

**НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ЦЕНТР
«ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТА МЕДИЦИНИ»
Кафедра біохімії**

Юет А.С., Гребіник Д.М., Дворщенко К.О., Савчук О.М., Остапченко Л.І.

ОСНОВНІ НАПРЯМКИ СУЧАСНИХ БІОТЕХНОЛОГІЙ

Навчальний посібник

Київ-2023

УДК 636.082.2

Автори:

А.С. Юет, Д.М. Гребіник, К.О. Дворщенко, О.М. Савчук, Л.І. Остапченко

Рецензенти:

д-р біол. наук, проф., акад. НАН України С.О. Костерін,
д-р біол. наук, проф. Т.М. Фалалєєва

*Рекомендовано до друку вченою радою
Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини»
Київського національного університету імені Тараса Шевченка
(протокол № 4 від 10 жовтня 2023 року)*

Основні напрямки сучасних біотехнологій: посібник / А.С. Юет, Д.М. Гребіник, К.О. Дворщенко, О.М. Савчук, Л.І. Остапченко. – К.: Електронне видання, 2023. – 390 с.

Навчальний посібник «Основні напрямки сучасних біотехнологій» створений у відповідності до робочих програм обов'язкової навчальної дисципліни із загальної біотехнології та вибіркової навчальної дисципліни з генної інженерії, які читаються для студентів кафедри біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка. У посібнику викладено класичні й сучасні методи генної інженерії, біотехнології, молекулярної біології та інших наук для отримання тих чи інших біологічних молекул чи трансгенних організмів із метою використання в різних галузях охорони здоров'я та екології: одержання та використання клітин мікроорганізмів, тварин і рослин, а також продуктів їх життєдіяльності: ферментів, амінокислот, вітамінів, антибіотиків тощо. Для студентів біологічних факультетів вищих навчальних закладів. Таблиць 11, рисунків 206, бібліогр.: 390 стор.

УДК 636.082.2

ЗМІСТ

Перелік умовних скорочень.....	5
Передмова.....	9
Розділ 1. Вступ. Стратегії застосування генної інженерії на користь людству.....	10
1.1. Вступ до курсу.....	10
1.2. Комерціалізація молекулярної біотехнології.....	10
Розділ 2. Використання рекомбінантних мікроорганізмів для отримання ліків та комерційних продуктів.....	15
2.1. Отримання рестриктаз.....	16
2.2. Отримання вітамінів.....	20
2.3. Отримання антибіотиків.....	35
2.4. Отримання терапевтичних речовин.....	57
2.5. Отримання амінокислот.....	65
2.6. Отримання біополімерів.....	74
Розділ 3. Трансгенні рослини.....	93
3.1. Базові поняття.....	93
3.2. Історичні, економічні та юридичні аспекти.....	100
3.3. Методи детекції генетичних модифікацій у зразках.....	116
3.4. Методи генетичної модифікації рослин.....	127
3.4.1. Векторні системи.....	127
3.4.2. Методи доставки чужорідної ДНК.....	140
3.4.3. Управління експресією рослинних генів.....	153
3.4.3.1. РНК-інтерференція.....	155
3.4.4. Сучасні методи редагування рослинних геномів.....	161
3.4.4.1. Система CRISPR/Cas.....	168
3.6. Очищення рекомбінантного рослинного білка.....	187
3.7. Створення трансгенних рослин без маркерів селекції.....	194
3.8. Синтез коліцинів у біотехнологічних рослинах.....	200

