A.* Результати гель-електрофорезу фрагментів ДНК, отриманих її розщепленням вказаними ферментами. Очищену ДНК гідролізували рестриктазами *EcoRI* і *BamHI* роздільно, а потім їх сумішшю, проводили гель-електрофореуз і візуалізували продукти шляхом фарбування бромідим етидієм. Числа зліва від горизонтальних смуг - довжина фрагментів в парах основ. *Б.* Рестрикційна карта, побудована за електрофоретичними даними. Числа - відстань між сайтами впізнання відповідних ферментів.

ДНК вірусу *SV40* завжди починається в одному специфічному *Hind II*-фрагменті й продовжується в обох напрямках. Потім з використанням інших рестриктаз дослідники точно вказали місце початку реплікації на відстані близько 1700 нуклеотидних пар від сайту *EcoIII*.

Наступний необхідний фермент для генної інженерії - ДНК-залежна ДНК-полімераза, що каталізує синтез однієї нитки ДНК на матриці іншої (Рис. 16).

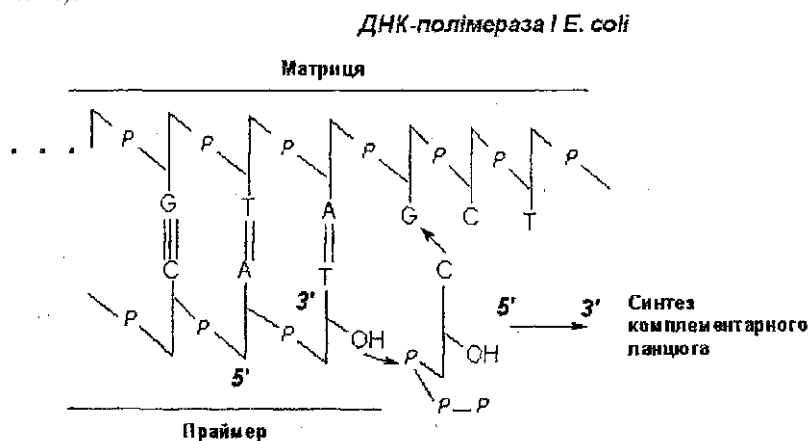


Рис. 16. Схема реакції, каталізованої ДНК-залежною ДНК-полімеразою

На сьогодні найкраще вивчена, а тому найчастіше застосовується ДНК-полімераза I *E. coli*. Цей фермент складається з одного поліпептидного ланцюга молекулярною масою 109 кДа. Йому притаманні три види активності:

1) полімеразна, що обумовлює синтез ланцюга ДНК у напрямку 5'-3', який здійснюється на одноланцюговій матриці у присутності усіх чотирьох трифосфатів, іонів Mg^{+} та NH_4^{+} , а також нативної ДНК та короткого ДНК-праймера, що має вільну 3'-гідроксильною групу;

2) екзонуклеазна, яка спричиняє відщеплення нуклеотидів від вільного 5'-кінця; реакція проходить на дволанцюгових молекулах ДНК у напрямку 5-3';

3) екзонуклеазна активність, що забезпечує відщеплення нуклеотидів від вільного 3'-кінця, здійснюється на одно- та дволанцюгових молекулах ДНК у напрямку 3'-5'; при цьому на дволанцюговій ДНК ця активність пригнічується полімеразною активністю ферменту.

ДНК-полімераза I одночасно може вести реакцію полімеризації та гідролізу нуклеотидного ланцюга у напрямку 5'-3', починаючи з одноланцюгового розриву в дволанцюговій ДНК. Даний процес має

називається *нік-трансляцією*. При цьому розрив (*нік*) переміщується вздовж ланцюга ДНК у напрямку 5'-3' на відстань до однієї тисячі пар нуклеотидів (далі - т.п.н.). Це явище використовують на практиці для введення в ДНК *in vitro* радіоактивно мічених нуклеотидів.

Матричний синтез ДНК, каталізований ДНК-полімеразами, виконує дві основні функції - реплікацію ДНК, тобто синтез нових дочірніх ланцюгів, комплементарних вихідним ланцюгам, і репарацію дволанцюгової ДНК за місцем пошкодження в одному з ланцюгів, що утворилися в результаті вирізування пошкоджених ділянок цього ланцюга спеціальними нуклеазами. В процесі репарації ДНК, окрім нуклеази, беруть участь три компоненти - матриця, на якій росте ланцюг, ДНК-субстрат (комплекс вільних нуклеозидтрифосфатів), а також ДНК-їюлімераза.

Від ДНК-полімерази I за допомогою трипсину або субтилізіну можна відокремити великий (так званий *кленовський*) фрагмент, що зберігає тільки полімеразну та 3'-5' екзонуклеазну активності. Відсутність в ньому 5'-3'екзонуклеазної активності дає змогу використовувати його для "заповнення" виступів одноланцюгових 5'-кінців, утворюваних при ступінчастому розрізуванні ДНК рестриктазами. При потребі в такий спосіб у кінці фрагментів ДНК можна вводити радіоактивну мітку.

ДНК-полімеразі фага Т4 притаманні ті самі активності, що й кленівському фрагменту ДНК-полімерази I, проте його 3'-5'~екзонуклеазна активність у 200 разів вища. Тому його найчастіше використовують для введення мітки до рестриктів з виступами 3'-кінців.

Для синтезу ДНК на матриці РНК використовують інший фермент - РНК-залежну ДНК-полімеразу, або *зворотну транскриптазу (ревертазу)*. Цей фермент виділяють з деяких РНК-вмісних онкогенних вірусів. Його назва пов'язана з тим, що він каталізує реакцію, зворотну першому етапу експресії гена - транскрипції (Рис. 17).

Зворотна транскриптаза



Рис. 17. Схема реакції, каталізованої РНК-залежною ДНК-полімеразою (звотною транскриптазою)

Продуктом реакції стає гібрид РЗЖ-ДНК. Біологічна роль зворотної транскриптази полягає в утворенні копій ДНК з геномів згаданих вірусів. У генній інженерії зазвичай використовують фермент, кодований вірусом мієлобластоу птахів. Він складається з двох поліпептидних ланцюгів, один з яких несе екзорибонуклеазну активність та 5'-3'-полімеразну активність. Як полімераза фермент працює на одноланцюгових РНК і ДНК, утворюючи комплементарний дезоксирибонуклеотидний ланцюг (кДНК).

У генній інженерії зворотну транскриптазу використовують при синтезі потрібної для клонування кДНК і отриманні часткових копій генів - так званих гібридизаційних зондів (див. далі).

Ще один фермент, що використовується у генній інженерії - *термінальна дезоксинуклеотидилтрансфераза*. Він здатен утворювати на дволанцюгових фрагментах ДНК одноланцюгові ділянки послідовним приєднанням до 3'-ОН-кінців обох ланцюгів нуклеотидів, використовуючи нуклеозидтрифосфати, наявні в реакційній суміші. Для функціонування такого ферменту не потрібна матриця ДНК. Використання цього ферменту - універсальний метод перетворення фрагментів ДНК з тупими кінцями на фрагменти з кінцями липкими (Рис. 18).

Кінцева трансфераза

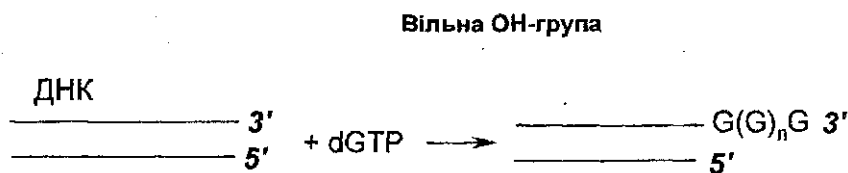


Рис. 18. Схема реакції, каталізованої термінальною дезоксинуклеотидилтрансферазою

Термінальна дезоксинуклеотидилтрансфераза здатна синтезувати гомополімери завдовжки до декількох сотень нуклеотидних залишків. Проте для ефективного об'єднання фрагментів ДНК досить 8-10 нуклеотидів. Тому, приміром, якщо до обох 3'-кінців дволанцюгового фрагмента ДНК приєднати poly(dA), а до 3'-кінців іншого фрагмента - poly(dT), то при змішуванні цих двох фрагментів між комплементарними одноланцюговими кінцями відбуватиметься спарювання та остаточне зшивання спеціальним ферментом - *ДНК-лігазою*. Така процедура лежить в основі іншого загального методу отримання рекомбінантних молекул ДНК, коли між з'єднуваними фрагментами вбудовуються дишки AAA/TTT. Такі додаткові послідовності можуть впливати на функції поєднувальних молекул, а тому

для отримання рекомбінантних ДНК намагаються користуватися лише липкими кінцями, що їх утворюють відповідні рестриктази.

Як було вже зазначено, процес об'єднання фрагментів ДНК каталізує такий фермент, як *ДНК-лігаза*. Відомо, що проміжні структури ДНК у різноманітних генетичних процесах (реплікація, рекомбінація, репарація) - це двоспиральні молекули з одноланцюговими розривами. Ферменти, що поєднують подібні ланцюги шляхом відновлення фосфодієфірних зв'язків між сусідніми нуклеотидами, отримали загальну назву *лігаз*.

Найкраще вивчено ДНК-лігази *EcoII* та фага Т4 з молекулярними масами відповідно 74 та 68 кДа. Для утворення ковалентних зв'язків ці ферменти потребують хімічних сполук із макроергічними зв'язками, як, наприклад, НАД (бактеріальна лігаза) та АТФ (фагова лігаза). В обох випадках ферменти аденілюються, а потім переносять АМФ на 5'-кінці полінуклеотидних ланцюгів, що супроводжується відновленням макроергічних пірофосфатних зв'язків. Заощаджена в такий спосіб енергія витрачається на утворення фосфодієфірних зв'язків, а це сприяє вивільненню АМФ.

ДНК-лігази проводять реакції на різних субстратах, зв'язуючи навіть дезоксирибо- та рибонуклеотидні ланцюги, а фагова лігаза може функціонувати і як РНК-лігаза. Матрицями у таких реакціях служать комплементарні ланцюги ДНК або РНК. Саме цей фермент здійснює остаточне з'єднання липких кінців ДНК.

Існують також і РНК-лігази, що поєднують відповідно фрагменти РНК, утворюючи фосфодієфірний зв'язок поміж акцепторним (3'-ОН) та донорним (5')-кінцями. У генній інженерії РНК-лігази використовують для синтезу олігорибо- та олігодезоксирибонуклеотидів, а також для введення радіоактивної мітки до 3'-кінця РНК.

Лужна фосфатаза. Фосфатази мають широку специфічність - вони гідролізують різні ефіри фосфорної кислоти. Лужна фосфатаза з клітин *EcoII* веде гідроліз будь-яких фосфомоефірів, включаючи й поліфосфати, тобто їй притаманна універсальна фосфомоестеразна активність. У генній інженерії її використовують для дефосфорилування полінуклеотидів на 5'- та 3'-кінцях.

Нуклеаза S1 виділяється з гриба *Aspergillus oryzae*, має ендо- та екзонуклеазну активності і не виявляє будь-якої специфічності до нуклеотидної послідовності ДНК. Вона гідролізує тільки одноланцюгові полінуклеотиди, а у дволанцюгових не утворює навіть поодиноких розривів. Фермент використовують для видалення будь-яких одноланцюгових структур, включаючи одноланцюгові ділянки в шпильках або в частково денатурованих областях ДНК.

Нуклеаза Bal31 виділяють з мікроорганізму *Alteromonas espejiana* *Bal31*. Вона має високоспецифічну ендонуклеазну активність щодо

однонитчатої ДНК, а також екзонуклеазну активність, завдяки якій каталізує відщеплення невеликих оліго- та мононуклеотидів з 5'- та 3'-кінців дволанцюгової ДНК. Субстратом для екзонуклеазної активності служать дволанцюгові фрагменти ДНК як з прямими кінцями, так і кінцями, що несуть виступи. Швидкості гідролізу обох ланцюгів ДНК (з обох кінців) приблизно однакові, причому їх можна регулювати зміною умов реакції. Це дає змогу застосовувати нуклеазу *Bal31* для вкорочення дволанцюгових фрагментів ДНК на задану величину. Описані властивості ферменту використовують для картування сайтів рестрикції на невеликих фрагментах ДНК.

В окремих випадках генної інженерії використовують також інші ферменти, що діють на нуклеїнові кислоти.

3.2. Секвенування та синтез полінуклеотидів

Бактеріальна хромосома, довжина якої дорівнює приблизно 1 мм, являє собою молекулу ДНК, що складається приблизно з 5 млн пар нуклеотидів; у клітині вона компактно укладена, скоротившись у декілька тисяч разів, менш як до 1 мкм у діаметрі. У соматичних клітинах людини ДНК організована в структурах 46 хромосом; кожна з цих хромосом містить молекулу ДНК завдовжки біля 4 см, а повне число нуклеотидів у ній наближається до 3 млрд п.н..

Вже саме лише застосування рестриктаз дає змогу отримати орієнтовні фізичні карти молекул ДНК, однак пряме визначення ігуклеотидної послідовності (*сіквенс* від англ. *sequence*) дає дослідникові повну послідовність з точністю до одного нуклеотиду. Саме така точність необхідна в генній інженерії.

Високоєфективні методи визначення нуклеотидної послідовності (*секвенування*) ДНК виникли як результат об'єднання ряду методичних досягнень. Вирішальну роль при цьому відіграла розробка методів електрофорезу, що дають змогу з високою точністю розділяти олігомери, що відрізняються за довжиною лише на один нуклеотид. Важливе значення мали також методи специфічної хімічної модифікації азотистих основ у складі молекул ДНК й наступного вищеплювання їх, способи радіоактивного і флуоресцентного мічення тощо.

Перший з методів секвенування, запропонований у 1977 р. А. Максимом та У. Плбертом, базується на селективній хімічній модифікації різних типів гетероциклічних основ у складі ДНК з наступним розщепленням міжнуклеотидних зв'язків у модифікованих ланцюгах. Згідно з цим методом, кінці фрагмента, одержаного раніше після дії рестриктази на ДНК, мітять за допомогою ізотопу фосфору ³²P. Радіоактивна мітка вводиться

фосфорилюванням за допомогою у-³²P-АТФ та Т4-полінуклеотидкінази. Отримаю фрагменти ДНК мають стандартну довжину, оскільки їх взято з єдиної електрофоретичної фракції. Препарат міченої ДНК ділять на чотири порції, і кожна з них обробляють хімічним реагентом, що специфічно модифікує одну або дві з чотирьох азотистих основ ДНК.

Специфічне руйнування (модифікація) пуринових основ відбувається за допомогою *диметилсульфату*. При цьому відбувається метилювання аденинових залишків по азоту в положенні 3, гуанінових - по азоту в положенні 7.

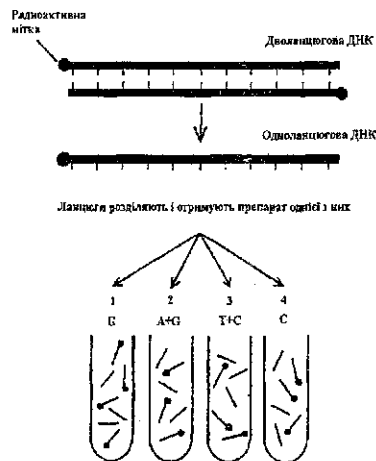
Обробка зразків ДНК *соляною кислотою* при 0 °С призводить до вищеплення метиладеніну. Наступна інкубація при температурі 90 °С у лужному середовищі викликає розрив цукро-фосфатного ланцюга ДНК у місцях вищеплення основ.

Піримідинові основи модифікуються *гідразином*. Якщо реакцію вести у безсолевому середовищі, то модифікуються як цитозин, так і тимідин; якщо обробку вести у присутності 2 М NaCl, то модифікується лише цитозин.

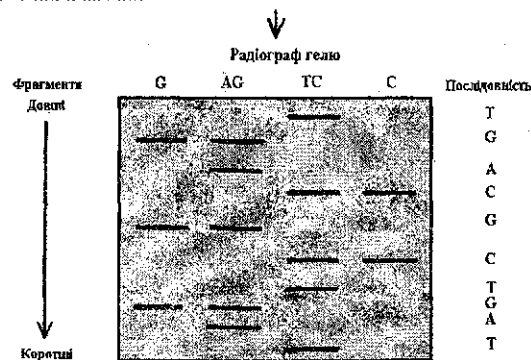
Вказані реакції вибіркової модифікації по кожному типу гетероциклічних основ проводяться таким чином, щоб у кожній молекулі ДНК у середньому модифікувалося лише одна ланка даного типу. Оскільки всі ланки даного типу у складі молекули еквівалентні і реагують з модифікаційним агентом з однаковими швидкостями, то в сумі кожна ланка цього типу виявиться частково модифікованою.

Далі, коли ці пошкоджені молекули обробляються *піперидином*, у ДНК утворюється розрив у тому місці, де знаходилась зруйнована основа. У результаті одержують набір мічених фрагментів, довжини яких визначаються відстанню від зруйнованої основи до кінця молекули. Наприклад, якщо основи G розміщені на відстані 5, 11, 15 та 22 нуклеотидів від міченого кінця, обробка такого ланцюга ДНК реагентом, що руйнує G, призводить до утворення мічених фрагментів завдовжки 5, 11, 15 та 22 нуклеотиди. При цьому, природно, утворюються й фрагменти завдовжки 6, 4 та 7 нуклеотидів (внутрішні фрагменти), але вони не будуть міченими. Набори мічених фрагментів, утворюваних після кожної з чотирьох реакцій, піддають електрофору на сусідніх доріжках поліакриламідного гелю, внаслідок чого фрагменти ДНК розділяються відповідно до своїх розмірів. Потім радіоавтографують гель. Набір смуг, реєстрованих на рентгенівській плівці, "читають", визначаючи таким чином нуклеотидку послідовність ДНК (Рис. 19).

Метод Максама-Гілберта, опрацьований для аналізу первинної структури достатньо довгих молекул ДНК, використовується і для коротких (8-16-ланкових) олігодезоксирибонуклеотидів. Однак у цьому випадку реакції хімічної модифікації проводять у більш жорстких умовах (збільшуючи час та температуру реакції), щоб підвищити ступінь модифікації.



Хімічним шляхом руйнують одну або дві з чотирьох основ, в результаті чого відбувається розщеплення ланцюгу у відповідних точках. Умови реакції підбираються таким чином, щоб у кожній точці розщеплювалися тільки деякі з ланцюгів; при цьому отримують набір фрагментів різної довжини



За допомогою електрофорезу в гелі фрагменти розділяються за розміром; ті з них, що містять радіоактивну мітку, залишають "відбитки" на рентгенівській плівці. За положенням цих відбитків можна визначити, яка саме основа була зруйнована при утворенні кожного з радіоактивних фрагментів



Послідовність зруйнованих основ відповідає нуклеотидній послідовності аналізованого ланцюга

Рис. 19. Схема методу секвенування ДНК за Максамом-Гілбертом.

Набір реакцій, що використовується для розщеплення ДНК по мономерних ланках певного типу, достатньо великий і постійно поповнюється.

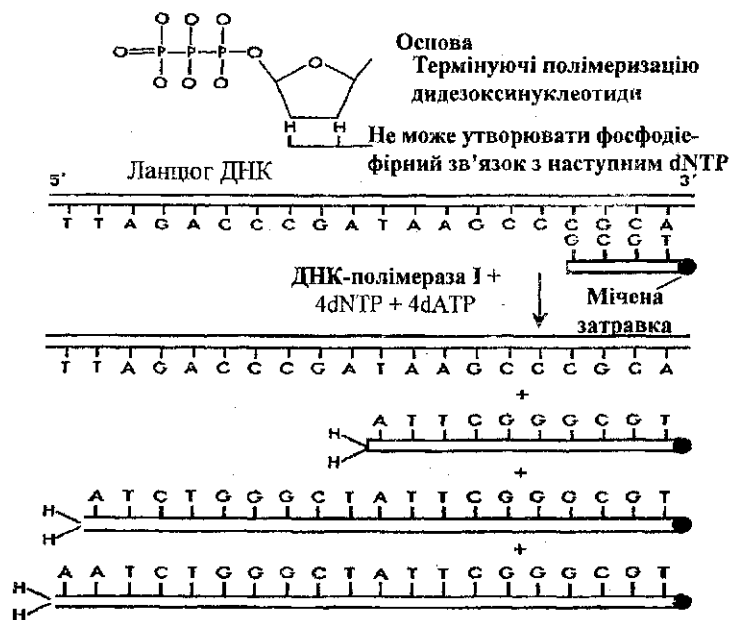
У даний час широко використовують два основних варіанти секвенування за Максамом-Гілбертом. У першому з них реакцію хімічної модифікації ДНК проводять у розчині, а в другому ДНК попередньо іммобілізують на твердому носії (наприклад, ДЕАЕ-целюлозі). Перший метод більш традиційний, його численні модифікації з успіхом використовувалися для секвенування фрагментів ДНК різних розмірів, у тому числі й олігонуклеотидів. У той же час другий метод має ряд переваг. Він вимагає менших затрат праці й часу, простіший у засвоєнні, дає змогу обійтися мінімальним набором обладнання. У цілому обидва методи забезпечують отримання цілком задовільних результатів, а вибір якогось з них визначається конкретними умовами лабораторії.

П. Сенджер розробив ще один метод секвенування ДНК - із застосуванням ферментативного підходу. У цьому методі використовують синтетичні 2'3'-дидезоксирибонуклеозидтрифосфати. Як відомо, ДНК - це полімер, цукрофосфатний кістяк якого складається з 3',5'-дезоксирибонуклеотидів. Тому за допомогою ДНК-полімерази згадані синтетичні аналоги нормально включаються в ланцюг ДНК, що росте, через свої 5'-фосфатні групи. Проте вони не утворюють фосфодієфірного зв'язку із наступним нуклеотидом, внаслідок чого ріст такого ланцюга припиняється. Через таку властивість 2',3'-дидезоксирибонуклеозидтрифосфати у цьому випадку отримали назву *термінаторів транскрипції*.

Щоб провести секвенування за Сенджером, беруть чотири 2',3'-дидезоксирибонуклеотиди для кожної з чотирьох основ. До реакційної суміші в цьому разі входять: 1) одонитчатий ланцюг ДНК, нуклеотидну послідовність якого мають визначити; 2) короткий фрагмент міченої ДНК, комплементарний кінцевій ділянці цього ланцюга (його називають затравкою); 3) один синтетичний дидезоксинуклеотид та відповідний нормальний дезоксинуклеотид у точно визначеному співвідношенні; 4) три інших дезоксинуклеотиди.

Коли до такої реакційної суміші додають ДНК-полімеразу, відбувається нормальна полімеризація нових ланцюгів ДНК, комплементарних присутньому у суміші, починаючи з затравки. Однак при включенні 2',3'-дидезоксирибонуклеотидів ріст даного ланцюга припиняється. Якщо співвідношення 2',3'-дидезоксирибонуклеотид/дезокси-рибонуклеотид підібрано правильно, утворюється набір мічених молекул, довжини яких дорівнюють відстаням від залишків даного нуклеотиду до кінця ДНКового ланцюга (Рис. 20).

А



Б

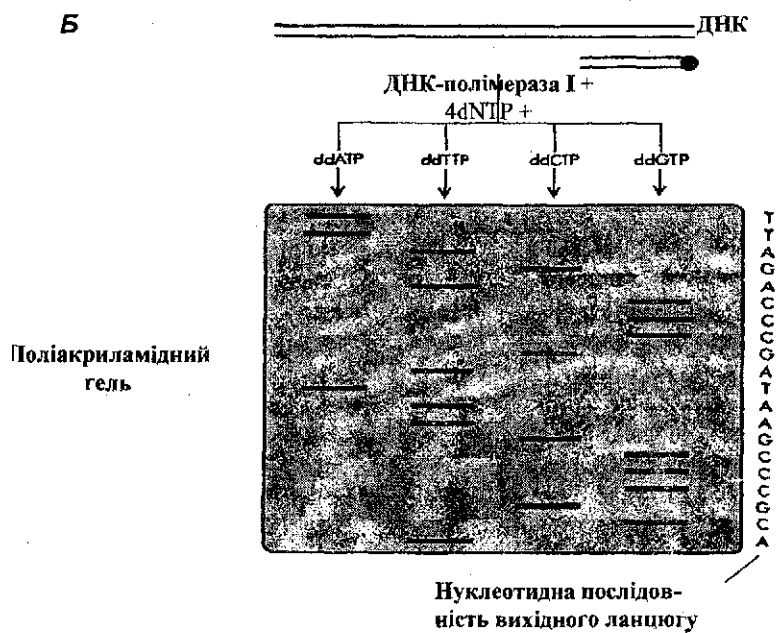


Рис 20. Схема методу секвенування ДНК за Сенджером. А. Синтезують 2',3'-дидезоксинуклеотиди для кожної з чотирьох основ. ДНК-полімераза *E.coli* може включати ці молекули в ДНК, оскільки вони містять нормальну 5'-фосфатну групу, однак, включившись у ДНК, дидезоксинуклеотид (ddNTP) не може утворювати фосфодієфірний зв'язок з наступним dNTP. В результаті ріст даного ланцюгу ДНК припиняється. Реакційна суміш для секвенування за Сенджером складається з ланцюгу ДНК, нуклеотидну послідовність якої хочуть визначити, короткого фрагменту міченої ДНК, комплементарної кінцевій ділянці цього ланцюгу (затравки), одного дидезоксинуклеотиду і відповідного дезоксинуклеотидів строго певному співвідношенні, а також трьох інших dNTP. Коли додають ДНК-полімеразу, відбувається нормальна полімеризація, починаючи з затравки, однак при включенні ddNTP ріст даного ланцюгу припиняється. Якщо співвідношення ddNTP: dNTP вибрано вірно, утворюється набір мічених молекул, довжини яких дорівнюють відстаням від залишків даного нуклеотиду до кінця ланцюгу ДНК. Б. ДНК, послідовність якої хочуть визначити, в присутності міченої затравки інкубують окремо в чотирьох реакційних сумішах для ДНК-полімеразної реакції, кожна з яких містить один з чотирьох ddNTP. Отримані мічені фрагменти розділяють за розміром в поліакриламідному гелі, проводять радіоавтографію і за картиною розподілу фрагментів встановлюють нуклеотидну послідовність ДНК.

Загалом, щоб просеквенувати за методом Сенджера молекулу ДНК, послідовність якої хочуть визначити, у присутності міченої затравки її інкубують окремо у чотирьох реакційних сумішах для ДНК-полімеразної реакції, кожна з яких містить один з чотирьох 2',3'-дидезоксирибонуклеотидів. Отримані в результаті реакції мічені фрагменти розділяють за розмірами у поліакриламідному гелі, радіоавтографують і за картиною розподілу фрагментів встановлюють нуклеотидну послідовність ДНК. Зараз цей метод трохи вдосконалено завдяки використанню флуоресцентно мічених 2',3'-дидезоксирибонуклеотидів як термінаторів транскрипції. При цьому такі мічені молекули, відповідно до основи, яку вони містять, розрізняються за квантовим виходом флуоресценції. Це значно спрощує процедуру секвенування, оскільки замість чотирьох реакцій копіювання тепер достатньо провести одну з додаванням всього набору 2',3'-дидезоксирибонуклеотидів. Використання флуоресцентних міток в секвенуванні дало змогу автоматизувати процедуру аналізу й визначати первинну структуру ДНК безпосередньо в процесі електрофоретичного розділення мічених фрагментів. Коли фрагменти ДНК проходять крізь зону сканування, лазерний пристрій «зчитує» сигнал специфічної мітки, потім комп'ютер автоматично обробляє отриману інформацію й вишиковує послідовність нуклеотидів.

Загалом слід відмітити, що обидва згадані методи секвенування ДНК засновані на одному принципі. У методі Максама-Гілберта використовується специфічне розщеплення ДНК, обумовлене природою основ, у методі Сенджера - статистичний синтез ДНК, що закінчується на одному з чотирьох нуклеотидів. Таким чином, основа обох методів - отримання повного (статистичного) набору фрагментів ДНК, що закінчуються на кожному з чотирьох нуклеотидів.

Хімічний метод (метод (Максама-Гілберта) простіше використовувати у тому випадку, коли досліджувані ДНК не надто великі (200-500 н.). У тому ж випадку, коли йдеться про секвенування високомолекулярної ДНК, краще використовувати метод полімеразного копіювання (метод Сенджера), щоб не вводити процедури рестриктазного розщеплення з виділенням індивідуальних фрагментів. При ензиматичному секвенуванні подовжених одноланцюгових ДНК (як, наприклад, ДНК бактеріофагів) можна використовувати набір олігонуклеотидів-затравок.

Методи секвенування, розроблені А. Максамом і У. Гілбертом та П. Сенджером, стали нині обов'язковою складовою арсеналу генної інженерії. В автоматизованому варіанті це доступна, відносно нескладна процедура. Автоматичні секвенатори виробляє цілий ряд фірм.

Аналітичні дані щодо побудови різних геномів накопичується настільки швидко, що реєстрація їх потребує використання найдосконаліших сучасних комп'ютерів. Як стало нещодавно відомо, такий підхід забезпечив дострокове виконання програми встановлення повної послідовності генома людини. Знаючи послідовність гена, легко визначити амінокислотну послідовність білку, ним кодованого. Нині часто буває простіше визначити первинну структуру білку саме опосередковано, ніж за допомогою прямого секвенування білку, яке теж розроблене. Однак якщо пряме визначення амінокислотної послідовності білку триває місяцями, а іноді й роками, то ДНК відповідної довжини вдається секвенувати за кілька тижнів. Слід відзначити, що комп'ютери необхідні не тільки для накопичення банку даних щодо послідовностей нуклеотидів, але й як інструмент дослідження способу запису в геномі регуляторних сигналів.

Паралельно з накопиченням даних про будову геномів зараз бурхливо розвивається *геноміка*. Це комплексна наука, що вивчає структуру і функцію генів, наука, яка інвентаризує гени, створюючи, таким чином, геномні карти живих істот. Її розділи включають структурну геноміку - встановлення вмісту й організації геномної інформації, функціональну геноміку - вивчення реалізації інформації, записаної в геномі (від гену до ознаки), а також порівняльну геноміку - порівняльні дослідження вмісту й організації геномів різних організмів.

Кінцева мета структурної геноміки - отримання послідовності нуклеотидів, яка являла б собою повністю кожен з хромосом від першого нуклеотида до останнього. Щоб отримати таку послідовність, сьогодні доводиться визначати послідовність нуклеотидів у достатньо коротких відрізках ДНК завдовжки приблизно 1.000 позицій. У геномі людини 3 млрд позицій, а це означає, що його потрібно розбити на шматки, які й будуть «читатися». Потім слід відновити єдину послідовність нуклеотидів через порівняння окремих прочитаних відрізків тексту. Відновлення засноване на порівнянні певних послідовностей і виявленні в них ідентичних ділянок тексту та ділянок, які перекриваються. Довжина ділянок перекривання повинна перевищувати довжину послідовності, яка може зустрітись в даному геномі з причин випадкового характеру. Наприклад, в геномі людини на $3 \cdot 10^9$ пар основ випадково може зустрітись одна і та ж послідовність завдовжки 15 нуклеотидів - оскільки у кожній позиції може знаходитись один з чотирьох нуклеотидів, то вірогідність того, що задані нуклеотиди виявляться у 15 однакових позиціях підряд, дорівнює 4^{15} , що приблизно дорівнює 10^9 . Це значить, що у відрізку завдовжки 10^9 нуклеотидів задана 15-нуклеотидна послідовність може зустрітись один раз з причин випадкового характеру. Але справа в тому, що в ДНК нуклеотиди розміщені не випадково, а це становить проблему при відновленні послідовності з перекривання відрізків. Якщо дві послідовності з 1.000 нуклеотидів перекриваються на 20 або 100 нуклеотидів - це ще нічого не значить, оскільки увесь цей фрагмент з 1.000 нуклеотидів може бути декілька разів повторений у геномі. Тому потрібно було спочатку розставити вздовж геному фрагменти, а вже потім виявляти перекривання їх на основі сіквенсу. Як це можна було зробити? Потрібно було поставити якісь маркери в геномі людини щоб визначити у якій послідовності розташовані ділянки. Послідовність згаданих ділянок і становить карту геному. Першою такою картою стала карта генетична (Рис. 21).

Поперечні смуги на хромосомі (Рис. 21) індивідуальні для кожної з них; кожна смуга має власний номер, який являє собою "адресу" даної ділянки на хромосомі. Ясно, що в кожній такій ділянці розміщуються мільйони пар нуклеотидів, послідовність яких потрібно визначити. Отримано поліморфні маркери, тобто знайдено такі ділянки хромосом, які у різних людей (або на різних хромосомах однієї людини) містять неідентичні послідовності нуклеотидів.

Генетична карта була першою картою геному людини, на основі якої будувалася подальша робота з картування. Цю карту співвіднесли з фізичною картою, яка показує порядок розміщення клонуваних фрагментів ДНК упродовж генома. Фізичні карти генома часто представлено наборами фрагментів ДНК, клонуваними у векторних молекулах, упорядковано

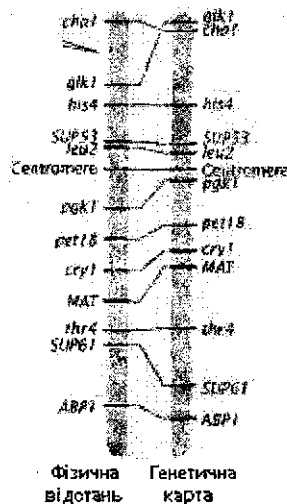


Рис. 21. Фізична та генетична карти хромосоми 3 дріжджів. Відносні генетичні відстані, встановлені на основі частот рекомбінації, відрізняються від відстаней на фізичній карті.

розміщених відносно одна одної. Такий набір фрагментів ДНК, що безперервно перекриваються, називається *контіг*. Щоб виявити перекривання клонованих фрагментів ДНК, знадобилась раніш встановлена карта генетичних маркерів. Перекривання встановлювалось між «великими» молекулами ДНК, що містять приблизно 10^6 пар нуклеотидів, які були клоновані в штучних хромосомах дріжджів (YAC-клони, скорочення від *Yeast Artificial Chromosome*). Штучними їх називають тому, тому що з них видалили головну частину власне дріжджової ДНК та вставили людські фрагменти ДНК. Такі конструкції здатні реплікуватися в клітинах дріжджів. Розмір хромосом дріжджів становить якраз приблизно 1-2 млн пар нуклеотидів. Співставлення даних щодо присутності певних генетичних маркерів в YAC-клонах дає змогу виявити послідовність їх перекривання.

Вставки ДНК з 3.000 YAC-клонів приблизно дорівнюють за довжиною геномові людини. В аналіз на перекривання YAC-клонів взяли 30.000 клонів, з тим щоб кожна точка генома перекривалася декількома клонами. Спочатку невідомо було, як вони розміщені, але в середньому кожна точка геному перекривалася 10 разів. Було використано близько 3.000 STR-маркерів, при цьому визначали, як ці маркери та клони перекриваються один з одним. Як метод, що виявляє присутність генетичного маркера у складі YAC-клонів, використовувалася ПЛР. На заключному етапі

складання фізичної карти геному людини у цих 30.000 YAC-клонах виявлено присутність приблизно 30.000 маркерів, що складає один маркер на 100.000 п.н. Відстань між кінцями YAC-клонів також склала 100.000 пар нуклеотидів (при довжині клону 1 млн п.н.). Картування проводили на роботизованих машинах, які здійснювали приблизно по 300.000 ПЛР на день. Це, зрештою, дозволило розставити в контіг усі YAC-клони.

Одразу ж після розробки методів секвенування з'явилися і методи хімічного синтезу порівняно довгих олігонуклеотидів з певною визначеною послідовністю. Ці методи ґрунтуються на специфічному захисті (тобто модифікації, яка запобігає вступу у хімічну реакцію) 5'- або 3'- кінця моне-та олігонуклеотидів. З такою метою до 5'- або 3'-гідроксиду приєднують об'ємну блокувальну групу. При цьому використовують різні блокувальні групи, деякі з них пізніше вилучають після обробки кислотою чи лугами. 5'-блокований мононуклеотид може вступати у реакцію конденсації з 3'-блокованим мононуклеотидом, в результаті чого утворюється динуклеотид, блокований по обох кінцях. Потім 5'- або 3'-блокувальна група вилучається, і динуклеотид далі реагує з відповідним чином деблокованим моно- або динуклеотидом. Подібний цикл, що охоплює конденсацію, вилучення тієї чи іншої блокувальної групи й подальшу конденсацію, можна повторювати доти, доки не буде отримано олігонуклеотиду потрібної довжини (Рис. 22).

Опрацьовано модифікацію цього методу, за якою перший нуклеотид конденсують з твердим носієм і додають по одному наступні нуклеотиди, промиваючи носій після кожного етапу. Зрозуміло, що таку процедуру автоматизували. Нині існують спеціальні прилади, які синтезують олігонуклеотиди згідно з заздалегідь введеною програмою.

Після визначення структури фенілаланінової транспортної РНК Г. Корана у 1972 р. здійснив синтез ДНК (інакше кажучи, гена) цієї РНК. Після цього хімічно синтезували також гени соматостатину та інсуліну людини. Пізніше ці гени успішно ввели в клітини *E. coli* за допомогою методів генної інженерії. Нарешті, у 1980 р. створили прилад-синтезатор генів, здатний протягом 6 год. синтезувати 12-ланковий олігонуклеотид із заданою послідовністю. Нині, за рахунок різних вдосконалень, швидкість дії таких приладів значно зросла.

У зв'язку з широким застосуванням ДНК-зондів, а також певних послідовностей ДНК (праймерних тощо) безпосередньо у генно-інженерних методиках широкого розповсюдження набув процес штучного багаторазового копіювання (*ампліфікації*) ДНК - так звана *полімеразна ланцюгова реакція* (ПЛР), запропонована у 1980 р. Автор її- американський вчений К. Мулліс, був за це відмічений Нобелівською премією 1994 р, ПЛР - це циклічний процес, у кожному циклі якого відбувається подвоєння кількості

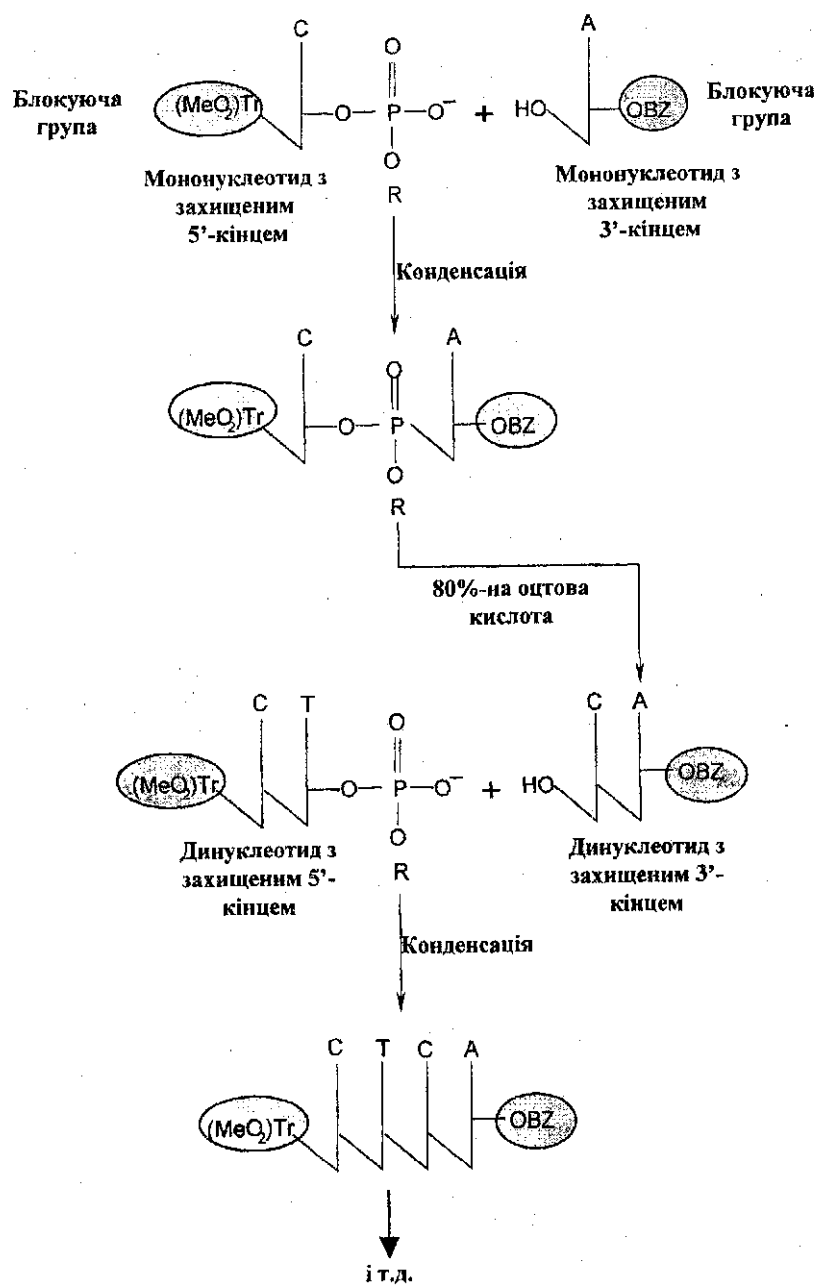


Рис. 22. Хімічний синтез олігонуклеотидів. До 5'- або 3'-кінців мононуклеотидів приєднують блокуючі групи. Ці групи являють собою залишки великих органічних молекул, що перешкоджають утворенню фосфодієфірного зв'язку; при необхідності їх можна вилучити за допомогою специфічних реакцій. Якщо нуклеотид з захищеним 5'-кінцем вступає в реакцію конденсації з іншим нуклеотидом, у якого захищений 3'-кінець, між двома вільними кінцями формується нормальний фосфодієфірний зв'язок і утворюється динуклеотид, у якого блоковані обидва кінця. Потім групу, що блокує 5'- або 3'-кінець, вилучають за допомогою кислоти або лугу. Захищений за 5'-кінцем динуклеотид можна конденсувати з мононуклеотидом (або динуклеотидом), захищеним за 3'-кінцем, з утворенням тринуклеотиду (або тетрануклеотиду). Цей цикл з конденсації, специфічного вилучення блокуючої групи з одного кінця і наступної конденсації повторюють до тих пір, поки не синтезується олігонуклеотид потрібної довжини.

молекул ДНК *in vitro*, які далі або тестують, або застосовують у генно-інженерних маніпуляціях як матеріал для вбудовування у вектори. Копіювання ДНК-матриці при ПЛР здійснюється специфічною термостабільною Tag-полімеразою (ДНК-полімеразою (фермент термофільних бактерій *Thermus aquaticus*). Важливо, що ДНК-полімераза не може розпочинати синтез ланцюга ДНК «з нуля»; їй необхідний короткий «затравочний» ланцюг ДНК, до якого вона зможе почати приєднувати нуклеотиди. Цей фрагмент ДНК називають затравкою за аналогією із кристалом затравки, що вноситься до насиченого розчину при кристалізації, або частіше праймером. Праймер - найважливіший елемент у ПЛР, який забезпечує старт та кінцеву специфічність реакції. Для конструювання праймерів необхідне знання не лише геному даного організму, але й близьких за походженням геномів.

Є два типи таких-коротких (20-30 н.), штучно синтезованих затравочних ДНК-олігонуклеотидів. Один з них комплементарний початкові одного ланцюга ДНК, інший - кінцеві другого ланцюга. При цьому специфічність ПЛР визначається здатністю праймерів розпізнавати точно визначену ділянку ДНК і зв'язуватися з нею відповідно з принципом комплементарності. Крім того, реакційна суміш містить дезоксирибонуклеотидтрифосфати, $MgCl_2$ та буфер.

ПЛР проводять автоматизовано за допомогою програмованого термостата (ампліфікатора). Процедура проходить таким чином: спочатку при нагріванні до температури 93-95 °C відбувається денатурація: молекула ДНК-матриці розділяється на два окремих комплементарних ланцюги. Далі температура знижується до 45-65 °C і за принципом комплементарності проходить гібридизація («відпалювання») праймерів на матриці, оскільки

їхня концентрація в розчині значно більша за концентрацію вихідних молекул ДНК-матриці. У результаті формуються дезоксирибонуклеотидні структури, які впізнає ДНК-полімераза. Потім суміш нагрівається до температури 72 °С, тобто до нормальної робочої температури для термостабільної ДНК-полімерази. У результаті починається синтез (подовження) ланцюга ДНК-матриці, відбувається синтез комплементарних ланцюгів, і число молекул ДШС-матриць подвоюється (Рис. 23). Цей процес подвоєння (ампліфікації) повторюють 30-40 разів (циклів) в результаті чого отримують до мільярда копій вихідної молекули ДНК-матриці.

Універсальність, висока чутливість і відносна простота виконання зумовили незамінність методу ПЛР для розв'язання різних завдань генної інженерії, а також завдань клінічної діагностики (виявлення і ідентифікації збудників захворювань, генетично обумовлених захворювань та генетичної схильності, ідентифікації особистості людини, виявлення генетично модифікованих організмів тощо).

3.3. Прийоми та методи генної інженерії

Перш ніж переходити до вивчення основних прийомів та методів генної інженерії, доцільно розглянути загальні принципи цього процесу й ознайомитися зі спеціальною термінологією.

На рисунку (Рис. 24) зображено спрощену схему клонування фрагмента ДНК. Під *тонуванням* при цьому розуміють приготування колонії генетично тотожних клітин, які містять потрібний нам сегмент ДНК. Цей сегмент, позначений на схемі як "чужорідна ДНК", отримують, розрізавши ділянки ДНК на фрагменти за допомогою розглянутих рестриктаз, або синтезом - хімічним чи ферментативним.

Чужорідну ДНК в умовах *in vitro* з'єднують з *вектором* - спеціальним інструментом для введення чужорідної ДНК в бактеріальну клітину. У даному разі роль вектора виконує плазмід. Молекулу рекомбінантної ДНК - комплексу чужорідної ДНК з плазмідною - вводять у ДНК клітини бактерії, використовуючи механізм трансформації. Далі за допомогою спеціальних методів ідентифікують клон, що містить плазмідну з чужорідною ДНК.

Таке клонування фрагмента ДНК дає можливість отримати його у кількостях, достатніх для детального вивчення й застосування реагенту в наступних біохімічних та генетичних роботах.

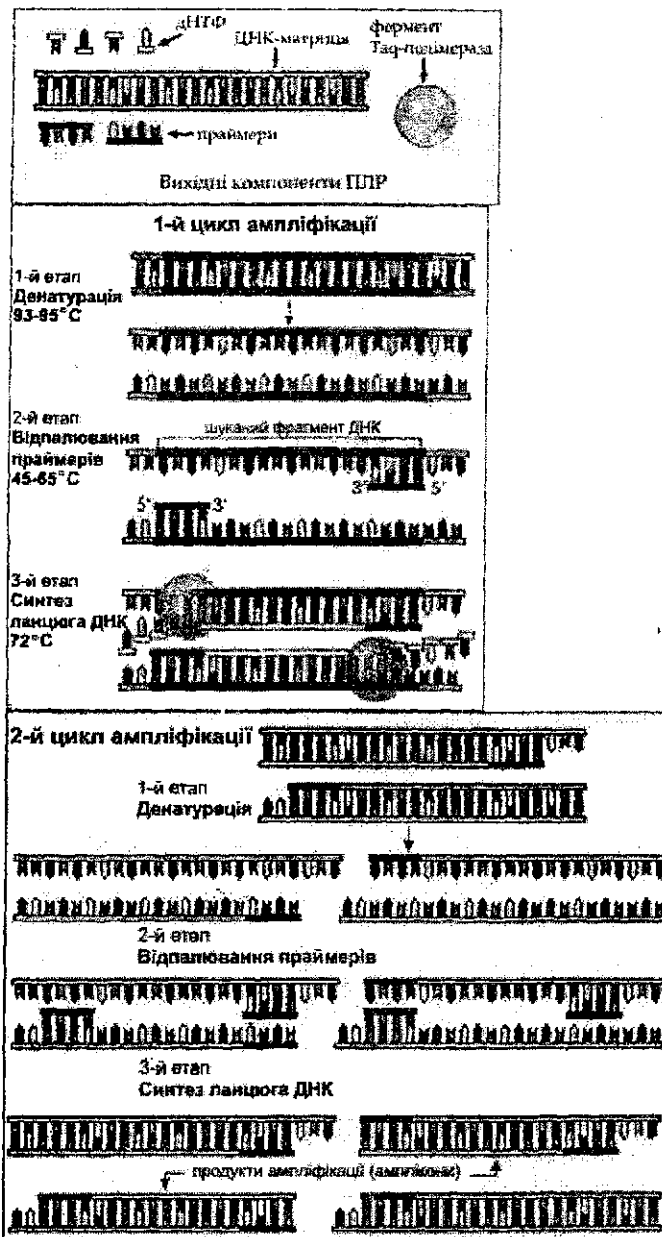


Рис. 23. Схема проходження полімеразної ланцюгової реакції.

In vitro

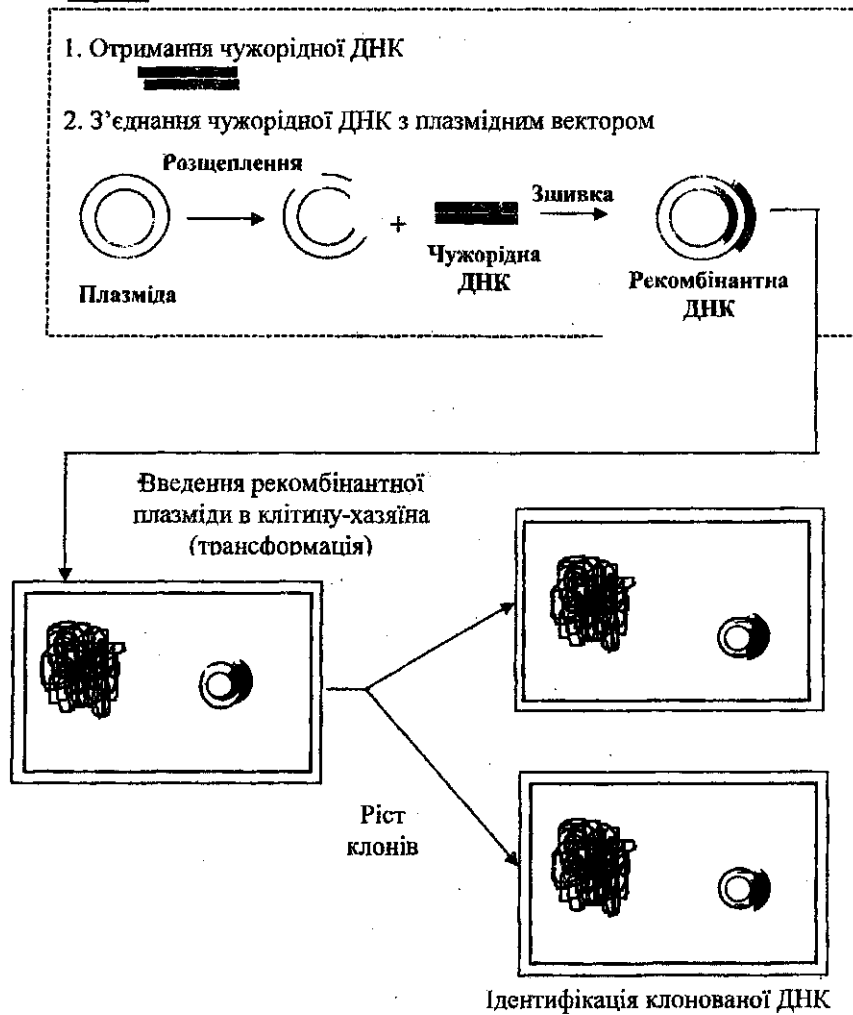


Рис. 24. Головні етапи клонування фрагментів чужорідної ДНК

3,3.1. Джерела генів

Експериментальна генна інженерія складається з кількох послідовних етапів. Перший етап - отримання генів, тобто ділянок молекул ДНК, які містять інформацію для синтезу молекули певного поліпептиду.

Синтез нових молекул РНК на ДНК-матриці повинен починатися у певних визначених положеннях. У зв'язку з цим на дволанцюгових ДНК існують спеціальні ділянки — *промотори*.

Промотор - це ділянка молекули близько 40 т.н.п., розташована безпосередньо перед ділянкою транскрипції. Саме на промоторі відбувається зв'язування ДНК-полімерази з молекулою ДНК, при цьому утворюються дуже міцні комплекси. До складу промотора входять дві консервативні послідовності, одна з яких (*послідовність Хогнес або -35*) потрібна для пізнання, а друга (*послідовність Прибнова або -10*) - для тісного зв'язування промотора з РНК-полімеразою. Білок-кодувальна частина гена обмежена ініціативним (звичайно - АУТ, рідше - ГУГ) і термінативним (УАА, УАГ та УГА) кодонами. Триплет АУТ звичайно кодує метіонін, але на початку синтезованого поліпептидного ланцюга він визначає підстановку модифікованої амінокислоти - *формілметіоніну*. У готовому білку ця амінокислота деформілюється або взагалі відщеплюється.

Встановлено, що спорідненістю до ДНК-полімерази володіють не тільки промотори, але і всі ділянки ДНК. Вважається, що спочатку РНК-полімераза зв'язується з довільною ділянкою ДНК, проте цей зв'язок є недостатнім для початку синтезу нових молекул РНК. У той же час таке зв'язування забезпечує можливість лінійного переміщення ферменту відносно ДНК до тих пір, поки фермент не досягне промотору і не виявиться міцно зафіксованим у положенні, з якого може розпочинатися збірка нового полірибонуклеотидного ланцюга.

Гени прокаріотів, окрім промоторів, містять також білок-кодувальну область та термінатор транскрипції (Рис. 25).

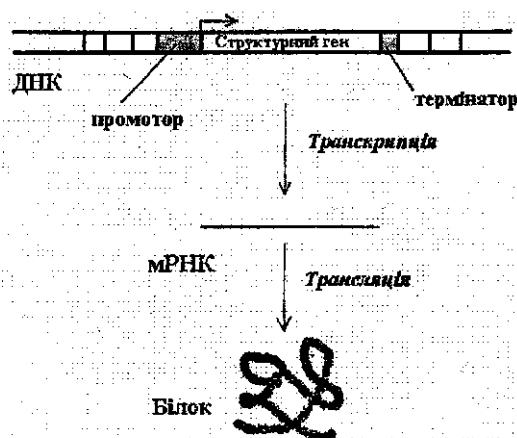


Рис. 25. Схематичне зображення прокаріотичного структурного гену.

Еукаріотичні гени за будовою та характером транскрипції значно відрізняються від прокаріотичних. Здебільшого вони мають мозаїчну будову - в них чергуються області, які кодують білок, та області, що його не кодують. Тому вони значно довші, ніж це потрібно для кодування білків заданої довжини. До того ж гени в ДНК не завжди займають фіксоване положення (Рис. 26).

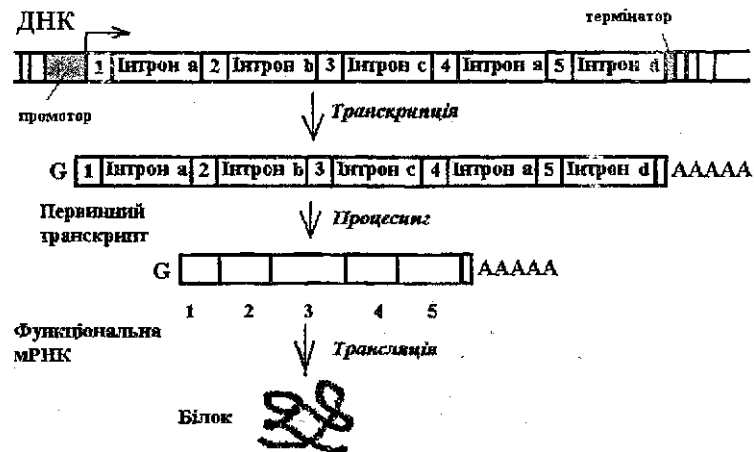


Рис. 26. Схематичне зображення еукаріотичного структурного гену

З промоторами еукаріотичних генів функціонально пов'язані їхні специфічні локуси - *енхансери* та *регуляторні елементи*. Енхансер збільшує кількість посадок РНК-полімерази у десятки й сотні разів. При цьому він може перебувати у будь-якій орієнтації щодо гена, розміщуватися з будь-якого його боку, всередині (в інтроні) і навіть на відстані у кілька тисяч пар нуклеотидів.

Регуляторні елементи присутні у так званих індукцибельних генах (гени інтерферону, металотіонеїну тощо), які зчитуються тільки коли до клітини потрапляють певні речовини. На відміну від енхансерів, регуляторні елементи тісно зчеплені з промоторами й розміщуються безпосередньо перед ними або перекриваються з ними.

Отже, механізм регуляції транскрипції в еукаріот набагато гнучкіший, ніж у прокаріот. Фіксована хімічна структура більшості прокаріотичних промоторів зумовлює регуляцію тільки за принципом "все або нічого", тоді як сумісні фізичні властивості еукаріотичних промоторів разом із властивостями енхансерів або регуляторних елементів дають змогу здійснювати тонку регуляцію - від повної експресії до повного її пригнічення, що досягається локальною модифікацією ДНК, зміною внутрішньоклітинних умов тощо.

У термінаторах транскрипції генів еукаріот, як і в промоторах, існують дві характерні області. На відстані приблизно 100 пар основ до сайта, де уривається транскрипція, розміщується послідовність, що складається з 30-40 тимідинових залишків. Вважають, що її роль полягає у гальмуванні руху РНК-полімерази уздовж ДНК в кінці гена. На відстані близько 20 п.н. до цього сайту розміщена характерна послідовність з шести пар основ, яка служить сигналом для зв'язування полі-А-полімерази, що здійснює поліаденілювання мРНК на 3'-кінці транскрипту.

Операції на ДНК *in vitro* охоплюють її виділення з клітини й фрагментацію, очищення окремих фрагментів або синтез їх, модифікацію або спрямоване мутування ізолюваних генів, формування у заданого фрагмента ДНК кінців потрібної будови і його поєднання з вектором.

Історично найпершим методом отримання генів став штучний синтез відповідно до послідовності, амінокислот у певному пептиді. Даний метод використовують для отримання невеликих генів, наприклад, гена соматостатину.

Головний засіб отримання ДНК - матеріалу для генної інженерії - розщеплення геномної ДНК рестриктазами. Зрозуміло, що величина ДНК-фрагментів залежить від розміщення сайтів ДНК, які упізнаються певною рестриктазою, та величиною цих сайтів. Якщо величина сайту упізнавання дорівнює чотирьом парам нуклеотидів, то в середньому такий сайт повторюється через 256 пар нуклеотидів. Послідовності нуклеотидів для рестриктаз із сайтом впізнавання у п'ять пар нуклеотидів у молекулах ДНК у середньому зустрічаються через 1.024 п.н., з шістьма парами - через 4.096 п.н. Таку саму закономірність простежують і далі по мірі зростання величини сайту впізнавання. Зрозуміло, що фрагменти ДНК, утворені в результаті гідролізу рестриктазами, зазвичай мають досить велику молекулярну масу (як правило, кілька сотень нуклеотидів). Це достатньо багато для того, щоб утворені фрагменти несли цінну генетичну інформацію, і водночас не досить для того, щоб їх можна було вивчати й модифікувати в умовах *in vitro*. Тому, вибираючи рестриктази з різною довжиною сайтів упізнавання, можна отримувати більш або менш довгі ділянки ДНК.

У зв'язку з вирішенням задачі секвенування генома людини опрацьовуються різноманітні підходи до створення генетичних карт довгих геномних ДНК. При цьому доступний засіб для специфічного гідролізу довгих ДНК у достатньо рідко розміщених сайтах сильно полегшив би роботу з такими молекулами. Як вказано вище, природні рестриктази, як правило, упізнають сайти, що складаються з 4-6 нуклеотидів. При гідролізі геномних ДНК такими ферментами отримують надзвичайно велику кількість близьких за довжиною фрагментів, які важко відокремити один від одного. Існують рестриктази, що впізнають 8-нуклеотидні сайти, але їх

мало, вони впізнають, головним чином, CG-багаті послідовності, а такі сайти, як правило, розміщені кластерами. Статистично вони зустрічаються один раз на 65,5 т.п.н., що також занадто часто. Рестриктази, які здійснюють гідроліз у рідше розміщених сайтах, практично не зустрічаються. Тому перед науковцями постало питання про створення штучних рідкорозщеплюючих рестриктаз.

Існує два підходи до створення таких рестриктаз. У першому з них використовується здатність певних олігонуклеотидів або їх аналогів, вдосконалених з точки зору зв'язування ДНК; вони складаються з 10-12 нуклеотидів. До олігонуклеотидів пришивалися активні групи, здатні гідролізувати ДНК у місцях їх зв'язування. З таких груп використовують хелатні сполуки деяких металів (Fe-EDTA; Cu-фенантролін). Крім того, дволанцюгові розриви можуть здійснюватися за допомогою реакції утворення фотозшивок, яка індукується деякими сполуками, ковалентно зв'язаними з олігонуклеотидами (азидопрофлавін, азидофенацел тощо); в цьому випадку фотозшивки перетворюються на дволанцюгові розриви під дією лугів.

Інший підхід базується на так званому методі «Ахіллесової п'яти». ДНК в комплексі з агентом, який зв'язує ДНК (білком, олігонуклеотидом), обробляється метилазою. При цьому сайти метилювання, що перекриваються з сайтами такого агента, або сусідні з ними виявляються захищеними від метилювання. Потім відбувається інактивація метилази й вилучення зв'язаного агента, після чого ДНК піддається гідролізу за допомогою рестриктази з відповідним сайтом упізнавання. В результаті ДНК виявляється гідролізованою тільки по тих сайтах рестрикції, які залишилися непрометильованими, тобто по сайтах, захищених від метилази агентом, зв'язаним з ДНК. Слід, однак, відмітити, що цей метод має ряд недоліків, які обмежують його використання.

Ще один метод внесення дволанцюгових розривів, що дає змогу гідролізувати ДНК у рідкорозміщених сайтах, базується на здатності молекул РНК, зв'язуючись тільки з одним з ланцюгів ДНК; інша половина ДНК залишається в одноланцюговому стані. Таким чином, утворена одноланцюгова ділянка може бути мішенню для нуклеази S1, що утворює у цьому місці дволанцюговий розрив.

Геноми багатоклітинних еукаріот містять багато тисяч генів; наприклад, у нематоди *C. elegans* приблизно 19.000 генів, у дрізофіли *D. melanogaster* - 13.600, у людини *Homo sapiens* - близько 25.000, а у рослини *Arabidopsis thaliana* - майже 25.000. Завдяки функціонуванню цих генів забезпечується розвиток і життєдіяльність організму.

Якщо кожен фрагмент ДНК певного індивіда ввести до клітин іншого (зокрема, бактеріального) хазяїна, можна отримати *бібліотеку генів*

відповідного організму. Потрібний ген у такій бібліотеці генів можна знайти за допомогою специфічних мічених ДНК- або РНК-зондів.

Молекули ДНК з банку генів, як правило, не підходять для експресії у отриманому вигляді. Потрібно вилучати або ж, навпаки, досинтезовувати певні ділянки і послідовності, щоб дана молекула функціонувала як повноцінний ген.

Гени у молекулах ДНК розміщені лінійно, між ними нема механічних меж або специфічних сайтів для рестриктаз. Місця розщеплення молекули ДНК рестриктазами знаходяться як у межах гена, так і поза ним. Тому фрагменти ДНК, отримані внаслідок обробки рестриктазою, не відповідають гену, який функціонує. Крім того, як вже вказувалося, у генах еукаріот існують інтрони, що не містять інформації для синтезу відповідної білкової молекули. Ці ділянки також не вилучаються рестриктазами. Отже, фрагменти ДНК, виділені з еукаріот, ще не можуть бути використані для вираження в клітинах прокаріот, оскільки там не відбувається сплайсинг (Рис. 27, 28). Промотори цих генів у прокаріотичних клітинах також не працюють. Але для використання у клітинах прокаріот генів прокаріотичного походження особливих труднощів не існує.

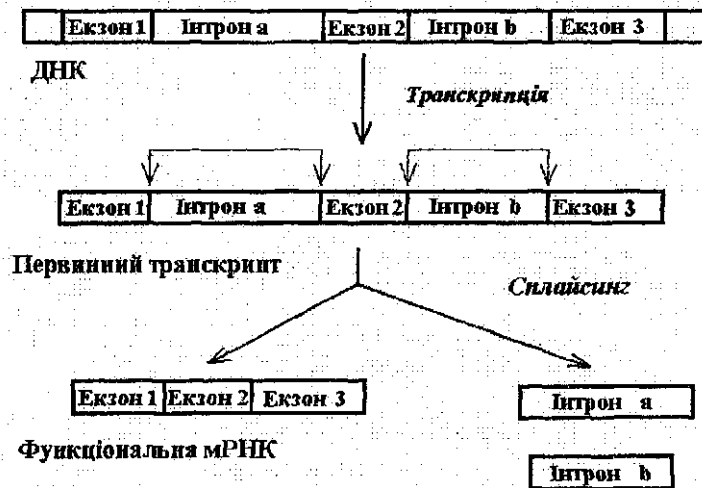


Рис. 27. Сплайсинг первинного транскрипту у еукаріот. Кутовими стрілками позначені місця з'єднання екзонів 1,2 та 3 після вилучення інтронів а і б.

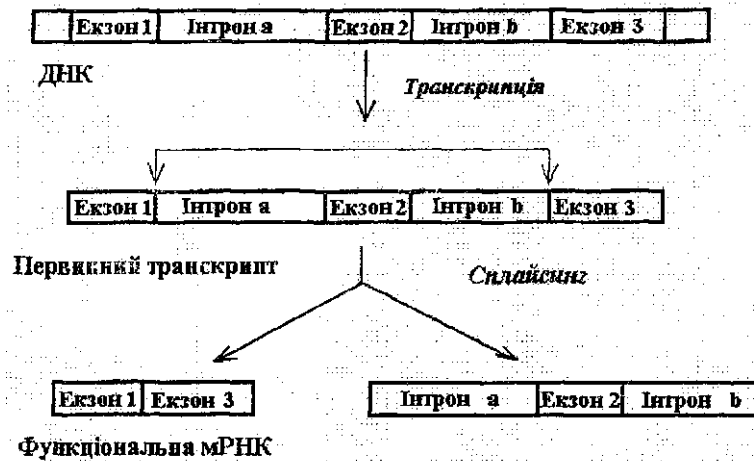


Рис. 28. Альтернативний сплайсинг первинного транскрипту у еукаріот. Стрілками вказані місця з'єднання екзонів після вилучення інтронів. Екзон 2, який фланкується інтронами 1 та 2, вирізається з первинного транскрипту, а екзони 1 і 3 поєднуються з утворенням функціонально активної мРНК.

Фрагменти ДНК, що містять окремі гени, отримують, подрібнюючи гени гідродинамічним способом або ультразвуком. Для отримання великих фрагментів ДНК (більше 19 т.п.н.) її звичайно піддають контрольованому гідродинамічному розриву. При цьому розриви розподіляються повздовж геному випадково, тому серед утворених фрагментів ДНК завжди міститься будь-який з генів у непошкодженному стані. Це важливо для створення банків клонів, що містять набір рекомбінантних молекул ДНК з фрагментами, які являють собою весь геном організму.

Фрагменти, отримувані під дією рестриктаз, розділяють за допомогою електрофорезу в агарозному або поліакриламідному гелях. Якщо розмір фрагмента, що містить потрібний ген, невідомий, його визначають методом гібридизації за Саузерном (див. далі). Якщо ж цей фрагмент треба виділити, його екстрагують з відповідної зони гелю.

Ще один зручний метод отримання еукаріотичних генів - використання мРНК. Тут слід відзначити, що практично всі гени еукаріот містять на своєму 3'-кінці послідовність полі(А); це забезпечує винятково зручну можливість для синтезу ДНК, комплементарної мРНК. З цією метою з клітин виділяють мРНК як полі(А)-вмісну фракцію за допомогою афінної хроматографії на оліго(с!Т)-целюлозі або полі(У)-сефарозі. Потім, якщо змішувати з мРНК

короткі оліго(дТ)-послідовності, вони будуть гібридизуватися з полі(А) та служитимуть затравками для зворотної транскриптази. Далі за допомогою цього ферменту на матриці мРНК отримують комплементарну ДНК (кДНК), після чого ланцюг РНК руйнують при додаванні лугу. Далі на матриці кДНК досинтезують другу нитку ДНК, комплементарну першій (Рис. 29). Отриманий у такий спосіб ген не містить інтронів, промоторів та інших елементів, що регулюють генну активність. Такі гени після приєднання до прокаріотичних промоторів експресуються в прокаріотах.

В окремих випадках, коли використовується не повна мРНК, а її певні фрагменти, використовують дві групи методів: 1) розщеплення полірибонуклеотидного ланцюга у заданому місці і 2) ферментативний синтез РНК на ДНК- або РНК-матрицях та хімічний синтез. У першому випадку використовують ферменти - рибонуклеазу Н, яка розщеплює полірибонуклеотидний ланцюг РНК у складі ДНК-РНК-гетеродуплекса, разом з відповідним синтетичним комплементарним олігодезоксирибонуклеотидом довжиною 6-10 нуклеотидних залишків; нуклеази, ковалентно зв'язані з олігонуклеотидами (наприклад, стафілококова нуклеаза), або так звані *рибозими* - природні РНК і синтетичні полірибонуклеотиди, здатні каталізувати цілий ряд перетворень в інших РНК (наприклад, рибозим L-19).

Необхідні ділянки РНК можна отримувати в такий спосіб, як синтез фрагментів РНК. Ферментативний синтез фрагментів РНК здійснюється з використанням різноманітних генно-інженерних конструкцій. Однак у даний час у переважній більшості випадків для препаративного отримання РНК використовують РНК-полімерази, кодовані геномами ряду ДНК-вмісних бактеріофагів (Т3, Т7 та SP6). Вони характеризуються дуже високою активністю і, на відміну від клітинних ДНК-полімераз, складаються з одного поліпептидного ланцюга.

Отримані у той чи інший спосіб фрагменти нуклеїнових кислот далі вбудовують у векторні молекули.

3.3.2. Вектори

На другому етапі генно-інженерної розробки треба включити попередньо отриману ділянку молекули ДНК у *вектор*. При звичайному введенні ДНК у клітини вона піддається дії ферментів оргазму-хазіяїна - нуклеаз, які розщеплюють цю ДНК до нуклеотидів. У деяких випадках ДНК достатньо зберігається, забезпечуючи успішну трансформацію. Але зазвичай для повного забезпечення ДНК від дії нуклеаз використовують векторні молекули ДНК, які після введення в клітину здатні до автономного існування як самостійні міні-хромосоми; під час наступних поділів клітини ці молекули реплікуються й стабільно підтримуються.

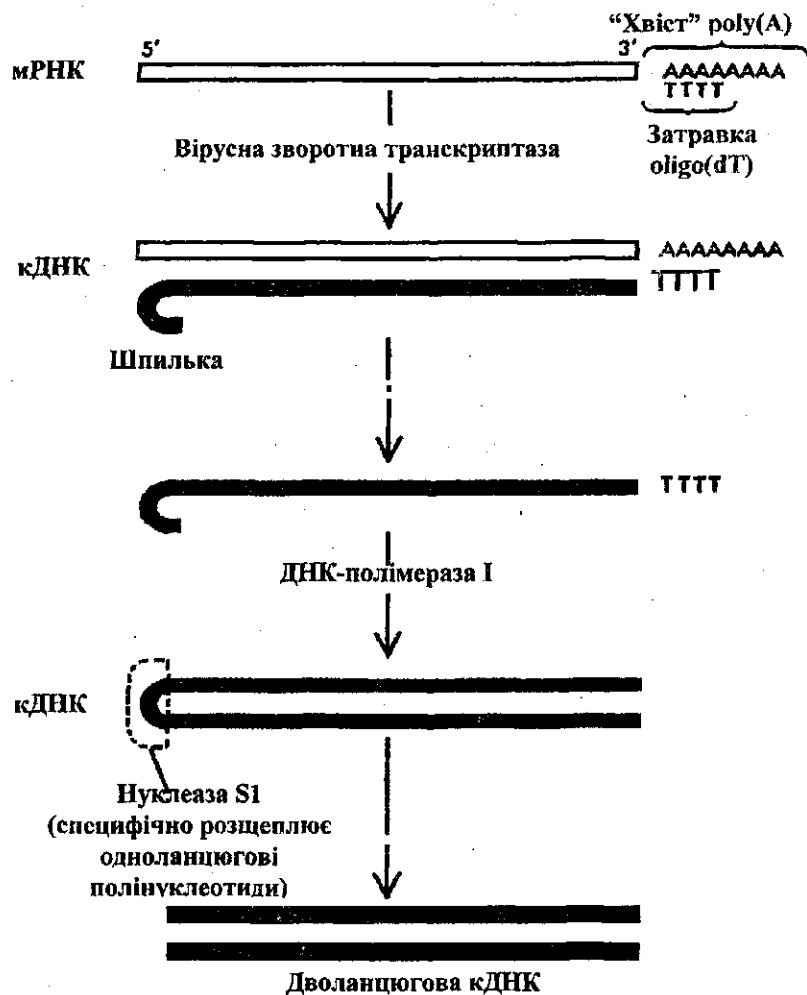


Рис. 29. Синтез дволанцюгової кДНК на мРНК. З poly(A)-хвостом мРНК гібридизують короткий фрагмент oligo(dT). Цей фрагмент слугує затравкою для зворотної транскриптази, яка використовує мРНК у якості матриці для синтезу комплементарного ланцюгу ДНК. КДНК, яка утворюється при цьому, закінчується шпилькою. МРНК руйнують обробкою NaOH, і ця шпилька слугує затравкою для ДНК-полімерази I, яка завершує синтез другого ланцюгу ДНК. Потім шпильку розщеплюють нуклеазою S1, в результаті чого утворюється дволанцюгова молекула кДНК.

Векторами називають молекули ДНК, здатні переносити й стабільно підтримувати у реципієнтних клітинах чужорідну генетичну інформацію. Як вектори звичайно використовують ДНК плазмід та вірусів.

Векторні молекули — головний інструмент генної інженерії. У генно-інженерній розробці *in vitro* у векторні молекули за допомогою ферментів вбудовують певні гени. Такі молекулярні гібриди називають *химерами* або *рекомбінантними молекулами ДНК*. Їх вводять у реципієнтні клітини, в результаті чого відбувається розділення суміші молекул на окремі молекули, причому кожна з таких молекул потрапляє практично лише до однієї з таких клітин. Оскільки внаслідок такого розподілу кожен з виділених клонів містить лише одну індивідуальну рекомбінантну ДНК, згадана процедура називається *тонуванням* рекомбінантних молекул ДНК. Цей же сенс вкладається і у поняття "*клонування генів*".

Будь-який вектор повинен забезпечувати стабільне успадкування рекомбінантних ДНК в автономному стані чи в стані інтеграції з хромосомою. Вектор має містити унікальні сайти рестрикції для декількох рестриктаз в області, не суттєвій для початку реплікації, щоб місця розрізання та введення іншої ДНК не впливали на реплікацію вектора. Існування даних сайтів забезпечує можливість вбудовування чужорідного фрагмента ДНК. Для того ж, щоб клонований ген був здатний експресуватися (тобто щоб за інформацією цього гена синтезувався білковий продукт), вектор має містити специфічні для даної клітини промотори і термінатори. До того ж вектор повинен мати генетичні маркери, які дозволяють легко виявляти трансформовані клітини, що полегшує селекцію клітин. Крім цих мінімальних умов вектор може мати додаткові властивості, що полегшують генно-інженерні маніпуляції: наприклад, мати маркер, який інактивується при вбудові в нього чужорідної ДНК; бути багатокопійним, що дозволяє легко виділити його з клітин в достатніх кількостях і забезпечити ампліфікацію клонованої ДНК; мати здатність до регульованої експресії вбудованого гена під контролем промотора тощо.

Реплікація вектора забезпечується за допомогою специфічної ділянки ДНК, так званого *реплікатора* (або ж оп-послідовності). Молекула ДНК, в межах якої за один акт починається і закінчується реплікація, називається *ретіконом*. Якщо вектор містить послідовності, гомологічні до послідовностей геному клітини, він набуває здатності включатися до складу ДНК клітини, тобто стає *інтегративним*.

Найпридатніші кандидатами на роль векторів — природні реплікони невеликих розмірів: ДНК плазмід, вірусів, в тому числі й фагів, мітохондрій, хлоропластів. Проте ці природні молекули ДНК рідко використовують безпосередньо як вектори. Зазвичай їх попередньо модифікують або комбінують для того, щоб вони відповідали вище названим умовам.

Конкретні властивості векторів визначаються метою клонування генів. У залежності від задач, що стоять перед дослідниками, користуються векторами двох класів: 1) звичайними векторами клонування, за допомогою яких із набору генів виділяють ті потрібні гени, які можна розмножити у достатній кількості для наступного використання; 2) спеціалізованими векторами для отримання клонотек генів і для експресії генів. Тому більшість векторів має спеціалізований характер, тобто їх пристосовують для вирішення вузького кола завдань. Є, наприклад, вектори для ампліфікації (примноження кількості) або секвенування генів, для секреції продуктів клонованих генів, вектори з регульованою й нерегульованою експресією генів, інтегративні й човникові вектори і т. д.

Плазмідні вектори. Окрім головної хромосоми (вона складається з близько 4 млн пар нуклеотидів), бактерії містять велику кількість маленьких кільцевих молекул ДНК, що складаються лише з 1 - 25 т.п.н., що відповідає 1-3 % генома бактеріальної клітини. Такі мініхромосоми, що їх називають *плазмідами*, ідентифіковано як генетичні елементи, не зчеплені з головною хромосомою. Плазмиди можуть нести інформацію, необхідну для кон'югації бактеріальних клітин, ними обумовлений ряд захворювань рослин і тварин. Вони дають змогу клітинам використовувати багато складних сполук як джерел живлення і здатні нести гени стійкості проти різноманітних токсичних агенів, особливо до антибіотиків (продукти цих генів - ферменти, що видозмінюють чи розщеплюють антибіотичні речовини) (Рис. 30).

Плазмиди реплікуються незалежно від бактеріальної хромосоми. Кількість плазмід у клітині може сягати кількох сотень, а у присутності специфічного інгібітора синтезу білків - хлорамфеніколу - $1 - 2 \cdot 10^3$ копій на клітину.

При кон'югації бактеріальних клітин може проходити обмін плазмідами поміж бактеріями, що належать до різних видів і навіть родів, які не здатні обмінюватися генами, що знаходяться у хромосомах. Такий обмін може призводити до переносу генів, входять до складу плазмід, з одного виду до іншого при рості на спільних субстратах і конкуренції. У результаті цього бактерії-реципієнти плазмід набувають здатності виживати за рахунок бактерій-донорів. Ця обставина вказує, що плазмиди здатні до виживання незалежно від долі тих чи інших клітин, у який у даний момент перебувають шіазміди.

Плазм ідам притаманна унікальна здатність включати в себе нові гени, а вже наявні в них гени «перетасовуються» таким чином, що це, з одного боку, не впливає на ефективність реплікації самих плазмід, а з іншого - наділяє клітину додатковою генетичною інформацією, яку вона при потребі використовує.

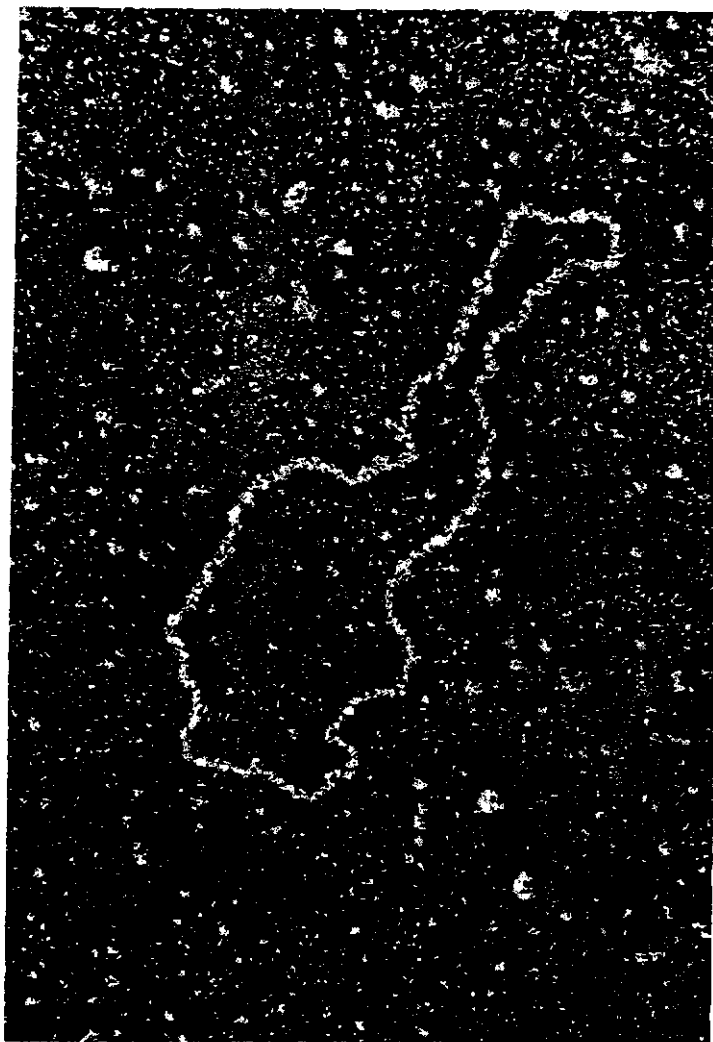


Рис. 30. Електронна мікрофотографія плазмиди pSC101

Бактеріальні плазмиди поділяють на два класи. Одні плазмиди (наприклад, добре вивчений фактор F, що визначає стать у *E.coli*) здатні самі переходити з клітини у клітину, іншим такою здатність не властива. З ряду причин, і перш за все для попередження неконтрольованого розповсюдження потенційно небезпечного генетичного матеріалу, переважна більшість бактеріальних плазмідних векторів створена на базі плазмід другого класу.

Багато природних плазмід, як вказувалося вище, вже містять у своєму складі гени, які визначають стійкість клітин проти певних антибіотиків. Крім того, до складу цих плазмід при конструюванні векторів вводяться додаткові гени, які визначають стійкість проти інших антибіотиків.

Певні плазміди, що отримали назву *episom*, мають здатність зворотно включатися до складу головної хромосоми. Плазміди, здатні включатися у бактерійну хромосому, можуть також передаватися від однієї бактерії до іншої при кон'югації клітин. Деякі плазміди, проте, не здатні включатися у бактерійну хромосому і відповідно не можуть передаватися від клітини до клітини при кон'югації. Їх називають *нетрансмісильними*, і якщо ген опинився у складі такої плазмиди, він не може легко передаватися.

Оскільки плазмідна ДНК значно коротша навіть за сильно фрагментовану хромосомну ДНК, її легко відокремити від останньої й отримати у чистому вигляді. З незрозумілих причин певна бактерійна клітина містить зазвичай плазміди лише одного типу.

Кількість копій плазмиди у клітині залежить від генетичних особливостей і самої плазмиди, й клітини-хазяїна. Так звані плазміди, що перебувають "під послабленим контролем", можуть розмножуватись доти, доки кожна клітина не буде містити в середньому від 10 до 200 копій плазмиди. На відміну від них, плазміди, що перебувають "під суворим контролем", реплікуються приблизно з тією ж швидкістю, що й головна хромосома клітини, і містяться у клітині в одній або декількох копіях. Для робіт з рекомбінантними ДНК використовують плазміди з послабленим контролем.

Для введення плазмід у клітини бактерій використовують механізм трансформації. Оскільки трансформована бактеріальна клітина (наприклад, клітина *Escol*) може містити тільки одну плазмиду певного типу, а для наступного виділення, ідентифікації та застосування послідовностей ДНК, що нас цікавлять, необхідно мати клон з великою кількістю ідентичних клітин, які містять плазміди, то шшзмїда обов'язково повинна мати здатність до реплікації при рості бактеріальної клітини. Для цього потрібно, щоб до складу плазмиди входила ділянка початку реплікації - нуклеотидна послідовність (близько 600 пар основ у разі плазмид *E.coli* типу Col E1), яка спрямовує та регулює процес реплікації таким чином, щоб кожна клітина містила достатню кількість плазмідних молекул (зазвичай близько 30).

Наприкінці 70-х років створили плазмідні вектори серій pMB та pBR, з яких нині найчастіше використовують pMB9 та pBR322.

Вектор pMB9 отримано послідовними вкороченнями плазмиди CoIE1 з доданням рестриктазного фрагменту плазмиди pSCIOI, який містить ген, що відповідає за стійкість проти тетрацикліну. Вектор включає по одному сайту впізнавання трьох рестриктаз - HindIII, Sail та BamHI.

М

У найпопулярнішому раніше векторі pBR322 (Рис. 31) від плазмиди СоіЕІ зберігається тільки здатність до мультикопійності й ампліфікації в присутності хлорамфеніколу. Від плазмиди pSC101 через плазмиду pMB9 йому передано ознака стійкості проти тетрацикліну, а від плазмиди Ridrd через плазмиду RSF2124 - проти ампіциліну.

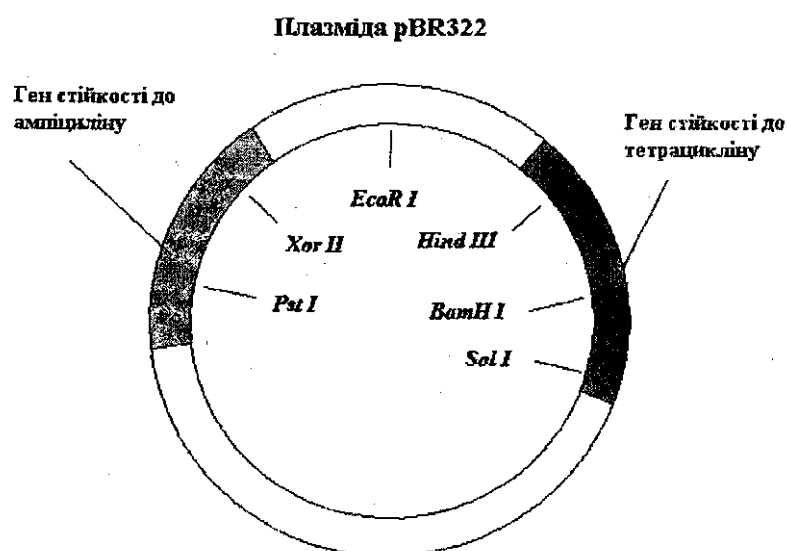


Рис. 31. Генетична карта плазмідного вектору pBR322. В генах стійкості до антибіотиків цієї плазмиди існують унікальні сайти впізнавання для рестриктаз *HincBI*, *SaiI*, *BamHI* та *PstI*. *EcoIII* - сайт розташований поза цими генами. Довжина вектору - 4361 п.н.

Вектор pBR322 містить у собі також ряд поодиноких сайтів рестрикції та ділянку початку реплікації, що забезпечує ампліфікацію плазмиди в клітині. У плазмиді pBR322 і споріднених векторах можуть клонуватися сегменти чужорідної ДНК, які містять до 15 т.п.н. На базі плазмиди pBR322, в свою чергу, сконструйовано багато похідних векторів різноманітного призначення.

У даний час на основі природних векторів сконструйовано вектори, зручніші для користувачів. Найбільшого поширення набули вектори типу pUC та їхні похідні (pBluescript, pGEM), які використовують як для клонування, так і для експресії. Вектори pUC - це невеликі (~ 2,7 т.п.н.) мультикопійні плазмиди, що містять огі-сайт. Щоб полегшити клонування в даному векторі, тут присутня штучно синтезована послідовність

полілінкера, яка являє собою унікальні сайти рестрикції для найчастіше використовуваних рестриктаз. Полілінкер вбудований в ген *lacZ*, який є зручним маркером на наявність у векторі чужорідної ДНК; завдяки цьому легко відбирати тільки ті клони бактерій, які містять рекомбінантну ДНК.

Відомі так звані ВАС-вектори - вектори на основі F-плазмід бактерій. Ємність ВАС-векторів - 100-300 т.п.н. при відносно невеликому власному розмірі (біля 7 т.п.н.).

Загалом шгазмідні вектори у зв'язку з біологічними властивостями можуть включати фрагменти ДНК будь-яких розмірів. Однак рекомбінантні молекули ДНК розміром понад 15 т.п.н. втрачають у клітині стабільність. Внаслідок цього плазмідні вектори використовують для клонування лише невеликих фрагментів ДНК.

Для генно-інженерних завдань найцікавіші *дворепліконні (човникові)* плазмідні гібриди, чиї системи реплікації належать плазмідам з різними хазяями. Вони здатні реплікуватися у різних клітинах (наприклад *E.coli*, з одного боку, і дріжджів та тварин з другого). Човникові вектори для *E. coli* та *B. subtilis* вперше сконструював С. Ерліх у 1978 р., поєднавши через *Hind III*-сайт плазмиду pC194 з векторами pBR313 та pBR322 і отримавши відповідно вектори pHV12 та pHV14. При цьому райони, що відповідають за реплікацію ДНК, залишаються недоторканими. Це дозволяє проводити головні операції з конструювання вектора в бактеріальній клітині (що набагато простіше), а потім отриману рекомбінантну ДНК використовувати для клонування генів у тваринній клітині.

Всі описані плазмідні вектори придатні в основному для роботи з клітинами *E.coli*. Вони універсальні, їх використовують для вирішення найрізноманітніших завдань. Одночасно сконструйовано багато спеціальних векторів, пристосованих тільки, приміром, для клонування промоторів, суперпродукції чужорідних білків, експресії генів тварин у бактеріях тощо.

У ряді випадків перевага віддається використанню *фагових векторів*, оскільки вони мають низку специфічних особливостей.

Фагові вектори здатні включати чужорідні фрагменти ДНК, розмір яких не перевищує строго визначену величину, залежну від місткості голівки фага. Так, максимальний розмір молекули ДНК, яку можна упакувати у голівку фага λ , дорівнює 51 т.п.н., а мінімальний - 36 т.п.н. Тому вводять поняття "максимальної" та "мінімальної" місткості фагових векторів, під якими розуміють відповідно максимальну та мінімальну кількості ДНК, які можна клонувати у векторі.

Рекомбінантні молекули ДНК фагів упаковуються *in vivo* у капсиди і можуть **бути** легко виділені у великих кількостях. Фагові вектори дають змогу клонувати гени, продукти яких токсичні для клітини, оскільки останні не спричиняють шкідливої дії на фаг.

Як фаговий клонуючий вектор широко вивчався бактеріофаг *X*. Перші фатові вектори були сконструйовані А. Рамбахом і П. Тиолле у 1974 р. на основі фага Хріас.

Тоді як у плазмідних векторах зазвичай клонують фрагменти ДНК завдовжки до 10 т.п.н., у фагових векторах (наприклад векторах на основі фага *X*) - до 25 т.п.н. У деякі спеціалізовані фатові вектори можна включити ДНК завдовжки до 45 т.п.н. З цієї причини вектори-бактеріофаги переважно застосовують за потреби клонування бібліотек, що складаються з цілого геному або з дуже великих його фрагментів.

На основі реплікатора бактеріофага і генів резистентності плазмід створені гібридні векторні конструкції, так звані *фазміди*.

Інші гібридні векторні конструкції, що отримали назву *косміди*, містять так звану «w-ділянку геному фагу *X*, яка бере участь в упаковці ДНК до фагової часточки, на кінцевій стадії розвитку, а також гени стійкості до антибіотиків і унікальні, сайти рестрикції від плазмід. Розміри космід невеликі - 4-6 т.п.н., тому в них можна включати клоновані гени завдовжки 35-45 т.п.н. Довжина таких фрагментів ДНК відповідає розмірам генів еукаріотів, тому косміди використовують для клонування саме таких генів. Наприклад, поширена косміда pLFR-5 (приблизно 6 т.п.н.) має два *cos*-сайти фага *X*, розділених сайтом рестрикції для рестриктази *Seal*, полілінкер із шістьма унікальними сайтами рестрикції, сайт початку реплікації ДНК (*ori*) і ген стійкості до тетрацикліну (*Tetr*). Ця косміда може інтегрувати чужорідну ДНК довжиною до 40 т.п.н. Опинившись в бактеріальній клітині, лінійна молекула pLFR-5 зі вставкою замикається в кільце завдяки спарюванню *cos*-сайтів. В такій стабільній конфігурації вона може довгий час існувати в клітині і реплікуватися, як гібридна плазміда, оскільки містить всі необхідні для цього елементи. Більш того, ген стійкості до тетрацикліну забезпечує появу колоній, які несуть дану косміду, на середовищі з цим антибіотиком; нетрансформовані клітини при цьому гинуть. Існують і інші космідні вектори на основі фага *X*.

Використовуючи косміди в одній рекомбінантній молекулі ДНК, можна поєднувати два або більше фрагментів чужорідної ДНК, які не розміщуються поряд у вихідному геномі.

Вектори еукаріотів. Для трансформації дріжджових клітин сконструйовані спеціальні човникові вектори (Рис. 32).

У даному разі вони містять послідовності автономно реплікованих ARS хромосом дріжджів або послідовності дріжджової плазміди, селекціонований для дріжджів ген прототрофності за лейцином, а також реплікатор плазміди і гени стійкості до антибіотиків від плазміди типу pBR. Такі вектори зручні для розмноження плазміди з включеною ДНК у клітинах

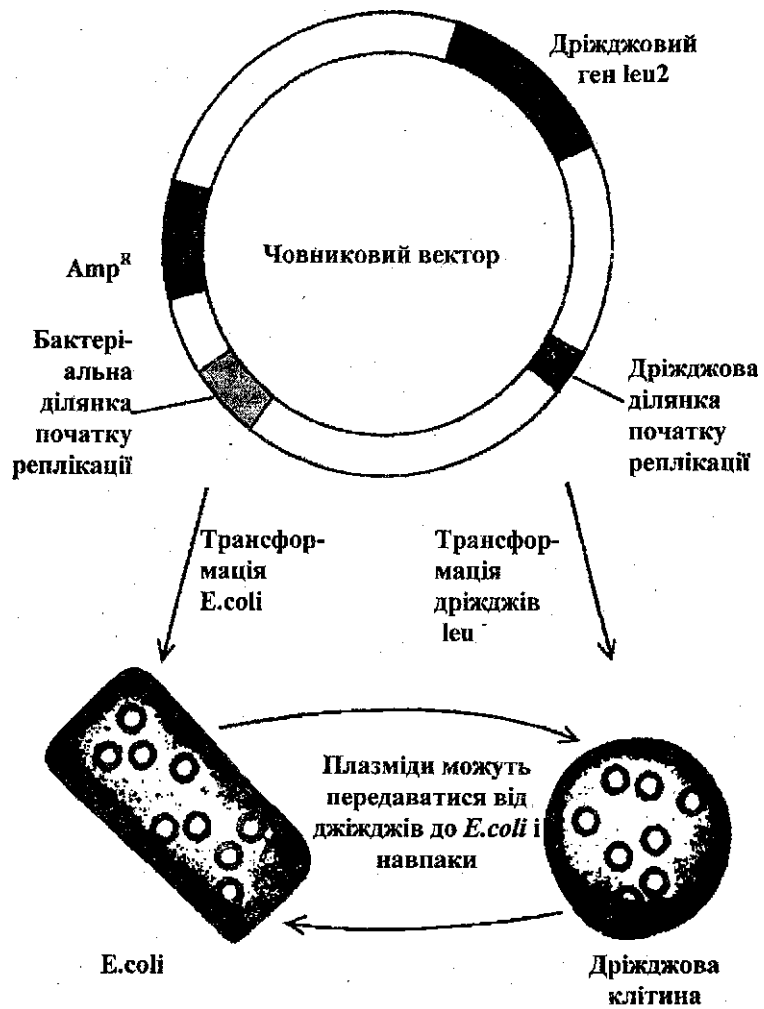


Рис. 32. Човникові вектори. Вони містять як послідовності ДНК, що забезпечують можливість реплікації в *E. coli*, так і послідовності, необхідні для реплікації в дієддждових клітинах. Тому такі плазмідиди можна переносити між цими двома організмами в любому напрямку.