Розділ 4. Трансгенні тварини	212
4.1. Мета, історія, яскраві приклади	212
4.2. Трансгенні миші: методологія	220
4.2.1. Метод мікроін'єкції ДНК	220
4.2.2. Вірусні вектори	224
4.2.3. Інженерія ембріональних стовбурових клітин	229
4.2.4. Умовна інактивація генів за допомогою системи рекомбінації Cre-loxP	236
4.2.5. Редагування генома за допомогою системи CRISPR-Cas	241
4.2.6. Нокдаун генів за допомогою РНК-інтерференції	246
4.3. Трансгенні миші: застосування	251
4.4. Трансгенна худоба	257
4.4.1. Клонування худоби шляхом перенесення ядра	260
4.4.2. Трансгенна худоба як продуцент терапевтичних білків	262
4.4.3. Продукування донорських органів	267
4.4.4. Створення резистентних до хвороб тварин	272
4.4.5. Покращення якості молока	277
4.4.6. Покращення продуктивності тварин	280
4.5. Трансгенні птахи	288
4.6. Трансгенна риба	294
Розділ 5. Медична біотехнологія	303
5.1. Імунологічна діагностика	303
5.2. Біофлуоресцентні та біолюмінесцентні системи детекції	312
5.2.1. Флуоресцентні білки	312
5.2.2. Люциферазна система детекції	317
5.3. ДНК- і РНК-діагностичні підходи	325
5.3.1 Гібридизація нуклеїнових кислот	325
5.3.2 Методи на основі ПЛР	338
5.3.3 ДНК- і РНК-мікрочипи	349
5.3.4 Методи секвенування ДНК	353

5.4. Основи генної терапії.....	359
5.5. Біонанотехнологія: наномашини, біосенсиори	369
Типові тестові завдання.....	377
Відповіді на типові тестові завдання.....	381
Список використаних та рекомендованих джерел.....	382

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АБ – антибіотики;

АДА – аденозиндезаміназа;

АК – амінокислоти;

АГ – антигени;

ВІЛ – Вірус імунодефіциту людини;

АТ – антитіла;

В_{кл} – В-лімфоцит (В-клітина);

ВРХ – велика рогата худоба;

ГМ – генетично модифікований;

ГМО – генетично модифікований організм;

ГМР – генетично модифіковані рослини;

ГМТ – генетично модифіковані тварини;

ЖК – жирні кислоти;

ЗТ-ПЛР – ПЛР із зворотною транскрипцією;

ІФА – імуноферментний аналіз (ELISA – The enzyme-linked immunosorbent assay (англ.);)

КТП – короткі тандемні повтори або мікросателіти;

міРНК – малі інтерферуючі РНК (siRNA (англ.);)

мшРНК – малі РНК, що утворюють шпильки, або короткі РНК, що утворюють шпильки – малі шпилькові РНК (shРНК – short hairpin RNAs (англ.);)

НАНУ – (НАН України) Національна академія наук України;

НК – нуклеїнова кислота;

5'-НТД і 3'-НТД – ділянки, що не транскрибуються;

ОТК – орнітин-транскарбамілаза;

ПГА – полігідроксиалканоати (polyhydroxyalkanoates (англ.);)

ПЕГ – поліетиленгліколь;

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція;

п.н. – пар нуклеотидів (base pairs – bp (англ.);)

РНКi – РНК-інтерференція (RNA interference, RNAi (англ.));

РНП – рибонуклеопротейн;

т.п.н. – тисяч пар нуклеотидів (kilo base pairs – kb (англ.));

ФМН – флавінмононуклеотид;

ХГЧ – хоріонічний гонадотропін;

ШКТ – шлунково-кишковий тракт;

2-КГК – 2-кето-L-гулонова кислота;

2,5-ДГК – 2,5-дикето-D-глюконова кислота;

ВАС – bacterial artificial chromosome (бактеріальна штучна хромосома);

BSE – bovine spongiform encephalopathy (губчаста енцефалопатія великої рогатої худоби);

Cas – CRISPR-associated genes (CRISPR-асоційовані гени);

CFPS – Cell-Free Protein Synthesis («безклітинний» білковий синтез);

ЧО – Chinese hamster ovary cell (клітини яєчника китайського хом'яка);

CMV – human cytomegalovirus (цитомегаловірус людини);

CNV – copy number variation (зміни кількості копій);

cre – circularization recombination gene (ген кільцевої рекомбінації);

crPHK – crRNA (короткі CRISPR РНК; спрямовуюча crPHK);

CRISPR – Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (прямі повтори й унікальні послідовності в ДНК бактерій та архей, що розділяють їх);

dPCR – Digital polymerase chain reaction (digital PCR, DigitalPCR, dPCR, dePCR (цифрова ПЛР));

ddPCR – Droplet Digital PCR (цифрова краплинна ПЛР);