E.coli. За допомогою цього матеріалу у подальшому можна трансформувати дріжджові клітини і отримувати експресію гена. Для дріжджів створені також інтегративні вектори та міні-хромосоми, здатні функціонувати у дріжджових клітинах.

Створені також вектори для трансформування грибів, вищих рослин та тварин. Вектори, які часто використовуються для трансформації рослинних клітин (як правило дводольних), створені на основі плазмиди Ti (від англ. Tumor inducing) бактерії *Agrobacterium tumefaciens*, яка спричиняє утворення специфічних пухлин - корончатих галлів. Крім того використовують вектори на основі ДНК-вмісних вірусів рослин, наприклад вірусу мозаїки кольорової капусти та вектори на основі мобільних елементів, наприклад Ac/Ds.

Ще до розробки методів генної інженерії достатньо глибоко була вивчена молекулярна біологія РНК- та ДНК-вмісних онкогенних вірусів. Було накопичено багато даних щодо їх життєвих циклів, способи проникнення у клітини та виходу з неї; було встановлено, що у залежності від типу заражених клітин онкогенні віруси можуть давати або продуктивну, або інтегративну (латентну) інфекцію. Ось чому саме ці віруси були очевидними кандидатами на роль векторів для введення чужорідної ДНК у клітини тварин.

Дуже суттєво, що вірусна інфекція може бути набагато ефективнішим способом введення ДНК у деякі клітини, ніж інші методи. При вірусній інфекції можна досягти, щоб кожна заражена клітина отримала багато копій чужорідного гена. Наявність сильних промоторів в геномі віруса забезпечує ефективну експресію генів, вбудованих у вірусну ДНК. В результаті утворюється набагато більше продуктів гена (як РНК, так і білка), і вони є більш доступними для подальшого використання.

Частіше всього для введення чужорідних генів в клітини тварин використовують вірус SV-40. Його геном являє собою ковалентно замкнену кільцеву ДНК, яка складається приблизно з 5200 п.н.; його можна умовно розділити на «ранню» та «пізню» області. Рання область експресується на протязі всього ліричного циклу, у той час коли експресія пізніх генів починається тільки після ініціації реплікації вірусної ДНК. Між ранньою та пізньою зонами генома знаходиться ділянка ДНК, на якій розміщена точка початку реплікації. Продукти генів ранньої області відповідальні, з одного боку, за ініціацію реплікації вірусної ДНК в пермісивних клітинах, а, з іншого боку, за злоякісну трансформацію непермісивних клітин (тобто клітин, в яких вірус не може завершити цикл репродукції). Пізня область геному кодує вірусні структурні білки, які створюють білковий капсид вірусних часток.

Для створення векторних систем на основі SV-40 були використані два підходи. Перший полягає в отриманні рекомбінантів між ДНК SV-40 та

фрагментами гетерологічної ДНК, після чого гібридні молекули вводять у пермісивні клітини, які потім продукують нормальні віріони, що включають в себе рекомбінантну ДНК. При іншому підході сконструйовані рекомбінанти між ДНК SV-40 та чужорідною ДНК не упаковуються у віріони. Рекомбінантна ДНК при цьому або решікується на протязі деякого часу як плазміда незалежно від клітинної ДНК, або вбудовується в хромосому.

Загалом, згідно обох вищезгаданих підходів, для того, щоб отримати вірусні частки SV-40, до складу яких входить рекомбінантна ДНК, ранню чи пізню область геному вірусу замінюють на фрагмент гетерологічної ДНК. Однак при цьому отримані рекомбінантні молекули не можуть індукувати синтез білків, необхідних для репродукції вірусу, якщо заміщена рання область, або капсидних білків, якщо вставка знаходиться на місці пізньої області. Тому, щоб отримати вірусні частки з рекомбінантною ДНК, недостаючі функції зазвичай поповнюють шляхом комплементції, заражуючи клітини додатково нормальним вірусом-помічником.

Доволі перспективним для створення векторів на даний час вважається використання РНК-вмісних ретровірусів. В основі конструювання таких векторів є лежать три важливих принципи. По-перше, вектори повинні зберігати послідовності вірусного геному, необхідні для реплікації та експресії генів, а також упаковки геному. По-друге чужорідні сегменти ДНК повинні вбудовуватися до кодуючих областей геному або частково замінювати їх. По-третє, ретровірусні вектори, як правило, призначені для використання у якості трансдукуючих векторів з упаковкою рекомбінантного геному у віріон. Самі ж ретровіруси являють собою природні трансдукуючі віруси - вони рекомбінують з клітинними геномами і трансдукують клітинні гени в інфіковані клітини у якості частини провірусу. ДНК-форма геномів багатьох ретровірусів була клонована в системах *E.coli* і тому є доступною для подальших маніпуляцій. Ці геноми вбудовують в рекомбінантні вектори *in vitro* і отримані форми клонують і реплікують в *E.coli*. Такі конструкції трансфікуються безпосередньо у відповідні клітини тварин.

У клітини тварин гени вносять також за допомогою векторів, сконструйованих на основі деяких інших вірусів тварин. Так на основі вірусу вісповакцини сконструйовано вектор, до якого включені гени грипу, гепатиту В, кору, малярії для індукування імунітету проти цих вірусів, а на основі папіломавірусу великої рогатої худоби - чисельні човникові вектори.

Останнім часом велика увага приділяється створенню векторів на базі штучних хромосом ссавців. Завдяки наявності основних структурних елементів звичайних хромосом, такі міні-хромосоми тривалий час утримуються в клітині, і здатні нести повнорозмірні гени та їхні природні регуляторні елементи, необхідні для правильної роботи гена в потрібній тканині і у необхідний час.

3.3.3. Операції на ДНК та РНК

Отримання рекомбінантних ДНК. Згідно визначення національних інститутів здоров'я США «рекомбінантними ДНК називають молекули ДНК, отримані поза живою клітиною шляхом з'єднання природних або штучних фрагментів ДНК з молекулами, що здатні реплікуватись в клітині». Маючи у розпорядженні всі необхідні елементи для конструювання рекомбінантних ДНК - гени, що нас цікавлять, відповідні вектори та ферменти, можна переходити до вирішення завдання створення рекомбінантної ДНК. Операції на ДНК *in vitro* охоплюють її виділення з клітини і фрагментацію, очищення окремих фрагментів або їх синтез, модифікацію або ж спрямоване мутування ізольованих генів, формування заданого фрагмента ДНК кінців потрібної будови і його поєднання з вектором. Всі ці операції контролюють методом електрофорезу в гелі або ж секвенуванням відповідних ділянок ДНК. Секвенування особливо важливе, коли треба досягти експресії генів, оскільки останні мають розміщуватись на певній відстані від промоторів і сайтів зв'язування рибосом.

Отримані у той чи інший з названих раніше способів гени далі ампліфікують у відповідних векторах. У свою чергу, спосіб отримання фрагментів ДНК з різними кінцями визначає вибір методу їх приєднання до векторних молекул.

Залежно від мети дослідів і лабораторних можливостей фрагменти ДНК перед клонуванням або фракціонують, або не фракціонують. Клонування нефракціонованої ДНК називають *шот-ган* експериментом (з англ. shot-gun - дробовик) - або ж *тотальним* (валовим) клонуванням.

Для приєднання клонованої ДНК до вектора при наявності липких кінців застосовують ДНК-лігази. Якщо при цьому векторні молекули та донорна ДНК оброблені однією рестриктазою або їх ізошизомерами, рекомбінантні молекули ДНК утворюються в результаті комплементарних взаємодій кінцевих ділянок з наступною дією лігази. За потреби клонований фрагмент вирізають з рекомбінантної молекули за допомогою тієї ж рестриктази. Проте при цьому можлива циркуляція молекул внаслідок об'єднання власних кінців, що знижує вихід рекомбінантних молекул ДНК. Для попередження такого явища лінійні векторні молекули попередньо обробляють лужною фосфатазою *KcoII*, після чого їх кінці не замикаються один на одний через відсутність у них фосфатних груп. Водночас клонований фрагмент вбудовується у векторну молекулу завдяки наявності у нього на кінцях фосфатних груп.

За наявності тупих кінців, наприклад при роботі з фрагментами дволанцюгової ДНК, до її 3'-кінців за допомогою кінцевої дезоксинуклеотидил-трансферази добудовують гомополімерні олігонуклеотидні кінці -

<Mro(dA⁵⁰-80) або оліго(<1Сп.і⁸) і, проводячи далі електрофорез, відбирають найтипівіші зразки. Подібним чином підготовлюють і вектор (наприклад плазмиду рВR322). Таку плазмиду розрізають за унікальним сайтом розщеплення рестриктазою PstI, добудовують до 3'-кінців отриманої лінійної форми плазмиди гомополімерні олігодезоксинуклеотидні послідовності, комплементарні 3'-кінцям гена. Молекули гена і вектора змішують і "відпалюють", тобто створюють умови, при яких ген і вектор поєднуються один з одним за допомогою комплементарних зв'язків між липкими кінцями.

Фрагменти ДНК з тупими кінцями поєднують також за допомогою ДНК-лігази фага Т4. Концентрації ДНК і ферменту при цьому мають бути на порядок вищими, ніж при об'єднанні липких кінців.

У разі потреби ступінчасті кінці фрагментів ДНК можна зробити прямими ферментативною дією. Для цього виступаючий 5'-кінець роблять дволанцюговим за допомогою ДНК-полімерази І, а виступаючий 3'-кінець гідролізують дією нуклеази S1.

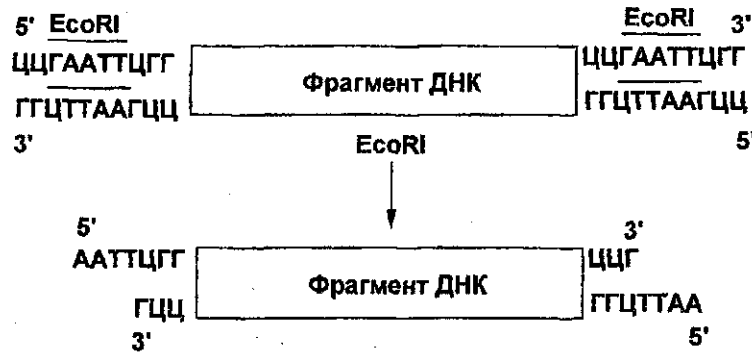
Фрагменти ДНК з липкими і тупими кінцями вбудовують у відповідні сайти векторів у будь-якій орієнтації, що є непридатним для багатьох експериментів, зокрема дослідів з експреси клонованих генів. Коли клонування потрібно проводити орієнтовано, вектор і фрагмент ДНК обробляють двома рестриктазами, які утворюють різні липкі кінці. Це забезпечує певне розміщення фрагмента в рекомбінантній молекулі ДНК. Проте у цьому разі можуть утворюватися мультимерні форми клонованих генів. Щоб запобігти цьому явищу, концентрацію векторних молекул у середовищі для лігування збільшують таким чином, щоб вона перевищувала концентрацію фрагментів ДНК втричі.

Для поєднання фрагментів ДНК також використовують синтетичні лінкери та адаптори. *Лінкерами* називають одноланцюгові олігонуклеотиди з такими послідовностями їх ланок, які після "відпалювання" можуть утворювати дуплекси, що містять сайти рестрикції й мають тупі кінці:



Сайтів рестрикції у лінкері може бути кілька. Лінкери з певним сайтом рестрикції використовують для приєднання фрагментів ДНК з тупими кінцями до липких кінців вектора. Для цього лінкери у вигляді дуплексів спочатку "іфішивають" з двох боків до фрагментів ДНК за допомогою

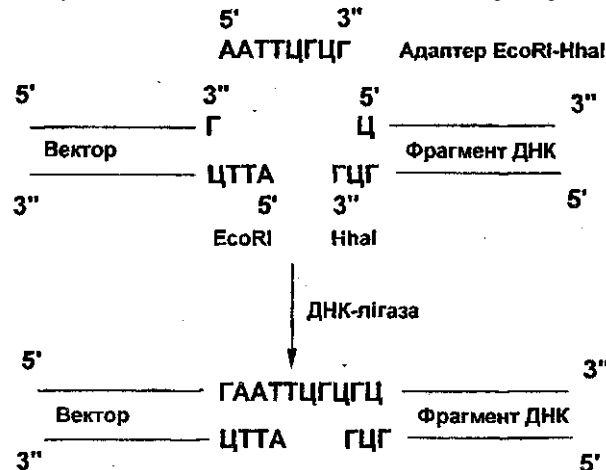
ДНК-лігази фага Т4, потім обробляють рестриктазою. Далі фрагменти і вектори поєднують через утворені липкі кінці:



Проте цей спосіб, природно, не підходить у разі, якщо клонований фрагмент містить сайт впізнавання для тієї самої рестриктази.

Адаптори називають одно- або дволанцюгові олігонуклеотиди, призначені для поєднання молекул з несумісними кінцями. Їх застосовують, коли виступаючі кінці векторних і ююнованих молекул утворені різними рестриктазами, а також коли у клонованих фрагментах ДНК є сайти використаних рестриктаз.

Одноланцюгові адаптори використовують для поєднання молекул з 5'- і 3'-виступаючими кінцями. Приміром, кінці, утворені рестриктазами EcoRI і NhaI, зістиковують за допомогою EcoRI-NhaI-адаптора: пробіли, або



прогалини, що виникають при цьому у дволанцюговій структурі заповнюються нуклеотидами, як правило, *in vivo* після трансформації.

У готовому вигляді існують лише одноланцюгові адаптори та лінкери. Дволанцюгові адаптори за потреби отримують комбінацією двох одноланцюгових адапторів, двох лінкерів або ж адаптера і лінкера.

Існує також так званий *коннекторний* метод, який дає змогу об'єднувати будь-які дволанцюгові фрагменти ДНК ферментативним нарощуванням на їх кінцях одноланцюгових комплементарних ділянок. Він полягає у тому, що фрагменти ДНК з тупими або виступящими кінцями (одним з них є векторна молекула в лінійній формі) обробляють екзонуклеазою фага *X* для заголення 3'-кінців. Це полегшує перебіг наступної реакції, коли термінальна дезоксирибонуклеотидилтрансфераза нарощує на 3'-кінцях фрагментів одноланцюгові гомополімерні ділянки з 10-30 нуклеотидів. Якщо ці ділянки у різних фрагментів складаються з комплементарних нуклеотидів, фрагменти можуть поєднуватися з їх допомогою. Завершують об'єднання ДНК-полімераза I, екзонуклеаза III і ДНК-лігаза, в результаті чого утворюються рекомбінантні молекули ДНК, якими можна трансформувати реципієнтні клітини.

Локалізований мутагенез. Локалізований, або ж спрямований мутагенез дає змогу отримувати мутації у певному гені. Розрізняють два види локалізованого мутагенезу - *сайт-специфічний* та *сегмент-специфічний*. Перший зводиться до введення певної мутації в заданий сайт ДНК. Під час здійснення мутагенезу другого типу мутації вводять у ділянку ДНК обмеженої довжини, а розподіляються вони випадковим чином.

Завдання з сайт-спрямованого мутагенезу ставлять тільки у разі, коли відома будова відповідної ділянки ДНК. Воно вирішується синтезом олігонуклеотиду з заданою зміною і подальшою інтеграцією його у геном. Цей метод розроблений Д. Хатчисоном зі співавторами у 1978 р.

Сегмент-специфічний мутагенез здійснюється, як правило, на одноланцюгових ділянках ДНК (прогалинах). Для їх утворення у задані ділянки вводять одноланцюгові розриви (ніки) і діють на них ДНК-полімеразою I. Далі заповнюють прогалину одним із двох способів: за допомогою полімерази, додаючи у реакційну суміш замість одного з нуклеотидів його аналог (після кількох раундів реплікації це призводить до появи мутацій у даній області), або обробкою ДНК бісульфітом натрію, який дезамінує цитидинові залишки у прогалинах, що перетворює їх на уридинові (мутація фіксується заповненням прогалини за допомогою ДНК-полімерази).

Такі методи локалізованого мутагенезу досить ефективні, але доволі складні й тому не завжди доступні. На практиці найчастіше спочатку проводять неспецифічний мутагенез *in vitro* рекомбінантних молекул ДНК, а потім переносять клонований фрагмент у непошкоджений вектор і після

трансформації клітин відшуковують потрібні мутанти. Слід відзначити і методи утворення невеликих делецій *in vitro*. Один з них зводиться до вилучення з фрагмента ДНК ділянки, розташованої між двома сайтами рестрикції, послідовною дією рестриктази і лігази. Другий метод полягає у вилученні липких кінців рестриктів нуклеазою S1. В результаті після з'єднання рестриктів у молекулі ДНК з'являється мікроделеція. Для збільшення її розміру кінці рестриктів додатково обробляють відповідними екзонуклеазами.

Отримання рекомбінантних РНК. Рекомбінантні РНК як правило отримують методами ферментативного або хімічного літування РНК. Крім того, недавно з'явилася принципово нова можливість вбудовування сегменту РНК в задане положення двох молекул РНК за допомогою *рибозимів*. Рибозими - молекули РНК, які мають ферментативну активність (як правило, якості автокаталізу).

Ковалентне зшивання окремих сегментів РНК при отриманні рекомбінантних молекул, як правило, здійснюють за допомогою лігази бактеріофага Т4. Цей фермент зшиває один з одним одноланцюгові оліго- і полінуклеотиди; для його роботи необхідна АТФ. Акцептором в реакції літування слугує повністю дефосфорильований, а донором - повністю фосфорильований по кінцевих нуклеотидних залишках олігонуклеотид. Це попереджує можливість зшивання однотипних олігонуклеотидів.

Ефективність ферментативного літування достатньо довгих полірибонуклеотидів сильно варіює і її важко передбачити виходячи лише з нуклеотидної послідовності сегментів РНК. Найкращі результати отримують у тих випадках, коли кінці полірибонуклеотидів, що зшиваються, були просторово зближені за рахунок комплементарного зв'язування сусідніх з ним ділянок РНК.

Метод хімічного літування заснований на активації кінцевої фосфатної групи одного з двох сегментів РНК, що зшиваються, водорозчинним карбодіїмідом або BrCN. У випадку BrCN реакція протікає дуже швидко і не супроводжується модифікацією нуклеотидних залишків, хоча під дією карбодіїмідів фосфодієфірний зв'язок утворюється з більш високим виходом. Для того, щоб забезпечити зближення кінцевих нуклеотидних залишків у фрагментах РНК, що зшиваються, було запропоновано використовувати олігодезоксирибонуклеотиди, комплементарні обом фрагментам у місці їх стику.

Хімічне лігування, як правило, проходить з суттєво меншим виходом, ніж ферментативне. Однак воно дозволяє отримувати рекомбінантні РНК з незвичайними типами міжнуклеотидного зв'язку і незвичайними нуклеотидними залишками у місці стику двох фрагментів.

Отримання рекомбінантних РНК за допомогою *рибозимів* засноване на зворотності реакції самосплайсингу (самодовільного розщеплення про-

мРНК на інтрони та екзони). Це надає можливість для вбудовування інтронної РНК в задану ділянку іншого сегменту. Фрагмент РНК, у який відбувається вбудовування, повинен містити нуклеотидну послідовність, ідентичну нуклеотидній послідовності 3'-кінцевої ділянки 5'-екзонного району 26S РНК і відповідно комплементарну тій нуклеотидній послідовності в інтроні, яка відповідає за специфічність прямої реакції. Фрагмент, до якого відбувається вбудовування, береться у надлишку.

3.3.4. Внесення генетичного матеріалу до клітин - реципієнтів

Будь-яка система клонування має містити два взаємопов'язані компоненти - вектор і реципієнтні клітини. У генно-інженерних експериментах реципієнтні клітини відіграють подвійну роль. На першому етапі після маніпуляцій з молекулами ДНК *in vitro* вони слугують для виділення із суміші рекомбінантних молекул потрібного типу. Потім їх використовують для ампліфікації клонованих генів, отримання продукту тощо.

Плазмідні вектори вводять у реципієнтні клітини методом трансформації. Ефективність трансформації бактерій залежить від їх здатності пропускати ДНК крізь клітинну стінку. Для деяких видів бактерій, наприклад *Bacillus subtilis*, *Diplococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, трансформація природна. Але такі клітини, як *E.coli*, гідролізують лінійну трансформуючу ДНК. Тому їх трансформація відбувається тільки у окремих штамів, де порушена система деградації ДНК.

Придатним для трансформації клітин *E.coli* виявився метод, що ґрунтується на здатності Х ДНК проходити у ці бактерії після обробки їх на холоді хлористим кальцієм. Це явище було відкрито М. Манделем та А. Хіга у 1970 р. Метод виявився придатним і для трансформації клітин *E.coli* плазмідами. Так, ефективність трансформації клітин *E. coli* плазмідною рBR322 за цим методом досягає 10^8 трансформантів на 1 мкг ДНК. Універсальним методом підготовки бактеріальних клітин до трансформації є обробка їх поліетиленгліколем. При цьому кількість трансформантів досягає 10^7 на 1 мкг плазмиди рBR322.

Клітини бактерій, що втратили свою стінку частково (сферопласти) або повністю (протопласти), але зберегли цитоплазматичну мембрану, також можна використовувати для трансформації. Проте на грамнегативні бактерії цей метод не поширився через складність будови їх клітинної стінки.

Як реципієнтні клітини здебільшого використовують штами, мутантні за системою рестрикції, попереджаючи тим самим розщеплення трансформуючої ДНК в дії рестриктази EcoR I.

Якщо під час клонування генів треба дотримуватися заходів безпеки, використовують спеціальний штам *E.coli* з множинними мутаціями. Вони утворюють міні-клітини (клітини, що не містять ДНК) і життєздатні лише в лабораторних умовах, оскільки розмножуються тільки на штучних субстратах. У природних екосистемах вони гинуть.

Щодо *B.subtilis*, то її компетентні клітини легко трансформуються гомологічною бактеріальною ДНК (при цьому майже кожний поглинений фрагмент ДНК інтегрується в хромосому), тоді як ефективність трансформації їх плазмідної ДНК низька (10^{-8} - 10^{-3} на одну поглинену плазмідну ДНК).

Як реципієнти можна використовувати протопласти грампозитивних бактерій, оскільки у них ефективно регенерується клітинна стінка завдяки відносній простоті її будови. Трансформацію протопластів *B.subtilis* готазмідною ДНК вперше здійснили А. Чанг і С. Коен у 1979 р. Як виявилось, протопласти *B.subtilis* ефективно трансформуються плазмідною ДНК будь-якої форми, включаючи й мономерні молекули. Це вказує на відмінність механізмів проникнення ДНК у клітину при трансформації бактерій та їх протопластів.

Щодо клітин *Pseudomonas*, то їх, так саме як і клітини *E.coli*, трансформують після обробки на холоді хлористим кальцієм. Однак ефективність їх трансформації на порядок нижча за *E.coli*.

Клітини *Streptomyces* трансформують на протопластах. Ефективність цього процесу підвищується у присутності поліетиленгліколю.

Фагові вектори і створені на їх основі рекомбінантні ДНК вводять у клітини *E.coli* трансформацією, що у даному разі називається *трансфекцією*, а також інфікуванням реципієнтних клітин реконструйованими *in vitro* фагами, що містять рекомбінантну ДНК.

Генетичні маркери селекції відіграють важливу роль у проведенні генно-інженерних робіт. Так, якщо, приміром, у плазміді включити гени стійкості до антибіотика, то швидка позитивна селекція клітин із плазмідами, не викличе труднощів. Для цього достатньо виростити клітини на середовищі з антибіотиком у такій концентрації, що призведе до загибелі усіх клітин, які не містять плазмід, і водночас забезпечить ріст клітин, які містять плазмід і відповідно ген стійкості до антибіотика. Інший загальний підхід до селекції полягає у використанні мутантної клітини-хазяїна, в якій відсутній фермент, потрібний для росту в певному середовищі, і в одночасному введенні відповідного цьому ферменту нормального гена в рекомбінантну плазмід. В цьому разі експресія гена плазміді компенсує генетичний дефект клітини-хазяїна.

Другий, досить розповсюджений приклад маркеру селекції пов'язаний з наявністю у векторній ДНК, поряд з генами, що надають клітині стійкість

до антибіотиків, фрагменту лактозного оперону, який забезпечує утворення в клітинах-реципієнтах активного ферменту β -галактозидази. Колонії клітин з такою ознакою легко виявляти при вирощуванні їх на твердому агарі, який містить у якості субстрату β -галактозидази 5-бром-4-хлор-3-індоліл- β -галактозид (X-gal), оскільки його розщеплення приводить до утворення бромхлоріндолу - барвника блакитного кольору. Якщо ж в ген β -галактозидази цього вектору вбудована чужорідна ДНК таким чином, що цей ген виявився порушеним, то трансформовані їм клітини утворюватимуть безбарвні колонії. Сама ж присутність рекомбінантного вектора в клітинах може бути зафіксована за їх стійкості до антибіотика.

У технології рекомбінантних ДНК маркери селекції в плазмідах можуть виконувати дві різні функції. По-перше, методи позитивної селекції, що дають змогу швидко ідентифікувати колонії, які містять вектор, суттєво інтенсифікують лабораторні дослідження. По-друге, у процесі подальшого вирощування клітин, що містять плазмиду тиск відбору (зумовлений, скажімо, введенням у живильне середовище антибіотика) зводить до мінімуму конкуренцію з боку будь-яких клітин, що не містять плазмиду, які можуть виникати в ході росту популяції.

3.4. Банки генів. Пошук клонів з рекомбінантними молекулами ДНК

Кінцевою метою генно-інженерних операцій на ДНК *in vitro* є конструювання рекомбінантних ДНК заданої структури або створення колекції гібридних векторів за допомогою вбудовування у певний вектор набору фрагментів ДНК. У першому випадку ідентифікація і характеристика генів здійснюється до їх вбудовування у вектор, а в другому - після цього/Колекцію гібридних векторів створюють тоді, коли призначений для клонування ген не вдалося виділити у чистому вигляді. При цьому здійснюють тотальне клонування, використовуючи для вбудовування суміш фрагментів, збагачену або незбагачену потрібним геном. Далі у той чи інший спосіб відшуковують клон з потрібним геном. Крім того, іноді постає завдання з клонування набору фрагментів ДНК, які являють собою по можливості весь геном певного організму. В цьому разі ідеться про створення банку або бібліотеки генів.

3.4.1. Банки генів

Банки генів являють собою сукупність індивідуальних генів організму у вигляді фрагментів ДНК, клонованих у векторах. Банки генів є джерелом матеріалу для вивчення регуляції, структури і функціонування генів та

білків організму. За їх допомогою також можна вирішувати проблему збереження генофонду видів, що зникають.

Індивідуальні гени утворюють лише незначну частину банку і відшукувати їх досить важко. Для цього застосовують метод гібридизації колоній або імунологічні методи.

Головною проблемою, що виникає під час створення банку генів, є проблема забезпечення їх повноти. Вона визначається вірогідністю зустрічальності (p) відшукуваного гена у колекції, що складається з n клонів:

$$p = 1 - \left(1 - \frac{m}{M}\right)^n,$$

де M та m – середня молекулярна маса відповідно генома та фрагмента.

Звичайно на практиці задають конкретну вірогідність (0,90, 0,95 або 0,99) і, знаючи M та m , визначають n :

$$n = \frac{\ln(1-p)}{\ln\left(1 - \frac{m}{M}\right)},$$

Так встановлюється число клонів з рекомбінантною ДНК, яке потрібно відібрати для забезпечення заданої вірогідності. При $\frac{m}{M} \ll 1$, що характерно практично для всіх геномів (крім вірусних),

$$n = \frac{m}{M} \ln(1-p),$$

До банків генів умовно належать така колекція клонів, у якій індивідуальні гени представлені з вірогідністю не менше 95%.

Очевидно, що зменшення величини m приводить до пропорційного збільшення n . Тому, створюючи банк генів намагаються клонувати якомога більші фрагменти ДНК. Однак внаслідок обмеженої місткості векторів середній розмір фрагментів становить 10^7 Да.

При створенні банку генів ДНК фрагментують переважно гідродинамічним методом. Він забезпечує статистично рівномірний розподіл точок розривів по молекулах ДНК і дає змогу регулювати середній розмір фрагментів. Проте використовуючи цей метод треба вибирати вихідні препарати ДНК, розміри яких значно перевищують 10^7 Да (30 - 40^7 Да). Цього досягають застосуванням лише певних способів виділення ДНК з клітин.

Перший банк генів був створений для клітин *E.coli* Л. Кларком та Дж. Карбоном у 1976 р. Як вектор при цьому використовували плазмиду CoIE1, яку фрагментували гідродинамічним способом. При цьому повнота отриманого банку становила 80%.

3.4.2. Ідентифікація клонованих ДНК

Утворення кільцевої плазмиди із вбудованим геном зовсім не є кількісною процедурою. Частина лінійних молекул може взагалі не утворити ніяких кільцевих структур, інша частина - утворити структури без вбудування додаткового гена; можуть також утворитися комплекси двох або більшої кількості плазмідних ДНК тощо. Тому необхідним є відбір плазмід, що містять додатковий ген. Цей відбір проводиться в ході процедури, відомої під назвою *клонування*.

Сутність клонування полягає в тому, що із кожної бактеріальної клітини вирощують популяцію клітин, яка є клоном. На відміну від початкової популяції, кожен клон є гомогенним, тобто або всі його клітини містять плазмиду з вбудованим геном, або не містять його взагалі. Тому після отримання клонів бактерій, що містять гібридні плазмиди, постає завдання відбору тих із них, що містять потрібний ген (скринінг) (Рис. 33).

Припустимо, що рекомбінантні плазмиди вдалося включити в популяцію клітин *E.coli* і що клітини, які містять плазмиди, вдалося виявити у селективному середовищі. Розглянемо методи скринінгу отриманих таким чином клонів і детального вивчення інсерцій (вставок) ДНК з клонів, що нас цікавлять.

Передовсім потрібно відрізнити клони, які містять плазмиди з інсерціями чужорідної ДНК, від клонів, до складу яких входять тільки вихідні плазмиди. Цього можна досягти за допомогою *інсерційної активації* у процесі клонування. Припустимо, наприклад, що фрагменти ДНК включені в сайт плазмиди pBR322, який розщеплюється рестриктазою PstI. Оскільки інсерція в цьому положенні розриває ген стійкості до ампіциліну, то клітини, що містять рекомбінантні плазмиди, будуть чутливими до ампіциліну і водночас стійкими до тетрацикліну. І навпаки, клітини з плазмідами без інсерції будуть стійкими і до ампіциліну, і до тетрацикліну.

У цьому разі клони, які містять рекомбінантні плазмиди, можна виявити так. Спочатку клітини вирощують на агарових пластинах в присутності тетрацикліну і позбавляються від суттєвого фону клітин, які не містять плазмиди. Потім застосовують метод реплік (відбитків): повстану або оксамитову подушечку або нітроцелюлозний фільтрувальний папір притискають спочатку до вихідної матричної пластинки, а потім до іншої пластинки (репліки), отримуючи на ній точну копію розподілу колоній на

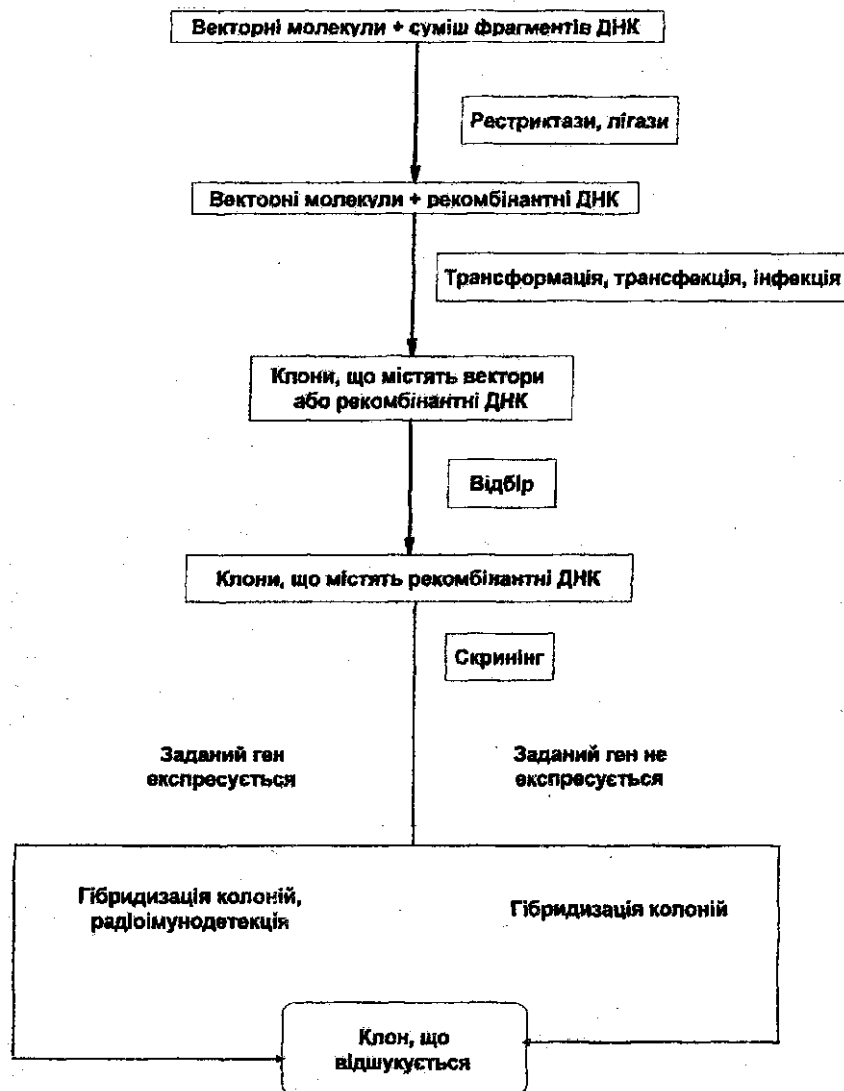


Рис. 33. Створення і пошук клонів, що містять рекомбінантні молекули ДНК із заданим геном

матричній пластинці. Якщо репліка оброблена ампіциліном, то колонії клітин, що містять плазмід з інсерціями в гені стійкості до ампіциліну, ростуть на матричній пластині, але не ростуть після передрукування.

Пошук клонів, що містять рекомбінантні молекули ДНК з заданим геном, утруднюється тим, що здебільшого для клонування використовують нефракціоновану (як при створенні банку генів) або слабо фракціоновану суміш фрагментів ДНК, де потрібний фрагмент становить незначну частку.

Якщо клонований ген беруть з організму, спорідненого реципієнтним клітинам, його експресія очікується. У цьому разі, якщо ген селективний і його ознака має домінуючий характер, клони з рекомбінантними молекулами ДНК відбирають безпосередньо у селективних умовах, як описано вище. Якщо ж виділяють сумарну ДНК з якоїсь тканини людини, розщеплюють її на фрагменти підхожою рестриктазою, вбудовують їх у плазмідний вектор і вводять отриману рекомбінантну ДНК у популяцію бактерій, то отримують бібліотеку генів людини. По суті, проте, це буде бібліотека без каталогу, і дослідник опиняється перед проблемою виділення бактерії, яка містить ген, що його цікавить з мільйонів інших. Для вирішення цієї проблеми нині застосовують ДНК- або РНК-зонди - радіоактивно мічену ДНК-, РНК, або їх фрагменти, комплементарні нуклеотидній послідовності того гена, який потрібно виділити. Це можуть бути спеціально синтезовані олігонуклеотиди довжиною у 15-20 залишків, послідовність яких вибрана на основі повністю або частково відомої первинної структури гену або закодованого у ньому білка. Це можуть бути також кДНК, синтезовані на індивідуальних РНК-копіях даного гену (як такі, або у вигляді відклованих, тобто суттєво збільшених у кількості фрагментів ДНК). Нарешті, це можуть бути самі індивідуальні РНК, закодовані у даному гені. У всіх випадках такі зонди повинні нести радіоактивну мітку (зазвичай ^{32}P) з достатньо високою питомою активністю.

За наявності вказаних ДНК- або РНК можна провести скринінг бібліотеки генів і знайти бактерію, що містить ДНК, комплементарну даному зонду. На наступних етапах генноінженерних дослідів кількість цієї ДНК збільшують до такого ступеню, за якого можна детектувати потрібний клон. Вибір методу при цьому залежить від очікуваного результату.

Якщо бактерії трансфікують плазмідами, які містять кДНК, отримані зі змішаної популяції мРНК (що на практиці завжди і відбувається, оскільки гомогенну мРНК одержати досить важко), то такі кДНК теж будуть являти собою суміш різних молекул. В цьому разі завдяки певному методичному прийому кожна бактерійна клітина отримує тільки одну рекомбінантну плазмиду, яка містить певну кДНК. У результаті ця клітина і всі її нащадки міститимуть тільки один вид кДНК. Проблема тепер полягає у тому, щоб розпізнати, яку саме кДНК містить кожна клітина.

Для цього відбирають одиничні колонії бактерій і вирощують з них великі гомогенні культури. З таких генетично однорідних клональних популяцій клітин виділяють плазмиди, що містять кДНК, і піддають їх денатурації (при цьому ланцюги ДНК розходяться). Денатуровану ДНК далі іммобілізують на нітроцелюлозних фільтрах. Коли через такі фільтри пропускають суміш мРНК, на фільтрах затримуються тільки молекули, комплементарні даній гомогенній кДНК. Потім зв'язану мРНК елюють з фільтра і вносять до безклітинної системи трансляції. Синтезований внаслідок цього білок, специфічний для даної кДНК, часто вдається ідентифікувати. Тоді у дослідників з'являється чиста кДНК, що служить зондом для пошуку індивідуального гена і відповідної мРНК.

Коли кДНК-зонд для даного білка (і гена) отриманий, його можна застосовувати з використанням методу гібридизації на нітроцелюлозних фільтрах для швидкого скринінгу великої кількості бактерійних колоній, з метою визначення вмісту інших рекомбінантних плазмід, які несуть такий самий або близькоспоріднений ген. За допомогою згаданих прийомів було отримано багато кДНК-зондів для різних білків.

За наявності як зонду підхожої мРНК або кДНК структуру індивідуальних генів еукаріотів можна попередньо досліджувати без клонування у бактеріях, використовуючи метод, розроблений англійським вченим Е. Саузерном (Нобелівська премія 1975 р.) (Рис. 34).

У рамках цього методу - "блотінга за Саузерном" високомолекулярну ДНК розщеплюють однією або кількома рестриктазами, і отримані фрагменти розділяють за розміром електрофорезом в агарозному гелі. Потім гель розміщують на аркуші нітроцелюлози і пропускають крізь нього відповідний буферний розчин у напрямку, перпендикулярному напрямкові електрофорезу. При цьому фрагменти ДНК елюються з гелю і зв'язуються з нітроцелюлозним фільтром, на якому в результаті з'являється репліка геля. Потім гібридизують ДНК на цьому фільтрі з міченим зондом, специфічним до досліджуваного гена. Як такий зонд використовують очищену РНК, кДНК, отриману при зворотній транскрипції цієї РНК, або фрагмент ДНК, клонований у *E. coli*. Мічений зонд гібридується зі специфічним фрагментом (або фрагментами), що містить комплементарні йому послідовності. Після радіоавтографії нітроцелюлозного фільтра виявляється чіткий набір смуг, що відповідає фрагменту або фрагментам ДНК, які містять досліджуваний ген.

Блотінг за Саузерном, розроблений незалежно від технології рекомбінантної ДНК, виявився винятково корисним методом аналізу геному еукаріотів. У поєднанні з технікою клонування він дає змогу, по-перше, встановити наявність чи відсутність у даному гені сайтів розщеплення тієї чи іншої рестриктази і визначити їх кількість, й, по-друге,

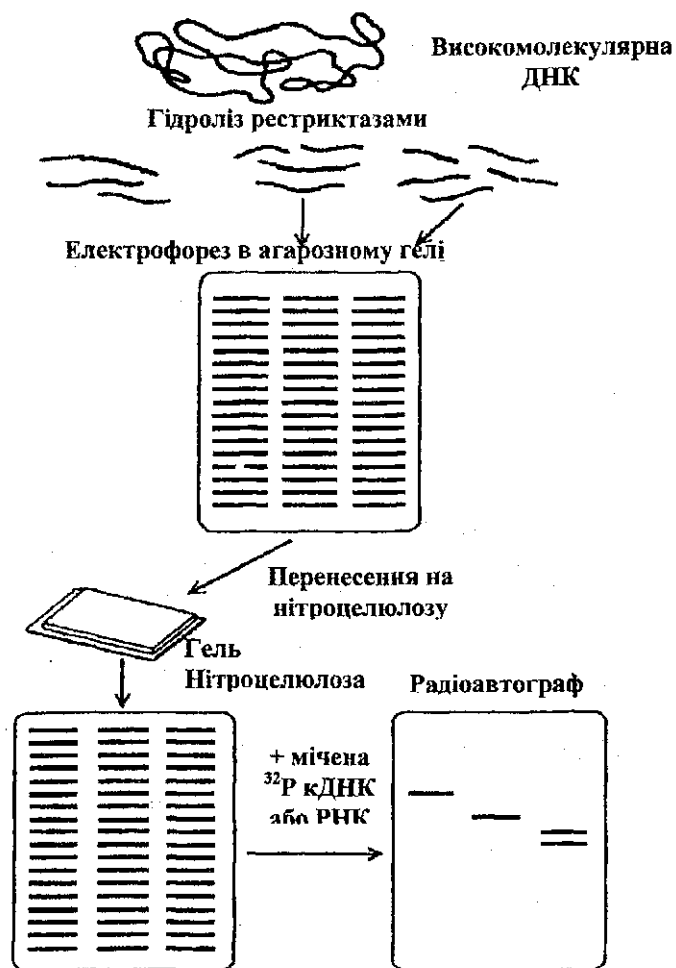


Рис. 34. Блотінг за Саузерном. Еукаріотичну ДНК гідролізують однією або декількома рестриктазами. Отримані фрагменти розділяють за розміром за допомогою електрофорузу в агарозному гелі. Потім гель розміщують на аркуші нітроцелюлози і пропускають буфер у напрямку від гелю до фільтру. Це призводить до елюції фрагментів ДНК з гелі і зв'язуванню їх з фільтром. В результаті на фільтрі з'являється репліка розподілу фрагментів ДНК в гелі. Потім ДНК на фільтрі гібридизують з відповідним міченим зондом; специфічні фрагменти ДНК, що гібридизуються з ним, виявляються радіоавтографічно.

встановити кількість копій даного гена у геномі. Дуже часто метод блотінга за Саузерном використовують для попереднього аналізу гена або сімейства генів з метою вибору оптимальної стратегії клонування.

Аналогічна методика для аналізу РНК отримала назву *Нозерн (північного) блотінга*: сумарну клітинну РНК або мРНК розділяють за розміром електрофорезом у агарозному гелі; потім матеріал з гелю переносять на оброблений за допомогою спеціального хімічного методу папір, що ковалентно зв'язує РНК, або на нітроцелюлозний фільтр. При гібридизації з відповідним міченим зондом після радіоавтографії з'являються смуги, за якими можна робити висновки щодо кількості і розміру РНК, комплементарних даному зонду. Нозерн блотінг корисний як додаток до техніки клонування ДНК, оскільки він дає можливість порівнювати розміри специфічної мРНК й відповідних клонованих к ДНК, і з'ясувати, які саме з останніх є повними копіями першої.

У разі експресії клонованих генів для виявлення клонів з рекомбінантними молекулами ДНК користуються також двома імунологічними методами (Рис. 35 та 36).

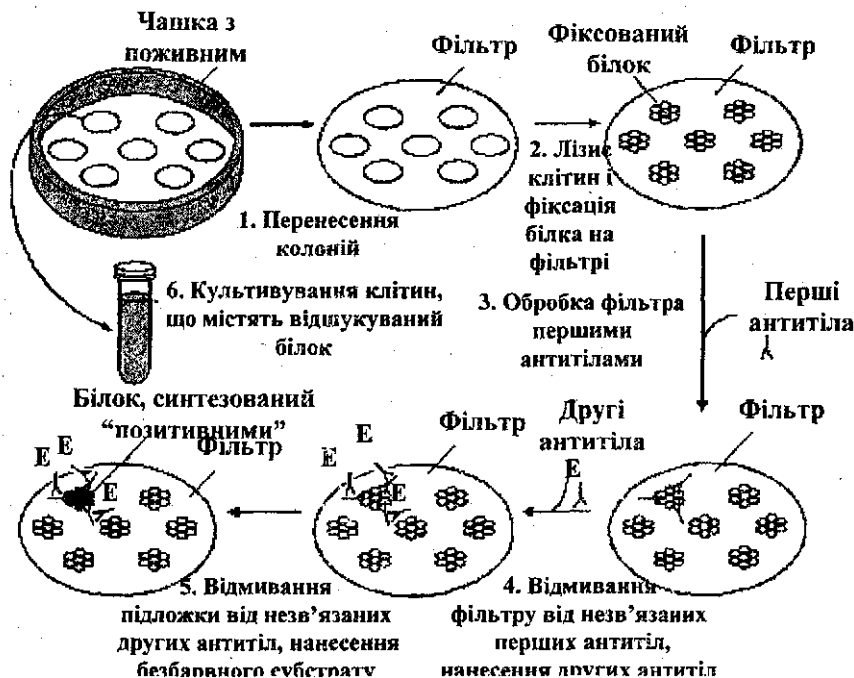


Рис. 35. Імунологічний скринінг геномної бібліотеки (імунологічне тестування колоній).

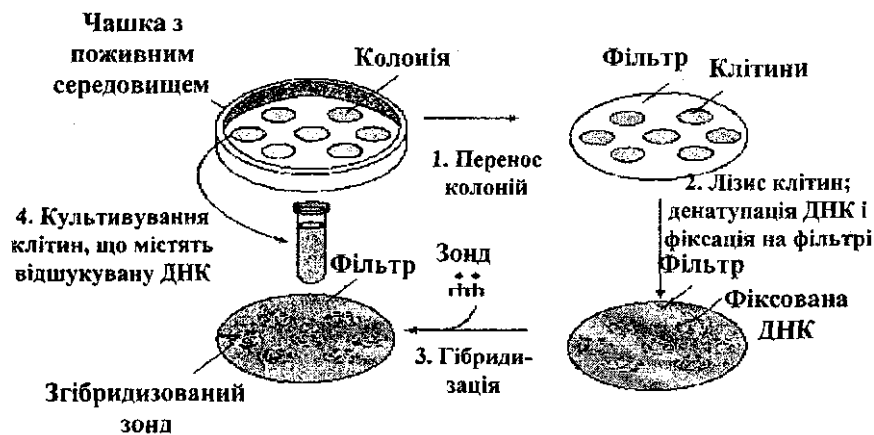


Рис. 36. Імунологічний скринінг бібліотеки геномної ДНК з застосуванням міченого зонду

Досить поширений метод прямої імуноселекції, за яким на чашку з поживним середовищем, у яку додані антитіла до детектованого білка, висівають клітини з рекомбінантними молекулами ДНК. Після утворення колоній клітини лізують і піддають інкубації. Лізис клітин при цьому здійснюють за допомогою фага або дією лізоциму. В результаті навкруги колоній, що містять певний білок, з'являються кільця імунопреципітації (Рис. 35).

Метод *радіоімунодетекції* полягає в тому, що колони бактерій з рекомбінантними молекулами ДНК лізують прямо на поверхні щільного живильного середовища і притискають до них диски, на які нанесені специфічні антитіла. При цьому відповідні антигени зв'язуються з антитілами і опиняються на диску. Положення на ньому комплексів антиген-антитіло і відповідно координати колоній, що синтезують специфічний продукт, визначають обробкою дисків тими самими, але міченими антитілами з наступною радіоавтографією (Рис. 36).

Використання методів генної інженерії дозволило створити комбінаторні бібліотеки кДНК різних генів, які налічують десятки і сотні мільйонів варіантів молекул. Аналізувати бібліотеки такого розміру методом реплік колоній практично неможливо. У 1988 р вперше показано можливість представлення (дисплея) пептидів на поверхні капсиду нитчастого бактеріофага, що лягло в основу сучасної технології селекції специфічних молекул *in vitro* - так званого *фагового дисплея*. Загальний принцип фагового дисплея представлено на Рис. 37.

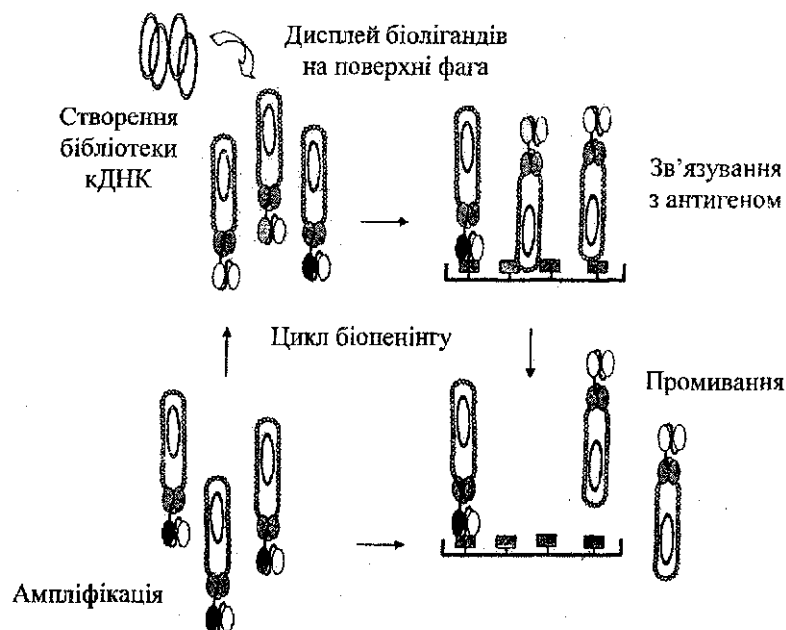


Рис. 37. Фаговий дисплей і афінна селекція біолігандів

ДНК, яка кодує велику кількість варіантів біолігандів (наприклад, пептидів, або білків), субклонується у геномі бактеріофага таким чином, що забезпечується утворення відкритої трансляційної рамки разом із геном, що кодує один із білків фагового капсиду (pIII, pVI або pVIII). При експресії утворюється гібридний білок, який включається до складу новоутворених фагів після їхньої ампліфікації в *E. coli*. Результатом включення гібридного білка до капсиду фага є експонування молекули біоліганду на поверхні останнього (фаговий дисплей), в той час як генетичний матеріал, що кодує біоліганд, знаходиться в складі фагового геному.

Цей зв'язок між генотипом і фенотипом дозволяє проводити афінне збагачення фагів, що несуть молекули специфічних біолігандів, при використанні послідовних циклів селекції на іммобілізованих молекулах-мішенях (*біопенінг*). Фаги із загального пулу, що представляють специфічний до мішені ліганд, зв'язуються, в той час як інші фаги видаляються при промиванні. Фаги, що зв'язалися, можуть бути елюйовані з поверхні мішені, введені інфікуванню у *E. coli*, ампліфіковані для збагачення ДНК-послідовностей, які ізольовані з бібліотеки, і використані для функціонального аналізу або проведення наступних циклів афінної

селекції. Отримання цільових молекул технікою фагового дисплея тісно пов'язано з використанням таких підходів, як створення великих за розміром комбінаторних бібліотек біолігандів, їхнього дисплея і послідовних циклів афінного збагачення.

Трансляція мРНК може бути здійснена у безклітинній системі. Однак у випадку еукаріотичних генів мРНК часто переносять до ооцитів жаби (ксенопусу) за допомогою мікроін'єкції, де вона транслюється. Продукт трансляції зазвичай знаходять за допомогою антитіл.

За оцінками фахівців лише 10-20% геному людини експресується в клітинах в один і той же час. Тому надзвичайно важливою практичною задачею є виявлення експресованих генів, у тому числі і клонованих, за допомогою генно-інженерних маніпуляцій. Досить недавно були розроблені принципово нові потужні методи аналізу експресії великої кількості генів на рівні транскриптів та білків. До таких методів відносяться серійний аналіз генної експресії та використання генних мікрочипів.

Серійний аналіз генної експресії (serial analysis of gene expression, SAGE) дозволяє виявляти повністю невідомі диференційно експресовані транскрипти і відстежувати рівні експресії відомих генів у досліді (Рис. 38).

На першому етапі створюється бібліотека, яка являє собою транскрипційний пул. Для створення зразків для бібліотеки SAGE всі мРНК з пулу зворотно транскрибується з використанням біотинильованих праймерів. Після обробки так званим «якірним» ферментом, рестриктазою, яка, як очікується від неї, розщепить більшість транскриптів як мінімум один раз, 3'-ділянки отриманих кДНК іммобілізуються за допомогою біотину. Іммобілізовані транскрипти розділяють на дві порції, після чого дві різні адапторні послідовності зв'язуються з 5' кінцями кДНК, які містять сайт для рестриктази IIS. Цей фермент робить розщеплення на певній відстані від сайту упізнавання; в результаті утворюються вивільнені 5' ділянки кДНК, включаючи адапторну послідовність і поодинокі транскрипт-специфічні послідовності. Після літування цих послідовностей утворені конструкції ампліфікуються за допомогою ПЛР. На завершальній стадії знову використовується адапторний фермент для вилучення адапторних послідовностей на 3' та 5' кінцях конструкцій. Отримані у такий спосіб транскрипт-специфічні послідовності зчіплюються і клонуються у відповідних плазмідах. На аналітичній стадії вставки секвенуються і піддаються всебічному аналізу, включаючи порівняння з базами даних та бібліотек з інших клітинних джерел.

Генні мікрочипи, що також називаються ДНК мікроряди (DNA microarrays) або олігонуклеотидні мікроряди (oligonucleotide microarrays), являють собою прототипну методологію, що була розроблена паралельно секвенуванню геному людини.



Рис. 38. Серійний аналіз генної експресії. Послідовність операцій.

Генні мікрочипи дозволяють визначати експресію великої кількості генів і врешті використовуватимуться для проведення аналізу експресії у масштабі всього геному. Зразки кДНК транскрипт-специфічних послідовностей тисяч потенційно експресованих генів вишиковують на скляних або мембранних підкладках. Потім мікрочипи гібридизують з міченою пробою кДНК, яка нас цікавить, і аналізують (Рис. 39).

Типові етапи дослідів з використанням мікрочипів включають наступне:

Приготування зразка та виділення мРНК. За допомогою відповідних методів мРНК виділяють з цікавлячої тканини. У більшості випадків клітинні культури забезпечують гомогенний клітинний матеріал.

Приготування та мічення кДНК. кДНК готується з використанням зворотної транскриптази. Цей етап також включає мічення ДНК з використанням різних реактивів, таких як радіоактивні та флуоресцентні речовини.

Гібридизація з мікрочипом. Наносяться одна або дві проби, мічені різними реактивами.

Відображення. Після промивання зв'язані проби детектують, використовуючи спосіб, що залежить від метода мічення.

Аналіз даних. Він включає поправку на різниці у зразках, отримання первинних даних, збір їх у відповідний формат та кластерний аналіз.

Аналіз генної експресії за допомогою генних мікрочипів зараз широко використовується для тестування ліків та токсикологічних досліджень, для аналізу шляхів метаболізму, а також для молекулярної класифікації причин захворювань.

Контрольні запитання до 3 розділу.

Укажіть основні ферменти, що використовуються в генній інженерії.

Що таке рестрикційні ендонуклеази II типу, і чому вони так важливі для технології рекомбінантних ДНК?

Як „перетворити” молекулу мРНК в кДНК?

Якими способами можна об'єднати фрагменти з різнойменними кінцями?

Навіщо рестриковану плазмідну ДНК перед літуванням часто обробляють лужною фосфатазою?

Детально опишіть два методи секвенування.

Які можливості відкриває геноміка у світлі наявних даних про нуклеотидні послідовності певних організмів?

Як синтезують гени за допомогою ПЛР?

Яким чином за допомогою хімічного синтезу можна синтезувати необхідні полінуклеотидні послідовності?

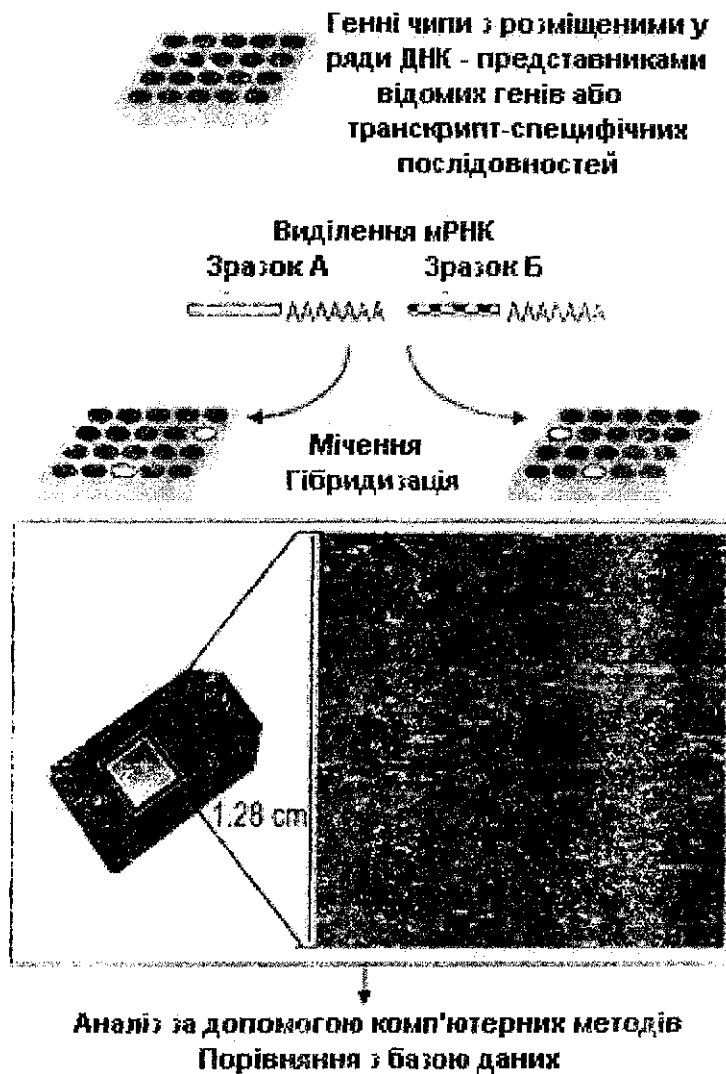


Рис. 39. Аналіз генної експресії за допомогою генних мікрочипів. Мікронний виробляються різними методами з використанням послідовностей відомих генів або транскрипт-специфічних послідовностей. На малюнку показано комерційний олігонуклеотидний мікрочип та с... н.'зша мікрофотографія міченого генного чипа.

Що таке вектор і які існують основні типи векторів?

Опишіть застосування плазміди, наприклад pBR322, в якості вектора.
Які особливості вона має?

В чому полягають переваги та недоліки клонування у фагах?

Які основні відмінності вектора для клонування і вектора для трансформації?

Опишіть технологію отримання рекомбінантних молекул ДНК.

Чим відрізняються сайт-специфічний мутагенез від сегмент-специфічного мутагенезу?

Опишіть способи введення рекомбінантних плазмід в бактерію, наприклад, у *E. coli*.

Як проводять ідентифікацію та відбір клонованих молекул ДНК?

Що таке банки генів і клонотеки?

4. ОТРИМАННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ СПОЛУК МЕТОДАМИ ГЕННОЇ ІНЖЕНЕРІЇ

Сучасні досягнення генної інженерії дали змогу започаткувати принципово нову галузь біотехнології, метою якої є отримання життєво важливих для людства біологічно активних речовин їх синтезом у генетично трансформованих організмах, зокрема бактеріях. Сьогодні із застосуванням методів генної інженерії випускається близько 25% всіх ліків в світі.

4.1. Біологічно активні поліпептиди

Сучасні приклади створення нових поліпептидних продуктів для медичної промисловості та лікування хвороб людини з використанням методів генної інженерії подано нижче.

Використання генно-інженерних продуктів у медицині

<i>Продукт</i>	<i>Сфера застосування</i>
Антикоагулянти Фактори крові	Активатор плазміногена, активує плазмін. Фактор VIII прискорює створення згустків; дефіцитний при гемофілії А. Використання фактора VIII, отриманого генноінженерними методами, усуває ризик, пов'язаний із переливанням крові
Колонієстимулюючі фактори	Ростові фактори імунної системи, що стимулюють утворення лейкоцитів. Застосовують для лікування імунodefіциту і боротьби з інфекціями
Еритропоетин	Стимулює утворення еритроцитів. Застосовують для лікування анемії у хворих з нирковою недостатністю
Ростові фактори	Стимулюють диференціацію і ріст різних типів клітин. Застосовують для прискорення лікування ран
Гормон росту людини	Застосовують при лікуванні карликовості
Людський інсулін	Використовують для лікування діабету
Інтерферон	Перешкоджає розмноженню вірусів, використовують для лікування деяких форм ракових захворювань
Супероксиддисмутаза	Запобігає ураженню тканин реактивними окислювальними в умовах короткочасної нестачі кисню, особливо в перебігу хірургічних операцій, коли потрібно раптово відновити потік крові

Вакцини	Штучно отримані вакцини (перша - проти гепатиту В) за багатьма показниками кращі за звичайні вакцини
---------	--

Першим прикладом такої біотехнології стало отримання з бактерій людського інсуліну.

Інсулін - назва походить від гістологічного терміну *insulae pancreaticae* (панкреатичні островці). Це білково-пептидний гормон, що синтезується у β -клітинах островців підшлункової залози (острівця Лангерганса). Інсулін є універсальним анаболічним гормоном, необхідним для росту і розвитку організму. Інсулін здійснює вплив на всі види обміну речовин: він стимулює транспорт речовин крізь клітинні мембрани, сприяє утилізації глюкози і утворенню глікогену, пригнічує глюконеогенез, гальмує ліполіз і активує ліпогенез, підвищує активність синтезу білка. До того ж інсулін, забезпечуючи окислення глюкози у циклі трикарбонових кислот, сприяє утворенню багатих на енергію сполук, зокрема АТФ, і підтриманню енергетичного балансу клітин.

В крові інсулін частково утворює комплекси з білками плазми крові (так званий зв'язаний інсулін), частково залишається у вільному стані (вільний інсулін). Вільний і зв'язаний інсулін відрізняються один від одного за біологічними, імунними та фізико-хімічними властивостями, а також за впливом на жирову і м'язову тканини, які є органами-мішенями для інсуліну, тобто інсуліночутливими тканинами.

Кількість інсуліну, що циркулює в крові, визначається не тільки інтенсивністю секреції цього гормону, але і швидкістю його метаболізму у тканинах і органах. Період біологічного напівжиття інсуліну людини складає біля 30 хв.

Порушення синтезу і секреції інсуліну можуть мати різний характер і різне походження. Нестача секреції інсуліну приводить до гіперглікемії і розвитку цукрового діабету. У цьому випадку для компенсації вмісту інсуліну в крові його постійно вводять хворим екзогенно. Надлишкове утворення інсуліну, що спостерігається, наприклад, при гормонально-активній пухлині, яка походить від β -клітин островців підшлункової залози - інсуломи, клінічно виражається симптомами гіперінсулінізму і гіпоглікемічного синдрому.

Донедавна препарати інсуліну виробляли винятково з тваринної сировини (підшлункова залоза великої рогатої худоби та свиней). Внаслідок потреби у великій кількості сировини (підшлункова залоза корови важить 200 - 250 г, а для отримання 100 г кристалічного інсуліну потрібно 800 - 1000 кг вихідної сировини) виробництво інсуліну було обмеженим, а його препарати коштували надзвичайно дорого.

Інсулін синтезується в інсулоцитах острівців підшлункової залози. Він побудований з двох поліпептидних ланцюгів А і В завдовжки у 20 та 30 амінокислот. Хімічний синтез обох ланцюгів і поєднання їх дисульфідними зв'язками для отримання інсуліну був здійснений ще у 1963 р. Проте проводити цей синтез, який складається із 170 хімічних реакцій, у промисловому масштабі надзвичайно складно. Вихід був знайдений у використанні для отримання інсуліну технології рекомбінантних ДНК.

Молекула інсуліну містить сигнальну послідовність, яка бере участь у транспорті поліпептидного ланцюга через внутрішньоклітинні мембрани. У процесі цього транспорту сигнальний пептид відщеплюється від решти поліпептидного ланцюга, депонованої у зв'язаних з мембраною везикулах у клітинах підшлункової залози. Цю форму інсуліну, що запасається, називають *проінсуліном*. Порушення перетворення проінсуліну в інсулін приводить до зміни кількісного співвідношення цих речовин у кровотоці, появи аномальних форм інсуліну і внаслідок цього - до зсуву в регуляції обміну речовин.

Проінсулін відрізняється як від *препроінсуліну* - повного поліпептидного ланцюга, що містить, крім того, сигнальну "пре"-послідовність, так і від фізіологічно активного зрілого інсуліну. Іншими словами, інсулін існує у трьох формах: 1 - *препроінсулін* - первинний продукт трансляції, що містить у інтактному вигляді сигнальну послідовність і А-, В- та С-сегменти; 2 - *проінсулін*, у якого відсутня сигнальна послідовність; 3 - *інсулін*, що складається з окремих А- та В-ланцюгів, утримуваних разом за допомогою трьох дисульфідних зв'язків.

З метою одержання генноінженерного інсуліну спочатку синтетичні гени А- та В-ланцюгів вбудовують у ген бактерійного ферменту р-галактозидази, який, у свою чергу, включають у плазмідний вектор. Отримані у такий спосіб рекомбінантні плазмідні далі вводять до клітин *E. coli*, де вони реплікуються, і під контролем регуляторних послідовностей гена Р-галактозидази синтезують мРНК. Її трансляція приводить до утворення білка, що складається з частини поліпептидного ланцюга р-галактозидази, з'єднаного через додатковий залишок метіоніну з А- та В-ланцюгами інсуліну. Після відповідного розщеплення такого складного білка та виділення і очищення отриманих фрагментів А- та В-ланцюги інсуліну змішують і зв'язують між собою за допомогою реакції, що сприяє утворенню специфічних дисульфідних зв'язків. У результаті отримують чистий людський інсулін.

Враховуючи очевидні переваги генноінженерної технології отримання інсуліну, вважають, що саме вона, після відповідних вдосконалень, забезпечить людство цим важливим препаратом.

Іншим прикладом цього напрямку є одержання пептидного гормону *соматотропіну* — гормону росту людини, який секретується передньою

частиною гіпофізу. Соматотропін контролює ріст людського тіла; його нестача призводить до захворювання - гіпофізарної карликовості (1 випадок на 5000 чоловік). Через видоспецифічність соматотропіну, його кількість як препарату була надзвичайно обмежена і не задовольняла попит. Вистачало лише для лікування 1/3 випадків гіпофізарної карликовості в розвинених країнах.

Роботи з отримання гормону росту людини у клітинах *E. coli* повною мірою демонструють складності генної інженерії. Соматотропін являє собою поліпептидний ланцюг з 191 амінокислоти. Послідовність, що кодує цей білок, була отримана за допомогою комбінації методів хімічного синтезу ДНК і ферментативного синтезу кДНК. Початок гена, що забезпечує правильну ініціацію синтезу білка, був синтезований хімічно, а залишок отриманий синтезом кДНК на мРНК з клітин гіпофізу людини. Потім ці два фрагменти були окремо клоновані, знов очищені й ліговані, в результаті чого була отримана повна послідовність ДНК, що кодує гормон росту людини. Цей ген потім вбудовували у вектор і вводили у клітини *E. coli*, де він індукував синтез гормону росту людини. Соматотропін, синтезований у такий спосіб в бактеріях, з усіх поглядів (в тому числі за біологічною активністю) аналогічний гіпофізарному. З 1984 року, після серйозних клінічних випробувань на токсичність, було розпочато широкомасштабне виробництво соматотропіну в бактеріях.

Цікавою розробкою в цьому напрямі є також отримання *інтерферону*. За сучасним визначенням інтерферони являють собою гетерогенне сімейство багатофункціональних цитокінів, які справляють протівірусну та антипроліферативну дію щодо багатьох типів клітин. Вони є сильними імуномодуляторами, впливають на антитілоутворення, природну прототоксичність та експресію антигенів клітинної поверхні (Рис. 40).

Залежно від імуногенних властивостей та відмінностей у генних послідовностях різних популяцій молекул інтерферонів, а також їх фізико-хімічних характеристик, засобу індукції, ефективності й механізму дії ці молекули нині поділяють на два типи: інтерферони I типу (кислотостійкі інтерферони -а та -Р), продукуються та секретуються більшістю клітин у відповідь на дію вірусів, дволанцюгових РНК або ряду синтетичних низькомолекулярних сполук, та інтерферон II типу (іmunний інтерферон) - кислотолабільний інтерферон-у, продукований Т-клітинами і клітинами - природними кілерами (ПКК) у відповідь на чужорідні антигени та мітогени.

Антивірусну дію інтерферон справляє, індукуючи синтез ряду протівірусних білків, з яких найвідоміші 2',5'-олігоаденілатсинтетаза (OAS), протеїнкіназа (PKR) та білок Мх.

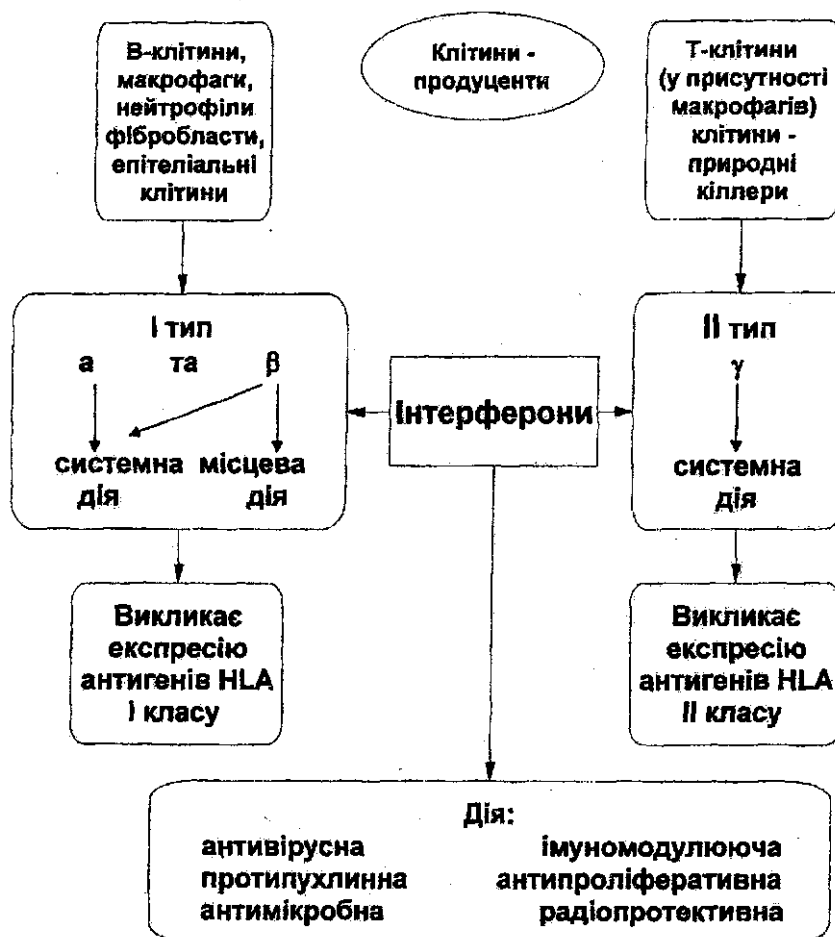


Рис. 40. Головні функції системи інтерферонів

Завдяки своїм унікальним фізіологічним властивостям препарати інтерферонів швидко поширилися у клінічній практиці. Проте видова специфічність інтерферону обмежувала його застосування, оскільки препарати інтерферону донедавна виготовляли винятково з крові людини. Процес отримання інтерферону в основному однаковий для всіх типів клітин, що вирощуються в культурі і утворюють інтерферон: клітини заражають індукторним вірусом і через 24 год. центрифугують; з надосадкової рідини отримують інтерферони, які далі піддають очищенню. При переробці 2 л крові вдається отримати до 4 млн. одиниць інтерферону, до того ж після 48 - 72 год. клітини-продуценти відмирають. Через це виробництво інтерферонів вважалося донедавна економічно мало вигідним. І в даному разі застосування генноінженерної технології для отримання великої кількості цього препарату виявилось найдоцільнішим.

Молекули інтерферону-а і інтерферону- β мають молекулярну масу близько 18 та 24 кДа відповідно, обидві складаються з 166 амінокислотних залишків. Молекулярна маса інтерферону- γ дещо вища (45 кДа, димер): він складається з 143 залишків. Інтерферон- α та інтерферон- γ належать до глікопротеїнів, проте їх олігосахаридні бічні групи не суттєві для прояву біологічної активності.

У 1980 р. у США був отриманий інтерферон людини в генетично сконструйованих клітинах *E. coli*. Використовуючи методи генетичної інженерії з мРНК, виділеної з лейкоцитів (з 1 л крові в одному досліді), була одержана відповідна двоспиральна кДНК, яку далі вбудували у плазмідну і отримали клони. Після дослідження понад 20 тис. клонів були виявлені окремі клони, здатні синтезувати інтерферон.

Подальша технологічна схема отримання рекомбінантного інтерферону складається із розмноження бактерій, що містять реконструйовану плазмідну, їх сепарування, дезінтеграції та екстракції, висолювання сульфатом амонію та наступного діалізу інтерферону і його кінцевого очищення на колонці з імуносорбентом (іммобілізованими моноклональними антитілами). Ці стадії реалізують у виробничих умовах, на відміну від перших стадій, які виконують в лабораторії.

В останній час стали приділяти велику увагу створенню принципово нових вакцин. Це пов'язано з тим, що до нинішнього часу не вдалося отримати високоефективні вакцини для попередження багатьох розповсюджених або небезпечних інфекційних захворювань. До того ж, збільшилася захворюваність, що обумовлена тими інфекціями, з якими людство раніш успішно боролось. Цьому сприяла поява лікарськи-стійких форм мікроорганізмів, збільшення числа ВІЛ-інфікованих пацієнтів з імунною недостатністю, тощо. При цьому розповсюдження

мікроорганізмів, стійких до дії антибактеріальних препаратів, набуло характеру екологічної катастрофи і поставило під загрозу ефективність лікування багатьох важких захворювань. Підвищений інтерес до нових вакцин виник після того, як була встановлена роль патогенних мікроорганізмів в розвитку тих захворювань, які раніш не вважали інфекційними, такі, як гастрити, пептична виразка шлунку та дванадцятипалої кишки, асоційована з *H. pylori*, злоякісні новоутворення печінки (викликані вірусами гепатиту В та С).

У виробництві сучасних вакцин поширилося використання технології рекомбінантних ДНК. Рекомбінантні вакцини мають цілий ряд переваг перед традиційними вакцинами. Вони характеризуються відсутністю (або значним зниженням вмісту) баластних компонентів, повною нешкідливістю, низькою вартістю, яка пов'язана зі здешевленням промислового виробництва вакцин. Експресований в клітинах вакцинованої тварини білок має конформацію, близьку до нативної, і володіє високою антигенною специфічністю. Очевидна перевага рекомбінантних вакцин обумовила їх широке використання в медицині і ветеринарії для вакцинації населення і сільськогосподарських тварин.

Розрізняють рекомбінантні вакцини, які містять компоненти мікроорганізмів, отримані методом генної інженерії, та так звані ДНК-вакцини.

Як приклад створення рекомбінантних вакцин розглянемо отримання поверхневого антигену вірусу гепатиту В (HBsAg) за допомогою спеціально розробленої системи на основі дріжджів *Pichia pastoris* з використанням інтегруючого вектора. Спочатку ген HBsAg вбудували між промотором гена алкогольоксидази 1 (*AOX1p*) і сигналом термінації-поліаденілювання (*AOX1i*) того самого гена. Активність гена *AOX1* регулювали за допомогою метанолу. У його присутності на долю алкогольоксидази припадає до 30% всіх білків клітини, а за відсутності метанолу алкогольоксидаза не синтезується взагалі.

Вектор, спеціально сконструйований для цієї роботи, містив такі елементи: 1 - блок *AOX1p-HBsAg-AOX1i*; 2 - сайт ініціації реплікації, що функціонує у *Pichia pastoris*; 3 - фрагмент ДНК, що містить сайт ініціації реплікації плазмиди pBR322 і селективний маркер *E.coli*; 4 - фрагмент *U-AOX1*, що сприяє інтеграції клонованої ДНК в певний сайт хромосоми; 5 - активний ген гістидинол-дегідрогенази (*HIS4*), який кодує фермент, що бере участь в синтезі гістидину. Наявність в цій конструкції послідовностей pBR322 дає змогу використовувати для роботи з нею *E.coli*, що полегшує клонування і за потреби сприяє отриманню великі кількості векторної ДНК.

Клон з інтегрованим фрагментом *AOX1p-HBsAg-AOX1i* при рості у присутності метанолу, що активує AOX1 -промотор, синтезував у великих кількостях аутентичний білок HBsAg, який накопичувався в цитоплазмі.

гічну і декілька хімічних стадій. Вихідний субстрат для нього - D-глюкоза (Рис. 41). На останньому етапі цього процесу 2-кетогулонова кислота (2-KLG) перетворюється у кислих умовах на L-аскорбінову кислоту. Біохімічні дослідження метаболізму різних бактерій показали, що 2-KLG не синтезується прямо з глюкози. Так, одні бактерії (*Acetobacter*, *Gluconobacter* та *Erwinia*) можуть перетворювати глюкозу на 2,5-дикетогулонову кислоту (DKG), а інші (*Corynebacterium*, *Brevibacterium* та *Arthrobacter*), які синтезують фермент 2,5-ОКО-редуктазу - перетворювати 2,5-DKG на 2-KLG.

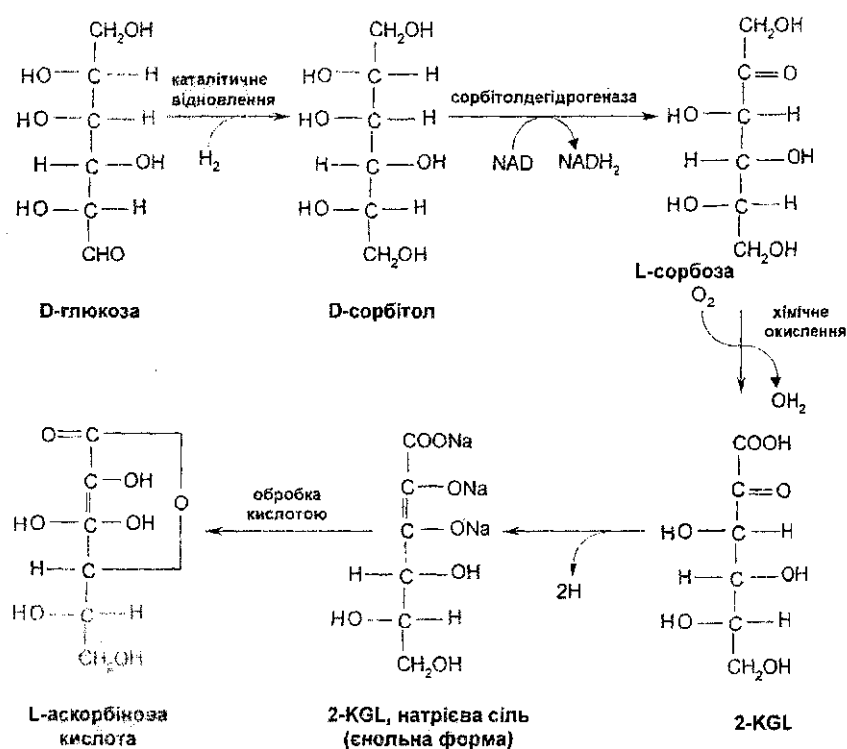


Рис. 41. Промисловий синтез L-аскорбінової кислоти

З метою поєднання всіх стадій утворення 2-KLG у метаболізмі одного рекомбінантного мікроорганізму був виділений ген 2,5-DKG-редуктази *Corynebacterium* sp. і перенесений в *Erwinia herbicola*. Першими етапами на цьому шляху були виділення і очищення 2,5-DKG-редуктази *Corynebacterium* sp. і визначення послідовності її перших 40 N-

амінокислот. Виходячи з цих даних були синтезовані два 43-нуклеотидних гібридизаційних зонди, які відповідали різним частинам білкової молекули. Синтезовані зонди використовували далі для скринінгу банку клонів ДНК *Corynebacterium*. У такий спосіб виділили клон, що містив ген 2,5-DKG-редуктази, і дали секвенувати цей ген. Нуклеотидні послідовності, розміщені до стартового кодону ATG, вирізали і замінювали їх на сигнали транскрипції та трансляції, що функціонують у *E.coli*, оскільки регуляторні послідовності грампозитивних мікроорганізмів типу *Corynebacterium spp.* не функціонують у клітинах цього мікроорганізму. Отриману конструкцію далі вводили у *E.coli* (при цьому синтезувалася активна 2,5-DKG-редуктаза), а потім переклоновували у векторі з широким колом хазяїв і трансформували їм *Ervinia herbicola*.

Трансформовані клітини *Ervinia* активно перетворювали D-глюкозу безпосередньо на 2,5-KLG, при цьому власні ферменти *Ervinia*, локалізовані у внутрішній мембрані бактерійної клітини, активно перетворювали глюкозу на 2,5-DKG, а 2,5-DKG-pepzyKТа3а, локалізована в цитоплазмі, каталізувала перетворення 2,5-DKG на 2,5-KLG. Отже, за допомогою генноінженерних маніпуляцій метаболічні реакції, що проходять у таких різних мікроорганізмах, вдалося здійснити в одному з них.

Ще один приклад застосування рекомбінантних мікроорганізмів для отримання цінних низькомолекулярних сполук - отримання з їх допомогою барвника *індиго*. Відомо, що багато бактерій, особливо виду *Pseudomonas*, здатні утилізувати різні органічні сполуки типу нафталіну, толуолу; ксилолу і фенолу, які є для них єдиним джерелом вуглецю. Дуже часто гени ферментів, що каталізують розщеплення цих органічних сполук, розміщуються у великих природних плазмідах (завдовжки 20 - 50 т.п.н.). При дослідженні одного з трансформантів, отриманих введенням до клітин *E. coli* однієї з таких плазмід (яка до того ж містила вставку завдовжки 10,5 т.п.н.) і здатного внаслідок цього перетворювати нафталін на саліцилову кислоту, виявилося, що мінімальне ростове середовище, яке містить триптофан, набуває синього забарвлення. Аналіз показав, що трансформовані клітини *E. coli* синтезували барвник індиго (Рис. 42).

Індиго - синій пігмент, застосований для фарбування вовни і бавовни, був вперше виділений з рослин. Нині його отримують хімічним синтезом. Цим барвником фарбують джинсову тканину, і тому попит на нього більший, ніж на будь-який інший барвник. Можливість одержання індиго за допомогою мікроорганізмів дає змогу розробити досить ефективний і економічний крупномасштабний мікробіологічний спосіб його виробництва, що виключає використання токсичних речовин, до яких вдаються при хімічному синтезі індиго.

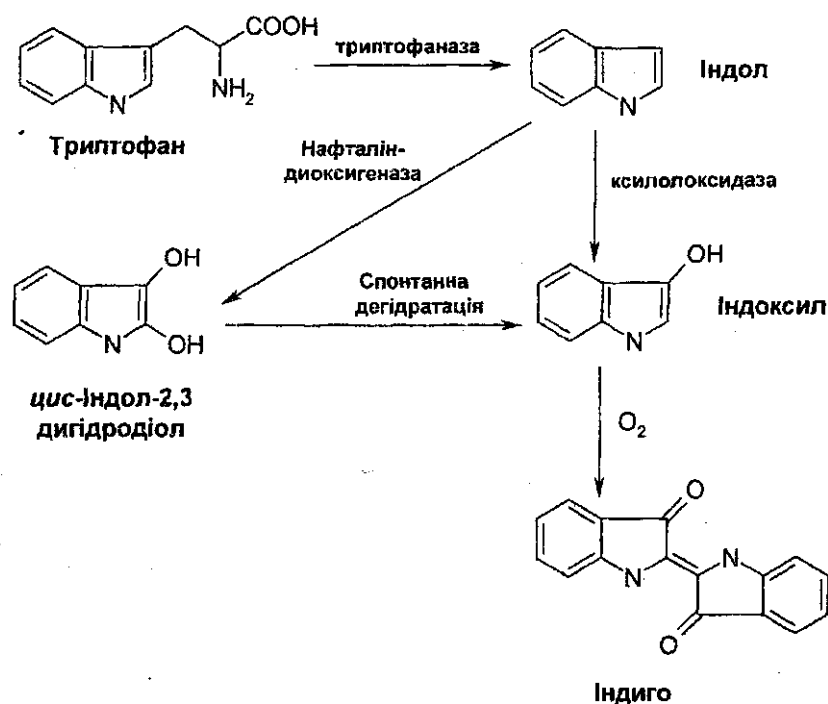


Рис. 42. Біосинтез індиго з триптофану

Досить перспективним здається застосування генноінженерних технологій і в галузі отримання антибіотиків. Важливість антибіотиків для людства загальновідома. Кожного року в світі відкривають до 200 нових антибіотиків, користуються тільки тими, які мають велику терапевтичну цінність і становлять економічний інтерес. На їх частку припадає лише 1-2% усіх антибіотиків. Великий ефект в цій галузі дає технологія рекомбінантних ДНК: по-перше, з її допомогою можна створювати нові антибіотики з унікальною структурою, які потужніше діють на певні мікроорганізми і мають мінімальні побічні ефекти; по-друге, генноінженерні підходи можуть бути використані для зниження вартості їх виробництва.

Процес біосинтезу одного антибіотика може складатися з 10-30 ферментативних реакцій, тому клонування всіх генів його біосинтезу є досить складним завданням. Один з підходів до виділення повного набору таких генів ґрунтується на трансформації одного або кількох мутантних штамів, не здатних синтезувати даний антибіотик, банком клонів, створених з хромосомної ДНК штаму дикого типу. Після введення банку клонів у

мутантні клітини відбирають трансформанти, здатні синтезувати антибіотик. Потім виділяють плазмідну ДНК клона, що містить функціональний експресуючий ген антибіотика і використовують її як зонд для скринінгу іншого банку клонів хромосомної ДНК. З цього банку відбирають клони, що містять нуклеотидні послідовності, які перекриваються з послідовностями зонду. Таким чином ідентифікують, а потім клонують елементи ДНК, що межують з комплементарною послідовністю, і відтворюють повний набір генів біосинтезу антибіотика.

Цей підхід з успіхом застосовувався для ідентифікації деяких генів біосинтезу *ундеципродігіозану* з *Streptomyces coelicolor A3*. В цьому разі використовували комплементацийний аналіз, що ґрунтується на порівнянні кольору колоній: колонії мікроорганізмів дикого типу — червоного кольору, а колонії мутантних мікроорганізмів - кремового.

Працюючи з генами, що беруть участь у біосинтезі вже відомих антибіотиків, отримують нові антибіотики з унікальними властивостями і специфічністю.

За допомогою генної інженерії можна не тільки створювати нові антибіотики, а і збільшувати ефективність синтезу вже відомих. Лімітуючим фактором у промисловому виробництві антибіотиків за допомогою *Streptomyces spp.* іноді виступає кількість доступного клітинам кисню. Внаслідок поганої розчинності кисню у воді та високої щільності культури *Streptomyces* його часто виявляється замало, ріст клітин уповільнюється і вихід антибіотика знижується. Для вирішення цієї проблеми створюють рекомбінантні штами *Streptomyces*, які ефективніше використовують наявний кисень.

Одна із стратегій, що використовується деякими аеробними мікроорганізмами для виживання в умовах нестачі кисню, полягає в синтезі гемоглобіноподібного продукту, здатного акумулювати кисень і доставляти його у клітини. Наприклад, аеробна бактерія *Vitreoscilla sp.* синтезує гомодимерний гемвмісний білок, функціонально подібний до еукаріотичного гемоглобіну. Ген такого "гемоглобіну" з *Vitreoscilla* був виділений, вбудований у плазмідний вектор *Streptomyces* і введений у клітини цього мікроорганізму. При цьому трансформовані клітини *S. coelicolor*, що росли при низькому вмісті розчиненого кисню (приблизно 5 % від насичуючої концентрації), синтезували у 10 разів більше антибіотика актинородину на 1 г сухої клітинної маси і мали більшу швидкість росту, ніж нетрансформовані. Цей підхід використовують і для забезпечення киснем інших мікроорганізмів, що ростуть в умовах нестачі кисню.

4.3. Біополшери

Деякі з високомолекулярних сполук, біополімерів, що синтезуються живими організмами, мають цінні фізичні та хімічні властивості, внаслідок чого їх використовують у харчовій, переробній та фармацевтичній промисловості. З виникненням технології рекомбінантних ДНК з'явилася можливість створення нових біополімерів, заміни синтетичних продуктів на їх біологічні аналоги, модифікування вже існуючих біополімерів з метою покращення їх фізичних та структурних характеристик, підвищення ефективності відповідних промислових процесів, зменшення їх вартості.

Одним з прикладів генноінженерної розробки у цьому напрямі є створення рекомбінантної бактерії *Xantomonas campestris* з метою отримання *ксантанового слизу*. Цінний комерційний біополімер - ксантановий слиз - є високомолекулярним екзополісахаридом. Він має високу в'язкість не руйнується у агресивних фізичних та хімічних середовищах й за фізичними і хімічними властивостями нагадує шаштик. Зокрема його використовують як стабілізуючий, загущуючий або суспендуєний агент. Для успішного комерційного виробництва ксантанового слизу треба вирощувати *X. campestris* на недорогому і доступному джерелі вуглецю. *X. campestris* дикого типу ефективно утилізує глюкозу, сахарозу і крохмаль, але не лактозу. З іншого боку, у промисловому виробництві сиру утворюється такий побічний продукт, як сироватка, що складається з води (94-95 %), лактози (3-4 %) і невеликих кількостей білка, мінеральних речовин і низькомолекулярних органічних сполук. Молочна промисловість дає величезні кількості сироватки, її утилізація - це велика проблема.

Сироватку можна використовувати як джерело вуглецю при вирощуванні цінних промислових мікроорганізмів. Щоб *X. campestris* набула здатності рости на сироватці, був застосований такий прийом. Гени *lacZY E.coli*, що кодують ферменти р-галактозидазу та лактозопермеазу, вбудували у плазмиду з широким колом хазяїв таким чином, щоб вони перебували під транскрипційним контролем промотору одного з бактеріофагів *X. campestris*. Цю конструкцію ввели у *E.coli*, а потім перенесли з *E.coli* до *X. campestris* потрібним схрещуванням. Отримані у такий спосіб трансформанти, що містили плазмиду, синтезували Р-галактозидазу та лактозопермеазу, використовуючи лактозу як єдине джерело вуглецю, а також тзодукували у великих кількостях ксантановий слиз, використовуючи як джерело вуглецю глюкозу, лактозу і сироватку.

Ще один приклад - отримання меланіну. Меланіни - це чисельне сімейство різних біополімерів, що поглинають світло. Їх синтезують тварини, рослини, бактерії та гриби. Ці пігменти використовують у виготовленні

сонцезахисних екранів і покриттів, а також як добавки до косметичних засобів. Нині меланіни отримують у невеликих кількостях переважно екстракцією з природних джерел, або хімічним синтезом. Одночасно на основі технологій рекомбінантних ДНК розвивається недороге крупномасштабне виробництво меланінів з різними фізичними властивостями.

Меланіни - це нерегулярні полімери, що складаються з залишків індолу, бензотіазолу та амінокислот. Перший етап їх біосинтезу каталізується мідьвмісним ферментом монооксигеназою тирозинази і являє собою окиснення тирозину до дигідроксифенілаланінхінону. Останні етапи полімеризації не є каталітичними реакціями і залежно від хімічної природи нехітонних сполук, що включаються в полімерну структуру, дають кінцеві продукти різних кольорів: чорного, коричневого, жовтого, червоного або фіолетового.

Були виділені й охарактеризовані гени біосинтезу меланіну в клітинах *Streptomyces antibioticus*. Один з них кодує тирозиназу, а другий (ORF438) - білок з невідомими функціями. Ці гени спочатку переклонували у експресуючий вектор *E.coli*, при цьому одна конструкція містила тільки ген тирозинази, а друга - і ген тирозинази, і ORF438. Виявилося, що для біосинтезу меланіну потрібні продукти обох генів.

За допомогою генетичної інженерії робляться спроби здійснити мікробіологічний синтез каучуку. Натуральний каучук, цис-1,4-поліізопрен, - це широко використовуваний біополімер, який отримують з різних рослин. Його біосинтез починається з перетворення простих цукрів і охоплює 17 ферментативних реакцій.

Передусім за допомогою мРНК з рослини *Hevea brasiliensis*, що синтезує каучук, створили відповідну кДНК бібліотеку. Потім провели гібридизацію з коротким ДНК-зондом, синтезованим виходячи з даних щодо амінокислотної послідовності однієї з ділянок молекули полімерази каучуку. Для того щоб довести, що клонована кДНК дійсно кодує цей фермент, застосували антитіла до очищеного ферменту. Тепер дослідники використовуючи цей клон кДНК, намагаються синтезувати натуральний каучук мікробіологічними методами. Робота в цьому напрямі триває, і у перспективі буде створено нову технологію біосинтезу каучуку.

І, нарешті, досить цікава розробка, здійснена у 1999 р. англійськими вченими, - отримання унікального природного клею, створеного на основі білка, що виробляється мідіями виду *Mutilus galoproponcialis*. Цьому білку притаманні надзвичайна клейкість, еластичність і, одночасно, значна гідрофобність. Важливою особливістю розробленого клею стало те, що він не відторгається людським організмом і може скріплювати живі тканини. Для отримання цього білка відповідний ген у складі векторної конструкції був введений у рослини тютюну.

4.4. Деградація ксенобіотиків. Супербацिला

Мікроорганізми, як відомо, можуть приносити користь не тільки завдяки якомусь певному продукту, який синтезуються ними, а і своєю дією на довкілля. В середині 60-х років були знайдені ґрунтові мікроорганізми, здатні до деградації ксенобіотиків (неприродних, синтетичних хімічних речовин; від грецького *xenos* - чужий) - гербіцидів, пестицидів, холодоагентів, розчинників і т.д. Це відкриття підтвердило правильність припущення, про те, що мікроорганізми можна використовувати для економічного і ефективного руйнування токсичних хімічних відходів.

Головну групу ґрунтових мікроорганізмів, що руйнують ксенобіотики, становлять бактерії роду *Pseudomonas*. Різні штами з *Pseudomonas* здатні розщеплювати понад 100 органічних сполук. Часто один штам використовує як джерело вуглецю кілька споріднених сполук.