ЕНЕС – Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, strain of bacteria (ентерогеморагічна *E. coli*, штам бактерії);

ЕМА – European Medicines Agency (Європейське агентство з лікарських засобів);

FACS – florescence-activated cell sorting (сортування клітин, що активується флуоресценцією);

FDA – U.S. Food and Drug Administration (Управління з продовольства і медикаментів США);

GFP – green fluorescent protein (зелений флуоресцентний білок);

GRAS – Generally recognized as safe (загальноновизнані як безпечні);

HLA – Human Leukocyte Antigens (людський лейкоцитарний антиген, головний комплекс гістосумісності [МНС] людини);

HPV – Human papillomavirus (вірус папіломи людини);

HR (HDR) – Homologous recombination (гомологічна рекомбінація);

HTS – High-Throuput Sequencing (високоєфективне секвенування);

IGA – intentional genomic alteration (навмисна зміна генома);

IgE – імуноглобуліни класу E;

LAP – latency-associated peptide (латентно асоційований пептид);

LCA10 – Leber Congenital Amaurosis type 10 (амавроз Лебера тип 10);

loxP – locus of crossing over [x] in P1 (локус кросинговеру [x] у P1);

LTR – Long terminal repeat (довгі кінцеві повтори);

MACS – magnetic-activated cell sorting (магнітно-активоване сортування клітин);

NGG – послідовність, де N – будь-який нуклеотид;

NGS – next-generation sequencing (секвенування нового покоління);

NHEJ – Non-homologous end joining (процес негомологічного з'єднання кінців);

PAM – protospacer adjacent motif (мотив, суміжний із протоспейсером);

PERV – Porcine endogenous retroviruses (ендогенний ретровірус свиней);

PRSV – papaya ringspot virus (вірус кільцевої плямистості папайї);

PTLBs – Phage tail-like bacteriocins (бактеріюцини, подібні до фагових хвостів);

RISC – RNA-induced silencing complex (РНК-індукований комплекс сайленсингу (замовчування));

RFP – red fluorescent protein (червоний флуоресцентний білок);

RNP – ribonucleoprotein (рибонуклеопротейн);

ScFv – Single-chain variable Fragment (одноланцюговий варіабельний фрагмент);

SCID – Severe combined immunodeficiency (важкий комбінований імунodefіцит);

sgRNA (gRNA) – engineered small guide RNA (sgPHK, сконструйована маленька спрямовуюча PHK);

SNP – single-nucleotide polymorphism (однонуклеотидний поліморфізм);

SSC – spermatogonial stem cell (сперматогоніальна стовбурова клітина);

SSR – simple sequence repeat (простий повтор послідовності або мікросателіти);

STR – short tandem repeat – короткий тандемний повтор або мікросателіти;

TALENs – Transcription activator-like effector nucleases (ефекторні нуклеази, подібні до транскрипційних активаторів);

TMV – Tobacco mosaic virus (Вірус тютюнової мозаїки, BTM);

TSP – total soluble protein (вихід загального розчинного білка);

tracrPHK – tracrRNA (trRNA), trans-activating CRISPR RNA (транс-активує CRISPR PHK (crPHK));

YAC – Yeast artificial chromosome (дріжджова штучна хромосома);

ZFNs – Zinc Finger Nucleases (нуклеази із цинковими пальцями).

ПЕРЕДМОВА

Цей навчальний посібник є викладом основних теоретичних та практичних відомостей навчальних дисциплін «Основи біотехнології» та «Генна інженерія», які читаються на кафедрі біохімії Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Необхідність створення вищезазначеного курсу у вигляді окремої книги викликана тим, що на сьогодні відсутній спеціальний посібник з цього розділу генної інженерії та молекулярної біотехнології, в якому повно і разом із тим доступною мірою було б викладено матеріал про сучасний стан молекулярної біотехнології як нового напрямку наукової й практичної діяльності людини на основі засвоєння методів клонування білків та отримання трансгенних одно- й багатоклітинних організмів. На нашу думку, такий посібник дасть можливість студентам досконаліше засвоїти теоретичний матеріал лекцій курсів під час самостійної роботи.

Виклад фактичного матеріалу починається описом стратегій застосування молекулярної біотехнології на користь людству, використовуючи різноманітні методи генної інженерії.

Основна частина присвячена практичним даним, що стосуються використання рекомбінантних мікроорганізмів, трансгенних рослин і тварин для отримання ліків та різних комерційних продуктів. Завершаючі глави книги присвячені розгляду медичної біотехнології та нанобіотехнології в розрізі молекулярної діагностики спадкових та неспадкових захворювань; генної терапії та спрямованого редагування геномів.

Текст книги супроводжується рисунками, схемами відповідних методик, які, на наше сподівання, дозволять студентам краще засвоїти навчальний матеріал.

Автори

Розділ 1. Вступ. Стратегії застосування генної інженерії на користь людству

1.1. Вступ до курсу

Навчальні дисципліни «Загальна біотехнологія» та «Генна інженерія» вивчають можливості використання методів генної інженерії, біохімії, молекулярної біології та інших наук для отримання тих чи інших біологічних молекул чи трансгенних організмів із метою використання в різних галузях охорони здоров'я та екології: одержання та використання клітин мікроорганізмів, тварин і рослин, а також продуктів їх життєдіяльності: ферментів, амінокислот, вітамінів, антибіотиків тощо. Для спеціальності Біотехнології та біоінженерія і Біологія ці курси є базовими і створюють основу для подальшої спеціалізації дослідників, які планують застосовувати новітні молекулярно-біотехнологічні методи досліджень як у галузі науки, так і в прикладних дослідженнях та промисловості.

Метою дисциплін є формування у студентів базових знань про сучасний стан молекулярної біотехнології як нового напрямку наукової й практичної діяльності людини на основі засвоєння методів клонування білків та отримання трансгенних одно- й багатоклітинних організмів для вирішення різних завдань у галузях охорони здоров'я та екології.

1.2. Комерціалізація молекулярної біотехнології

Розвиток біотехнології назавжди змінився завдяки розвитку технології рекомбінантної ДНК та надбанням генної інженерії. Генна інженерія надала засоби не лише для виділення, але й для створення високопродуктивних мікробних штамів. Невдовзі, після виробництва першого комерційного

препарату рекомбінантного людського інсуліну в 1982 році, бактерії, а потім й еукаріотичні клітини були використані для виробництва інсуліну, інтерферону, гормону росту, вірусних антигенів та інших білків, що використовуються в терапії різних хвороб.

Технологія рекомбінантної ДНК також сприяла біологічному виробництву великої кількості корисних низькомолекулярних сполук та макромолекул, які в природних умовах зустрічаються в незначних кількостях. Рослини та тварини стали інструментами-біореакторами для виробництва нових або модифікованих генних продуктів, які ніколи не могли бути створені ані шляхом мутагенезу та селекції, ані шляхом схрещування.

Молекулярна біотехнологія стала стандартним методом для розробки живих систем із новими функціями та можливостями для синтезу важливих комерційних продуктів. Більшість нових наукових дисциплін виникають не самі по собі. Вони часто формуються шляхом синтезу знань із різних областей досліджень. Так, підходи молекулярної біотехнології були вдосконалені промисловими мікробіологами та інженерами-хіміками, тоді як частина технології рекомбінантної ДНК багато в чому завдячує відкриттям, що відбулись у молекулярній біології, генетиці бактерій та ензимології нуклеїнових кислот. У широкому розумінні молекулярна біотехнологія спирається на знання з різноманітних галузей фундаментальних наукових дисциплін (генетики, біохімії, молекулярної біології тощо) для створення та вдосконалення продуктів широкого спектру застосування: ліків, вакцин, діагностичних підходів тощо (рис. 1.1).

Комерціалізація – це діяльність особи або організації, спрямована на отримання прибутку. Це поняття є невід'ємною частиною створення нового продукту або модифікації вже існуючого з метою виходу на ринок та отримання прибутку. Іншими словами, це скоординовані технічні та бізнесові процеси прийняття рішень та їх виконання, необхідних для успішної трансформації нового продукту або послуги від концепції до ринка. Це передбачено тим, що ідея або набір технологій не являють собою продукт,

зрозумілий кінцевому споживачу, необхідні деякі модифікації та удосконалення, після яких буде сформовано повноцінний продукт, який можна буде просувати на ринок. Тому головною метою комерціалізації має бути повна відповідність створюваного продукту вимогам ринку.