У біодеградації складної органічної молекули зазвичай беруть участь кілька різних ферментів. Гени, що їх кодують, можуть мати хромосомну локалізацію, але частіш входять до складу великих (50 - 200 т.п.н.) плазмід.

Бактерії, що руйнують негалогеновані ароматичні сполуки, як правило, перетворюють їх на катехол або протокатехоат, а потім, у ході кількох реакцій окиснювального розщеплення - на ацетил-CoA та сукцинат, або піруват та ацетальдегід. Ці останні сполуки метаболізуються практично всіма мікроорганізмами. Галогенізовані ароматичні сполуки, головні компоненти більшості пестицидів та гербіцидів, за допомогою тих же ферментів руйнуються до катехолу, протокатехолату, гідрохінону та їх галогенізованих похідних, причому швидкість їх деградації зворотно пропорційна кількості атомів галогенів у вихідній сполуці. Дегалогенування (відщеплення замінного атому галогену від органічної молекули), необхідне для детоксикації сполуки, часто здійснюється у ході неспецифічної діоксигеназної реакції заміщенням галогену в бензольному кільці на гідроксильну групу.

Деякі мікроорганізми мають природну здатність до деградації різних ксенобіотиків, проте, слід зважати на таке: 1 - жоден з них не здатен руйнувати всі органічні сполуки; 2 - деякі органічні сполуки у високій концентрації пригнічують функціонування або ріст деградуючих їх мікроорганізмів; 3 - більшість джерел забруднення містить суміш хімікатів, і мікроорганізм, здатний руйнувати один або кілька її компонентів, може інактивуватися іншими компонентами; 4 - багато неполярних сполук адсорбуються частками ґрунту і стають менш доступними; 5 - біодеградація органічних сполук часто відбувається досить повільно.

Частину цих проблем можна вирішити, здійснивши кон'югаційне перенесення плазмід, які кодують ферменти різних катаболічних шляхів, у

один реципієнтний штам. При цьому, якщо дві плазмиди містять гомологічні ділянки, то між ними може відбутися рекомбінація з утворенням гібридної плазмиди великого розміру і яка має властивості вихідних плазмід. Якщо ж дві плазмиди не містять гомологічних ділянок і належать до різних груп несумісності, то вони можуть співіснувати в одній бактерії.

У 1970-х роках Р. Чакрабарті з співавторами створив перший бактеріальний штам із надзвичайними катаболічними властивостями. Він розщеплював більшість вуглеводнів нафти і був названий "*супербациою*". Для його отримання використовували плазмиди, кожна з яких кодувала фермент, що розщеплював певний клас вуглеводнів: плазміда САМ детермінувала деградацію камфори, ОСТ - октану, НАН - нафталіну, ХУЛ - ксилолу. Спочатку кон'югацією перенесли плазмиду САМ до штам, що ніс плазмиду ОСТ. Ці дві плазмиди - несумісні (не можуть співіснувати в одній клітині у вигляді окремих плазмід), але в результаті рекомбінації, що відбувається між ними, утворюється одна плазміда, яка об'єднує їх функції. Потім аналогічним чином плазмиду НАН перенесли у штам, що ніс плазмиду ХУЛ. Ці плазмиди сумісні й можуть співіснувати в одній клітині-хазяїні. І, нарешті, гібридну плазмиду перенесли у штам, що ніс плазмиди НАН і ХУЛ. У результаті був отриманий штам, який росте на неочищеній нафті краще за вихідні штами, взяті окремо або разом (Рис. 43).

Контрольні запитання до 4 розділу.

Коротко опишіть створення двох, будь яких генно-інженерних поліпептидів, що використовуються в медицині.

Які генно інженерні підходи застосовують до створення нових вакційних препаратів.

Які стратегії клонування й експресії ДНК застосовують при створенні коротких поліпептидів медичного значення?

Як синтезувати індиго в *E. coli*.

Які біополімери можна отримувати за допомогою генетично змінених мікроорганізмів?

Що таке "супербацила"?

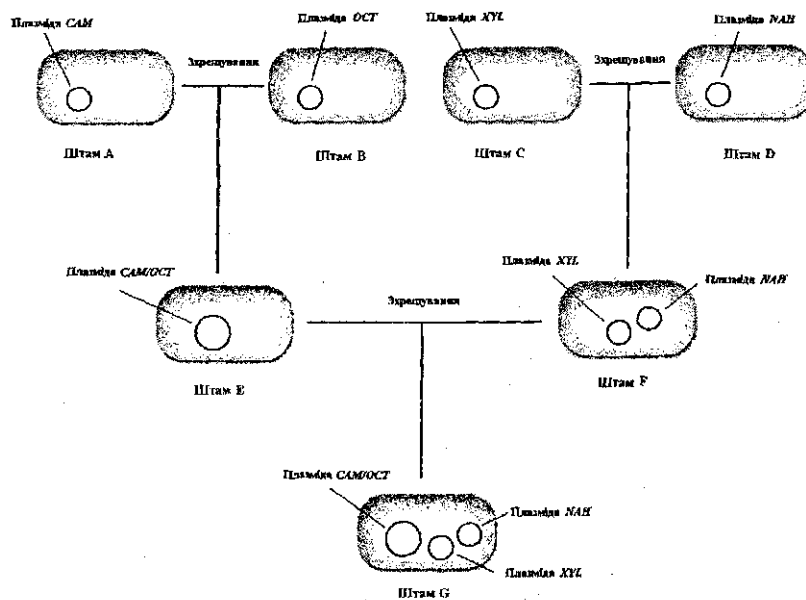


Рис. 43. Створення бактеріального штаму, здатного руйнувати камфору, ксилол та нафталін (супфбацили). Штам А, що несе плазмиду САМ (вона детермінує руйнування камфари), схрещують зі штамом В, який несе плазмиду ОСТ (руйнування октану). При цьому утворюється штам Е, який містить гібридну плазмиду, утворену в результаті гомологічної рекомбінації між вихідними плазмідами і маючу функції кожної з них. Штам С, що містить плазмиду ХУЛ (руйнування ксилолу), схрещують зі штамом Д, який містить плазмиду НАН (руйнування нафталіну), і отримують штам Ф, що несе обидві ці плазміди. Нарешті, схрещують штами Е та Ф, в результаті чого утворюється штам Г, що містить плазміди САМ/ОСТ, ХУЛ і НАН.

5. БЮТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ

5.1. Об'єкти генетичної інженерії

Бактерія *E. coli* - найпопулярніший об'єкт більшості робіт з клонування у генетичній інженерії, оскільки вона найдетальніше вивчена на молекулярному рівні. Одночасно *E. coli* практично невідома в мікробіологічній промисловості, оскільки вона є грамнегативним мікроорганізмом. Основна вада *E. coli* полягає у тому, що вона належить до умовно-патогенних для людини мікроорганізмів, оскільки містить у своїй зовнішній оболонці токсичні ліпополісахариди (так, зараження крові *E. coli* призводить до летального наслідку в 50 % випадків); ця обставина може скласти труднощі при отриманні на її основі фармацевтичних препаратів. Слід відмітити і той факт, що *E. coli* не секретує білки у середовище. До того ж, як прокаріот *E. coli* не здатна здійснювати характерні для еукаріотичної клітини сплайсинг і посттрансляційну модифікацію білків. Тому великий інтерес становить розробка систем клонування і експресії в інших, відмінних від *E. coli* організмах.

Відомі методи клонування і експресії генів у кількох бактеріях. З них найповніше вивчена *B. subtilis* - грампозитивний непато генний, непаразитичний мікроорганізм, що використовувався до початку ери генної інженерії у мікробіологічній промисловості для виробництва низки ферментів і поліпептидних антибіотиків. Ця ґрунтова бактерія є безпечною для людини і тварин і чудово освоєна мікробіологічною промисловістю. *B. subtilis* секретує деякі з своїх білків у середовище. У генній інженерії остання властивість найзручніша, оскільки секретовані білки звичайно не забруднені великою кількістю дуже близьких внутрішньоклітинних білків. До того ж секреція білка в середовище в принципі дає змогу досягти вищої концентрації синтезованого білка порівняно з внутрішньоклітинними білками.

У клітинах *B. subtilis* можна клонувати низку плазмід і бактеріофагів. Як уже відзначалося, для введення у *B. subtilis* чужорідної ДНК можуть застосовуватися методи трансформації, трансдукції та злиття протопластів. У *B. subtilis* вдалося успішно здійснити експресію кількох білків ссавців. Однак дана бактерія має певні недоліки для генної інженерії: рекомбінантні плазмідні в *B. subtilis* характеризуються нестабільністю, що виражається у перебудовах і делеціях ДНК, бацили секретують у культуральне середовище велику кількість протеаз, що суттєво ускладнює питання максималізації отримання цільового білка на основі бацил-прОдудентів.

Технологія клонування може бути застосована також і до ряду штамів *Pseudomonas* і *Streptomyces*. Поєднанням генної інженерії з методами мутації та селекції вдалося отримати штами *Pseudomonas* з цілком новим механізмом метаболізму; ці штами, наприклад, живуть на зазвичай токсичних хлорованих вуглеводнях як на єдиному джерелі вуглецю. Велике ігрове значення різних видів *Streptomyces* зумовило інтенсивне вивчення можливостей застосування методів генної інженерії до цих мікроорганізмів.

Останнім часом вдалося досягти великих успіхів у генній інженерії еукаріотичних клітин. Особливо інтенсивно вивчали дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*. Одна з переваг *S. cerevisiae* як експериментальної системи - простота та надійність її генетичного аналізу. Дріжджі відзначаються потужною генетичною системою, здатною до прямої експресії як деяких еукаріотичних, так і прокаріотичних генів, а також здатністю трансформуватися за допомогою чистої ДНК. Доведена їх нешкідливість для людини та тварин. Багато штамів дріжджів освоєно мікробіологічною промисловістю.

Крім того дріжджі здійснюють деякі типові для еукаріотів посттрансляційні модифікації й секретують ряд білків у середовище. Приміром, рекомбінантні *S. cerevisiae* продукують антиген австралійського гепатиту В, який за ступенем глікозилювання і агрегації не відрізняється від антигенів, знайдених в організмі хворих людей. Генетично модифіковані дріжджі секретують у середовище імунний інтерферон людини (ІФНту).

За допомогою систем експресії *Saccharomyces cerevisiae* вдалося отримати багато різних рекомбінантних білків, серед яких білки - лікарські препарати (фактор росту епідермісу, інсулін, інсуліноподібний та тромбоцитарний фактори росту, α -антитрипсин, фактор ХШа системи зсідання крові), вакцини (поверхневий антиген вірусу гепатиту В, білок малярійного плазмодію, білок оболонки ВІЛ-1) та білки, використовувані у діагностиці (білок вірусу гепатиту С, антигени ВІЛ-1). До переваг дріжджів належать:

- вони - одноклітинні організми, генетика і фізіологія яких детально вивчені, і які можна вирощувати як у колбах, так і у промислових біореакторах;
- виділено і схарактеризовано декілька сильних промоторів;
- у клітинах *Saccharomyces cerevisiae* здійснюється велика кількість згаданих вище посттрансляційних модифікацій;
- лише небагато з власних дріжджових білків секретуються у середовище; отже, якщо рекомбінантний білок секретується у середовище, то його очищення не становитиме великих труднощів;
- оскільки дріжджі визнані безпечними (протягом тривалого часу їх використовують у хлібопеченні та пивоварінні), їх застосування з метою отримання білків, для медичної практики не потребує додаткових експериментів.

З появою генної інженерії увагу дослідників привернула система культивованих клітин тварин. Особливий інтерес до культур клітин тварин став проявлятися після з'ясування того, що еукаріотичні гени є мозаїчними (складаються з інтронів та екзонів) і лише у системі клітин вищих еукаріот можна досягти правильної експресії таких генів. Крім того, багато білків тварин та їх вірусів синтезуються спочатку у вигляді більш високомолекулярних попередників, які в результаті специфічного протеолітичного процесінгу переходять у так звану зрілу форму.

Клонування і експресія генів у клітинах ссавців досі здійснювалися тільки за допомогою векторів на основі вірусу SV40. Геном цього вірусу (ковалентно замкнена кільцева ДНК) може реплікуватися в клітинах ссавців як самостійно, так і після включення у хромосоми клітини-хазяїна. Процес експресії клонованого гена забезпечується наявністю у вірусі SV40 промоторів, а також ділянки початку реплікації, які функціонують у клітинах ссавців. З цією ж метою використовуються і згадувані раніш човникові вектори, що можуть реплікуватися у клітинах як про-, так і еукаріотів, оскільки мають дві ділянки початку реплікації - по одному на кожний організм-хазяїн. Завдяки такому човниковому вектору вдалося, зокрема, продукувати імунний інтерферон у клітинах мавп.

В даний час в генній інженерії дуже широко використовуються культури клітин і тканин рослин. Сфери застосування їх надзвичайно широкі від отримання вторинних метаболітів рослин і полегшення власне селекційного процесу до створення генетично-модифікованих рослин, як таких, що полегшують вирощування та покращують продуктивність, так і рослин-продуцентів фармацевтичних білків та «їстівних вакцин».

5.2. Особливості експресії еукаріотичних білків в прокаріотичних клітинах

Першими прикладами успішного застосування генної інженерії в біотехнології були синтези низки цінних білків еукаріотів у клітинах *E.coli*. Вище відзначалися суттєві відмінності у структурі про- і еукаріотичних генів. Через ці відмінності пряма експресія генів еукаріотів у *E.coli* пов'язана з однією принциповою перешкодою. Прокаріоти взагалі, і *E.coli* зокрема, не мають біохімічного механізму, здатного здійснювати визрівання (сплайсинг) мРНК. Тому еукаріотичний ген, включений безпосередньо у *E.coli* не буде нормально експресуватися. У *E.coli* транслюватимуться послідовності інтронів еукаріотичного гена мРНК і синтезований поліпептид у загальному випадку різко відрізнятиметься від нормального еукаріотичного білка.

Очевидно, що потрібно якимось чином приготувати бактерійний ген, що відповідає еукаріотичному білку, тобто ген, який би містив тільки нук-

леотидну послідовність, що кодує лише первинну структуру білка і не має жодного інтрону. Ця мета може бути досягнута двома принципово різними шляхами. Один з них зводиться до хімічного синтезу заданої нуклеотидної послідовності. Слід проте підкреслити, що синтетична хімія ДНК поки не дає змоги здійснювати прямий синтез всього гена. Зазвичай синтезують олігонуклеотиди з послідовностями, які частково перекриваються і тому мають здатність до самозбирання у повну дволанцюгову нуклеотидну послідовність. Плануючи синтез гена беруть до уваги ряд інших вимог, пов'язаних з клонуванням та експресією, у тому числі властивості кодонів, відсутність сигналів термінації, наявність сайтів рестрикції.

Для ефективної експресії структурному гену мають передувати нуклеотидні послідовності, які забезпечують шідацію транскрипції (послідовність промотору) та початок трансляції (сайт, що зв'язує рибосому, та стартовий кодон); слідом за структурним геном повинен іти термінуючий кодон, що визначає припинення трансляції, та термінатор транскрипції. До векторів експресії входять всі ці регуляторні послідовності, ділянка початку реплікації, а також хоча б один маркер селекції.

Бажано, щоб застосовуваний промотор був регульованим, тобто включався тільки за певної зміни параметрів середовища, як-от при додаванні індуктора, активації репресора або при зміні температури.

У добре відпрацьованій системі експресії вміст білка, що відповідає клонованому гену, може досягати 70 % від всіх клітинних білків, хоча звичайно ця величина дорівнює 10 - 25 %. Оскільки продукт експресії не виконує жодної корисної для клітини-хазяїна функції, таке суттєве відволікання білоксинтезуючого апарата клітини на синтез не потрібних клітині білків не може не позначитися на швидкості росту клітин і навіть на їх життєздатності. Тому в практичній роботі, як правило, умови культивування в реакторі змінюють так, щоб спочатку експресія клонованого гена була практично пригніченою і, головним чином, забезпечувався швидкий ріст клітинної маси аж до досягнення необхідної щільності клітин, а вже потім експресія здійснювалася б з максимальною швидкістю.

5.3. Суперпродукція і проблеми стабільності штамів

У бактеріальній клітині міститься 2-3 тис. різних білків, кожний з яких становить у середньому 0,04 % від їх загальної маси. При клонуванні й експресії у бактеріях чужорідного гена частка кодованого ним індивідуального білка може досягати 20 %. Клітини, у яких ця величина дорівнює 2 % і більше, називають суперпродуцентами; вони витрачають значну частину енергії і речовин на виробництво непотрібного для них продукту. У результаті швидкість синтезу життєво важливих білків

знижується, і час поділу клітин збільшується, що утруднює промислове культивування суперпродуцентів.

Для забезпечення найбільш ефективної експресії клонованих генів у векторні молекули іноді вбудовують певні фрагменти ДНК, що дозволяють збільшити вихід чужорідного білка. Так, для досягнення більш високого рівня експресії гена HBsAg у клітинах *E. coli* було використано різні за силою промотори (промотори генів *cat*, *cap*, *bla*, *trp* і тандемно розміщені промотори *cap* та *trp*). При цьому рівні синтезу послідовностей HBsAg (даниного і у складі химерних білків) складали у залежності від використаних конструкцій векторів від 100 до 100000 молекул на клітину.

Окремо стоїть проблема щодо часу експресії чужорідного гена у тих випадках, коли трансген вбудовано в хромосому хазяїна. Часто після двох - п'яти поколінь активно транскрибований ген перестає експресуватися. Частіш за все така інактивація трансгена відбувається внаслідок метилювання регуляторних послідовностей, або ж можлива репресія в результаті взаємодії з промотором якихось білків. Активувати подібний виключений промотор не вдається, а спрогнозувати дану ситуацію досить важко, оскільки вона залежить від ряду факторів, у тому числі і від послідовності самого зв'язаного з промотором білка, а також місця інтеграції цього промотора в геном хазяїна. Подолати це небажане явище у якійсь мірі можливо шляхом здійснення багаторазової трансформації і отримання у такий спосіб різних ліній, що несуть однакову векторну конструкцію з різними місцями вбудовування в геном хазяїна.

У всіх описаних випадках утворення великих кількостей такого білка, непотрібного бактерійній клітині, ставить останню у несприятливе положення при відборі. Тому на практиці слід вирішувати складні проблеми стабілізації таких штамів. Вдається їх вирішити створенням жорстких умов відбору, спрямованих на збереження плазмідного вектора, а іноді й гена, що у ньому клонують. Так, для створення оптимальних умов нарощування культури до підхожої концентрації клітин експресію клонованих генів у продуцентів включають тільки на пізніх стадіях ферментації. Цього досягають, зокрема, розміщенням експресованого гена під контроль специфічного оператора основного вектора, а у допоміжному векторі клонують ген репресора. Іншим прийомом є використання індукцйних промоторів. Це перешкоджає постійному синтезу продукту, і він утворюється лише в результаті індукції у певний час клітинного циклу.

Промислове культивування суперпродуцентів утруднюється також і тим, що синтезовані в них чужорідні білки (особливо низькомолекулярні) можуть піддаватися протеолізу. У деяких випадках деградація цих білків попереджується їх суперпродукуванням. Наприклад, при низьких концентраціях Р-галактозидаза, позбавлена на С-кінці 12 амінокислот,

швидко розкладається, а у суперпродуцентах вміст дефектного ферменту досягає 50 % від загального білка. Це пояснюється тим, що за таких умов білок агрегує, що і попереджує його протеоліз. Протеоліз чужорідного білка можна виключити також приєднанням до його N-кінця частини амінокислотної послідовності білка реципієнтної клітини. Це здійснюється *in vivo*, якщо клонований ген є включеним у ген вектора.

Суттєву проблему при культивуванні суперпродуцентів являє і нестабільність рекомбінантних молекул ДНК, сконструйованих на базі плазмідних векторів. Ця нестабільність може бути *функціональною* або *структурною*. Перша виникає внаслідок порушень механізму реплікації або розподілу векторних молекул ДНК по дочірніх клітинах. При цьому вектори і рекомбінантні ДНК виключаються з клітин частіш за плазмиди, на базі яких вони були сконструйовані. Однією з причин такого явища може бути мультимеризація векторів (утворення кільцевих димерів, тримерів і т.д.), що призводить до зменшення кількості репліконів і, як наслідок, до збільшення вірогідності утворення безплазмідних клітин у процесі поділу. Безшкідливі ж клітини при культивуванні швидко витісняють суперпродуценти. В лабораторних умовах такі клітини елімують додаванням у культуральне середовище антибіотиків, якщо вектори містять відповідні маркери антибіотикостійкості. Через дорожнечу цей метод негосподарний для промислового культивування клітин. У промисловості застосовують інші селективні маркери або інтегрують клонований ген у клітинну хромосому.

Структурна нестабільність рекомбінантних молекул ДНК полягає у тому, що вони можуть довільно вкорочуватися і втрачати ділянки нуклеотидної послідовності, в тому числі й клонований ген. Клітини з такими химерами діляться швидше, ніж клітини з вихідними рекомбінантними молекулами ДНК, і в результаті "засмічують" популяцію продуцентів.

Проблема стабілізації рекомбінантних мікроорганізмів не виникає, якщо разом з клонованим геном, клітина-хазяїн отримує певні переваги при відборі. Так, методи генної інженерії дають можливість розширити спектр субстратів, що їх використовує мікроорганізм. Пивоваріння, скажімо, зацікавлене у створенні штамів дріжджів, здатних до секреції ферментів, які руйнують крохмаль та білки. Поява у організмі ряду нових ферментативних активностей може збільшити ефективність обміну його речовин. Нині вже існує можливість конструювання штучних лінійних хромосом дріжджів, що у принципі сприяє здійсненню стабільної модифікації клітин формуванням у них нових шляхів метаболізму.

Введення чужорідного гена у клітини організму-продуцента - це зовсім не єдиний генноінженерний спосіб конструювання нових штамів. Іноді виявляється корисним клонувати власний ген організму. Так, якщо відомо, що певна ферментативна реакція лімітує швидкість якогось метаболічного

процесу, то введення багатьох копій відповідного гена у рекомбінантні плазмиди може ліквідувати це "вузьке місце" завдяки утворенню великої кількості молекул ферменту. Головною цариною застосування "самокловування", як вважається, може стати направлений мутагенез. При звичайному методі отримання нових штамів за допомогою мутагенезу і відбору дії мутагену піддається весь геном організму-годоуцента. При цьому корисні мутації у генах, що нас цікавлять не гарантовані. Мутують також й інші гени, і деякі з таких мутацій негативно позначаються на життєздатності організму-продуцента. Якщо ж клонувати потрібні гени, то їх обробку мутагеном можна провести *in vitro*, а потім повернути ці гени в організм, що і гарантує отримання тільки бажаних мутацій.

5.4. Виділення внутрішньоклітинних чужорідних білків з культур рекомбінантних мікроорганізмів

Коли у L.co/i концентрація чужорідних білків досягає високого рівня, вони акумулюються в клітині у вигляді щільних утворень. Останні являють собою переважно чужорідний білок, але містять і невеликі кількості бактеріальних білків, причому чужорідний білок звичайно перебуває у денатурованому стані. Клітини, що містять такі щільні утворення, часто мають викривлену форму. І, хоча висока концентрація білка в тією чи іншою мірою полегшує процеси виділення, його подальша стабілізація і перетворення на активну форму зумовлює необхідність додаткових технологічних стадій.

Кінцеву продуктивність рекомбінантної культури може лімітувати нестабільність білка, зумовлювана тим чи іншим фактором. Бактерія *E.coli* містить внутрішньоклітинні протеази, здатні певним чином впізнавати невеликі аномальні білки і руйнувати їх. У звичайних клітинах ці протеази виконують корисну функцію, руйнуючи помилково синтезовані білки до амінокислот, які потім можна знов використовувати для синтезу білків. У рекомбінантних системах подібні протеїнази можуть швидко розщепити весь чужорідний для клітини білок. Для підвищення стійкості останнього часто методами генної інженерії синтезують гібридний білок, що складається з білка *E.coli*, до якого (як правило, до С-кінця) приєднується чужорідний білок.

Такий підхід застосовується для стабілізації низки відносно невеликих поліпептидів, у тому числі А- та В-ланцюгів вже розглянутого інсуліну людини.

На рекомбінантні популяції можуть вплинути два різновиди генетичної нестабільності. По-перше, певна частина новоутворених клітин може не містити плазмід. У цьому разі, завдяки так званій *сегрегаційній*

нестійкості, клітини, які не містять плазмід, можуть пригнічувати ріст продуктивних клітин-носіїв плазмід, якщо тільки система не перебуває під тиском відбору. Однак навіть під цим тиском сефегатійна нестабільність знижує загальну швидкість росту та продуктивність рекомбінантної популяції. По-друге, до нездатності клітин синтезувати активний білок призводить *структурна нестійкість*. Причина такої нестабільності може полягати у мутації структурного гена або регуляторних нуклеотидних послідовностей.

Якщо білок синтезується у генетично модифікованому організмі й призначений для ін'єкції людині або тваринам, то він вимагає ретельного очищення. Так, пірогени з *Е. coli*, включаючи й ліпополісахариди (LPS) зовнішньої оболонки бактерії, слід відокремити або інактивувати. (В організмі людини LPS викликає лихоманку в дозах, що перевищують 0,5 нг/кг маси тіла). Крім того, продукт має бути захищений від дії протеаз *Е. coli*. З цією метою при виділенні та очищенні продукту до буферного розчину часто додають інгібітор серинових протеаз - метилсульфонілфторид.

На Рис. 44 наведено послідовність операцій при очищенні інсуліну людини, гормону росту людини та лейкоцитарного інтерферону людини, синтезованих у культурах рекомбінантних *E. coli*. У кожному процесі для досягнення необхідного ступеня чистоти використовували ряд операцій осадження та хроматографічного розділення.

Якщо білок синтезується в рекомбінантній бактерії у великих кількостях, то він часто накопичується у вигляді внутрішньоклітинних структур (вже згаданих тілець включення), що специфічно заломлюють світло. Ці тільца легко відокремити від дезінтегрованих лізисом клітин за допомогою центрифугування. У таких утвореннях, проте, молекули білків зв'язані між собою великою кількістю поперечних зв'язків, тому для виділення білка у нативному стані осад після центрифугування треба розчинити і ренатурувати.

При отриманні біологічно-активних білків з рекомбінантних організмів слід враховувати явище *посттрансляційних модифікацій*. Посттрансляційні модифікації - це модифікації білкових молекул ковалентної природи, які регулюють функції білків, визначають стан їх активності, клітинну локалізацію та динаміку взаємодії з іншими білками. Відомо більш як 300 різних типів посттрансляційних модифікацій; найбільш важливі й вивчені з них - зворотне фосфорилування залишків треоніну, серину та тирозину, а також глікозилування, яке являє собою ковалентне приєднання олігосахаридів до залишків аспарагіну (так званий N-зв'язок) або серину/треоніну (О-зв'язок). Інші розповсюджені модифікації-ацетилювання, метилювання, приєднання ліпідів та утворення дисульфідних зв'язків.

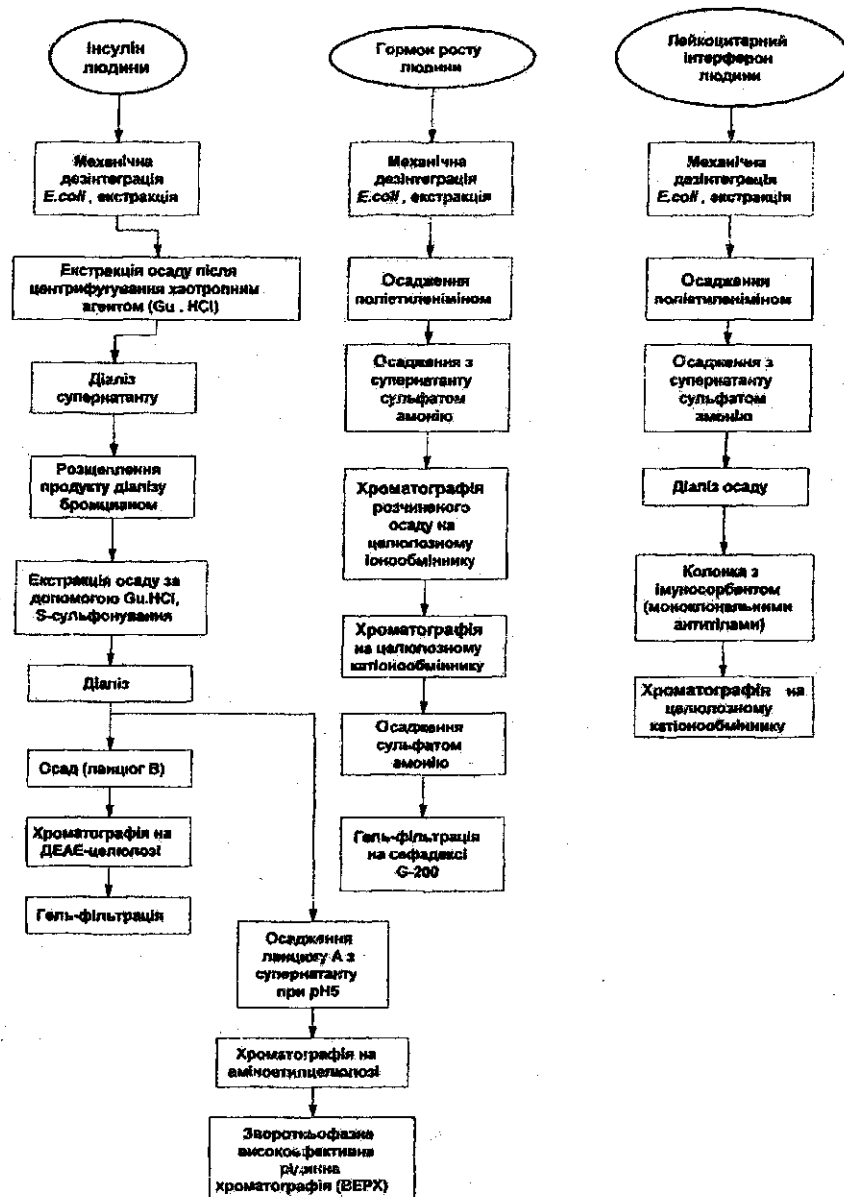


Рис. 44. Головні операції очищення трьох білків людини, синтезованих у культурі рекомбінантних *E.coli*.

Секреція рекомбінантних білків дріжджовими клітинами має в цьому плані свої особливості. Тут глікозилюються тільки секретовані білки, тому для отримання рекомбінантних білків, які для переходу в активну форму слід піддавати N- або O-глікозилюванню, потрібно використовувати системи секреції. Для цього перед кДНК, що кодує потрібний білок, розміщують так званий *пре-про-а-фактор* - лідерну (сигнальну) послідовність гена **СІІ** фактора спарювання дріжджів. Синтезований рекомбінантний білок у цьому разі ефективно виділяється з дріжджових клітин.

Під час транспорту синтезованого білку утворюються дисульфідні зв'язки, відбувається протеолітичне розщеплення й інші посттрансляційні модифікації. Отже, у деяких випадках у середовище потрапляє вже активний білок. Лідерний пептид забезпечує проникнення білка крізь цитоплазматичну мембрану та секрецію; при цьому сам він відщеплюється дріжджовою ендопроїназою, що впізнає дипептид Lys-Arg. Тому кодони Lys та Arg мають розміщуватися безпосередньо перед кДНК, так щоб після відщеплення сигнального пептиду синтезований білок містив на N-кінці потрібний амінокислотний залишок.

Нині використовують цілий ряд інших видів дріжджів, зокрема *Kluyveromyces lactis* - дріжджі, застосовувані для промислового виробництва лактози, *Schizosaccharomyces pombe* - дріжджі, розмножувани діленням, *Yarrowia lipolytica*, які використовують алкани як субстрат, *Pichia pastoris* та *Hansenula polymorpha*, здатні використовувати метанол як єдине джерело вуглецю та енергії.

Контрольні запитання до 5 розділу.

Чому в молекулярній біотехнології застосовується так багато різних біологічних систем?

Чому для білків, що використовуються в медицині краще застосовувати еукаріотичні, а не прокаріотичні системи експресії?

Які технологічні проблеми постають при виділенні рекомбінантних білків?

Коротко опишіть проблеми стабільності штамів рекомбінантних мікроорганізмів при суперпродукуванні білків.

Яке значення мають функціональна та структурна нестабільність штамів при суперпродукуванні рекомбінантних білків?

6. ГЕННО-ІНЖЕНЕРНІ ПІДХОДИ ДО СТВОРЕННЯ ІНТЕНСИВНИХ ТЕХНОЛОГІЙ У РОСЛИННИЦТВІ

Значних успіхів досягнуто в області перенесення ідентифікованих генів у рослинні клітини та одержання трансгенних рослин з одночасним опрацюванням дієвих методів регенерації рослин з культур їхніх клітин.

Нині розроблено декілька ефективних систем переносу ДНК та векторів, які експресуються в ряді рослинних клітин. Одна з переваг цих клітин - їхня тотипотентність: з однієї клітини можна регенерувати цілу рослину. Отже з клітин, сконструйованих генно-інженерними методами, можна отримати рослини, всі клітини яких несуть чужорідний ген чи гени, тобто *трансгенні рослини*. Якщо така рослина цвіте і дає життєздатне насіння, то бажана ознака може передаватись наступним поколінням. Часто для отримання генетично однорідних рослин трансгенні рослини, створені *de novo*, розмножують вегетативно.

На користь отримання трансгенних рослин наводять такі аргументи: 1) введення гена (генів) часто сприяє підвищенню сільськогосподарської цінності та декоративних якостей культурних рослин; 2) трансгенні рослини можуть служити живими біореакторами при маловитратному виробництві економічно важливих білків або інших речовин; 3) генетична трансформація рослин (трансгеноз) дає змогу вивчати дію генів у ході розвитку рослини та інших біологічних процесів.

При введенні в рослину одного чи декількох генів вона може набувати нових генетичних ознак, як от інсектицидна активність, стійкість проти вірусних захворювань і гербіцидів, уповільнення старіння, стійкість проти несприятливих умов довкілля, зміна забарвлення квітів, підвищена харчова цінність тощо.

6.1. Трансформація рослин за допомогою *Agrobacterium tumefaciens*. Ті-плазмід

Можливості створення молекули рекомбінантної ДНК та ідентифікації генів отриманих клонів у поєднанні з результатами досліджень в області хвороби рослин - корневих пухлин, які викликає *Agrobacterium tumefaciens*, дали змогу використовувати цей природний ґрунтовий вектор для зміни рослин. Грам-негативна ґрунтова бактерія *A. tumefaciens* - це фітопатоген, і у процесі свого життєвого циклу трансформує клітини рослин. Така трансформація веде до утворення корончатого гала - пухлини, що порушує нормальний ріст рослин (Рис. 45). До цієї хвороби з серйозними агрономічними наслідками чутливі тільки дводольні рослини.

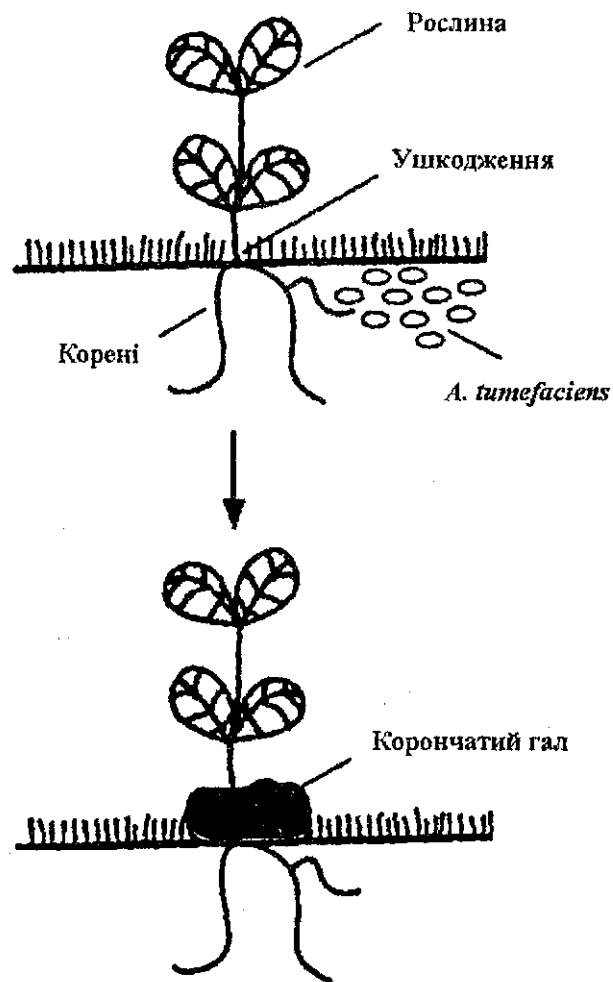


Рис. 45. Інфікування рослин *A. tumefaciens* і утворення корончатого галу

Утворення корончатого гала починається з проникнення, інтеграції до генома рослинних клітин і експресії специфічного сегмента бактерійної плазмідної ДНК, так званої Т-ДНК (від англ. *transforming DNA*). Т-ДНК - це частина плазмиди, яка викликає розвиток пухлини (tumor-inducing plasmid, Ti-плазмиди); таку плазмиду несуть більшість штамів *A. tumefaciens*.

Інфекційний процес починається з прикріплення *A. tumefaciens* до рослинних клітин у місцях ушкодження. Специфічні фенольні сполуки, які виділяє рослина, активують гени вірулентності (*vir*), локалізовані в ділянці Ті-плазмиди завдовжки до 40 т.п.н., розміщені за межами Т-ДНК. Продукти *w*'-генів потрібні для транспорту й інтеграції Т-ДНК у геном рослинної клітини. Існують принаймні сім різних *vz*'-генів.

Після приєднання *A. tumefaciens*, що несе Ті-плазмиду, до рослинної клітини та активації *vz*'-генів Т-ДНК транспортується в клітину за допомогою механізму, аналогічного механізму перенесення плазмідної ДНК з донорської клітини у реципієнтну під час кон'югації. При цьому ДНК перебуває в одноланцюговій формі, і саме у цій формі вона вбудовується у хромосомну ДНК рослини (Рис. 46).

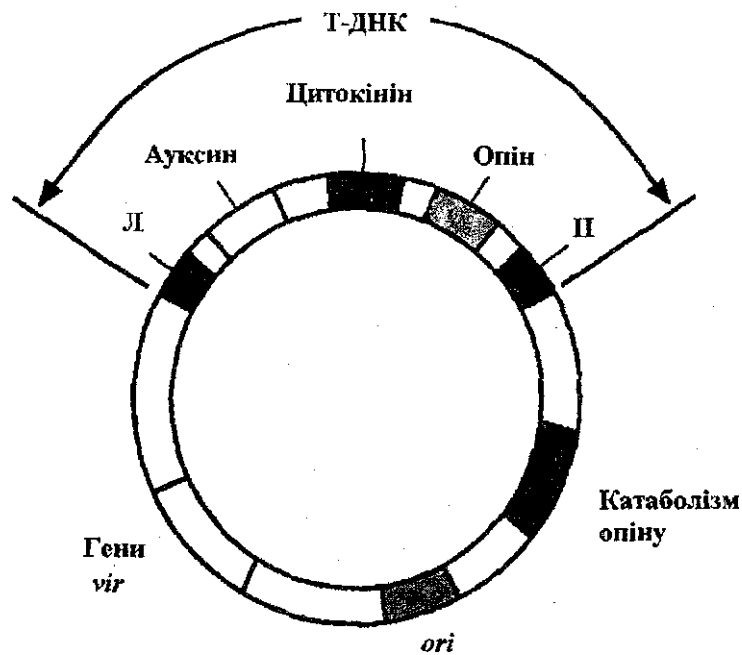


Рис. 46. Генетична карта Ті-плазмиди. Т-ДНК містить гени ауксину, цитокініну та опіну, які транскрибуються і транлюються тільки в рослинних клітинах. За межами Т-ДНК знаходиться кластер *vz*'-генів, ген(и), що кодують фермент(и) катаболізму опіну, та сайт ініціації реплікації (*ipgI*), який забезпечує стабільну підтримку плазмиди в *A. tumefaciens*. Л та П - ліва та права фланкуючі послідовності відповідно.

Найпростіший спосіб використання природної здатності Ti-плазмід до генетичної трансформації рослин передбачає вбудовування нуклеотидної послідовності, що цікавить дослідника, у Т-ДНК, а потім використання Ti-плазмід і *Agrobacterium tumefaciens* для доставки і вбудовування клонованого гена (генів) у геном компетентної рослинної клітини.

На основі Ti-плазмід сконструювали кілька векторів для рослинних клітин. Всі вони організовані подібним чином і несуть такі елементи: 1) селективний маркерний ген, наприклад, ген неоміцинофосфотрансферази, який забезпечує стійкість трансформованих рослинних клітин проти канаміцину; 2) сайт ініціації реплікації, що дає змогу плазміді реплікуватися в *E.coli*. Деякі вектори містять також і сайт ініціації реплікації⁺, *tumefaciens*; 3) послідовність, що праворуч прилягає до Т-ДНК (цей елемент абсолютно необхідний для інтеграції Т-ДНК в клітинну ДНК рослини); 4) полілінкер (множинний сайт клонування) для вбудовування гена у ділянку між межами Т-ДНК.

Оскільки серед генів, підданих клонуванню, немає гена *vir*, вони самі не здатні забезпечувати транспорт та інтеграцію Т-ДНК у клітини рослини-хазяїна. Для вирішення цієї проблеми розроблено два підходи. При першому підході використовують бінарну векторну систему. Бінарний клонувальний вектор містить сайти ініціації реплікації і для *E.coli*, і для *A. tumefaciens*, але не несе генів *vir*, тобто це практично човниковий вектор *E.coli* - *A. tumefaciens*. Всі стадії клонування проводять в *E.coli*, а потім вектор вводять в *A. tumefaciens*. Штам-рецидивент *A. tumefaciens* несе модифіковану неонкогенну ("роззброєну") Ti-плазмиду: вона містить повний набір у/г-генів, але з неї вилучено частину (або всю) Т-ДНК. У цій системі на неонкогенній Ti-плазміді синтезуються продукти у/г-генів, які мобілізують ділянку Т-ДНК бінарного клонувального вектора. Продукуючи білки, що кодується у/г-генами, неонкогенна Ti-плазміда виступає в ролі помічника, сприяючи вбудовуванню Т-ДНК з бінарного клонувального вектора в хромосому ДНК рослини.

При другому підході використовують коінтегративну векторну систему. Векторна ДНК рекомбінує в *A. tumefaciens* з "роззброєною" Ti-плазмідю, Т-ДНК якої не несе пухлинотворних генів, таким чином, що повний клонувальний вектор вбудовується в неонкогенну Ti-плазмиду. Коінтегративний вектор і неонкогенна Ti-плазміда-помічник містять гомологічні послідовності, які утворюють сайт для гомологічної рекомбінації *in vivo*. Звичайно ці послідовності розміщені в Т-ДНК. Після рекомбінації клонувальний вектор стає частиною неонкогенної Ti-плазмід, яка містить *vir*-гени, необхідні для перенесення Т-ДНК у рослинну хазяйську клітину. Єдиний засіб підтримання клонувального вектора в *A. tumefaciens* - використання такої коінтегративної структури. У цій конфігурації генетичну сконструйовану ділянку Т-ДНК можна перенести в рослинні клітини.

За допомогою агробактерій трансформовано велику кількість видів дводольних рослин; це, зокрема, баклажани, картопля, льон, томат, перець, соняшник, ріпак, цукровий буряк, бавовник та ін. Слід, проте, відзначити, що системи перенесення генів за допомогою *A. tumefaciens* ефективно працюють тільки для досить обмеженої кількості рослинних видів. Зокрема, однодольні рослини, включаючи головні зернові культури (такі як рис, пшениця та кукурудза), практично не трансформуються.

6.2. Біолістика

Нижче подано ряд методів трансформації, які в основному застосовують для однодольних рослин. Деякі з цих методів потребують видалення клітинної стінки з утворенням протопластів. Протопласти підтримують у культурі як клітини, що незалежно ростуть. Культивують їх у спеціальному поживному середовищі, де вони утворюють клітинні стінки; з отриманих у такий спосіб повноцінних клітин можна одержати цілу рослину. Крім того, розроблено методи трансформації, які дають змогу вводити клонований ген у невелику кількість клітин рослинної тканини, звідки регенерувати цілу рослину, не потребуючи регенерації з протопластів. Нині для доставки ДНК у клітини рослин найчастіше використовують або вектори на основі Ті-плазмід, або бомбардування мікрочастинками.

Бомбардування мікрочасточками, або *біолістика* - це наразі дуже перспективний метод введення ДНК у рослинну клітину. Золоті або вольфрамові сферичні часточки діаметром 0,4-1,2 мкм покривають шаром ДНК, яку осаджують CaCl_2 , спермідином або поліетиленгліколем, і "вистрілюють" цим комплексом у суспензію клітин зі спеціальною "рушницею", що діє завдяки стисненому повітрю чи гелію, або газам, утворюваним при згорянні пороху. Часточки розганяються до швидкості 300-600 м/с і пробивають клітинну стінку та мембрани рослинних клітин. Звичайно клітини, що знаходяться безпосередньо по центру, гинуть через велику кількість та тиск вольфрамових або золотих частинок, в той час як у зоні 0,6-1 см від центру будуть знаходитись трансформовані клітини.

Потрапивши до клітини, ДНК, що вкриває вказані часточки, за допомогою ще не встановленого механізму інтегрується в рослинну ДНК. Метод бомбардування мікрочасточками дає змогу трансформувати різноманітні рослини, у тому числі однодольні та хвойні, куди не вдається ввести ДНК за допомогою *A. tumefaciens*.

Бомбардування мікрочасточками можна використовувати також для введення чужорідної ДНК у суспензію рослинних клітин, культури клітин, меристематичні тканини, незрілі зародки та пилки багатьох рослин. Крім

того, за допомогою цього методу було транспортовано гени в хлоропласти та мітохондрії. На поверхню мікрочасточок можна осаджувати також плазмідну ДНК. Це дає змогу підвищити частоту трансформації збільшенням кількості плазмідної ДНК.

Методи введення ДНК у клітини рослин

Метод	Коментарій
Використання Ті-плазмід	Відмінна високоефективна система, але придатна не для всіх рослин
Бомбардування мікрочасточками	Використовують для широкого кола рослин і тканин; простий і дешевий спосіб
Використання векторів на основі вірусів	Невелика місткість вектора (800-1000 п.н.) і обмежене коло хазяїв - хрестоцвіті
Пряме введення генів до протопластів рослин	Можна використовувати для введення генів тільки в протопласти рослинних клітин, з яких можуть бути регенеровані життєздатні рослини
Мікроін'єкції	Мають обмежене застосування, оскільки одночасно ін'єкцію можна зробити тільки в одну клітину; маніпуляції можуть проводити тільки спеціалісти
Електропорація	Застосовують для введення генів тільки в протопласти, з яких можна отримати життєздатні протопласти та рослини
Злиття ліпосом	Застосовують для введення генів тільки в протопласти, з яких можуть бути регенеровані життєздатні протопласти та рослини

6.3. Застосування репортерних генів при трансформації рослинних клітин

Для ідентифікації трансформованих клітин треба вміти знаходити чужорідну ДНК, інтегровану в геномну ДНК рослини. Це потребує застосування репортерних генів, які дають змогу або відбирати трансформовані клітини, або оцінювати активність кодованого ними ферменту. Перевірено декілька різних генів, які можна використати як домінантні селективні маркери, а також гени, білкові продукти яких можна знайти за допомогою специфічних методів. Оскільки багато з репортерних генів бактеріального походження, вони оснащені регуляторними послідовностями, що забезпечують експресію їх у рослинних клітинах. Проводячи відбір за домінантним маркером, можна отримати культуру, що містить

тільки трансформовані клітини. Так, у присутності канаміцину виживають тільки рослинні клітини, які синтезують активну неоміцинфосфотрансферазу. Перші експерименти з генетичної трансформації рослин проводили на протопластах з використанням саме цього гена.