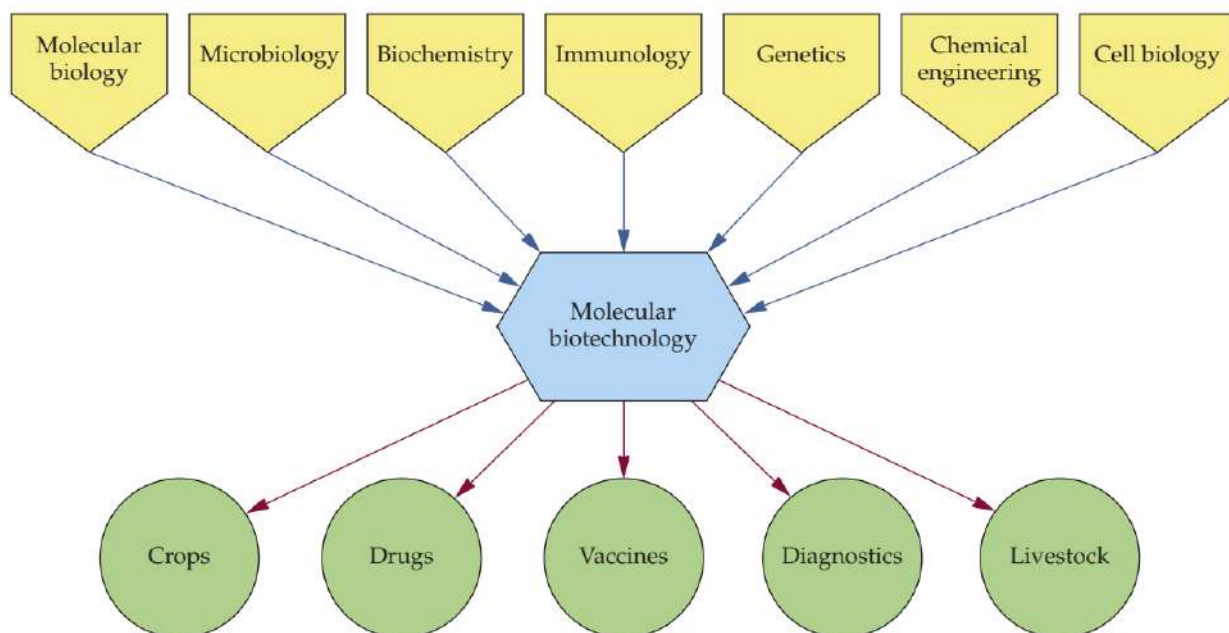


Рис. 1.1. Численні наукові дисципліни, які сприяють розвитку молекулярної біотехнології для виробництва широкого спектру комерційних продуктів. Пояснення в тексті. Запозичено з [24]

Так, потенційні можливості технології рекомбінантної ДНК швидко знайшли практичне застосування у винахідливих бізнесменів, збагативши їх. Справді, протягом 20 хв після початку торгів на Нью-Йоркській фондовій біржі 14 жовтня 1980 року ціна акцій компанії «Genentech», яка виробляла рекомбінантний людський інсулін, зросла з 35 до 89 доларів. Це було найшвидшим зростанням вартості будь-якої первинної публічної пропозиції в історії ринку до того часу.

Передбачалося, що деякі генетично сконструйовані мікроорганізми замінять хімічні добрива, а інші утилізують розливи нафти; будуть створені рослини із спадковою стійкістю до різноманітних шкідників і винятковим

вмістом поживних речовин; а худоба буде мати пришвидшені терміни вирощування, а також м'ясо з більш низьким вмістом жиру.

На сьогодні, у багатьох аспектах вищезазначені перспективи технології рекомбінантної ДНК стали реальністю. За 35 років після комерційного виробництва рекомбінантного людського інсуліну понад 300 нових препаратів, вироблених за цією ж технологією, були використані для лікування понад 300 мільйонів людей від таких хвороб, як, наприклад, рак, розсіяний склероз, ревматоїдний артрит, муковісцидоз тощо, а також для захисту від численних інфекційних захворювань.

Як уже було зазначено, кінцевою метою всіх біотехнологічних досліджень є створення та розвиток комерційних продуктів. Отже, молекулярна біотехнологія значною мірою обумовлена перспективою фінансової вигоди. На сьогодні, у США налічується близько 2500 біотехнологічних компаній та 2100 в Європі з річним прибутком у 132 млрд доларів на 2015 р.

Біотехнологічна індустрія в цих регіонах надає робочі місця для понад 200000 людей. Великі багатонаціональні хімічні та фармацевтичні компанії, такі як «Monsanto», «Bayer», «Du Pont», «Pfizer», «GlaxoSmithKline», «Merck», «Novartis», «Hoffmann-LaRoche», «Gilead Sciences» та «Amgen», одні з багатьох, що взяли на себе значні наукові зобов'язання щодо молекулярної біотехнології. Під час стрімкого розвитку біотехнологічного бізнесу у 1980-х роках невеликі компанії, які спеціалізувалися на одному конкретному типі продукту рекомбінантної ДНК, часто поглиналися більшими: відбувалися стратегічні злиття та організовувалися спільні підприємства. Наприклад, у 1991 році 60 % «Genentech» було продано «Hoffmann-LaRoche» за 2,1 млрд доларів. Неминуче і з різних причин відбулася низка банкрутств біотехнологічних компаній. Такий стан потоку є характерною рисою цієї промисловості.

Наразі перелік біотехнологічних компаній у світі є великим і містить ті, які зосереджені: на вдосконаленні вакцин, модифікації нуклеїнових кислот і

білків в якості терапевтичних агентів; на створенні підходів по доставці ліків; на розробці сучасних методів молекулярній діагностики; на оптимізації стратегій промислової переробки; та на сільськогосподарській біотехнології.

Підсумки. На сьогодні, розроблено велику кількість продуктів молекулярної біотехнології. Багато вакцин і терапевтичних препаратів на основі білків та нуклеїнових кислот виробляються з генетично модифікованих мікроорганізмів, клітин ссавців або трансгенних тварин і використовуються для лікування різних захворювань у людей і тварин. Молекулярні діагностичні тести, отримані за допомогою технології рекомбінантної ДНК, швидко й з високою чутливістю виявляють специфічні білки або послідовності нуклеїнових кислот, які, у свою чергу, вказують на схильність до певного захворювання або на його прогресування, або на відповідну реакцію на лікування. Білки та біополімери, що мають промислове значення, часто виробляються у великих масштабах генно-інженерними мікроорганізмами. Збільшення сільськогосподарського виробництва стало можливим завдяки виведенню трансгенних рослин, стійких до шкідників, патогенів та абіотичних стресів, таких як посуха та висока солоність ґрунту.

Нещодавною віхою стало схвалення першої генетично модифікованої тварини (лосося) для споживання людиною Управлінням з продовольства і медикаментів США (FDA) у 2015 році. Багато інших важливих рішень медичних, екологічних, промислових та сільськогосподарських проблем перебувають на стадії розробки, впровадження та патентування.

У той же час, через вагомий вплив генної інженерії на суспільство, а також деякі вражачі приклади генетично модифікованих організмів усі підходи молекулярної біотехнології ретельно аналізуються щодо можливих потенційних ефектів. Деякі з висловлених побоювань різних спільнот стосовно подальшого практичного використання молекулярної біотехнології стосуються її безпеки, можливого негативного впливу на навколишнє середовище та суспільство та врегулювань питань приватної чи державної власності на генетично модифіковані організми.

Розділ 2. Використання рекомбінантних мікроорганізмів для отримання ліків та комерційних продуктів

На сьогодні, дослідження в області молекулярної біотехнології зосереджені, в основному, на виробництві цілого ряду різноманітних білків, включно з ферментами, які використовуються в комерційних цілях. Однак методи рекомбінантної ДНК також можуть бути використані для підвищення виробництва низькомолекулярних сполук, таких як: вітаміни, амінокислоти, барвники, попередники біополімерів, антибіотики. У цих випадках більшість мікроорганізмів модифіковано таким чином, щоб вони могли стати відповідною «фабрикою» з виробництва корисних метаболітів.