Вибір того або іншого репортерного гена диктується характером конкретної роботи. Якщо експресія гена заважає нормальному росту рослини, то його не можна використовувати як репортерний. Крім того, як нині вважають, присутність деяких генів та їхніх продуктів може призводити до забруднення комерційного продукту. У зв'язку з цим гени стійкості проти антибіотиків краще не вводити у сільськогосподарські рослини.

Деякі продукти репортерних генів (як от р-D-глюкуронідазу, а також люциферазу, синтезовану бактеріями та світляками) можна знайти в інтактних рослинних тканинах. У системах трансформації найчастіше використовують ген (і-D-глюкуронідази *E.coli* (GUS-ген). Він кодує стабільний фермент, який каталізує розщеплення р-D-глюкуронідів та звичайно відсутній у рослин. Його активність у трансформованих рослинних тканинах можна виявити за появою синього забарвлення в результаті гідролізу незабарвленого субстрату - 5-бром-4-хлор-3-індоліл-р-В-глюкуронової кислоти.

Переважає більшість рослинних генів локалізована в ядерній ДНК, однак хлоропласти і мітохондрії теж містять гени, що кодують ряд важливих і унікальних функцій. При цьому не всі білки, присутні в цих органелах, заковані в їхній ДНК. Більшість білків хлоропластів та мітохондрій кодуються ядерною ДНК, синтезуються в цитоплазмі, а потім за допомогою спеціального механізму імпортується у відповідну органелу. Є два способи введення специфічного чужорідного білку в мітохондрії або хлоропласти. Перший - це злиття гена, який кодує чужорідний білок, і послідовності сигнального пептиду, що спрямовує білки до органел. Така конструкція може бути вбудована у хромосомну ДНК, і рекомбінантний білок буде імпортуватися у відповідну органелу. Другий спосіб передбачає вбудовування гена, що кодує чужорідний білок, безпосередньо в ДНК хлоропластів або мітохондрій.

6.4. Трансгенні рослини

На початок XXI-го сторіччя у світі проживає близько 5 млрд чоловік. За прогнозами вчених, до кінця цього сторіччя населення Землі може збільшитися до 10 мільярдів. Зауважимо, що все це відбувається на тлі систематичного зниження площі посівних земель. Як прогнати таку кількість людей якісною їжею, якщо і нині у деяких регіонах населення голодує? Втім, якби такої проблеми й не існувало, то людство для

вирішення інших своїх проблем прагнуло б впроваджувати в сільське господарство найбільш продуктивні біотехнології. Одна з них - це саме генна інженерія.

Необхідне подвоєння чи навіть потроєння світового виробництва сільськогосподарської продукції неможливе без застосування трансгенних рослин, створення яких багаторазово прискорює процес селекції культурних рослин, збільшує врожайність, здешевлює продукти харчування, а також дає змогу одержати рослини з такими властивостями, які не притаманні рослинам, отриманим традиційними методами.

Протягом всієї історії сільського господарства (близько 10.000 років) людина заради власної користі покращувала тварин і рослини. Спочатку селекцію базували на явищі природної генетичної мінливості, пізніше люди навчилися штучно створювати комбінаторну мінливість (при гібридизації), а в останні десятиріччя - і мутаційну (при мутагенезі). Принцип селекції завжди залишався незмінним - відбір цінних генотипів. Результат відомий — сучасні види капусти не схожі на своїх далеких предків, а качани кукурудзи сьогодні приблизно в 10 разів більші тих, що вирощувалися п'ять тисячоліть тому. На жаль, коефіцієнт корисної дії селекції дуже низький - з тисяч і десятків тисяч початкових рослин селекціонер виводить всього один-два сорти.

Генна інженерія відкриває перед селекцією рослин нові перспективи, пов'язані з можливістю перенесення в рослини генів від бактерій, грибів, екзотичних рослин та навіть людини і тварин, чого неможливо досягти методами експериментального мутагенезу і традиційної селекції.

Генетичні модифікації	
основних харчових та технічних сільськогосподарських культур	
Культура	Модифікації
Кукурудза	Стійкість проти комах, гербіцидна толерантність
Картопля	Стійкість проти комах, вірусів, підвищений вміст крохмалю
Соя	Гербіцидна толерантність, стійкість проти вірусів
Ріпак	Покращений склад одії, гербіцидна толерантність
Капуста	Стійкість проти пестицидів
Суниця	Підвищена придатність до зберігання
Кавун	Те саме
Пшениця	Гербіцидна толерантність, покращення вмісту вуглеводів
Соняшник	Покращений склад олії
Овочі для салату	Стійкість проти комах, подовжене зберігання
Яблука	Стійкість проти хвороб, тривале зберігання

Виділяють три етапи у створенні нових форм рослин. Перший - створення рослин з певною новою властивістю стійкості: проти вірусів, паразитів чи гербіцидів. Наприкінці 1980-х рр. отримали трансгенні рослини основних сільськогосподарських культур з ключовими ознаками стійкості. Для них характерне те, що та чи інша ознака стійкості обумовлена наявністю лише одного цільового гену в їхніх геномах. Першими були такі рослини, як кукурудза, картопля, цукровий буряк. Використання генетично модифікованих ліній цих рослин в сільському господарстві веде до значного зменшення використання пестицидів і відповідно до зниження залишкової забрудненості рослинної сировини хімічними речовинами, що протягом уже багатьох років залишається дуже серйозною проблемою безпеки харчування людини.

Зараз відбувається другий етап - створення рослин з новими агрономічними функціональними властивостями. В першу чергу йдеться про змінений склад олій в олійних культурах, а також фрукти та городину з підвищеним вмістом вітамінів, зернові культури з підвищеною поживністю зерна тощо. Один з прикладів цього - так званий «золотий рис», до генома якого вбудовано гени, необхідні для синтезу бета-каротину, а також гени, за допомогою яких підвищується вміст заліза в зернах. Завдяки цьому створено реальні передумови вирішення проблеми дефіциту заліза та вітаміну А в раціоні багатьох мільйонів людей, що страждають на анемію.

Сьогодні вже створюються рослини третього етапу. Йдеться про деякі принципово нові напрямки - рослини-вакцини, рослини-фабрики з виробництва індустріальних продуктів, таких як різні види пластмас, барвників (індіго), технічних масел для двигунів. Фактично маємо справу зі створенням нової екологічно більш чистої промисловості для виробництва основних технологічних продуктів.

Один з прикладів розробок у цьому напрямі - створення трансгенних рослин сої та ріпаку зі зміненим вмістом ненасичених жирних кислот. Відомо, що якість і користь рослинних жирів залежить від вмісту пальмітинової, стеаринової, олеїнової, лінолевої кислот. Так, жири, збагачені олеїновою кислотою, стійкі проти окиснення, мають кращий запах і корисніші для здоров'я, а жири, збагачені лінолевою та ліноленою кислотами, мають гірші органолептичні характеристики.

Трансгенні рослини сої, які несуть ген, що кодує антисенсову омега-3-десатуразу (каталізує синтез лінолевої кислоти з лінолевої), характеризувалися зниженим вмістом лінолевої кислоти. У трансгенних сої та ріпаку з геном омега-3-десатурази знижено вміст лінолевої і підвищено вміст олеїнової кислоти. Ріпак з внесеним геном агдальтїоестерази мав у насінні підвищений вміст пальмітинової та стеаринової кислот. Нині отримують трансгенні рослини сої, що синтезують інші жирні масла, використовувані у промисловості.

Людина та ссавці для повноцінної життєдіяльності потребують наявності у раціоні восьми незамінних амінокислот. Але жоден з їстівних рослинних білків не містить збалансованого набору цих амінокислот. Білки з насіння злаків бідні на лізин і триптофан, тоді як у білках бобових не вистачає сірковмісних амінокислот метіоніну і цистеїну.

Змінюючи регуляцію біосинтезу амінокислот, можна змінити їхній вміст у білках. Так, у рослини нуту ввели ген треоніндезамінази. При цьому вміст треоніну, метіоніну і лізину підвищився в декілька разів.

Вміст лізину й метіоніну у сої та кукурудзі підешпували введенням генів нових запасних білків, а також модифікацією генів, які контролюють основні етапи біосинтезу запасних білків.

У верхівки пагонів і щитки незрілих зародків сорго мікробомбардуванням вводили мутантний ген, що кодує нечутливу до ретроінгібування дигідроіколінатсинтазу - фермент біосинтезу лізину. Добір трансформантів на S-аміноетилцистеїні (аналог лізину) і (або) антибіотику генеттнін дав змогу отримати рослини сорго зі зміненим вмістом лізину.

Наразі найвищі шанси першочергового використання генної інженерії у рослинництві передбачаються у трьох головних напрямках: реакції на гербіциди, стійкість проти шкідників і хвороб та якість продукції.

Сучасні гербіциди значно ефективніші і екологічно безпечніші за своїх попередників, але вони діють на всі рослини загалом, як культурні рослини, так і бур'яни; тому раніше гербіциди в основному використовувалися або до висадки рослин, або після збирання врожаю. З появою технології генетичної трансформації стало можливим вбудовувати в рослини гени, які роблять їх нечутливими до таких гербіцидів. Таким чином, після обробки гербіцидом бур'яни гинуть, а трансгенні культури - ні.

Грам-позитивна ентомопатогенна бактерія *Bacillus thuringiensis* експресує кристалічні білки-прототоксини (Vt-токсини), яким притаманна значна інсектицидна дія. Vt-токсини асоційовані зі спорами бактерій. Коли спори потрапляють у кишечник комах, прототоксини в умовах лужного середовища протеолітично розщеплюються та перетворюються на активні токсини. Останні зв'язуються зі специфічними рецепторами та утворюють пори в мембранах кишкових клітин. Це призводить до порушення мембран, лізису клітин і руйнування кишкового епітелію, спричиняючи загибель комах. За даними Агентства з охорони навколишнього середовища США, при годуванні теплокровних таким токсином у значних кількостях (більш 5 г/кг ваги) не виявлено його токсичного, алергенного, канцерогенного чи тератогенного ефекту. Токсин не позначався також негативною дією на рибу, безхребетних та корисних комах.

Базуючись на цих спостереженнях, дослідники створили сорт трансгенної картоплі, який містить ген такого токсину у поєднанні з промотором

35S-PHK CaMV вірусу мозаїки кольорової капусти (*cauliflower mosaic virus*) та чотирма тандемно розташованими енхансерами. Цей сорт характеризувався 100 % стійкістю проти личинок метеликів. При цьому кількість копій гена в трансгенних рослинах коливалась від 1 до 10.

Стійкість рослин проти гербіцидів може бути результатом точкових мутацій генів, які кодують білок-мішень для даного гербіциду, що призводить до зміни спорідненості гербіциду з його ферментом-мішенню. Такі мутації описані за стійкістю проти гербіцидів, що діють на фотосинтетичний апарат рослин і біосинтез амінокислот. Ці мутації стають причиною виникнення на полях стійких бур'янів, що призводить до необхідності ротації гербіцидів через певну кількість років. Стійкість проти гербіцидів може бути пов'язана також з ампліфікацією генів стійкості, що призводить до гальмівного впливу на молекули гербіциду.

Фермент ацетолактат-синтаза (ALS) - це мішень для ряду гербіцидів. Проведено клонування гена ALS, його мутагенез *in vitro* та *in vivo* і трансформацію гербіцидостійкого гена в рослинах ріпаку за допомогою агробактерій. Добір за стійкістю проти канаміцину і безпосередньо за стійкістю проти гербіцидів привів до появи гербіцидостійких рослин.

Серед найпоширеніших реакцій рослин на атаку патогенів описано посилення клітинної оболонки, синтез вторинних метаболітів (в тому числі антибіотиків типу фітоалексинів), а також синтез широкого спектру захисних поліпептидів з антимікробною активністю. Завдяки цьому у багатьох видів рослин у відповідь на дію патогенів виникає системно індукована стійкість (SAR), вплив якої може тривати тижнями й місяцями. Ідентифіковано ряд генів SAR.

Останніми роками для отримання трансгенних рослин, стійких проти хвороб, розробляють такі підходи, як індукція SAR за допомогою деяких хімічних сполук, а також синтез антигрибкових білків, що активують продукцію низькомолекулярних фунгітоксичних сполук (таких як фітоалексини та дефензини).

У середині 1980-х рр. створили так звану трансгенну CP-рослина, стійку проти вірусів. Ця стійкість базувалася на перенесенні в її геном вірусного гена, що кодує білок капсиду, CP (coat protein). Зараз методика отримання трансгенних рослин, стійких проти вірусів, базується головним чином на трьох напрямках: крім створення трансгенних CP-рослин, такі трансгенні рослини отримують вбудовою у геном рослини реплікаторних генів чи антисенсів РНК вірусів та МР-білків вірусу, що є для останнього специфічними білками руху (movement proteins) в рослинному організмі.

У 2002 р. 75 % всіх вирощуваних трансгенних рослин містили ген стійкості проти гербіцидів, 17 % - ген стійкості проти шкідників і майже 8 % - по два гени стійкості. Але сьогодні пріоритети у створенні рослин,

яким властиві ті чи інші ознаки, змінилися. Якщо у 1990-і рр. в основному працювали над рослинами, володіючими корисними властивостями з точки зору технології їх вирощування, - а саме такі рослини зараз вирощуються на полях, - то в даний час основна увага приділяється поліпшенню споживацьких властивостей. За прогнозами, такі поліпшені культури включатимуть і рослини, що синтезують деякі медикаменти.

Існують розробки, спрямовані на те, щоб покращити зберігання плодів. Так, відомо, що фермент полігалактуроназа призводить до розм'якшування плодів після їх дозрівання. Замість генів, що гальмують синтез цього ферменту, пропонують вводити гени, що загальмовують синтез етилену, прискорюючи у такий спосіб дозрівання фруктів і деякої городини.

При зберіганні картоплі при температурі нижче 8 °C відбувається накопичення відновлених цукрів, що робить її непридатною для приготування чіпсів. Ці відновлені цукри утворюються при гідролізі крохмалю під дією α -амілази. Отримано трансгенні рослини картоплі з антисенсовою конструкцією гена, що кодує α -амілазу. Одна з таких трансгенних ліній характеризується значним зниженням вмісту відновлених цукрів і активності α -амілази при зберіганні бульб при температурі 4 °C та 12 °C.

Проводяться також розробки для створення рослин, стійких проти стресових факторів довкілля. Найперспективніші розробки по отриманню соле- та посухостійких трансгенних рослин; наприклад, одержано експериментальні рослини тютюну, які можуть вкорінюватися і рости при концентрації солі в середовищі 20 г/л (350 мМ), а трансгенний рис з інактивованим геном *Fad1* (білок, впливає на метаболізм жирних кислот) може рости при підвищених температурах і витримувати до двох годин при 47 °C. У найближчому майбутньому завдяки генно-інженерним прийомам очікуються успіхи в підвищенні ефективності фотосинтезу рослин.

Ведуться роботи над створенням «розумних рослин», що почнуть світитися у випадку нестачі води або при перших ознаках захворювання. На основі технології генетичної модифікації рослин створюється пластмаса, яка руйнується, потрапивши в довкілля. Для цього в олійні культури вводять гени бактерій, що надають можливості отримувати цю пластмасу в складі біомаси рослин.

Рослини дають велику кількість біомаси; вирощування їх не вимагає великих затрат праці; тому постала проблема створення трансгенних рослин, здатних синтезувати комерційно цінні білки та інші речовини. На відміну від рекомбінантних бактерій, які культивують у великих біореакторах, для вирощування сільськогосподарських культур не потрібно великих коштів на обладнання та висококваліфікований персонал. Ще одна перевага рослин-продуцентів фармакологічних білків - висока якість отриманого продукту і

майже повна відповідність гліколізації білків до тієї, яка відбувається в організмі людини. Головні проблеми, які можуть виникнути при використанні рослин як біореакторів - це низький рівень експресії перенесених генів, можливі ускладнення з виділенням продукту введеного гена з рослинної маси і порівняно висока вартість виробництва порівняно з продуктом, отримуваним за допомогою мікроорганізмів. Відносно останнього пункту слід відмітити, що у випадку, коли необхідні білки не дуже великі і посттрансляційно не модифікуються, то їх напрацьовують в газокаріотичних системах. В інших випадках підшуковують придатних продуцентів серед еукаріот. Вже створено трансгенні рослини-продуценти моноклональних антитіл, функціональних фрагментів антитіл і полімеру полі-Р-оксибутирату, з якого виготовляють матеріал, який піддається біодеградації. На даний час вважаються перспективними розробки по створенню так званих «їстівних вакцин». «Їстівні вакцини» - це трансгенні рослини-продуценти епітопів хвороботворних агентів людини і тварин. До переваг і доцільності створення таких вакцин відносять економічність, безпеку і доступність для широкої імунпрофілактики населення. Вже створено трансгенні рослини тютюну, картоплі, салату, помідорів, кукурудзи та ін., які синтезують антигени різноманітних інфекційних патогенів (холерного вібріону, вірусів сказу, гепатиту В, ящуру тощо).

За останні декілька років у провідних біотехнологічних центрах світу створено трансгенні рослини-продуценти гормонів, цитокінів, факторів росту, ферментів та сполук, застосовуваних у фармакології. Ось деякі з таких сполук: сироватковий альбумін, епідермальний фактор росту, еритропоетин, а-1-антитрипсин, апротонін, інтерлейкін-10, кальцитонін, а-інтерферон. Усі вони за біологічною активністю не поступаються аналогам, отриманим в інших системах експресії. Очікують, що одержання деяких рекомбінантних білків, наприклад, глікоцерброзидази (препарат вводять при синдромі Гоше) з трансгенних рослин дасть змогу значно знизити її вартість. Слід відмітити, що незважаючи на значні досягнення в області продукування рекомбінантних білків медичного значення в рослинах, цей напрямок знаходиться лише на початковій стадії свого розвитку. Вважається, що в недалекому майбутньому рекомбінантні препарати, які отримуватимуть з генетично модифікованих рослин, замінять дорогі аналоги, одержані з тварин та бактерій, на фармацевтичному ринку.

Нещодавно розроблено технологію, яка дає змогу швидко та у значних кількостях напрацьовувати в рослинах білки і невеликі молекули після зараження рослин генетично модифікованими вірусами із вбудованими чужорідними генами тих чи інших білків. Технологія вважається надзвичайно перспективною, оскільки сприяє зміні біосинтетичних процесів у рослинах без довготривалих і затратних маніпуляцій з рослинним геномом.

Повідомляється про успішне введення в генну структуру звичайного бавовника гена рослин з квітами блакитного кольору. Завдяки цьому з'явилася реальна можливість революціонізувати ринок джинсової тканини - виробництво барвників припинить скидати докілья отруйні стічні води.

Експерименти проводяться й у іншій області - області пахощів. Деякі не люблять аромат троянд, вважаючи його занадто нудотним; для таких людей намагаються вирощувати троянди, що пахнуть лимоном. У принципі можна виростити троянду з запахом парфумів провідних парфумерних фірм - маніпуляції з генами, що відповідають за запах, дозволяють вивести рослини з будь-яким ароматом.

Генна інженерія рослин розвивається дуже швидкими темпами. Перша трансгенна, або генетично модифікована рослина була отримана у 1984 р., а через два роки у США та Франції вже проводилися польові випробування. Площі, зайняті трансгенними рослинами, стрімко зростають: з 1,7 млн га у 1996 р., коли почався обробіток їх у промислових масштабах, до 58,7 млн га у 2002 р., що склало близько 4,4 % всіх орних площ світу. Відмітимо, що 99 % цієї площ, де вирощують трансгенні культури, займають чотири з них - соя, бавовник, кукурудза і рапс. Вирощуються також генетично модифіковані картопля та представники родини гарбузових.

За останні 15 років пройшли польові випробування 25.000 різних трансгенних культур, з яких 40 % стійкі проти вірусів, 25% - проти гербіцидів, а 25% - проти інсектицидів. У 2000 р. ринок трансгенного зерна склав 3 млрд дол., у 2010 - повинен скласти 25 млрд дол.

Контрольні запитання до 6 розділу.

Чому Ті-плазмід з *Agrobacterium tumefaciens* підходить для створення вектора - переносника чужорідного гена в геном рослини?

Чим відрізняється бінарна й коінтегративна векторні системи?

Що таке репортерні гени і як вони використовуються при трансформації рослинних клітин?

У чому полягає метод біобалістики, що використовується для трансформації рослин?

Запропонуйте стратегії створення рослин, стійких до комах-шкідників.

Як можна забезпечити стійкість рослин до специфічних вірусів, до гербіцидів?

Як за допомогою генної інженерії підвищити вміст певної амінокислоти в рослинному білку?

Опишіть можливості використання рослин як продуцентів рекомбінантних білків медичного значення.

7. ГЕННО-ІНЖЕНЕРНІ ПІДХОДИ ДО СТВОРЕННЯ ІНТЕНСИВНИХ ТЕХНОЛОГІЙ У ТВАРИННИЦТВІ

Головні прийоми селекційно-племінної роботи, які використовуються нині (відбір тварин з бажаними властивостями, схрещування - відбір тощо) вимагають великих затрат праці та часу. При схрещуванні тварин важко прогнозувати батьківські ознаки в потомстві, що подовжує час вдосконалення наявних та створення нових порід.

Перспективно проводити селекційну роботу вже на ембріонах, оскільки в яйцеклітинах та ранніх ембріонах зосереджено всю спадкову інформацію майбутньої особини. Маніпулюючи ними, можна формувати бажані ознаки дорослих організмів. Генетичні зміни можуть стати результатами операцій як з цілими яйцеклітинами та ембріонами, так і з їхніми клітинами, ядрами та окремими генами. Цей напрямок визначається як *ембріогенетична інженерія* тварин. При цьому, якщо при клонуванні з використанням клітин та ядер отримують лише копію генетично потрібної тварини, методи, пов'язані з введенням окремих генів, дають можливість отримувати так званих *супертварин*.

У природі існує два види розмноження: *статеве* та *вегетативне*. Вегетативне розмноження притаманне мікроорганізмам, рослинам і примітивним тваринам. У природі при такому розмноженні нова особина розвивається з якоїсь частини тіла батьківського організму за участю великої кількості його клітин і генетично цей організм повторює.

Більшість тварин у процесі еволюції втратили здатність до вегетативного розмноження й розмножуються тільки статеве. При цьому відбувається рекомбінація генів батька й матері, постійно підтримуючи генетичне різноманіття всередині виду. Промислове тваришництво потребує генетично ідентичних популяцій, стандартизованих за ознаками. У зв'язку з цим для задоволення потреб практики визначились такі напрямки робіт: 1) отримання тварин з виключенням генів одного з батьків; йдеться про *партеногенез*, *гіногенез* та *андрогенез* (*партеногенез* - розвиток особи з яйцеклітини без участі сперматозоїда, містить тільки материнські гени; *гіногенез* - розвиток особи з запліднених яєць (зиготи), з яких видаляють чоловіче ядро; *андрогенез* - розвиток із заплідненої яйцеклітини, з якої виділяють жіноче ядро; у всіх випадках отримана особина містить гени тільки одного з батьків); 2) отримання однойцевих (монозиготних) близнюків; 3) отримання тварин з яйцеклітин, ядра яких замінені генетично тотожними ядрами соматичних клітин однієї особи (яку потрібно розмножити).

Великі можливості відкриваються для використання методу клонування ссавців, який вже застосовується в ембріології корів та овець.

Ембріони (на стадії до 64 клітин) роздіблюють і підрощують до утворення ембріонів, а потім пересаджують самицям. Виходить, що кожен окрему клітину такого ембріона можна репрограмувати у стан одноклітинної зиготи й отримати численні копії генетично однакових тварин. Таким чином з одного ембріона отримують кілька десятків тварин.

Найрозвинутіший нині напрямок у біотехнології тварин - трансплантація ембріонів. Він дає змогу передусім прискорити розведення тварин з високими спадковими якостями, а також зберегти цінний генофонд, оскільки отримані ембріони можна консервувати замороженням і зберігати як завгодно довго. За допомогою цього методу вже отримують до 80 ембріонів з однієї корови за два роки.

Генетичне покращання тварин пов'язане з розробкою технології трансплантації ембріонів і методів мікроманіпуляцій з ними (отримання одностайних близнюків, міжвидова пересадка ембріонів, отримання химерних тварин, клонування тварин при пересадці ядер ембріональних клітин в яйцеклітини з видаленим ядром). Такі маніпуляції виконують за допомогою спеціального приладу, що отримав назву мікроманіпулятор (Рис. 47).

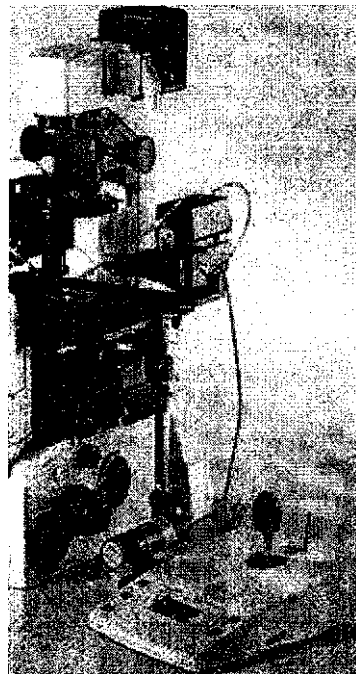


Рис. 47. Мікроманіпулятор - прилад, що використовується для робіт з клітинної інженерії

У 1997 р. шотландським вченим вперше вдалося отримати найвідомішу в світі вівцю на ім'я Доллі з такої яйцеклітини, куди пересадили ядро соматичної клітини дорослої тварини. При цьому ядра з клітин молочної залози 6-річної дорослої вагітної вівці (у такому випадку ці клітини здатні краще ділитися) однієї породи пересадили у попередньо очищену від власних ядер яйцеклітину вівці іншої породи, а зародок у ході його розвитку помістили до вівці третьої породи. Після декількох сотень дослідів одна з подібних маніпуляцій вдалася. Ця робота відкрила широкі можливості для клонування елітних порід замість багаторічної селекції. Відтоді отримано велику кількість клонованих тварин (корови, кози, свині) шляхом пересадки ядер різних соматичних клітин в енукейовані яйцеклітини. Але великі затрати праці, низька ефективність і часті виникнення різних відхилень у таких тварин не дають змоги поставити таке клонування на промислову основу. Високий рівень пре- і постнатальної смертності клонованих тварин, а також появу різних аномалій пов'язують з епігенетичною пам'яттю (генний імпринтинг, метилювання ДНК). Тому зараз ці роботи мають суто науковий інтерес; ймовірно, що коли будуть розроблені ефективні методи повного перепрограмування високо диференційованих клітин ссавців, то можна буде дійсно говорити про клонування вищих хребетних (Рис. 48).



Рис. 48. Перший у світі клонований організм - вівця Доллі

Успіхи у введенні чужорідних генів у клітини ссавців і можливість створити генетично ідентичних тварин перенесенням ядра з ембріональної

клітини в яйцеклітину з вилученим ядром дали змогу включати в хромосомну ДНК вищих тварин окремі функціональні гени або цілі їхні кластери. Стратегія, використовувана при цьому така: 1) клонований ген вводять до ядра заплідненої яйцеклітини; 2) інокульовані запліднені яйцеклітини імплантують в реципієнтами жіночий організм; 3) відбирають нащадків, які розвилися з імплантованих яйцеклітин та містять клонований ген у всіх клітинах; 4) схрещують тварин, які несуть клонований ген у клітинах зародкової лінії, і отримують нову генетичну лінію. Так, у 1999 р. американські вчені виділили ген, який експресується у курячих ніжках і відповідальний за їхній ріст. Ген пересадили в крила курчат і через кілька місяців були отримані чотириногі кури. Вважається, що ці тварини будуть мати велике значення в тваринництві майбутнього.

Ідею генетичної зміни тварин введенням генів у запліднені яйцеклітини практично реалізували у 1980-х рр. У 1986 р. австралійські вчені створили трансгенну вівцю шляхом введення в ембріон гена, що відповідає за синтез гормону росту овець. Відтоді трансгенез став потужним інструментом для дослідження молекулярних основ експресії генів ссавців та розвитку їх, для створення модельних систем, що дають змогу вивчати хвороби людини, а також для генетичної модифікації клітин молочних залоз тварин з метою отримувати з молоком білки, важливі для медицини. Запропонований навіть новий термін "*фармінг*" для позначення процесу отримання з молока свійських тварин аутентичних білків людини та фармацевтичних препаратів (від англійського "*pharmaceutic*"). Використання молока доцільне тому, що воно утворюється в організмі тварини у великій кількості; його можна надавати при потребі без шкоди для тварини. Використання таких трансгенних тварин дозволить вирішити ще одну причетну до цього проблему - проблему очищення лікувальних білків. Навіть якщо після очищення в препараті залишаться домішки, це будуть нетоксичні для людини білки молока.

Сьогодні найбільша частина експериментальних тварин, що виділяють трансгенні продукти у молоко - це миші. Миші з їхнім коротким періодом вирощування та вагітності - зручний об'єкт для аналізу експресії генної конструкції; на мишах відпрацьовують ті методики, які потім використовують для отримання промислових трансгенних тварин-біореакторів. З використанням цієї моделі зараз отримано цілий ряд важливих з медичної точки зору білків людини; це, наприклад, антитрипсин, інтерферон, фактор згортання крові IX, сироватковий альбумін, трофобластин, урокіназа, супероксиддисмутаза, деякі імуноглобуліни тощо. Щодо більш крупних трансгенних ссавців, які виділяють білкові продукти трансгенів у молоко, то на сьогодні список їх порівняно невеликий; кролі синтезують інтерлейкін та тканинний

активатор плазміногену, вівці - антитрипсин та фактор згортання крові IX, кози - тканинний активатор плазміногену. Відсутність у цьому списку корів, найбільш перспективних продуцентів білків людини, пояснюється тим, що для отримання трансгенної корови потрібен відносно довгий час. Ведуться також роботи по створенню корів, що продукують молюч-0 за своїм складом максимально наближене до материнського молока г:мд,и«и. Для цього дослідники намагаються виключити декілька генів корови та ввести в її геном декілька генів людини.

У Росії виведено породу овець, що виробляють разом з молоком також сичужний фермент, необхідний у виробництві сиру.

Серед цього переліку експериментальних тварин-біореакторів, виходячи з кількісної необхідності конкретного лікувального білку, природно-економічних факторів та релігійних традицій, наразі надають перевагу трансгенним козам. Для цього навіть спеціально виводять нові породи кіз, наприклад BELE^R, яка розмножується цілорічно, рано починає давати хороші надой молока. На основі таких порід вже отримано цілий ряд трансгенних тварин-біореакторів і створено експериментальні стада цих тварин.

Зусилля щодо створення великої кількості експериментальних трансгенних кіз, що з молоком продукують різні фармацевтичні білки, в найближчому майбутньому можуть увінчатися успіхом. Зараз Європейське агенство з контролю за якістю медикаментів (EMA) завершує опрацювання документації щодо процедур, необхідних для видачі дозволу на застосування людського антитромбіну, отриманого з молока трансгенних кіз. Якщо препарат під назвою ATgen отримає «добро», то буде поставлено крапку в 15-річних дослідженнях фірми GTC Biotherapeutics; на черзі будуть інші препарати. На сьогодні методика отримання лікувальних препаратів з молока трансгенних кіз поки не викликала настільки бурхливих дебатів, якими зустріли появу генетично модифікованих сільськогосподарських культур, що також важливо. Тому даний напрямок відносять до найперспективніших біотехнологій XXI сторіччя, а найближче майбутнє сьогодні залежить від того, яке рішення буде прийняте в Європі.

Зараз у світі розробляються такі трансгенні проекти, як, наприклад, шовкова вівця (що даватиме шовк замість вовни), коза, в молоці якої міститься інтерферон, бик, що несе людський ген лактофєрину (останній кодує білок, який покращує сон немовлят; у коров'ячому молоці такого білку немає).

Ще одним перспективним напрямком робіт з клонування тварин - отримання тваринних органів, які можна буде використовувати для трансплантації людині. У світі існує суттєва нестача донорських органів - нирок, сердець, підшлункових залоз, печінки тощо. Багато хворих, які протягом багатьох років сподіваються на пересадку нирки або серця, так і

не встигають дочекатися своєї черги. Вирішенням цієї проблеми могла б бути пересадка людині органів від тварин. Вважається, що органи свині найбільш підходять людині за своєю будовою, розмірами і багатьма біохімічними показниками. Але такі пересадки неможливі, оскільки ці органи будуть негайно відторгнуті імунною системою пацієнта. Щоб цього уникнути, дослідники намагаються сконструювати трансгенну свиню, у якої вилучено власні гени гістосумісності і замість них введено гени гістосумісності людини. Загалом ідею про створення конвеєрного виробництва трансгенних свиней, які за графіком постачатимуть такі органи для пацієнтів, спеціально підготовлених для прийому цих органів, вважають дуже плідною.

Існує, нарешті, ще й такий напрямок, як створення тварин-генетичних моделей спадкових захворювань людини. У випадку таких захворювань часто важко встановити конкретну причину захворювання, співвіднести знайдені у пацієнта генетичні дефекти з його діагнозом. В останні роки для вирішення цих питань все частіше використовують трансгенні моделі спадкових захворювань людини. Після того, як знайдено ген, ймовірно відповідальний за дане захворювання, можна створити два типи модельних тварин: миші з функціональним трансгеном і миші, у яких втрачено функцію даного гена. Перший тип - це класичні трансгенні миші, в геном яких введено ген людини, відповідальний за конкретне захворювання. Якщо схильність до захворювання залежить від наявності в геномі однієї з алелей, то для перевірки цієї гіпотези створюються лінії трансгенних мишей, що несуть різні алелі даного гена. На цих моделях можна досліджувати вплив кількості копій гена та рівня його експресії на прояв захворювання, а також розробляти нові методи лікування. Другий тип модельних тварин - це миші, у яких вимкнено ген, аналогічний тому, який викликає дане захворювання у людини. На такій моделі досліджують конкретні функції генів, що особливо важливо для аналізу причин мультигенних захворювань.

Трансгенні технології вперше розроблялися і потім вдосконалювалися на мишах. З початку 1980-х рр. у різні лінії мишей вводили сотні генів. Введення чужорідної ДНК мишам можна здійснювати трьома різними методами: за допомогою ретровірусних векторів, що інфікують клітини ембріона на різних стадіях його розвитку перед імплантацією у самку-реципієнта; мікроін'єкцією у збільшене ядро спермію заплідненої яйцеклітини; введенням генетично модифікованих ембріональних стовбурових клітин у попередньо імплантований ембріон на ранніх стадіях розвитку.

Після введення ДНК від 25 до 40 яйцеклітин імплантують мікрохірургічним шляхом у "сурогатну" матір. Для ідентифікації трансгенних тварин виділяють ДНК з шматочка хвоста і тестують її на наявність трансгену за

допомогою блот-гібридизації за Саузерном. Щоб визначити, чи знаходиться трансген у клітинах зародкової лінії тварин, трансгенну мишу схрещують з іншою мишею. Далі можна схрещувати нащадків для отримання чистих (гомозиготних) трансгенних ліній.

Клітини, виділені з ембріонів на стадії бластоцисти, можуть проліферувати в культурі, зберігаючи здатність до диференціювання у будь-які типи клітин, в тому числі й у клітини зародкової лінії, при введенні в інший ембріон на стадії бластоцисти. Це - вже описані раніш ембріональні стовбурові клітини. Такі клітини в культурі легко модифікувати методами генної інженерії, не порушивши їхньої плюрипотентності. Наприклад, у певний сайт несуттєвого гена в мишачому геномі можна вбудувати функціональний трансген. Потім можна відібрати змінені клітини, культивувати їх та використовувати для отримання трансгенних тварин. Це сприяє уникненню випадкового вбудовування, характерного як для методів мікроін'єкцій, так і для ретровірусних векторних систем.

Плюрипотентність можна виявити, якщо перенести ядро тестованої клітини у яйцеклітину з вилученим ядром і потім дослідити здатність останньої до розвитку й утворення життєздатного потомства. За допомогою такого прийому отримали згадану трансгенну вівцю Доллі та життєздатні особини великої рогатої худоби. Цим однозначно довели плюрипотентність ядра диференційованої дорослої клітини.

Головна проблема, яку слід вирішити для того, щоб уможливити створення трансгенних тварин за допомогою методу переносу ядер - це збереження плюрипотентності клітин у безперервній культурі. Якщо це вдасться, то генетична зміна таких клітин і створення трансгенних організмів стане майже рутинною процедурою.

Основні побоювання, пов'язані з трансгенними тваринами, такі: а) вони можуть синтезувати фізіологічно активні речовини, потрапляння яких у їжу не бажане (наприклад, гормони, що стимулюють ріст, лактацію тощо); активність трансгена може викликати в тварин синтез шкідливих речовин або репродукцію небажаних вірусів; в) вони можуть «випадково» передати трансгени нетрансгенним родичам. Усі ці (й інші) небажані можливості вивчаються, і, якщо вони реальні, мінімізуються.

Як можна бачити з наведених вище даних, створення трансгенних тварин потребує великих затрат праці. Цей висновок підкріплює статистика - одну трансгенну тварину вдається отримати з 40 ін'єктованих зигот миші, 200 зигот вівці чи кози або 1.500 зигот корови. З цих трансгенних тварин не більше половини експресують трансгенний білок. При отриманні тварин-продуцентів людських білків тільки у деяких особин рівень експресії трансгена в клітинах епітелію молочної залози достатньо високий. Можливий і такий варіант - ген експресується, але трансгенний білок з

якихось причин не виділяється в молоко. Далі, якщо навіть вдається отримати трансгенну тварину, ідеальну за всіма параметрами, то її нащадки далеко не завжди успадковують її якості. Однак сучасний темп поступу біотехнології в цій галузі дає змогу очікувати швидкого подолання всіх труднощів на шляху створення трансгенних тварин.

Контрольні запитання до 7 розділу.

Як отримують трансгенних тварин?

Що таке клонування?

Чим обґрунтована можливість використання молочної залози в трансгенних тварин для виробництва чужорідних протеїнів?

Які переваги мають трансгенні тварини в порівнянні з рекомбінантними мікроорганізмами й клітинними лініями ссавців в одержанні коштовних фармакологічних речовин?

Яким чином трансгеноз може полегшити трансплантацію органів?

8. ГЕННА ІНЖЕНЕРІЯ В МЕДИЦИНІ

Кінцева мета медико-генетичних досліджень - створення методів лікування спадкових захворювань людей. Як відомо, багато хвороб мають спадкові причини. Це стосується не тільки моногенних захворювань, що відбуваються через мутацію в одному певному гені. Часто причиною захворювання стає цілий комплекс геномних порушень: присутність алелей, що визначають схильність до захворювання, гіперфункція певних генів через наявність додаткових копій цього гена або порушень в його регуляції та багато інших, генетично обумовлених причин. Спадкові захворювання мають складні клінічні прояви, і лікування їх носить головним чином симптоматичний характер. На жаль, до лікування таких захворювань вдаються тоді тільки, коли пацієнт перебуває в критичному стані, а тому вдається лише ненабагато продовжити його життя. Оскільки генетичні захворювання часто мають системний характер і призводять до послаблення організму, розробка методів лікування - складне завдання.

8.1. Генна діагностика та терапія людини

8.1.1. Молекулярно-генетичний методу генній діагностиці

Спадковість людини вивчає *антропогенетика* (від грецьк. антропос — людина). Частина антропогенетики, що займається вивченням спадкових хвороб, зокрема нормальних і патологічних властивостей крові, входить до складу *медичної генетики*.

Сучасна антропогенетика озброєна рядом методів, які дають змогу простежити деякі закономірності передачі спадкових ознак. Це сприяє встановленню правильного діагнозу, уможливорює боротьбу з хворобою і дає можливість надавати генетичну консультацію особам, що її потребують.

Серед різноманітних методів вивчення спадковості людини на даний час широкого розповсюдження набув *молекулярно-генетичний метод*, який базується на використанні ПЛР. Секвенування генома людини дало змогу створити маркери (неповні послідовності яких використовують як праймери); за допомогою їх уточнюють діагноз та встановлюють схильність до захворювання. У першу чергу намагаються виявити вже описані в літературі мутації, асоційовані з конкретним спадковим захворюванням. На наявність такої мутації в геномній ДНК пацієнта вказує діагноз спадкового захворювання, поставлений на підставі симптомів хвороби. У той же час невиявлення відомих мутацій у його геномній ДНК не може вважатися доказом відсутності відповідного захворювання, оскільки воно може

викликатися новими мутаціями в тому ж самому або інших генах, функціонально пов'язаних з першим геном. Тому в таких випадках використовують методи, за допомогою яких можна виявляти невідомі мутації. Як вказано вище, останнім часом перевагу віддають методам аналізу продуктів ПЛР. При цьому для виявлення нових невідомих мутацій найчастіше використовують такі різновиди аналізу вказаних продуктів:

1. *Пряме секвенування продуктів ПЛР* - дуже ефективний і чутливий метод виявлення мутацій. Прийнято вважати, що за допомогою прямого секвенування одноланцюгових і дволанцюгових продуктів ПЛР стандартними методами можна виявляти до 99 % мутацій при мінімальній кількості хибно-позитивних та хибно-негативних результатів. Метод дає змогу не тільки точно локалізувати мутацію в досліджуваній послідовності нуклеотидів, але й визначити її тип і можливий механізм виникнення з урахуванням контексту сусідніх нуклеотидів.

2. *Електрофорез продуктів ПЛР в градієнтному гелі з денатурацією (denaturing gradient gel electrophoresis - DGGE)*. Послідовність нуклеотидів у дволанцюгових фрагментах ДНК визначає особливості плавлення цих фрагментів в умовах денатурації. Звідси випливає, що мутації (в тому числі й одиночні заміни нуклеотидів) можуть змінювати температуру плавлення (денатурації) локальних ділянок (*доменів*) ДНК, що містять ці мутації. Сукупність доменів плавлення певної ділянки ДНК утворює *профіль плавлення*. Вважається, що метод електрофоретичного розділення фрагментів ДНК у гелях із градієнтом, що містить денатураційні речовини, дає можливість виявляти до 95 % мутацій. Однак, незважаючи на високу ефективність, цим методом не можна точно локалізувати мутації в аналізованих ділянках ДНК.

3. *Виявлення мутацій шляхом оцінки конформаційного поліморфізму одноланцюгових фрагментів ДНК (single-stranded conformation polymorphism - SSCP)*. Окремі ланцюги денатурованих фрагментів ДНК здатні утворювати вторинну структуру, особливості якої залежать від послідовності нуклеотидів у цих фрагментах. Конформація *одноланцюгових* фрагментів ДНК, утворена під час їхнього *рфолдингу* (згортання після теплової денатурації вихідного дволанцюгового фрагменту й швидкого охолодження, під час якого більшість фрагментів залишається в *одноланцюговій* формі), впливає на електрофоретичну рухливість фрагментів. Метод оцінки конформаційного поліморфізму *одноланцюгових* фрагментів ДНК простий у постановці й дає змогу виявляти до 80 % мутацій. Цим методом, однак, не можна точно локалізувати мутації.

4. *Метод поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів ДНК (ПДРФ) (restriction fragments length polymorphism, RFLP)*. Наявність сайтів рестрикції в геномній ДНК та їхнє взаємне розташування однозначно

обумовлені послідовністю нуклеотидів досліджуваної ДНК, оскільки сам сайт рестрикції - не що інше, як певна послідовність нуклеотидів ДНК, яка упирається й розщеплюється рестриктазами. Отже, будь-яка мутація, що змінює послідовність нуклеотидів сайту рестрикції, знищує цей сайт. Повне розщеплення аналізованої геномної ДНК окремими рестриктазами призводить до утворення певного набору фрагментів ДНК, число й розміри яких відповідають розташуванню сайтів рестрикції. Гібридизація за Саузерном дає змогу визначати розміри та взаємне розташування рестрикційних фрагментів ДНК після електрофоретичного розподілу цих фрагментів. При наявності мутації в одному з сайтів рестрикції цей сайт залишається після рестрикції нерозщепленим. Це, у свою чергу, викликає злиття сусідніх рестрикційних фрагментів ДНК, відокремлених мутантним сайтом, і утворення фрагмента ДНК більшого розміру. У результаті довжина рестрикційних фрагментів ДНК, що містять мутантні сайти, може змінюватися (стає поліморфною), що чітко виявляється при порівнянні ДНК з різних джерел методом ПДРФ. Метод ПДРФ широко використовується і в генетичних дослідженнях популяцій, бо наявність у геномі досліджуваного організму рестрикційного фрагмента ДНК певної довжини становить прекрасний генетичний маркер та одночасно фенотипову ознаку, тісно пов'язану з генотипом організму. Завдяки цьому легко простежити за поширенням такого маркера в популяціях, за передачею його від батьків до потомства при схрещуваннях і використовувати для побудови генетичних карт досліджуваних організмів класичні генетичні методи. ПДРФ-маркери завдяки їхній чіткій присутності в певних генетичних локусах не поступаються за інформативністю розповсюдженим біохімічним маркерам, а у багатьох випадках виявляються зручнішими за складні фенотипові ознаки (такі, як колір очей, волосся або вовни - для тварин; форма квітів, листків - для рослин), обумовлені багатьма генними локусами.

Усі розглянуті вище методи пошуку нових мутацій з успіхом використовуються й для ідентифікації відомих мутацій в досліджуваній ДНК. Проте, для виявлення мутацій, вже описаних у літературі, які викликають окремі патологічні стани організму (наприклад серповидноклітинну анемію або порушення в системі згортання крові) буває зручніше використовувати деякі специфічні методи: *алель-специфічну гібридизацію олігонуклеотидів, алель-специфічну ПЛР та алель-специфічний аналіз з використанням ПЛР.*

Кількісна ПЛР. Більшість методів з використанням ПЛР не дають кількісного результату. За допомогою цих методів легко виявляють якісні зміни в генах: точкові мутації, делеції та вставки. Однак при деяких спадкових захворюваннях відповідні симптоми виникають у відповідь на

зміну дози (кількості копій) певних генів. Виявлення таких мутацій неможливе традиційними цитогенетичними методами. Однак за допомогою кількісної ГОТР визначення півтораразового зростання дози відповідної ділянки хромосоми (локусу) стає реальним. Проведення кількісної ПЛР характеризується, принаймні, двома особливостями. По-перше, ПЛР проводять у присутності дезоксирибонуклеозидтрифосфатів або праймерів, мічених радіоактивною або флуоресцентною міткою, щоб точно визначати кількість продукту, утвореного після проведення ПЛР. По-друге, під час проведення ПЛР необхідно завершувати реакцію досить рано, поки не утворилось занадто багато її продуктів. Це пов'язане з тим, що на кінцевій фазі насичення, коли продуктів ПЛР стає занадто багато, проведення реакції обмежується недостатністю як субстратів (дезоксирибонуклеозидтрифосфатів), так і самого ферменту, для молекул якого стає занадто багато матричної ДНК у вигляді ШГР-продуктів. За таких умов завершення чергового циклу ПЛР вже не супроводжується подвоєнням кількості продукту; відбувається нівелювання невеликих кількісних розходжень між різними пробами, які досить чітко виявляються на ранніх стадіях ПЛР після проходження декількох циклів реакції. При проведенні кількісної ПЛР у реакційну суміш необхідно вводити внутрішні контролю у вигляді додаткової пари праймерів, за допомогою яких відбувається ампліфікація генетичного локусу, для якого точно відома його доза (кількість копій на молекулу геномної ДНК) в досліджуваному геномі. Таким чином, порівняння кількості утвореного при ампліфікації продукту досліджуваного локусу з кількістю продукту ПЛР контрольного локусу дає змогу визначати кількісні співвідношення їх у геномі.