За допомогою технології рекомбінантної ДНК можна модифікувати метаболічні шляхи організмів шляхом як введення нових генів, так і шляхом зміни існуючих. Мета полягає в тому, щоб створити організм із новою ферментативною активністю, здатний перетворити існуючий субстрат у комерційні сполуки, які, нещодавно можна бути отримати лише за допомогою комбінації хімічних обробок та стадій ферментації.

Ранні експерименти з метаболічної інженерії, зазвичай, модифікували 1 або 2 гени в біосинтетичному шляху. Однак, знаючи повні послідовності ДНК багатьох бактеріальних геномів, а також шляхи регуляції експресії таких генів, отримані за допомогою різноманітних підходів геноміки, протеоміки та метаболоміки (**метаболом** – це сукупність усіх метаболітів, які є кінцевими продуктами обміну речовин у клітині тощо), можна розробити стратегії підвищення виходу молекул у мікроорганізмах шляхом введення або модифікації цілої групи споріднених генів.

На сьогодні, за допомогою підходів генної інженерії та метаболоміки мікроорганізмів було оптимізовано синтез багатьох промислово корисних речовин, таких як: спирти, кислоти, амінокислоти, антибіотики, ліпіди, вітаміни, біополімери тощо. Метаболічна інженерія була використана для посилення синтезу таких сполук як у лабораторних штамах, де продуктивність

може бути відносно низькою (зазвичай, < 5 г на літр), так і в промислових штамах, де продуктивність зазвичай оптимізована (> 50 г на літр).

2.1. Отримання рестриктаз

Ендонуклеази рестрикції (рестриктази). Технологія рекомбінантної ДНК була б неможливою без готового набору різноманітних ендонуклеаз рестрикції. На сьогодні, відомо й описано приблизно 3000-4000 рестриктаз, більше 600 різних ферментів є комерційно доступними зі світовими продажами у 2015 році більше ніж 500 мільйонів доларів. Ці ферменти зустрічаються в природі в багатьох різних мікроорганізмах: аеробних, анаеробних, фотосинтетичних, діазотрофних (мікроорганізми, які засвоюють атмосферний азот та переводять його в зручнішу для інших організмів форму, таку як аміак), мезофільних (найкраще всього ростуть при середніх температурах, не надто високих і не надто низьких, зазвичай, між 15 і 40 °C), термофільних, психрофільних (здатні рости при температурах від -10 °C до $+20$ °C) тощо.

Спочатку для кожного з організмів, що синтезують рестриктазу, мав бути розроблений та оптимізований докладний протокол ферментації (він визначав температуру, рН середовища та кількість кисню, щоб досягти максимального виходу цільового ферменту). Для того, щоб компанія могла виробляти значну кількість різних ферментів рестрикції, необхідно було підтримувати велику кількість різноманітних мікроорганізмів, мати дуже широкий спектр компонентів мікробного середовища росту, спроектувати декілька різних типів ферментерів і витратити надмірну кількість часу на розробку оптимальних умов росту для різних організмів.

Щоб уникнути цих труднощів і зайвих затрат, було запропоновано клонувати й експресувати гени різних ферментів рестрикції в *Escherichia coli*. Отже, використання *E. coli* дозволило вченим стандартизувати умови

виробництва всіх рестрикційних ендонуклеаз. Крім того, ця бактерія характеризується швидким ростом, здатністю досягати високої щільності клітин і може бути модифікованою певним чином для збільшення синтезу будь-якого цільового рестрикційного ферменту.

Хоча технологію виділення й експресії чужорідних генів в *E. coli* налаштовано достатньо ефективно, слід також пам'ятати, що ця бактерія – це жива істота, і виробництво або присутність деяких гетерологічних білків може бути шкідливим або навіть смертельним для її власного організму.

Як відомо, рестриктази можуть різати молекулу ДНК у певних специфічних місцях. У результаті організм, який експресує клонований ген певної рестриктази, швидше за все, матиме свою власну деградовану (порізану) ДНК у випадку, якщо відсутній механізм захисту (рис. 2.1).