8.1.2. Техніка генної терапії

Після того як дослідили молекулярні основи трансформації бактерій, з'явилася надія, що аналогічний механізм - введення нормальних генів у дефектні соматичні клітини - можна буде використати для лікування спадкових захворювань людини. Техніка рекомбінантних ДНК дала змогу виділяти гени людини, зробити потрібну конструкцію, ввести в клітини (прокаріотичні або еукаріотичні) і з них, уже в необмеженій кількості, отримати білки та пептиди людини. Залишався останній логічний крок. Навіщо ген вводити в бактерії (або інші об'єкти), отримувати з них людський білок, чистити, а потім знов вводити людині, коли той самий ген можна прямо вводити людині в її клітини? Цей останній крок переводить генні технології безпосередньо на рівень людини.

Класичні спадкові хвороби (головним чином, моногенні) характеризуються пошкодженням гена, що міститься у всіх клітинах організму. Таке

пошкодження веде до патології. Одна (але конкретна) нуклеотидна заміна у гені глобіну призводить до серповидно-клітинної анемії, випадіння фрагменту гена глобіну - до талассемії тощо.

Як відомо, за своїми функціями гени поділяються на загальноклітинні (що працюють у всіх клітинах, підтримуючи їхнє існування) і тканино-специфічні. Так, гемоглобін потрібний і, відповідно, напрацьовується тільки в еритроїдних клітинах. Тому для лікування серповидно-клітинної анемії теоретично досить ввести повноцінний ген глобіну тільки в клітини еритроїдного ряду.

Генна терапія - медичний підхід, що базується на введенні в клітини генних конструкцій з лікувальною метою. Бажаного результату досягають або в результаті експресії введеного гена, або за рахунок часткового чи повного пригнічення функції пошкодженого гена, що був причиною захворювання. Останнім часом вчені намагаються також коригувати структури й функції генів, активність яких не відповідає нормі. Варто зазначити, що генна терапія має за мету *лікування не генів, а захворювань організмів з використанням генів*.

Перспективи генної корекції соматичних клітин стали реальнішими у 1980-х рр., коли опрацювали методи отримання ізолюваних генів, створили вектори, здатні експресуватися в еукаріотах; стали рутинними експерименти з перенесення генів на мишах. У 1990 р. зробили першу спробу застосування генотерапії для лікування важкого комбінованого імунodefіциту (SCID, від англ. *severe combined immunodeficiency*) у чотирирічної дівчинки.

Використовувався такий підхід. Клоновану кДНК аденозиндезамінази (АДА) ввели в лімфоцити, отримані від пацієнтки. Модифіковані клітини, які синтезували АДА, культивували і протягом двох років з певною періодичністю вводили дівчинці. Через чотири роки після початку лікування у пацієнтки спостерігали експресію гена АДА та полегшення симптомів SCID. Проте дійсну причину покращання стану хворої до кінця не з'ясували; невідомо, чи це був результат замісної терапії (внутрішньовенного введення захищеної форми АДА - поліетиленгліколь-АДА), чи власне генної терапії. Беззаперечно тільки, що цей дослід довів безпечність генної терапії.

Спочатку вважалося, що генна терапія дасть змогу виправити дефекти в генах, які викликають моногенні захворювання. Теоретично вважалося, що корекція пошкодження гена можлива як на рівні соматичних, так і на рівні зародкових (статевих) клітин. Але численні досліді внесли поправки в ці уявлення. Значно простіше виявилось виправити не саме пошкодження в гені, тобто замінити весь мутантний ген або його пошкоджений фрагмент на нормальний, а вводити в організм пацієнта повноцінний функціональний

геа При цьому також опрацьовують і перспективні методи корекції дефектних генів, заміни дефектного гена на нормальний, методи підсилення експресії нормального гена, відновлення експресії блокованого гена та методи блокади експресії хвороботворного гену.

Нині існує три стратегії генної терапії. Одну з них застосовують у тих випадках, коли клітини, які потрібно вилікувати, втратили функцію певного гена, і для лікування потрібно цю функцію відновити. Тоді в клітину потрібно доставити ген, здатний забезпечувати втрачену функцію. Цей підхід застосовують при терапії, наприклад, рецесивних спадкових захворювань. Навпаки, часто хвороба викликається надлишковою активністю певних генів, що не властиву нормальній клітині. Таке трапляється при трансформаціях, і тоді слід цю зайву активність загальмувати. До генно-терапевтичних тепер включають і такі підходи, коли клітини модифікують, щоб посилити імунну відповідь організму на небажані явища, викликані інфекцією або виникненням пухлин. Модифікацію здійснюють введенням нової генетичної інформації або в клітини, проти яких хочуть збільшити імунну відповідь, або в клітини імунної системи, за допомогою яких хочуть цю відповідь посилити.

Оскільки генна терапія являє собою новий напрямок, а захворювання, які намічають лікувати з її допомогою, дуже різноманітні, розглядають багато різних підходів. Нині всі дослідження з генної терапії спрямовано на корекцію генетичних дефектів соматичних, а не статевих (зародкових) клітин. Це пояснюється як етичними, так і чисто технічними причинами, а також міркуваннями безпеки.

До генної терапії соматичних клітин з'являються все нові підходи, що поділяються на дві великі категорії: генна терапія *in vivo* та *ex vivo*. Генна терапія *ex vivo* включає, як правило, такі етапи: 1) отримання клітин від хворого; 2) виправлення генетичного дефекту перенесенням потрібного гена в ізольовані клітини; 3) відбір і нарізання генетично "виправлених" клітин; 4) інфузія або трансплантація цих клітин хворому.

«Хірургічна» генна терапія використовується при таких захворюваннях, коли і гени, і регуляція їх в цілому організмі повноцінні, але патологія наявна в генетичному апараті локальної групи або груп клітин, ж це відбувається при появі злоякісних пухлин. Для вилучення таких клітин у генній терапії використовують своєрідний часово-локальний підхід. У випадку онкологічних хвороб з біопсійного матеріалу відділяють і переводять у культуру пухлинопроникнені лімфоцити. Їх розмножують, вводять у них ген, що кодує відповідний імуноактивний продукт (інтерлейкін 2, фактор некрозу пухлин тощо) і повертають до організму хворого. За час свого перебування в організмі такі модифіковані клітини знищують або всі пухлинні клітини, або певну їх частину. В останньому

випадку процедуру повторюють до повного позбавлення від пухлинних клітин. Загальний принцип такого підходу полягає в тому, що після лікування в організмі не залишається не тільки злоякісних клітин, але й тих генетично змінених клітин, які їх знищили.

Використання власних клітин пацієнта (аутологічних клітин) гарантує, що після введення їх не виникне імунної відповіді.

Потрібно, щоб після перенесення "терапевтичного" гена він стабільно підтримувався та безперервно експресувався. Цим умовам відповідають вектори, отримані на основі мишачих ретровірусів. Але ретровіруси мають суттєвий недолік - вони можуть призводити до злоякісної трансформації клітин. Таку вірогідність слід зменшити, а краще повністю виключити. Для перенесення генів у клітини-мішені, що інтенсивно ростуть, останні обробляють очищеними частинками упакованого ретровірусного вектора або проводять спільне культивування їх з клітинною лінією, де розмножується цей вектор, а потім здійснюють диференціальну селекцію для відокремлення клітин-мішеней від інших допоміжних клітин. Трансдуковані клітини-мішені (ті, в які за допомогою вірусу перенесли невірусну ДНК) тестують, щоб переконатися, що: в них синтезується продукт терапевтичного гену; не утворюються віруси, здатні розмножуватися; ДНК ретровірусного вектора не вбудувалася в сайт, що змінює здатність клітин до росту або перешкоджає нормальному їх функціонуванню. Після тестування трансдуковані клітини нарощують у великих кількостях і з різними інтервалами вводять хворому.

Найвірогідніші кандидати для проведення генної терапії *ex vivo* - пацієнти зі спадковими захворюваннями, для лікування яких застосовують трансплантацію кісткового мозку.

Генна терапія *in vivo* базується на прямому введенні клонованих і певним чином упакованих послідовностей ДНК у специфічні тканини хворого, при цьому передбачено доставку "лікувального" гена безпосередньо в клітини певної тканини пацієнта.

Найвагоміші результати генної терапії очікуються в тих випадках, коли захворювання обумовлене дефектом одного гена. Тоді значно зростає вірогідність того, що нормальний ген прицільно вбудується у те місце на хромосомі, де розташований дефектний ген, внаслідок чого при подальшій гомологічній рекомбінації введений ген замінить дефектний. Вважають, що такої одноразової процедури в ряді випадків буде досить, щобвилікувати хворобу. Однак на практиці дуже важко проконтролювати, скільки ДНК ввели в клітину, і на одне правильне вбудовування в геном припадає понад 1.000 випадкових. Розробляють і інший підхід, коли введений ген не замінює дефектний, а лише компенсує його функцію, вбудовуючись у іншому місці.

Вирішальна умовою успішної генотерапії - забезпечення ефективної доставки, тобто введення (при використанні вірусних векторів) чужорідного гена до клітин-мішеней, забезпечення довготривалої роботи його в цих клітинах і створення умов для повноцінної експресії. При цьому клітини з новим геном повинні або самостійно виживати протягом довгого часу, або передавати отриманий ген наступним поколінням клітин. Крім того, переданий ген (трансген) повинен успішно експресуватися, тобто виробляти достатню кількість білкового продукту. І, нарешті, передача гена не повинна пошкоджувати нормальної ДНК. Якщо ген неправильно введений у ДНК, може бути порушена робота інших генів або відбувається активація «мовчазних» генів; така ситуація може призводити до виникнення пухлин та інших аномальних змін клітини. Мета полягає в тому, щоб додати нову здатність, не вплинувши на інші функції клітини.

Головні небезпеки генної терапії пов'язані з вірусною природою вектора - носія трансгена. Такий вірус не повинен заражати інших людей і потрапляти в статеві клітини пацієнта, щоб не передати трансген потомству і зробити його трансгенним. Стаття 13 «Конвенції з прав людини і біомедицини», прийнята у 1996 р. Радою Європи, проголошує: «Втручання в геном людини, спрямоване на його модифікацію, може бути здійснене тільки з профілактичною, терапевтичною чи діагностичною метою та лише за умови, що подібні втручання не спрямовані на зміну генома нащадків даної людини». Загалом вважають, що сьогодні технології генної терапії, при розумному виборі їх, не несуть пацієнтам загрози, що веде за рамки звичайних медичних процедур.

Розроблено різноманітні вірусні й невірусні векторні системи доставки "терапевтичних" трансгенів, що враховують велику кількість потенційних тканин-мішеней (як-от шкіра, м'язи, легені, мозок, товстий кишечник, селезінка, печінка, клітини крові) і розміщення їх в організмі людини. "Ідеальна" система доставки має забезпечувати високу ефективність поглинання "терапевтичного" гена клітинами-мішенями, якнайменше його пошкодження всередині клітини при перенесенні до ядра та підтримання рівня експресії, достатнього для полегшення стану хворого.

У ретровірусну векторну систему внесено додаткові вдосконалення: збільшено кількість утворюваних вірусних часточок, підвищено ефективність трансдукції, здійснено генно-інженерну модифікацію, що забезпечує їх проникнення в клітини, які не діляться, підвищено специфічність інфекції. За допомогою ретровірусних векторів можна переносити трансгенні послідовності завбільшки до 10 т.п.н. Однак ретровірусні вектори потрапляють тільки до таких клітин-мішеней, які діляться. Тому їх неможливо застосовувати для клітин м'язової та нервової тканини, печінки та легенів. Виключення складають вектори лентівірусів.

До числа їх належать збудники ВШ-інфекції, які теж в принципі можуть бути використані в генній терапії.

Окрім ретровірусів, як вектори застосовують також інші віруси, зокрема, аденовіруси, адено-асоційовані віруси та вірус простого герпесу. Так, аденовіруси, що містять дволанцюгову ДНК, зазвичай дають змогу доставляти в клітину суттєво більший об'єм корисної генетичної інформації. Аденовіруси не вбудовуються в геном хазяйських клітин, і у процесі поділу інформація знищується. Аденовірусні вектори ефективно переносять гени як в клітини у ході поділу, так і в ті, що не діляться, забезпечують високі титри рекомбінантного вірусу та високий рівень експресії введених генів. Ці віруси ефективні при трансфекції, особливо у випадку клітин дихальних шляхів, де можна трансфікувати більш як половину клітин, що на порядок вище, ніж у випадку ретровірусів. Однак сучасні аденовірусні вектори можуть викликати неспецифічне запалення та антивірусну реакцію клітинного імунітету, що скорочує тривалість експресії до тижнів або місяців. У результаті ці вектори змушені вводити не один раз, а регулярно.

Адено-асоційований вірус - маленький вірус, який містить одноланцюгову ДНК та здатен інфікувати клітини, що не діляться. Даний вірус не патогенний і не цитотоксичний. При інфікуванні клітин він інтегрує свою ДНК в геном клітини-хазяїна зі значною специфічністю. На сьогоднішні вектори на його основі вважаються найбільш перспективними.

Вектори на основі вірусу простого герпесу також доволі привабливі (висока ефективність, широке коло клітин-хазяїв, велика місткість - до 30 т.п.н.), але з них важко створювати векторні конструкції, і у цих вірусів складна регуляція.

В опосередкованій вірусами доставці генів беруть участь клітинні рецептори, за допомогою яких вектор потрапляє у клітину-мішень, не руйнуючись лізосомними ферментами; векторна ДНК потрапляє до ядра. Проте вірусні вектори мають ряд недоліків: вони дорого коштують і часто мають обмежену клонувальну місткість, що не дає змоги регулювати експресію "терапевтичного" гена за допомогою тканинно-специфічних послідовностей. Крім того, вірусні білки можуть викликати реакцію запалення, що виключає повторне введення вектора. До недоліків вірусних векторів належать також ініціація імунної відповіді на введення чужорідного білку, часто - відсутність тканинної специфічності, а також ризик виникнення онкогенних мутацій вірусу або рекомбінації активних патогенних часточок. Тому розробили невірусні системи доставки генів.

Найпростіша з таких систем - пряме введення конструкцій ДНК у клітини тканини-мішені шляхом ін'єкції. Але застосування цього підходу обмежене тим, що не всі тканини доступні для ін'єкцій (лише шкіра, тимус,

поперечно-смугасті м'язи, деякі щільні пухлини). Досить тривала (до року) експресія трансгена спостерігається переважно в м'язовій тканині. Крім того, для здійснення прямого введення потрібні великі кількості ДНК. Ефективність такої трансфекції низька (менше 1 %), але цілком достатня, наприклад, для генетичної імунізації.

Можна бомбардувати за допомогою генної "рушниці" (gene gun) клітини шкіри або - через надріз - клітини підшкірної пухлини кон'югованими з ДНК частками золота або вольфраму діаметром 1-3 мкм. Введені таким чином "терапевтичні" гени експресуються в тканинах-мішенях, а їхні продукти потрапляють у кров. Глибина проникнення мікрочасточок, як правило, невелика - до 1 мм, тому метод використовують переважно для трансфекції клітин шкіри або хряща, що до неї прилягає. Проте при особливих умовах обстрілу мікрочасточки можуть проникати в тканину на глибину до 4-5 мм і переносити ген у волокна поперечно-смугастих м'язів.

Існує ще декілька методів прямого введення генів: введення всередину кровоносних судин, що проходять крізь орган, який трансфікується (використовують його переважно для лікування хвороб печінки); введення в нирку шляхом ін'єкції у ниркову паренхіму та сечовивідні шляхи; аерозольне введення в дихальні шляхи.

Останнім часом особливу увагу приділяють створенню векторів на базі штучних хромосом ссавців. Завдяки наявності основних структурних елементів такі міні-хромосоми довгий час утримуються в клітинах і здатні нести повновимірні (геномні) гени та їхні природні регуляторні елементи, необхідні для правильної роботи гена у потрібній тканині та у визначений час.

ДЛЯ ДОСТАВКИ ДО КЛІТИНИ КРУПНИХ ГЕНЕТИЧНИХ КОНСТРУКЦІЙ (>10 т.п.н.) за допомогою ендосомного клітинного транспорту, що дає змогу уникнути руйнування ДНК, утворюють кон'югат ДНК з іншими молекулами. Для цього полі- β -лізін ковалентно зшивають з молекулою, яка зв'язується зі специфічним клітинним рецептором, а потім додають ДНК. У результаті створюється компактна, щільно скручена структура (тор), на зовнішній поверхні якої розміщуються сайти зв'язування з клітинними рецепторами.

Полімерні молекули, що несуть надлишковий катіонний заряд, можуть суттєво підвищувати ефективність трансфекції. Певну активність мають навіть невеликі молекули (протамін, диметилсульфоксид, похідні імідазолу, грамїцидін, лілополіамін). Більшу активність звичайно проявляють синтетичні полімери (поліетиленімін, полілізін, лілополілізін або його кон'югати з трансферином, галактозою, манозою), а також природні катіонні білки (гістон H1, галактозильований гістон H1, гістон H4 у комплексі з ДНК і кон'югатом трансферину з полілізином). Висока ефективність багатих на лізін пептидів і білків може бути зумовлена їх схожістю зі специфічними сигнальними послідовностями, відповідальними

за транспорт з цитоплазми до ядра. Водночас полісахариди та білкові ліганди, що входять до складу зазначених комплексів, визначають комплексоутворення їх зі специфічними рецепторами на поверхні клітин.

Для введення ДНК до клітин використовують також спеціальні ДНК-ліпідні комплекси (ліпосоми). Переваги застосування таких комплексів щодо вірусних векторів полягають у тому, що ліпосоми можуть нести більший об'єм генетичної інформації, не набувають інфекційних властивостей внаслідок рекомбінації, мають нижчу вірогідність ініціації імунної відповіді або реакції запалення, до того ж, простіші й дешевші у виготовленні.

Особливо перспективним вважають використання фосфоліпідів, наприклад кардіоліпіну і фосфатидилетаноламіну. Ці сполуки, подібно до двошарових мембран, утворюють інвертовані міцелярні структури, відомі як кубічні та гексагональні фази. Така властивість вказаних ліпідів визначає їх здатність ініціювати злиття мембран. У присутності катіонів кальцію або магнію взаємодія ДНК з фосфоліпідами посилюється, і ліпосоми реагують на це тим, що ДНК потрапляє до внутрішнього об'єму везикул. Використання високомолекулярних катіонних посередників, що забезпечують формування комплексів ДНК з фосфоліпідами і взаємодію цих комплексів з поверхнею клітин, покращує їхню ефективність у трансфекції.

Дуже успішним виявилось практичне застосування першого низькотоксичного катіонного ліпиду ДОТМА (1,2-диолеїл-3-К,К,К-триметиламінопропану). Одночасно у практику було ввели термін "*ліпофекція*", який підкреслює високу ефективність генетичної трансфекції клітин, що наближає ліпосомальні препарати до інфекційних вірусних частинок.

Вже на етапі доставки ДНК до поверхні клітин виникає ряд труднощів. Так, практично всі катіонні ліпіди, що входять до складу ліпосом, інактивуються в присутності навіть незначних кількостей плазми крові. До того ж, деякі органи мають ендотеліальний бар'єр, що перешкоджає проникненню ліпосом. Для подолання цих перешкод використовують цілу низку методичних прийомів: ліпосоми вкривають шаром високополімерних молекул (наприклад поліетиленгліколю), що суттєво збільшує час циркуляції ліпосом у руслі крові, роблячи їх недоступними для осадження імуноглобулінами; для більш спрямованої доставки на поверхні ліпосом розміщують антитіла до клітин-мішеней; використовують специфічні клітинні рецептори (наприклад, рецептори фолату - маркера пухлинних клітин) тощо.

Щодо природи механізму проникнення ДНК в цитоплазму, то її досі не зрозуміли. Злиття ліпосом з плазматичною мембраною на поверхні клітин, в результаті чого внутрішній вміст ліпосоми може потрапляти в цитоплазму, - це найпростіший та, на перший погляд, очевидний механізм транслокації ДНК. Однак існують серйозні аргументи на користь того, що

проникнення ДНК в цитоплазму відбувається на значно пізніших етапах, коли більша частина ліпосом інтерналізується в цитоплазму. Цей процес на перший погляд нагадує ендоцитоз, оскільки в місцях сорбції катіонних везикул на поверхні клітини відбувається інвагінація плазматичної мембрани і відбруньковування всередину цитоплазми мембранного пухирця з катіонними ліпосомами або ДНК-ліпідним комплексом у внутрішньому просторі. Інвагінація плазматичної мембрани під дією катіонних ліпосом, сорбованих на її поверхні, очевидно не потребує спеціального механізму, оскільки вона спостерігається навіть на поверхні еритроцитів.

Далі відбувається вивільнення ДНК в цитоплазму та подальше перенесення її до ядра. При цьому великі маси екзогенної ДНК накопичується в областях, прилеглих до ядра. Накопичення великої кількості матеріалу в цих зонах свідчить про те, що саме етап вивільнення ДНК з ендосом може бути фактором, що обмежує ефективність трансфекції.

Зазвичай ендосоми з захопленими всередину часточками, включаючи й віруси, перетворюються на лізосоми, з мембраною яких і зливаються вірусні часточки при низьких значеннях рН. Вивільнення ДНК в цитоплазму скоріш за все відбувається з ендосом, минаючи стадію утворення лізосом. Більш того, катіонні ліпіди перешкоджають потраплянню ДНК в лізосоми.

Існує гіпотеза, що механізм вивільнення ДНК базується на обміні ліпідами між катіонною ліпосомою і мембранами клітин, в результаті чого катіонний заряд нейтралізується, а зв'язок ДНК з мембраною послаблюється.

При злитті комплексу ДНК-катіонний ліпід з мембранами аніонного ліпідів відбувається фазовий перехід у структурі комплексу, кінцевим етапом якого стає розпад комплексу на окремі компоненти, що складаються з молекул ДНК, вкритих трубчатими двошаровими структурами ліпідів. Виходячи з цього, вважають, що одна з можливих причин низької ефективності трансфекції може полягати в тому, що ДНК навіть після вивільнення з ліпосом продовжує утримувати велику кількість адсорбованого катіонного ліпідів.

Після вивільнення в цитоплазму подальше просування ДНК до ядра відбувається з використанням мало ще вивчених механізмів клітинного транспорту. Можливо, що катіонні ліпосоми здатні вивільняти ДНК безпосередньо у ядро.

Гематопоетичні стовбурові клітини - це зручний об'єкт для генної терапії завдяки їхній здатності до самовідновлення та унікальним властивостям щодо диференціації. З дослідницькою метою як вектори для внесення до таких стовбурових клітин відповідних генів часто використовують ретровіруси. Слід, однак, зазначити, що ефективність

перенесення генів у цьому випадку досить незначна. Використовуються й інші стратегії внесення генетичного матеріалу - лентивірусні вектори та селективне привнесення *in vivo* генно-модифікованих клітин з геном стійкості проти лікувальних препаратів або селективно примножених генів з подальшою перевіркою кількості таких генно-модифікованих клітин.

На додачу до високої ефективності перенесення генів, для ефективної терапії генно-модифікованими гематопоетичними стовбуровими клітинами необхідно досягти високоефективної та довготривалої експресії трансгенів. Останнім часом для цього використовують деякі певні послідовності еукаріотичної ДНК - регіон, що контролює локус (LCR), та так званий *хроматиновий інсулятор*. Перша послідовність являє собою ділянку ДНК завдовжки 20 т.п.н., що знаходиться у напрямку 5' від Р-глобіноподібного генного кластера людини та направляє синтез високого рівня генної експресії Р-глобіну. Друга послідовність - хроматиновий інсулятор - це ділянка завдовжки 1,2 т.п.н., виявлена у складі LCR курчат. Коли такі послідовності вводять разом з трансгеном до складу векторів, фракція трансдукованих гематопоетичних стовбурових клітин в організмі значно підвищується.

Сьогодні на людях випробують способи генної терапії багатьох спадкових захворювань: гемофілії, міодистрофії Дюшена, муковісцидозу, синдромом вродженого імунodefіциту, глухлих захворювань і деяких інших.

Всім добре відома так звана «царська хвороба» - гемофілія. В основі захворювання лежить дефект у генах VIII або GX фактора зсідання крові (гемофілія типу А та типу В відповідно). Гени цих білків виділені та просеквеновані; отримано різноманітні ДНК-конструкції, що містять ці гени, розташовані на Х-хромосомі. Для лікування гемофілії створено ретровірусні конструкції, що несуть гени факторів зсідання крові. Певних успіхів досягають в лікуванні гемофілії В, використавши введення гена фактора IX зсідання крові. При цьому продемонстровано тривалу часткову корекцію гемофілії В на моделях мишей і собак; розпочато клінічні випробування з лікування гемофілії В у людини. Робота над генною терапією гемофілії А також проводиться, хоча все надзвичайно ускладнюється великими розмірами гена, що кодує VIII фактор згортання крові. Адже цей білок величезний - 2.351 амінокислотний залишок; це ускладнює вбудовування його гена у вірусні вектори. Цей білок складається з ряду доменів, і виявилось, що певні домени можна виключити з білку без втрати його функціональної активності. Вже отримано позитивні результати при введенні такого вкороченого гена мишам у складі ретровірусного вектора.

Ще одне широко відоме моногенне захворювання - міодистрофія Дюшена. Воно обумовлене дефектом у гені дистрофіну. Хворі хлопчики до десятирічного віку втрачають здатність рухатися, а протягом наступних

десяти років вмирають через посилення слабкості серцевої та легеневої мускулатури. Можливість генної терапії міодистрофії вивчається вже давно. Ген дистрофіну виділено, клоновано і секвеновано, на його базі створено різноманітні генні конструкції. На моделях мишей, позбавлених гена дистрофіну, продемонстровано можливість одержати трансгенних тварин, що синтезують у м'язах нормальний ген, який забезпечує нормалізацію функцій м'язів.

Загалом лікування більш як десятка спадкових патологій вже апробовано генною терапією на тваринах і проходить шлях формального санкціонування для переходу на людей. Для лікування ще кількох десятків таких хвороб технології відпрацьовуються на тваринах.

Методи генної терапії успішно розповсюджуються також і на лікування захворювань, що належать до неспадкових (не пов'язаних з уродженим дефектом у структурі та функції гена). Генна терапія таких захворювань базується на припущенні, що введений в організм «лікувальний ген» призводить до синтезу білку, який і справляє лікувальну дію. Інша можлива схема базується на зміні властивостей трансфікованих клітин - така зміна викликає лікувальну дію сама по собі або ж робить ці клітини чутливими до дії лікарських препаратів.

Яскравий приклад досягнень генної терапії у цій галузі - використання її при лікуванні хвороб серцево-судинної системи. Перший напрямок цих робіт - запобігання тромбоутворення. Основна ідея - генетична модифікація ендотелію кровоносних судин за допомогою генів, продукти яких можуть запобігати формуванню тромбів (до них, наприклад, належить ген тканинного активатора плазміногену). При цьому до судинного ендотелію гени доставляють через катетер, введений у кровоносну судину. Другий напрямок робіт - розробка методу створення нових кровоносних судин людини; він полягає в ін'єкції в тканини серця додаткових генів (наприклад, гену ангіотензину), які сприяють утворенню нових кровоносних судин. При цьому за два-три тижні в організмі хворих створюється обхідний шлях для протікання крові. Цей метод лікування вже випробувано на хворих із закупоркою артерій на ногах. Третім напрямком вважається профілактика і лікування атеросклерозу завдяки введенню генів, відповідальних за синтез лшопротейнів високої густини, необхідних для нормального процесу обміну жирових компонентів крові.

Опрацьовується також генно-терапевтичний підхід до лікування атеросклеротичних змін судин шляхом запобігання розростанню й міграції клітин гладеньких м'язів судинної стінки. З цією метою туди вводять відповідні гени, які пригнічують проліферацію.

Незважаючи на те, що спектр неспадкових захворювань, лікуванням яких займається генна терапія, дуже широкий, до 80 % усіх сучасних

розробок генної терапії припадають на пухлинні захворювання. Такий стан справ обумовлений наявністю величезної кількості ракових захворювань, їхнім фатальним перебігом при відсутності лікування, труднощами, а часто й неможливістю проведення відповідної терапії взагалі. Але є й друга група причин: стосовно важких, часто безнадійних ракових хворих втрачають своє значення такі міркування, як віддалений ризик генетичних ушкоджень. Адже для лікування цих хворих використовують такі безсумнівно небезпечні засоби, як масоване опромінення організму, введення у величезних дозах надзвичайно токсичних хімічних речовин або хірургічне видалення життєво важливих органів.

Загалом основні методи генної терапії пухлин такі:

посилення імуногенності пухлин;

генетична модифікація клітин імунної системи для посилення їхньої протипухлинної активності;

введення в пухлину генів чутливості до хіміотерапевтичних препаратів («генів самогубства»);

блокування експресії онкогенів (наприклад, за допомогою внутрішньоклітинних антитіл);

введення в ракові клітини гена-супресора пухлинного росту (наприклад, гена білку p53);

блокування експресії генів проліферації (онкогенів);

захист нормальних клітин від системної токсичної дії хіміотерапії (наприклад, введення в стовбурові клітини кісткового мозку гена множинної лікарської стійкості);

підвищення стійкості проти опромінення у тих клітин нормальних тканин, які знаходяться поруч з пухлиною, за рахунок суперекспресії в них антиоксидантів (Наприклад, глутатіон-синтетази або трансферази);

створення та використання рекомбінантних генних протипухлинних вакцин.

Розглянемо докладніше один з цих підходів, наприклад, підвищення чутливості пухлинних клітин до хіміотерапевтичних препаратів. При цьому в клітини пухлини вводять гени, що кодують ферменти, здатні трансформувати хімічні сполуки зі слаботоксичної у високотоксичну форму. Зазвичай з цією метою використовують тимідинкіназу вірусу простого герпесу. Цей ген вибірково фосфорилує синтетичний нуклеозидний аналог генцикловір, який потім ефективно пригнічує синтез ДНК. Даний метод генної терапії пухлин інтенсивно розвивається, ведуться клінічні випробування на пацієнтах, зокрема, з плевральною мезотеліомою, раком яєчників та пухлиною мозку - гліобластомою.

Крім того, розробляються підходи до лікування інфекційних захворювань. Типовий приклад - спроби терапії СНІДу. ВІЛ, збудник

СНІДу, проявляє в організмі подвійну дію. По-перше, це типове інфекційне захворювання, а стратегії його лікування і профілактики типові для інфекційних захворювань. По-друге, СНІД - це незвичне інфекційне захворювання, оскільки в цьому випадку генетичний матеріал збудника потрапляє в геном і залишається там до кінця існування клітини.

Сьогодні використовують два головних підходи: внутрішньоклітинну імунізацію та підвищення імунності проти вірусу з використанням генетично модифікованих клітин. Термін «внутрішньоклітинна імунізація» був запропонований **Нобелівським** лауреатом Д. Балтимором для визначення процесу створення клітин, стійких проти збудника, шляхом введення в ці клітини нової інформації, яка дає змогу пригнічувати вплив збудника на клітину. Таким чином клітина набуває здатності продукувати внутрішньоклітинні антитіла. Цей підход тим цікавіший, що зараз розроблено методи, які дають змогу модифікувати антитіла. Внутрішньоклітинні антитіла відкривають унікальний засіб впливу зсередини клітини на будь-які внутрішньоклітинні об'єкти - білки, цукри або нуклеїнові кислоти.

Для багатьох інфекційних збудників показано, що існують певні лінії їхніх клітин-хазяїв, які не інфікуються або не підтримують реплікацію даного збудника. Цей факт використовують для створення клітин, стійких до вірусів. Так, стосовно ВІЛ показано, що у 10% представників європеоїдної раси міститься мутантний вірусний корецептор СКР5. В результаті гомозиготні індивідууми не інфікуються ВІЛ-1. Запропоновано декілька варіантів використання цих даних для боротьби з інфекцією: запобігання інфекції шляхом блокування рецепторів, пригнічення експресії корецептору або його спрямована делеція.

8.2. Генно-інженерні підходи до створення вакцин

Вакцини — одне з найвидатніших досягнень медицини, а використання їх надзвичайно ефективно як з медичної, так і з економічної точки зору. Останнім часом розробці вакцин стали приділяти особливу увагу. Це обумовлене тим, що досі не вдалося отримати високоефективних вакцин для попередження багатьох розповсюджених або тяжких інфекційних захворювань, таких як СНІД, туберкульоз, малярія тощо. Крім того, збільшилася захворюваність, обумовлена тими інфекціями, з якими людство раніш успішно боролось. Цьому сприяла поява форм мікроорганізмів, стійких проти лікувальних препаратів, збільшення кількості ВІЛ-інфікованих пацієнтів з імунною недостатністю, послаблення систем охорони здоров'я в країнах з перехідною економікою, збільшення міграції населення, регіональні конфлікти та інші причини. При цьому розповсюдження мікроорганізмів, стійких проти антибактеріальних

препаратів, набуло характеру екологічної катастрофи та поставило під загрозу ефективність лікування багатьох важких захворювань. Підвищений інтерес до вакцин виник після того, як встановили роль патогенних мікроорганізмів у розвитку тих захворювань, які раніше не вважали інфекційними (наприклад, гастрити, пептична виразка шлунку та дванадцятипалої кишки, асоційована з *Helicobacter pylori*, злоякісні новоутворення печінки як наслідок зараження вірусами гепатиту В і С).

З огляду на вищезазначене, велику увагу приділяють зараз розробці рекомбінантних вакцин, отриманих методом генної інженерії (такі вакцини містять компоненти мікроорганізмів), а також створенню живих ослаблених вакцин нового типу. Ослаблення вірулентності збудників досягають шляхом направлених мутацій у генах, які кодують вірулентні білки збудника. Цю ж технологію використовують і для отримання живих рекомбінантних вакцин, вбудовуючи гени, які кодують імуногенні білки, у живі непатогенні віруси чи бактерії як вектори, які вводять людині.

8.2.1. Генно-інженерні вакцини

Генно-інженерні підходи застосовуються для створення багатьох вакцин. Для деяких вірусів не вдається підібрати умов їхнього розмноження ані в культурах клітин, ані в організмі лабораторних тварин і як наслідок цього - неможливо отримувати навіть інактивовані вакцини. Яскравий приклад - вірус гепатиту В людини, для якого не знайдено культур клітин ссавців, де б він розмножувався (крім людини, до даного вірусу чутливі тільки шимпанзе). Тому даний вірус одним з перших привернув увагу дослідників, що працюють у галузі генної інженерії. В 1984 р. створили та успішно випробували «дріжджову» молекулярну вакцина проти гепатиту В.

В опрацюванні генно-інженерних вакцин першого покоління, тобто вакцин, отриманих з цілих або вкорочених антигенів, аналогічних за амінокислотною послідовністю природним, але синтезованих у про- або еукаріотичних клітинах за допомогою техніки рекомбінантних ДНК, можна виділити три головні напрями. Один з них - створення методами генетичної інженерії прокаріотичних продуцентів для антигенів, введення яких викликає утворення протективних (захисних) антитіл. Інший напрямок - отримання білків-імуногенів, синтезованих в еукаріотичних клітинах під контролем генетичних регуляторних елементів клітини або еукаріотичних векторних систем, для створення яких можуть бути використані різні віруси. Третій напрямок - конструювання ефективних рекомбінантних живих *полівалентних* вакцин (полівалентні - тому, що захищають від двох або більше інфекцій), призначених для безпосередньої імунізації людей і

тварин. Суть методу полягає у вбудовуванні в геном вірусу (зазвичай вірусу вісповакцини) генів, що кодуєть протективні антигени збудників різних інфекцій. Експресія вбудованих генів здійснюється при цьому під контролем регуляторних елементів вірусу вісповакцини. Синтезовані поліпептиди транспортуються до клітинної мембрани й проходять стадії процесингу та глікозилювання, характерні для природної інфекції. Очевидно, що при створенні живих полівалентних вакцин як векторних найдоцільніше використовувати віруси, вже застосовувані у препаратах живих вакцин; один них - вірус вісповакцини. Цьому сприяє ще й висока стійкість цього вірусу (у порівнянні з вірусами інших сімейств) проти впливів зовнішніх фізичних факторів, а також та обставина, що штучне ушкодження певних генів вірусу вісповакцини приводить до зниження його реактогенності (у даному випадку - його вірулентності).

Щодо генно-інженерних вакцин другого покоління, то відзначено успішне використання їх для профілактики низки інфекцій. У дослідях з вірусами ящуру, грипу, поліовірусами, аденовірусами та деякими іншими встановлено, що коротким пептидам, які містять антигенні детермінанти, притаманна деяка антигенна активність, яка у ряді випадків при використанні імуностимуляторів дорівнює імуногенній активності інтактного вірусу. Це, в свою чергу, свідчить про реальність створення методами генної інженерії штучних вакцин, включно з полівалентними, які несуть увесь спектр антигенних детермінант. Проте у збудників інфекцій, у яких первинна структура антигенних детермінант дуже мінлива (грип, ящур, аденовіруси, а особливо ВІЛ), отримання таких вакцин для різних серотипів - завдання дуже складне.

Проведення хімічного синтезу олігопептидів - складний і дорогий процес, який навряд чи можна використати у широкомасштабному виробництві синтетичних вакцин. Безумовно*- у цьому разі більш перспективний і технологічний генно-інженерний шлях синтезу олігопептидів і навіть поліпептидів, що містять послідовності антигенних детермінант як одного, так і багатьох збудників інфекцій. Хімічний синтез штучної ДНК, що кодує такий поліпептид, сьогодні доступний. Використання такої ДНК для конструювання рекомбінантних молекул дає змогу перейти до створення мікроорганізмів-продуцентів синтетичних вакцин, тобто вакцин третього покоління.

Вакцинні препарати, отримані з використанням методів генетичної інженерії, мають певні переваги: відсутність (або значне зниження) баластних компонентів у препаратах; повна безпечність завдяки гарантованій відсутності залишкової інфекційності, низька -вартість, пов'язана зі здешевленням промислового виробництва вакцин, що не потребує спеціально обладнаних приміщень для захисту персоналу та довкілля.

Перший етап створення генно-інженерних вакцин, як і одержання будь-яких генно-інженерних продуктів, - це отримання потрібних розробникові генів, що кодують відповідні білки (у даному разі білки-антигени). Успіх цієї стадії залежить від того, наскільки вивчено даний ген та його положення у геномі донора, наскільки розроблено методи виділення мРНК, кодованої даним геном, методи виявлення функціональної активності продукту цього гена, наскільки вивчено особливості структури гена та найближчих ділянок геномної ДНК (сайти рестрикції), яку кількість мРНК кодує ген.

Створення генно-інженерних вакцин на основі отримання продуцентів (трансформованих бактерій або культур клітин) антигенів різних збудників, що викликають утворення відповідних проєктивних антитіл, потребує виконання головного завдання - виділення відповідного імуногенного білку. Щодо різних патогенів це завдання вирішується різними способами, описаними вище. Так, для збудників бактерійної природи, а також для ДНК-вмісних вірусів це може бути виділення гена, що кодує потрібний антиген, з геномної ДНК за допомогою набору рестриктаз. Можливий також і синтез гена в системі зворотної транскрипції за умови виділення достатньої кількості мРНК, що кодує потрібний антиген. Отримання генів за допомогою "вирізання" з генома найзручніше у випадку протозойних збудників, бактерій та рикетсій, а також для деяких ДНК-вмісних вірусів складної будови. Щодо отримання генів через синтез кДНК, то воно набуло найбільшого застосування і становить головне джерело генів для більшості ДНК-вмісних вірусів та єдине джерело - для РНК-вмісних вірусів.

Отримані у той чи інший спосіб гени протективних білків далі ампліфікують у векторах (найчастіше у плазміді pBR322), після чого гібридну плазмідну, що містить ген, використовують для трансфекції бактерійних клітин.

Через низьку імуногенність деяких вірусних білків виникла ідея створення надмолекулярних вірусоподібних білкових структур, у яких багаторазово представлені ті чи інші антигенні детермінанти. При цьому необхідна наявність білку-носія, що за певних умов здатен здійснювати самозбірку вірусоподібних часток. При вбудуванні смислової послідовності антигенної детермінанти вірусу в заздалегідь вибрану ділянку гена білку-носія можна сподіватися на те, що такий химерний білок буде здатен як формувати надмолекулярні структури, так і експонувати на поверхні цих структур додані вірусні антигенні детермінанти. На сьогодні подібні структури створені й проходять дослідження як безпечні молекулярні противірусні вакцини.

Конструювання генів антигенних білків для подальшого отримання проєктивних антитіл до них - це складне завдання. Проте його необхідно

вирішити для створення рекомбінантних мікроорганізмів, що містять ці гени в активному стані. Вважається, що отримання полівалентних вакцин третього покоління проти ряду патогенів генно-інженерними методами, незважаючи на багато невирішених питань, - це перспектива не дуже віддалена.

8.2.2. ДНК-вакцини

При створенні живих полівалентних вірусних вакцин одна з основних проблем - подолання можливих побічних наслідків вакцинації. По-перше, необхідно звести до мінімуму реактогенність отриманого гібридного вірусу. По-друге, при вакцинації гібридним вірусом формується повноцінна імунна відповідь не тільки на цільовий синтезований антиген, але й на інші антигени векторного вірусу. Тому повторне використання того ж вектора, але вже для вакцинації проти іншого захворювання, може викликати заперечення.

Перебороти ці перешкоди, можливо, вдасться при використанні більш нового підходу - застосування так званих ДНК-вакцин. Виявилося, що в організм тварини можна просто вводити препарат гібридної плазмиди, яка містить ген для кодування потрібного вірусного антигену. Така плазміда далі може експресуватися в клітинах ссавців (включаючи й людину).

ДНК-вакцини можна вводити в сольовому розчині парентерально (у м'яз чи під шкіру). При цьому більша частина ДНК потрапляє до міжклітинного простору і тільки після цього включається в клітини. Використовують і інший метод введення - за допомогою так званого генного пістолета (Рис. 49 та 50). Для цього ДНК фіксують на мікроскопічних золотих гранулах (біля 1-2 мкм), потім за допомогою пристрою, що приводиться в дію стисненим гелієм, гранули «вистрілюють» безпосередньо всередину клітин.

Слід відмітити, що аналогічний принцип введення ліків за допомогою струменю стисненого гелію використовують і для розробки нових способів доставки лікувальних засобів (з цією метою оптимізують розміри часток лікувальної речовини та їхню щільність для досягнення необхідної глибини проникнення у відповідну тканину організму). Цей метод потребує дуже невеликої кількості ДНК для імунізації. Якщо при імунізації класичними субодиничними вакцинами вводять мікрограми білку, то при використанні ДНК-вакцини — нанограми і навіть менше.

Слід додати, що за допомогою генного пістолета можна одноразово ввести фактично 27.000 різних плазмід і отримати імунну відповідь на індивідуальну плазмиду. Синтез вірусного білку (антигену), що відбувається при введенні ДНК-вакцин, приводить до формування повноцінної (як гумо-



Рис. 49. Одноразовий генний пістолет компанії «Powderject»
а — зовнішній вид; б — в розрізі

ральної, так і клітинної) імунної відповіді. У дослідях на лабораторних тваринах (миші, курчата) доведено, що вакцинація препаратами рекомбінантних плазмід забезпечує імунний захист від вірусів грипу, гепатиту В, гепатиту С тощо.

ДНК-вакцини мають ряд переваг у порівнянні з традиційними вакцинами:

Підвищену ефективність і безпечність імунізації;

Сприяють напрацюванню антитіл до нативних молекул вірусних білків;

Забезпечують синтез імуногенних білків клітинами самого організму, сприяють формуванню як гуморального, так і клітинного імунітету;

Можуть вибірково впливати на різні субпопуляції Т-лімфоцитів. У принципі таким чином можна створити генні вакцини для лікування осіб з аутоімунними або алергічними захворюваннями, патогенез яких пов'язаний з порушенням різних ланок імунної регуляції.

Сприяють формуванню довгочасного імунітету;

Усувають ризик зараження;



Рис. 50. Багаторазовий генний пістолет компанії «Powderject»
а — змінний картридж; б — повністю зібраний прилад

Спрощення розробки та виробництва нових вакцин;

Спрощено вимоги до умов зберігання вакцин.

ДНК-вакцинам притаманна висока стабільність. Вони здатні витримувати низькі й високі температури (трохи нижчі за температуру кипіння води) та різні умови вологості. Тому генні вакцини не потребують створення так званих холододових ланцюгів (необхідності зберігання вакцин у холодильних установках протягом усього шляху від місця виробництва до споживача). Тому вони мають значні переваги перед іншими вакцинами, оскільки вартість транспортування та зберігання ДНК-вакцин значно нижча.

Слід, однак, відмітити, що є певні обмеження щодо застосування ДНК-вакцин. Оскільки гени кодують синтез білкових молекул, то ДНК-вакцини сприяють формуванню імунітету тільки проти білкових компонентів хвороботворних мікроорганізмів. Тому вони не можуть замінити вакцини, дія яких базується на використанні інших антигенних молекул. Інше обмеження пов'язане з тим, що білкові молекули після синтезу часто піддаються у клітині подальшим біохімічним змінам, наприклад, глікозилуванню.

Як і у випадках впровадження всіх нових медичних технологій, використання ДНК-вакцин супроводжується багатьма питаннями щодо безпечності їх використання. Так, є побоювання, що молекула ДНК плазмиди може вбудовуватися у ДНК людської хромосоми, а це призведе до мутації гена в цій ділянці. Однак досліді на мишах свідчать, що інтеграція плазмиди в ДНК мишей спостерігається приблизно у 1.000 разів рідше, ніж спонтанні мутації генів.

Існує ще один сучасний підхід використання так званих *рибосомальних вакцин*. Імуногенність бактеріальних рибосом встановили в 1965 р. Як відомо, рибосоми — це органели, що продукують білок на матриці інформаційної РНК. Виділені рибосоми з матрицею у чистому вигляді і являють собою вакцину. Як приклад можна навести бронхіальну та дизентерійну вакцини (наприклад, ІРС-19, Бронхо-мунал, Рибомуніл). Переваги рибосомальних вакцин обумовлені такими властивостями їх:

Бактеріальні рибосоми нетоксичні для тварин і мало реактивні для людини;

Вони мають більш виражену імуногенність порівняно з корпускулярними вакцинами;

Такі вакцини здатні створювати перехресний імунітет проти різних серотипів і серогруп у межах виду.

Щодо механізму дії рибосомальних вакцин існує декілька гіпотез. Так, згідно з однією з них, захисну дію даних вакцин обумовлено впливом бактеріальної РНК, що реплікується за допомогою клітинної зворотної транскриптази, даючи відповідні фрагменти ДНК; інша гіпотеза передбачає імуногенну дію антигенів-«контамінантів», що містяться у складі рибосомальних препаратів - капсульних полісахаридів, білків клітинної стінки тощо.

8.3. Лікувальні засоби на основі олігонуклеотидів

У більшості випадків генної терапії *in vivo* та *ex vivo* використовують кдоновані генетичні конструкції, що компенсують функціональну форму білку, який не синтезується в організмі хворого або синтезується в дефектній формі. Проте багато захворювань людини (злоякісні пухлини, запалення, вірусні та паразитарні інфекції) пов'язані, навпаки, з надлишковим синтезом нормального білку. Для лікування таких станів розроблено терапевтичні системи з використанням олігонуклеотидів. Невеликий олігонуклеотид може гібридизуватися зі специфічним геном або мРНК та знижувати рівень транскрипції або трансляції, зменшуючи тим самим кількість синтезованого білку, що відповідає за виникнення патології. Олігонуклеотид, який гібридується з самим геном і блокує його транскрипцію,

називається *антигенним*, а той, що гібридизується з відповідною мРНК - *антисенсовим*. Знизити рівень транскрипції та трансляції гена-мішені може також олігонуклеотид, який зв'язується з фактором транскрипції, що контролює експресію специфічного гена. Для попередження активації транскрипції специфічних генів можна використовувати також дволанцюгові олігонуклеотиди, приєднані до білків, що зв'язують ДНК. Нарешті, для зменшення кількості певної РНК можна модифікувати *рибозими* - природні РНК-послідовності, які зв'язуються зі специфічними молекулами РНК і розрізають їх. Вважають, що в недалекому майбутньому лікувальні препарати на основі нуклеїнових кислот знайдуть широке застосування, при цьому головним об'єктом наукових досліджень і клінічних випробувань стануть "антисенсові" олігонуклеотиди.

Для отримання антисенсових РНК використовують вектори для експресії, що несуть ДНК-вставки у такій орієнтації, щоб транскрипти їх були антисенсовими щодо мРНК. Терапевтична дія синтетичних антисенсових олігонуклеотидів залежить від специфічності гібридизації їх з доступним сайтом мРНК-мішені, стійкості проти ДІІ клітинних нуклеаз та наявності системи доставки до клітини. Уже проведено клінічні випробування олігонуклеотидів - лікувальних препаратів першого покоління. Мішенями для них стали РНК цитомегаловірусу, вірусу імунodefіциту людини, а також мРНК генів, відповідальних за розвиток раку, хвороб кишечника та інших недуг.

Особливий тип олігонуклеотидів - невеликі дволанцюгові молекули РНК, так звані короткі інтерферуючі РНК (siРНК, від англ. *short interfering*), які примушують «замовкнути» гени-мішені в клітинах ссавців у культурі. Це нещодавно відкритий природний механізм блокування експресії генів - РНК-інтерференція. Блокування відбувається на рівні трансляції (Рис. 51).

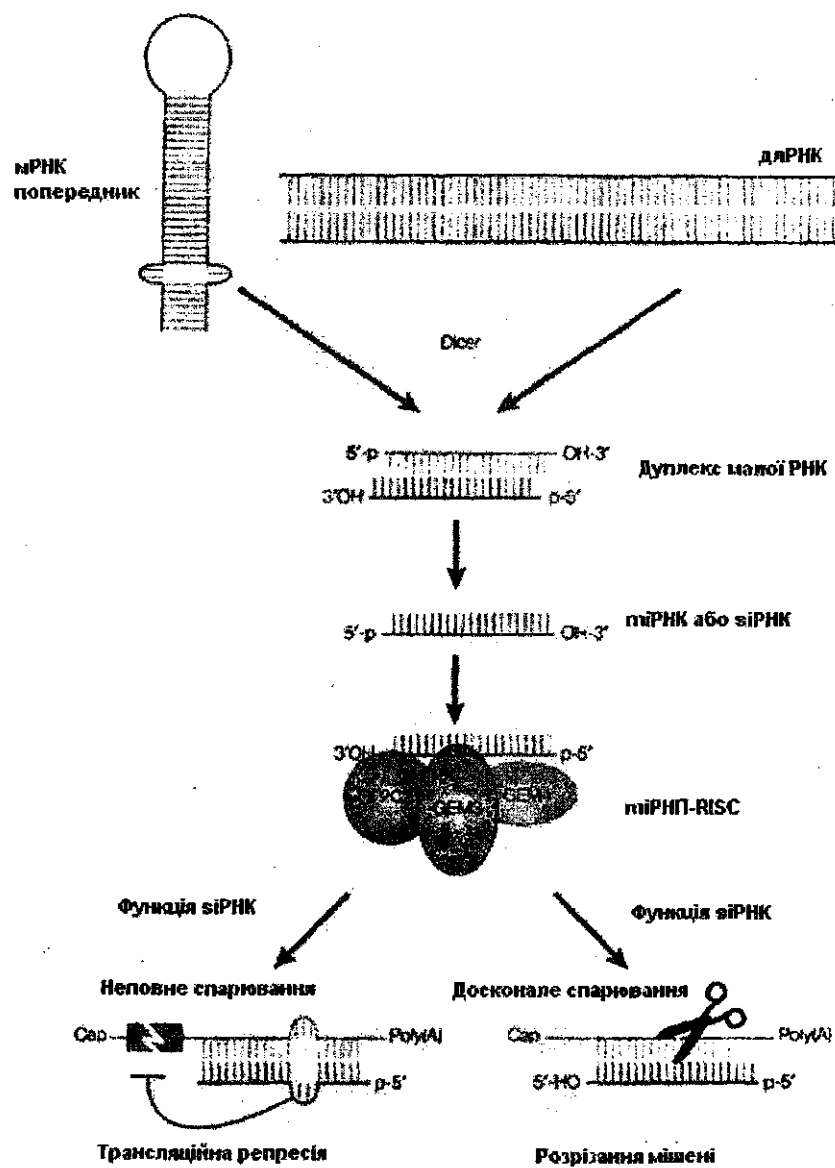


Рис. 51. Схема процесу «приглушення» генів-мішеней за допомогою РНК-інтерференції.

За відкриття і вивчення даного механізму вчені Ендрю Файр (Andrew Z. Fire) та Крейг Мелло (Craig C. Mello) у 2006 році стали лауреатами Нобелівської премії по фізіології і медицині. На перший погляд, різниця між антисенсовими і siРНК невелика. Антисенсові РНК - полінуклеотидні ланцюги, отримані штучним шляхом. Вони зв'язуються з мРНК, які містять комплементарні їм послідовності, що призводить до блокування експресії відповідних генів. siРНК також змушує ген «замовкнути» і використовує для цього комплементарне спарювання з РНК. Відбувається це таким чином: у клітині siРНК переходить в одноланцюгову форму, а один з ланцюгів (гнтисенсовий) включається до складу білкового комплексу; в результаті утворюється РНК-індукований сайленсінг-комплекс (RISC, від англ. *RNA-induced silencing complex*). Цей комплекс зв'язується з мРНК, комплементарній антисенсовому ланцюгу в складі комплексу, і особливий фермент розрізує мРНК. Однак, на відміну від антисенсових РНК, siРНК - інструмент багаторазового використання. Вони зв'язуються все з новими й новими молекулами специфічної мРНК, щоразу виводячи їх з ладу. Вважають, що потенціал siРНК в 100, а то й в 1.000 разів більший, ніж в антисенсових РНК. За рекордно короткий час РНК-інтерференція стала незамінним інструментом для дослідників. Але судити про можливість її застосування в медицині можна буде тільки через деякий час, коли пройдуть перші клінічні випробування. Вчені вважають: якщо те, що вдалося з клітинами свавців у культурі, можна буде відтворити на рівні цілого організму, ми отримаємо унікальний метод створення лікувальних препаратів. Тому сьогодні багато біотехнологічних і фармацевтичних компаній мають підрозділи, які зосередились на суто медичних аспектах siРНК-технологій.

Контрольні запитання до 8 розділу.

Коротко опишіть, як за допомогою ПЛР можна виявити зміни в гені?
Які основні методи використовують для виявлення невідомих мутацій?
Що таке генна терапія *ex vivo*?
Що таке генна терапія *in vivo*?
Детально опишіть дві будь-які вірусні системи адресної доставки генів.
Детально опишіть дві будь-які не вірусні системи доставки генів.
Що таке терапія з використанням "антисенсових" олігонуклеотидів?
Що таке малі інтерферуючі РНК?

Лікування яких спадкових захворювань у майбутньому можливе за допомогою генної терапії?

Які основні стратегії використовуються при розробці генної терапії пухлинних захворювань?

9. ГЕНОМІКА, ПРОТЕОМІКА, БІЛКОВА ІНЖЕНЕРІЯ

Сучасні дослідники починають роботу з ідентифікації частин генома людини, а потім встановлюють їхні функції у стані здоров'я та хвороби. Це поле діяльності отримало назву «функціональної геноміки» або «пост-геномної ери».

Коли проект «Геном людини» розпочинався наприкінці 1980-х рр., наукова спільнота обговорювала доцільність підходу з використанням отриманих крупномасштабних даних у біомедицині. Потім зрозуміли, що геноміка матиме величезний вплив на майбутнє таких напрямків, як відкриття нових ліків, та суттєво змінить медицину. У постгеномну еру (час, після того, як деякі геноми було повністю відсеквеновано) основні зусилля після набуття та накопичення інформації зосередились на більш функціональних поглядах, включаючи різноманітні підходи до отримання великих наборів даних, пов'язаних між собою.

Кількість даних щодо різноманітних геномів наразі експоненційно зростає. З метою подальшого їх аналізу широко використовують комп'ютерні програми пошуку генів. Такі методи пошуку відмінностей у послідовностях ДНК, які кодують білки, поділяються на «внутрішні» та «зовнішні». Перші з них розраховані на аналіз обмежених ділянок, що містять ген; вони порівнюють статистичну картину всередині та ззовні певної ділянки гена. Друга група методів використовує інформацію, отриману при здійсненні аналізу подібності вже визначених білкових послідовностей.

Протеоміка - наука, що займається систематизацією відомостей, що стосуються структури білків. Ця наука виросла з геноміки, але її задачі на декілька порядків складніші. Дослідження з протеоміки зараз включають вивчення профілів білкової експресії біологічних зразків, отриманих у певному фізіологічному стані з метою широкомасштабної характеристики всіх виявлених білків, включаючи їхні постірансляційно модифіковані різновиди (структурна протеоміка), порівняння рівнів білкової експресії у двох або більше фізіологічних станах (тобто нормальних білків та білків, змінених за патологічних умов) (порівняльна або кількісна протеоміка), аналіз білок-білкових взаємодій, субклітинної локалізації білків тощо.

Протеоміка має великий потенціал для впровадженні у практичній медицині. Так, зокрема, проект «Геном людини» виявив, що в людини генів, які кодують білки, значно менше, ніж самих білків (~ 30.000 генів проти ~ 400.000 білків). Таким чином саме протеоміка, на відміну від аналізу генної експресії, є найбільш адекватним шляхом встановлення всієї

повноти картини мультибілкового комплексу клітин за умови нормальної фізіології людини та різних її патологій.

Зараз можна не тільки зчитувати послідовності, але й аналізувати всі модифіковані білки: фосфорильовані, глікозильовані, процесовані тощо (Рис. 52).



Рис. 52 Графічне представлення ідентифікованих на даний час білків, згруповане на основі їх функціональної ролі та процесів, у яких вони беруть участь.

Один з напрямків протеоміки - розробка нових шляхів діагностики та створення прогностичних біомаркерів. Для вирішення цієї задачі у протеоміці існує декілька відмінних один від одного аналітичних підходів, які включають в себе мас-спектрометрію, двовимірний електрофорез у поліакриламідному гелі, використання радіоактивної мітки та аналіз даних за допомогою комп'ютерної техніки.

Протеомний аналіз ведуть наступним чином. Перший етап - двовимірний електрофорез, який дає розділення за молекулярною масою та

ізоелектричною точкою. Другий етап - аналіз. Показано, що в патологічно змінених тканинах вміст деяких білків збільшується (це має значення для онкології), а в інших - зменшується. Третій етап - мас-спектроскопія, за допомогою якої можна прочитати послідовності цих білків з точністю до атомів. Можна виходити на атомарний рівень і визначати залишки глюкози, фосфорної кислоти в молекулі білку, можна визначати послідовності окремих білків у суміші, не розділяючи їх.

У більшості випадків розділені білки кількісно вимірюють, порівнюючи білкові профілі, отримані при різних фізіологічних станах, використовуючи при цьому фарбування відповідними хімікатами, після чого ідентифікують методом мас-спектрометрії. В інших методиках білки ідентифікують без попереднього розділення. Білкова суміш розщеплюється протеазами, а отримана у такий спосіб пептидна суміш розділяється за допомогою різних хроматографічних прийомів та аналізується далі на мас-спектрометрії для отримання інформації щодо послідовностей пептидів. Цей метод відомий, як «протеоміка дробовика» (shot-gun proteomics).

Уся набута інформація щодо структури білків зберігається у сучасних банках даних. Нині там знаходиться до 4 млн геномних послідовностей, але тільки 10.000 відомих тривимірних структур для 2.000 окремих білків. Задача протеоміки - аналіз білку, встановлення його послідовності, співвіднесення цієї послідовності з банком даних та встановлення тривимірної структури за допомогою методу рентгено-структурного аналізу.

Білкова інженерія - нова галузь молекулярної біології та біотехнології. Вона виникла як синтетична наука і увібрала в себе останні досягнення генної інженерії, структурної біології та комп'ютерних технологій. Теоретичним підґрунтям білкової інженерії стала протеоміка. Як головне завдання білкова інженерія ставить направлену зміну структури наявних білків для надання їм нових унікальних або зміни наявних властивостей. У білковій інженерії дизайн білку здійснюють на рівні його просторової структури, у чому полягає її принципова відмінність від генної інженерії, хоча експериментальні методи і підходи генної інженерії становлять складову частину білкової інженерії.

У свою чергу, головні напрямки білкової інженерії нині - це: структурно-функціональний аналіз білків методом сайт-спрямованого мутагенезу окремих амінокислотних залишків; створення химерних і мультифункціональних білків; випадковий мутагенез і селекція білків з певною функцією (молекулярна еволюція); створення штучних білків *de novo*.

До проблем білкової інженерії належать: зміна специфічності ферментів та їхніх каталітичних характеристик; зміна структурних властивостей білків (підвищення термостабільності, стабільності в органічних розчинниках, зміна фізико-хімічних властивостей, модифікація специфічності

зв'язування лігандів, зміни внутрішньомолекулярної динаміки білку); створення нових систем (химерні та мультифункціональні білки, введення репортерних доменів та інші); підвищення ефективності білків як терапевтичних макромолекул для застосування у фармакології та медицині.

Послідовність окремих етапів дослідження білкової інженерії наведено на Рис. 53. На першому етапі здійснюється дизайн білку та моделювання, на наступних - сайт-специфічний мутагенез, експресія та очищення мутантного білку, його функціональний та структурний аналіз. При цьому успіх дизайну білку за допомогою комп'ютерних методів залежить як від розуміння прищипів укладки (*фолдингу*) білків, так і від структурної інформації, що отримується з баз даних. Цикл головних етапів дослідження білкової інженерії повторюється доти, доки не буде досягнуте поставлене завдання.



Рис. 53. Цикл окремих етапів дослідження в білковій інженерії

Можливість спрямованих селективних заміन певних амінокислотних залишків методом сайт-спрямованого мутагенезу, розглянутого раніше, сприяє вивченню функціональної ролі таких залишків. Під час проведення мутагенезу цього типу відбувається спрямована зміна певного нуклеотиду в послідовності гена, що приводить до заміни відповідної амінокислоти у білку. При цьому використовують олігонуклеотидний праймер, до послідовності якого введено плановану мутацію, з наступним його включенням до складу молекули ДНК у ході полімеразної ланцюгової реакції або матричного синтезу ДНК. Застосовуючи методи сайт-направленого мутагенезу, можна вводити до ДНК такі мутації, як точкові заміни, вставки, делеції, інверсії, злиття генів.

Комп'ютерне моделювання білків - один з ключових етапів застосування Методів білкової інженерії. На основі аналізу експериментально визначених структур білків розроблено емпіричні правила і алгоритми прогнозу трьохмірної їх структури, які лежать в основі молекулярного моделювання просторової структури білків. Нині спеціальний банк даних містить 15 тис. просторових структур різних білків. Атомні координати гомологічного білку можуть бути використані як просторова матриця для моделювання за гомологією. За допомогою "комп'ютерного мутагенезу" бокові радикали амінокислотних залишків замінюються на залишки модельованого білку. Для аналізу моделі просторової структури білку й наступного дизайну нової структури білку використовують методи комп'ютерної графіки.

Один з прикладів застосування білкової інженерії у біотехнології - штучне підвищення стабільності білків. Загальновідомо, що використання ферментів у інженерній ензимології звичайно включає проведення біотехнологічних процесів при підвищених температурах. Критичний параметр для використання ферментів в біотехнологічних процесах - їхня термостабільність. На сьогодні стандартний підхід для збільшення термостабільності білків - конструювання термостабільних мутантів введенням S-S-зв'язків на основі відомої тривимірної структури. Такий підхід реалізовано, зокрема, для ксиланази з *Bacillus circulans* за рахунок введення нових S-S-зв'язків методом сайт-спрямованого мутагенезу. Сукупність мутацій призвела до отримання мутантного білку ксиланази, термостабільність якого збільшилася на 15°C. У результаті введення мутацій з'ясувалося, що збереження активного центра цього ферменту залежить від стабільності одного з елементів структури - р-листка, оскільки саме він мобільний у цій структурі.

Дизайн білків *de novo* передбачає конструювання нових поліпептидних послідовностей - носіїв заданих функцій білку, здатних згорнутися у певні просторові структури з компактною укладкою. Прикладом такого підходу можна вважати дизайн білку cs^4 , що складається з чотирьох поєднаних трьома петлями α -спіралей і містить гідрофобне ядро з лейцинових залишків. Отриманий білок був компактним, стабільним при денатурації, з високим вмістом α -спіральних структур, але водночас перебував у стані так званої розплавленої глобули, що являє собою проміжну стадію в самоорганізації білку. Р-Структурний білок бетабелін сконструювали за типом «сандвіча» з двох ідентичних чотирьохланцюгових антипаралельних Р-структур. Далі таким чином отримано кілька металозв'язувальних білків: тетраспіральний білок «геліхром», що зв'язує залізо, та гемопротейд, що зв'язує рутеній.

Дослідникам вдалось сконструювати також білки з новою, не знайденою досі в природі структурною організацією. Одна з таких білкових

структур, альбебетин, складається з двох елементів сфр і являє собою 4-тяжевий антипаралельний Р-лист. Далі альбебетин модифікували для введення його до складу біологічно, активної ділянки фрагмента інтерферону. Аналіз структури нового білка альбеферону (альбебетин з фрагментом інтерферону) показав, що він компактний, стабільний і має близьку до албебетину вторинну структуру, тобто введення біологічно активного фрагмента не порушило суттєво загальну структуру штучного білку. У перспективі подібні білкові конструкції можуть бути використані як носії різних біологічних активностей.

Загалом білкова інженерія відкриває цікаві перспективи у біотехнології. Передбачається створення нових мутантних білків для медицини, зокрема, цитокінів з посиленою біологічною активністю, модифікованих антитіл тощо. На основі експресії *in vivo* мутантних білків зі зміненими властивостями (посилена або послаблена дія, елімінація сайтів фосфорилування, протеолізу тощо) можливе створення нового підходу у генній терапії.

Підвищення стабільності білків методами направленої зміни їхньої структури розширює можливості застосування їх у різних областях біотехнології. Новим напрямком використання білкової інженерії може бути її поєднання з мікроелектронікою та створення нових біосенсорів. У свою чергу, це відкриває можливості появи виключно малих швидкодіючих біодатчиків для комп'ютерів нового покоління.

Контрольні запитання до 9 розділу.

Що таке геноміка та протеоміка?

Які фізичні та хімічні властивості білків можна змінювати за допомогою сайт-спрямованого мутагенезу?

Як можна підвищити стабільність певного білка?

10. ПОТЕНЦІЙНІ ЗАГРОЗИ ВІД ВПРОВАДЖЕННЯ ТРАНСГЕННИХ ТЕХНОЛОГІЙ ТА БІОБЕЗПЕКА

Трансгенна біотехнологія - одна найпередовіших галузей сучасної біоіндустрії та особливо сучасного сільського господарства; вона стрімко розвивається. Широкомасштабне застосування трансгенних культур не тільки обіцяє, згідно із прогнозами, різке підвищення продуктивності сільського господарства в найближчому майбутньому. Вже зараз посіви трансгенних рослин займають значні площі в ряді країн світу й, зважаючи на все, застосування трансгенних організмів буде розширюватися.

Властивості, отримані сільськогосподарськими культурами в результаті генно-інженерної модифікації, можуть бути надзвичайно цінними. Стійкість до дії гербіцидів і пестицидів, надзвичайно широкий діапазон температур довкілля, при якому забезпечується збереження плодів, а врожайність не знижується, підвищення показників урожайності - все це досягло значних висот. Те саме стосується виражених корисних властивостей деяких продуктів, як, наприклад, оптимізований для профілактики атеросклерозу і надлишкової ваги профіль жирних кислот у деяких сортах генетично модифікованої кукурудзи та сої, особливі властивості крохмалю в картоплі (завдяки цьому не всмоктується багато жиру під час смаження картоплі).

Проте поряд з позитивними результатами, які стосуються високої ефективності трансгенних організмів і висловлюваним із цього приводу оптимізмом, у суспільстві (в основному серед екологів, політиків, активістів природоохоронних організацій і рухів) наростає занепокоєння, пов'язане з потенційною екологічною небезпекою широкого застосування трансгенних організмів. Занепокоєння базується переважно на уявленнях про те, що введення чужорідних ДНК в основні сорти продовольчих культур - процес не природний і тому супроводжується ризиком для здоров'я. Але оскільки всі живі організми, включаючи сільськогосподарські культури, тварин, мікроорганізмів тощо, містять ДНК, як можна вважати неприродними рекомбінантні ДНК (скомбіновані з наявних у природі генів)? Навіть визначення поняття «чужорідний ген» проблематичне, бо велика кількість генів спільна для багатьох різних організмів.

Від самого початку становлення генної інженерії ставлення до неї було неоднозначне. Загалом висловлювалися побоювання, що трансгенні організми, які створено без урахування їхніх ймовірних екологічних характеристик і які не пройшли тривалої спільної еволюції з природними організмами, «вирвавшись з пробірки на волю», зможуть безконтрольно й необмежено розмножитися, що приведе:

до витіснення природних організмів з місць природного розселення їх (з екологічних ніш);

до наступної ланцюгової реакції «падаючого доміно» порушень екологічної рівноваги;

до зменшення біорізноманіття;

до активації сплячих, раніше невідомих патогенних мікроорганізмів;

до «втечі» чужорідних генів із трансгенних організмів;

до хаотичного переносу генів у біосфері;

до появи монстрів, що знищують усе.

З часом виявилось, що первісні страхи були сильно перебільшені. Спочатку техніка безпеки робіт з трансгенними організмами виходила з того, що ці химери можуть бути небезпечними, як, наприклад, чума, холера, віспа тощо. Тому з трансгенними мікробами працювали у спеціальних інженерних спорудах, звідкіля живою могла вийти тільки людина, та й то, після того, як зніме спецодяг. Однак поступово стало ясно, що ризик сильно завищували. Як вже відмічалось (гл. 5), трансгенні мікроорганізми виявилися менш жстездатними, ніж вихідні форми. До того ж існує надзвичайно велика відмінність у функціонуванні про- і еукаріотичних генів, що теж обмежує потенційну загрозу довкіллю від генетично модифікованих організмів.

Загрози, яких зараз очікують від генетично модифікованих продуктів, можна умовно розділити на дві категорії - потенційні (гіпотетичні) і... приписувані. Що стосується останніх, то сюди можна віднести алергійні реакції (у тому числі неправильно інтерпретовані реакції на введення деяких антибіотиків) і нібито відмічені гормональні зміни (фемінізацію хлопчиків і передчасне статеве дозрівання дівчаток). Жоден з Цих ефектів генетично модифікованих продуктів у даний час не підтверджений методами доказової медицини - і це значить, що всі дані твердження можуть вважатися фактично голосливими.

Складніше стоїть справа з загрозами потенційними. У фахівців основні побоювання пов'язані, у першу чергу, із трансгенними мікробами. По-перше, якщо їх одного разу випустити в природу, цей процес неможливо повернути назад. По-друге, у світі мікроорганізмів розповсюджений обмін генами між різними видами. По-третє, екологічні взаємодії між мікроорганізмами і а так само поміж мікро- та макроорганізмами, вивчені дуже мало. По-четверте, вважається, що на даний час науці відомі лише від 1 до 10 % наявних у природі мікроорганізмів, інші залишаються невідомими. Тому прогнозувати наслідки інтродукції трансгенних мікробів у природні екосистеми дуже важко. Саме тому у світі проведено лише 10 польових випробувань трансгенних мікроорганізмів, але більш як 25,000 польових випробувань трансгенних рослин.

Біотехнологів звинувачують у насильстві над природою, оскільки вони, на відміну від звичайних селекціонерів, пересаджують гени звідки завгодно і куди завгодно, що може призвести до непередбачуваних наслідків. Деякі непередбачувані (вторинні) ефекти вбудовування чужого гена в геном рослини можливі. Але вони такою ж мірою властиві й звичайній селекції. І генна інженерія, і селекція переносять новий генетичний матеріал, який може викликати порушення роботи генів, модифікацію їх, виключення або активацію, здатність синтезувати якісь нові білки або змінювати рівень синтезу вже наявних білків. Нові продукти життєдіяльності клітин, у принципі, можуть бути й токсичні, і алергенні, і канцерогенні.

Прикладом появи непередбачуваних результатів у звичайній селекції служить історія з гібридом кукурудзи «Техас». На початку 1970-х рр. величезні посівні площі цієї культури в США були спустошені грибовим захворюванням. З'ясувалося, що продукт гена, специфічного для даного гібрида, взаємодіяв з токсином гриба, що в результаті приводило до розвитку захворювання.

Отже, генетична модифікація рослин за можливими наслідками не більш небезпечна, ніж звичайна селекція. Навіть більше: іноді селекція призводить до набагато більш істотних порушень в геномі рослини, ніж спрямована генетична модифікація. З 1930-х рр. для селекції використовують радіацію та хімікати, що викликають мутагенез. Досі відомо близько 2.200 сортів різних культур, отриманих у такий спосіб. Очевидно, що на відміну від генетичної модифікації таке грубе втручання зачіпає не один ген і має непередбачувані наслідки.

Небезпечнішим за генетичну модифікацію може бути навіть звичайне схрещування. Наприклад, латинські літери (Т, N, V, F) на упаковках насіння томатів означають стійкість проти різних захворювань, отриману шляхом схрещування з неїстівним для людини диким томатом. Помідори N, стійкі проти нематоди, містять сегмент (3,5 млн п.н.) з генома дикого родича цього сорту; фрагмент складає 0,3 % від усієї ДНК томату (для порівняння, ген стійкості в трансгенних рослинах має всього близько 7 т.п.н.). Таким чином, звичайне схрещування, крім потрібного гена, вносить у рослину декілька десятків зайвих невідомих генів. А гени з неїстівної рослини цілком можуть кодувати токсини, алергени та інші шкідливі для людини речовини. Парадокс полягає в тому, що томат, куди методами генної інженерії перенесли один-єдиний відомий і перевірений ген, ретельно вивчатимуть і регулюватимуть його розповсюдження, а томат, у який звичайною селекцією перенесли десятки невідомих генів, за міжнародними правилами не вимагає ніякого контролю та вивчення.

Головний контраргумент прихильників генетично модифікованих продуктів зводиться до відомого вислову «Людина завжди вживала в їжу

рослини і м'ясо тварин, але у неї не виросли ані листя, ані хвіст — в організмі всі білкові молекули і ДНК (тобто, гени) розпадаються, як правило, до структурних одиниць - амінокислот і нуклеотидів, однакових для всього живого».

Так чи інакше, але якщо побоювання щодо трансгенних організмів тією чи іншою мірою виправдані, то застосування їх дійсно варто обмежити й воно повинне суворо регулюватися; якщо ж ці побоювання не виправдані, то вони можуть сильно загальмувати розвиток передової галузі біоіндустрії. От чому розробка методів раціональних і науково обґрунтованих оцінок ризиків, пов'язаних із широким застосуванням трансгенних культур, досить актуальне й практично необхідне завдання. Зокрема, у цей час у багатьох країнах прийнята або обговорюється можливість прийняття державних документів, які (з врахуванням науково обґрунтованих оцінок ризиків, що пов'язані із використанням трансгенних організмів) повинні дозволити, обмежити або заборонити використання трансгенних організмів.

Приблизно половина всіх програм, опрацьовуваних ООН, UNIDO, UNEP, спрямовані на те, щоб запропонувати проекти міжнародних угод для вирішення проблем, пов'язаних із трансгенними організмами. Розроблені два головних документи - «Кодекс добровільно прийнятих правил, яких слід дотримуватися при інтродукції організмів у навколишнє середовище», підготовлений секретаріатом UNIDO, і «Протокол з біобезпеки у рамках Конвенції з біологічної розмаїтості» UNEP. Вважають, що Кодекс як зразок для добровільного наслідування буде корисний для урядів при розробці чи зміні національних правил, які регулюють створення трансгенних організмів та роботу з ними. Згідно з Протоколом, очікується, що кожна сторона, яка приєднується до Конвенції з біорізноманіття, вводитиме і реалізовуватиме запобіжні заходи для недопущення несприятливого впливу трансгенних організмів на біорізноманіття.

В останні роки минулого сторіччя дослідники приступили до інтенсивного створення трансгенних організмів, корисна дія яких повинна проявлятися в довкіллі і які призначені для здійснення дуже знаменного етапу в розвитку цивілізації - для спрямованої генетичної модифікації біосфери. Це означає, що такі трансгенні мікроорганізми, рослини й тварини житимуть не в біореакторах, не в теплицях та клітках, а на волі. Цілі, які дослідники ставлять перед собою при створенні цих організмів, такі:

- призупинення розпаду та наступне поліпшення довкілля;
- заміна (у максимально можливих масштабах) невідновлюваних джерел енергії і сировини;
- підвищення ефективності сільського господарства і харчової промисловості;
- контроль над спадковими захворюваннями людини;
- генна терапія спадкових хвороб людини;

генетична модифікація людини;
клонування людини;
створення організмів, призначених для поширення життя на інших планетах;

створення принципово нових, більш перспективних форм життя.

Усі ці проекти за ступенем їхнього практичного втілення можна розподілити на чотири групи. Проекти *першої групи* успішно здійснюються й розвиваються. Це, головним чином, створення різних трансгенних рослин і тварин. Проекти *другої групи* реалізуються тільки в лабораторних умовах, оскільки масове застосування відповідних трансгенних організмів у відкритому середовищі поки що заборонене через неясність екологічних наслідків. Це, в основному, трансгенні мікроорганізми, призначені для очищення ґрунтів і акваторій від забруднення (біоремедіація), для поліпшення довкілля тощо.

Проекти *третьої групи* не реалізуються й не розробляються з морально-етичних причин. Це, в основному, роботи з повного клонування людини та створення трансгенних людей. Клонування організму - це технологія, у результаті якої організм розвивається не з заплідненої яйцеклітини, а з соматичної клітини. Ядро соматичної клітини, узятє від іншого індивіда, в умовах *in vitro* зливають з яйцеклітиною і імплантують так званій сурогатній матері, що виношуватиме дитину, не будучи його генетичною матір'ю. Потім у нормальний термін повинна народитися людина, точна копія того, хто був донором клітини.

Клонування *in vitro* людських ембріонів до віку не більш 14 днів, потрібних для одержання з них культур клітин для медицини, в Англії вже дозволене. З'явилися повідомлення про початок клонування людей і до того ж у тих країнах, де це не викликає моральних заперечень. Вже з'явився новий термін «off-shore biotech lab» - офшорна біотехнологічна лабораторія. Великий комплекс моральних, етичних, філософських та богословських проблем, пов'язаних з цим питанням, у цьому підручнику не розглядаються. З ними можна ознайомитися з рекомендованої літератури.

Проекти *четвертої групи* ще перебувають на початковій стадії розробки через їхню високу складність. Це, в основному, створення принципово нових форм життя й організмів для колонізації інших планет. У цьому випадку вже синтезовано два нових нуклеотиди для побудови нового генетичного коду та 80 нових амінокислот. В НАСА обговорюють проект створення мікроорганізмів для Марсу, які повинні утилізувати компоненти марсіанського ґрунту і виділяти вуглекислий газ; остання обставина має привести до глобальної зміни клімату цієї планети.

Відповідно до загальноприйнятої у світовій науковій літературі точки зору, методологія оцінок екологічного ризику трансгенних організмів

повинна базуватися на основних принципах і положеннях Картахенського Протоколу з біобезпеки (2000 р.) Конвенції про біологічну розмаїтість. Мета цих міжнародно погоджених принципів полягає, зокрема, у «забезпеченні належного рівня захисту в області безпечної передачі, обробки й використання живих змінених організмів, що є результатом сучасної біотехнології та здатні несприятливо вплинути на збереження й стійке використання біологічної розмаїтості...»

У цілому всі ризики, пов'язані із застосуванням трансгенних організмів, можуть бути віднесені або 1) до потенційної небезпеки для здоров'я людини чи тварин при вживанні їжі й/або кормів, отриманих із трансгенних організмів, або 2) до потенційної екологічної небезпеки виробництва трансгенних організмів для біоти різних екосистем, особливо для біорізноманіття агроекосистем.

Стосовно першої групи ризику вчені виділяють три основні небезпеки, що можуть виникнути. По-перше, несподівані результати прояву активності гена. Йдеться, по-перше, про можливі зміни хімічного складу та зниження харчової цінності продукту. По-друге, можливі зміни технологічних параметрів, що погіршують споживчі властивості продуктів. По-третє, не виключено, що в результаті генної модифікації можуть синтезуватися якісь компоненти, що викликають алергічні реакції, чи з'явитися небезпечні сполуки, які з мутагенними, канцерогенними чи токсикогенними властивостями.

Цього ми боїмося, і виходить, повинні опрацювати адекватну систему оцінки трансгенної продукції. Мало довести, що ген дуже вузько змінює фактично одну молекулу з мільйона в складі даного продукту; важливо показати, що не змінюються його властивості та не виникають небезпечні нові особливості. Модифікації роблять генетики та біотехнологи, одержуючи блискучі результати, а далі цілий ряд досліджень повинні провести медики. Оцінка генетично зміненого продукту включає три блоки питань. Перший, медико-генетичний, оцінює зміни в генотипі організму та можливість їхнього подальшого впливу на людину. Другий, технологічний, встановлює, що отриманий цим методом продукт не змінює свої технологічні властивості. І третій, величезний блок медико-біологічної оцінки, досліджує вплив трансгенних продуктів на імунний статус організму, систему ферментного захисту клітини та оцінює потенційну мутагенність. Тільки після вивчення цих показників, у тому числі на декількох поколіннях лабораторних тварин, починається процес державної реєстрації та отримується дозвіл на широке використання при обов'язковому подальшому моніторингу.

Стосовно другої групи ризику, то наразі основна можлива небезпека від трансгенних рослин, які масово вирощуються у відкритому ґрунті. Існує

також ймовірність небажаного потрапляння трансгенних мікроорганізмів з промислових умов до природних екосистем. А чи можливо на сьогоднішній день за допомогою науково обґрунтованих методів дійсно оцінити реальні кількісні показники екологічного ризику, що може бути викликаний, наприклад, вирощуванням трансгенних рослин? Особливо це стосується вирощування ентомоцидних трансгенних рослин, які вже культивуються в світі на 20 млн га; ці рослини несуть гени ентомоцидних токсинів і призначені для ураження певних видів комах. Це стосується й трансгенних рослин, стійких проти гербіцидів тощо. Так, з оцінками агро-екологічного ризику ентомоцидних трансгенних рослин пов'язані серйозні труднощі. Як правило, агроекосистеми досить складні й складаються з великої кількості популяцій видів, які взаємодіють між собою. Ці популяції можуть перебувати як у конкурентних взаємовідносинах, так і в симбіотичних. Популяції поєднані одна з одною досить складними й часом розгалуженими трофічними зв'язками. Визначення й опис домінантних видів і кількісна характеристика їхніх взаємодій як один з одним, так і з довкіллям - завдання, що потребує великих затрат часу та праці. Теоретично, безпосередньо викликане трансгенними рослинами збільшення або зменшення чисельності якихось видів тварин може призвести до наступної зміни чисельності популяцій інших видів, що перебувають, зокрема, у відносинах типу "хижак-жертва" тощо. Для оцінки причиново-наслідкових зв'язків, що можуть призвести до небажаних наслідків, необхідне вичленовування істотних характеристик агроекосистем і прийнятний ступінь досить детального їх опису. Такими істотними характеристиками можуть бути: а) **біорізноманіття** - стосовно до основних панівних видів рослин, тварин і мікроорганізмів, а також показники їхньої питомої щільності (чисельності), б) основні **трофічні взаємодії** в агроекосистемах і **в) критерії неприйнятності змін в агроекосистемах**.

Сьогодні розглядають такі основні типи ризиків, безпосередньо пов'язаних з ентомоцидними трансгенними рослинами:

1) ураження нецільових комах, зокрема, порушення балансу в системах хижак-жертва, що тягне за собою небажане підвищення або зниження чисельності інших тварин;

2) виникнення стійкості до ентомотоксину у цільових і нецільових комах, що, у свою чергу, повинне призвести до: а) зниження ефективності ентомоцидної дії ентомоцидних трансгенних рослин і мікробних препаратів *Bt*-токсинів, б) зниженню чисельності природних мікроорганізмів (зокрема, *Bacillus thuringiensis*), яким для свого розвитку необхідні життєздатні комахи, чутливі до *Bt*-токсинів;

3) інтрогресію трансгенів - перенесення з пилком ентомоцидних трансгенних рослин їхніх трансгенів у вихідні нетрансгенні сорти й/або до

їхніх диких родичів і викликане цим генетичне забруднення сортів культивованих рослин та дикорослих видів, що зменшує їхнє біорізноманіття.

Тому коли вчені планують створення нових рослин за допомогою біоінженерії, то детально обговорюється кожен ген, що вводять у новий продукт. Після створення нового трансгенного організму його безпека ретельно перевіряється. За заданих умов, під суворим контролем, протягом трьох років проходить випробування та оцінка впливу даного трансгенного організму на довкілля, нецільові організми, найпоширеніші ентомофаги, ураження ґрунтових комах, ризик негативного впливу на ризосферні мікроорганізми, ризик виникнення й поширення стійких комах, рослин тощо, ризик негативних плейотропних ефектів трансгенів, можливість передачі трансгена іншим організмам тощо. Наприклад, у світовій практиці до виходу трансгенної рослини на ринок проходить, як правило, до 10 років. Незважаючи на всі наявні заходи безпеки, все ж є проблемні моменти. Так, проведені широкомасштабні дослідження використовуваних ентомоцидних Vt-рослин не виявили негативного впливу на різні екологічні ніші. Є тільки декілька повідомлень про зниження здатності бджіл до навчання. Але в 2001 р. були оприлюднені дані про те, що в природних популяціях кукурудзи (провінція Оаксака, Мексика, природний центр походження кукурудзи) виявлено ДНК, комплементарну до 35S вірусу мозаїки кольорової капусти CaMV, який широко застосовується як промотор; це призвело до широких дискусій. Тому в Мексиці було створено комісію і проведено повторні дослідження, в результаті яких показано, що до 12 % дикорослих рослин кукурудзи, а в деяких районах і до 36 %, містять трансгенний промотор. Крім того, в деяких зразках виявили послідовності ДНК, комплементарні до Vt-конструкцій. У травні 2002 р. незалежні групи вчених заявили, що немає ніяких сумнівів в тому, що приблизно 10 % традиційних сортів кукурудзи містять трансгени. Тому керівництво Мексики заборонило посів трансгенної кукурудзи по всій території країни. Оскільки трансгени передаються з пилком, ведуться активні роботи по отриманню трансгенних рослин, що несуть трансген не в ядерному геномі, а в хлорогшастному. Цитоплазматичні гени не потрапляють до складу пилку тому, бо у більшості рослин вони передаються по материнській лінії. Крім того, ці рослини будуть безпечними і для комах, що контактують з пилком.

Виходячи з наведених даних, бажано, щоб у комплексі методологічно обґрунтованих оцінок ризиків був би блок методів, максимально уніфікованих і стандартизованих а також, разом з тим, концептуально обґрунтована методологія, що дозволяє прогнозувати ризики, виходячи з суто специфічних характеристик як самого трансгенного організму, так і запланованого регіону його інтродукції.

Прогнозування поведінки екосистем, що базується на математичному моделюванні їхньої просторово-часової динаміки або на аналізі часових рядів, які отримані під час спостережень (експериментів) - надзвичайно важкий процес. Звичайно, така динаміка добре прогнозується тільки на порівняно коротких відрізках часу, обмежених так званим горизонтом передбачуваності. Поки що узагальнення й попередній аналіз опублікованих матеріалів з екологічної оцінки виробництва трансгенних організмів дають змогу зробити попередній висновок про те, що ступінь тяжкості можливих негативних наслідків використання трансгенних організмів (як й імовірність їхньої реалізації) залишається невизначеною. Тому, зрозуміло, методи оцінок екологічних ризиків, пов'язаних із сучасною генно-інженерною біотехнологією, повинні постійно розвиватися, уточнюватися й удосконалюватися. Бажано, щоб темп розвитку й застосування цих методів випереджав світове зростання кількості створених трансгенних організмів та їхнє використання. Наразі цього не спостерігається.

Зараз на ринку продовольчої сировини відбувся розподіл на генетично модифіковані культури (ГМ-культури) та «звичайні», генетично немодифіковані. Для забезпечення цього розподілу зараз у харчовій промисловості Європи та США існує два типи систем «зберігання ідентичності» (IP-systems): м'яка (soft IP-system) та жорстка (hard IP-system). Жорстка система зберігання ідентичності передбачає кількісний контроль наявності ГМ-продуктів по всьому виробничому циклу, починаючи від контролю насіння, його збору, окремого зберігання, транспортування та поставки на переробні підприємства, а також контроль окремої переробки генетично немодифікованої сировини, виробничий контроль, окреме зберігання кінцевих продуктів після пакування та відвантаження з підприємства. М'яка система зберігання ідентичності передбачає лише контроль на переробних підприємствах чи контроль кінцевого продукту у відповідності з гоюванням у державі законодавством.

Обов'язкове маркування продукції, яка містить генно-модифіковану сировину, не означає, що даний продукт шкідливий для здоров'я людини. Це лише додаткова інформація для споживачів, які мають право вибору.

Підводячи підсумки, слід визнати, що звичайно, про повністю гарантовану безпеку трансгенних організмів для людського здоров'я говорити поки що не доводиться, хоча б тому, що сучасна генна інженерія аж ніяк не досконала. Однак ймовірність наявності негативних впливів при використанні генетично модифікованих продуктів однозначно оцінюється фахівцями як низька. Загалом, за увесь час інтенсивного застосування генної інженерії в усьому світі за більш ніж 30 років жодного випадку виникнення небезпеки, пов'язаної з трансгенними організмами,

зареєстровано не було. До цього потрібно додати, що з цією «загрозою» кожен з нас має право боротися у добровільному порядку - ігноруючи генетично модифіковані продукти у продажу. У деяких країнах, включаючи європейські, законодавством передбачене обов'язкове маркування харчових продуктів, що містять визначені кількості генетично модифікованих компонентів. Для Європи, наприклад, ця кількість складає 0,9 %. Слід, однак, відмітити, що спеціальне маркування продуктів харчування, вміст генетично модифікованих компонентів у яких перевищує 0,9%, в Україні зараз не обов'язкове - поки що ця справа суто добровільна.

Нині жоден із сортів генетично модифікованих рослин не дозволений для комерційного вирощування на території України. Державний дозвіл можна одержати тільки на польові випробування, що проводитимуться за умов нерозповсюдження трансгенних рослин у довкіллі. За даними Міністерства екології і природних ресурсів України, такі досліді проводили компанії «Монсанто», «КВС» та «Авентіс» у Київській і Черкаській областях.

Оскільки Україна намагається стати членом Світової Організації Торгівлі (СОТ), вона буде змушена відкрити кордони для генетично модифікованих продуктів із США та інших країн. Якщо ви купуєте соєве молоко виробництва США та Канади, то, незважаючи на відсутність відповідного маркування, ймовірно, що воно зроблене з трансгенної сої. Є дані, що генетично модифіковані продукти реалізуються через мережу "McDonalds". Важче визначитися з багатокомпонентними продуктами, які теж можуть містити добавки з генетично модифікованих продуктів, такі як ковбаса і м'ясні вироби, печиво, морозиво тощо. До речі, вони не повинні неодмінно бути імпортного виробництва. У звичайному вітчизняному кетчупі може бути модифікований крохмаль, а у цукерках - соя. Генетично модифікованими можуть бути такі продукти, як кукурудзяна олія, кукурудзяний крохмаль, соєвий білок та соєве масло, лецитин, соєвий соус, бавовникова олія. Генетично модифікована соя може міститися у деяких сортах печива, в дитячому харчуванні, маргаринах, супах, піці, їжі швидкого приготування, у ковбасах, цукерках, морозиві, чіпсах, шоколаді, соусах. Генетично модифікованими можуть бути також імпортні полуниці, кабачки, папайя, цикорій тощо.

Продукти генної інженерії вносять в наше життя багато нового та необхідного, завдяки цим продуктам людство може реалізувати свої потреби, необхідно лише дотримуватися правил безпеки при впровадженні цих продуктів.

Настав вік біотехнологій. Бо практично у всіх сферах людського життя можуть бути використані методи генної інженерії. Якщо держава не

приділити уваги даній галузі сьогодні, то ми відстанемо від світового рівня не на роки, а на віки.

Контрольні запитання до 10 розділу.

Що таке біобезпека?

У чому полягає сутність генетичного ризику й можливої небезпеки в біоінженерії?

Обсудіть тезис «Генна інженерія... - це технологія, що суперечить фундаментальним законам природи».

Які критерії використовують при винесенні рішення щодо можливості використання генетично модифікованих організмів і отриманих із них нових харчових продуктів?

Як ви вважаєте, які державні органи та інститути повинні контролювати дослідження в області рекомбінантних ДНК?

Як контролюють створення генетично модифікованих організмів, що призначені для вільного використання в навколишньому середовищі і навіщо такий контроль є необхідним?

У чому причини і який зміст суспільного протесту проти біоінженерії у світі?

Наведіть аргументи щодо необхідності впровадження систем маркування продукції.

Запропонуйте закони, постанови уряду або інші нормативно-правові акти, які необхідно прийняти в нашій країні в області біотехнології, генно-інженерної діяльності й біобезпеки?

ЛІТЕРАТУРА

Основна

- Биотехнология / Под ред. А.А. Баева. - М.: Наука, 1984. - 310 с.
Герасименко В.Г. Биотехнология. - К.: Вища школа, 1989. - 186 с.
Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. - М.: Мир, 2002. - 589 с.
Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии. - М.: Academia, 2003. - 208с.
Зенгбуш П. Молекулярная и клеточная биология. - М.: Мир, 1982. - 320с.
Мельничук М.Д., Новак Т.В., Кунах В.А. Біотехнологія рослин.- К.: Поліграфконсалтинг, 2003. - 520 с.
Муромцев Г.С., Бутенко Р.Г., Тихоненко Т.И. Основы сельскохозяйственной биотехнологии. - М.: Знание, 1989. - 260 с.
Рыбчин В.Н. Основы генетической инженерии: Учебное пособие для вузов. - Санкт-Петербург: СПбГТУ, 2002. - 522 с.
Хантер Р.Х.Ф. Физиология и технология воспроизводства домашних животных. - М.: Колос, 1984. - 210 с.
Хиггинс И., Бест Д., Джонс Дж. Биотехнология. - М.: Мир, 1988. - 230 с.

Додаткова

- Беккер М.Е. Введение в биотехнологию. - М.: Мир, 1978. - 180 с.
Вакула В. Биотехнология. Что это такое? - М.: Мир, 1989. - 120 с.
Пехов А.П. Плазмиды бактерий. - М.: Наука, 1986. - 162 с.
Уотсон Дж., Туз Дж., Курц Д. Рекомбинантные ДНК. - М.: Мир, 1986. - 288 с.
Kosuge T., Meredith C., Hollaender A. (Eds) Genetic engineering of plants. An agricultural perspective. - New York: Plenum Press, 1983. - 172 pp.
Williamson R. (Eds) Genetic engineering. - New York: Academic Press. - Vol. 1-4. - 1981-1984.

Карпов Олександр Вікторович

Демидов Сергій Вікторович

Кир'яченко Сергій Сергійович

Друкується в авторській редакції

Відповідальний за випуск - Соломаха І.В.

Видавництво Українського фітосоціологічного центру
тел/факс (044) 524-11-61

Підписано до друку 24.12.2009 р. Формат 60x84 1/16.
Друк різнографічний. Папір офсетний. Гарнітура Times.
Умов. друк. арк. 10.6. Умов. вид. арк. 11.4. Зам. №740.

Надруковано в друкарні
Українського фітосоціологічного центру