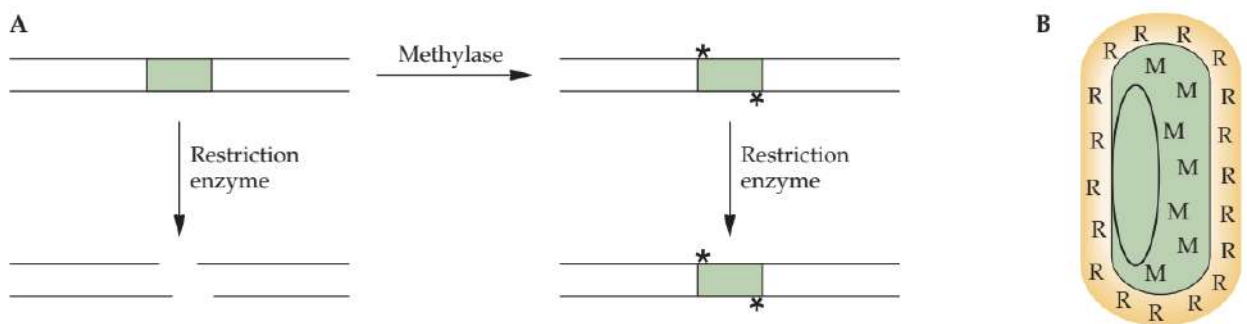


Рис. 2.1. (А) Захист ДНК від перетравлення ендонуклеазою рестрикції шляхом попереднього оброблення метилазою, ферментом метилювання (модифікації). (В) Цитоплазматична локалізація ферменту модифікації (М) і периплазматична локалізація рекстриктази (R) у грамнегативних бактеріях. Зірочки вказують на наявність метильованої основи. Пояснення в тексті. Запозичено з [24]

Фактично, мікроорганізми, які природним чином виробляють ендонуклеази рестрикції, розвинули власну високоефективну систему самозахисту: **рестрикції-модифікації**. Метилювання однієї або декількох основ ДНК у межах послідовності розпізнавання (сайт рестрикції)

перешкоджає гомологічній ендонуклеазі рестрикції розрізати ДНК на цій ділянці (рис. 2.1. А).

Грамнегативні ж мікроорганізми мають також додатковий засіб захисту, який передбачає локалізацію ендонуклеази рестрикції в периплазматичному просторі, а ферменту метилювання (модифікації) у цитоплазмі клітини. Ця компартменталізація фізично відокремлює рестриктазу від ДНК, забезпечуючи при цьому вільний доступ ферменту модифікації до хромосомної ДНК (рис. 2.1. В).

На додаток до захисту клітини від токсичної дії ферменту рестрикції, зазначена сегрегація забезпечує клітинний захист від атаки будь-якої чужорідної ДНК (такої як ДНК бактеріального вірусу, яка може проникнути в периплазму).

Одним із способів вирішити проблему розщеплення ДНК господаря гетерологічними ендонуклеазами рестрикції є клонування та експресія генів як для рестриктази, так і для його специфічного (спорідненого) ферменту модифікації в організмі господаря. Цьому сприяє загальне розташування генів ендонуклеази рестрикції та ферменту метилювання, що примикають один до одного на хромосомі, і як правило, знаходяться в складі одного й того ж оперона.

Інша стратегія також була використана для виділення генів ферментів рестрикції та модифікації (метилювання). Обґрунтування цієї процедури полягає в тому, що клони, які несуть та експресують цільовий фермент модифікації, будуть продукувати плазмідну ДНК, стійку до перетравлення цільовою ендонуклеазою рестрикції, оскільки їх ДНК буде метильована в місцях розпізнавання (рис. 2.2). Так, із ДНК донорського організму (*Desulfovibrio desulfuricans*, грамнегативна сульфатредуюча бактерія), котрий містив раніше ідентифіковану рестриктазу, була створена бібліотека геномної ДНК. Плазмідний вектор містив заклоновану ДНК (використовували рестриктазу HindIII) із цього організму та мав принаймні один сайт для розпізнавання цільовою ендонуклеазою рестрикції. Далі, *E. coli* було

трансформовано цією геномною бібліотекою. Ця стадія збільшувала кількість рекомбінантної плазмідної ДНК, а також дозволяла експресувати модифікуючий фермент.

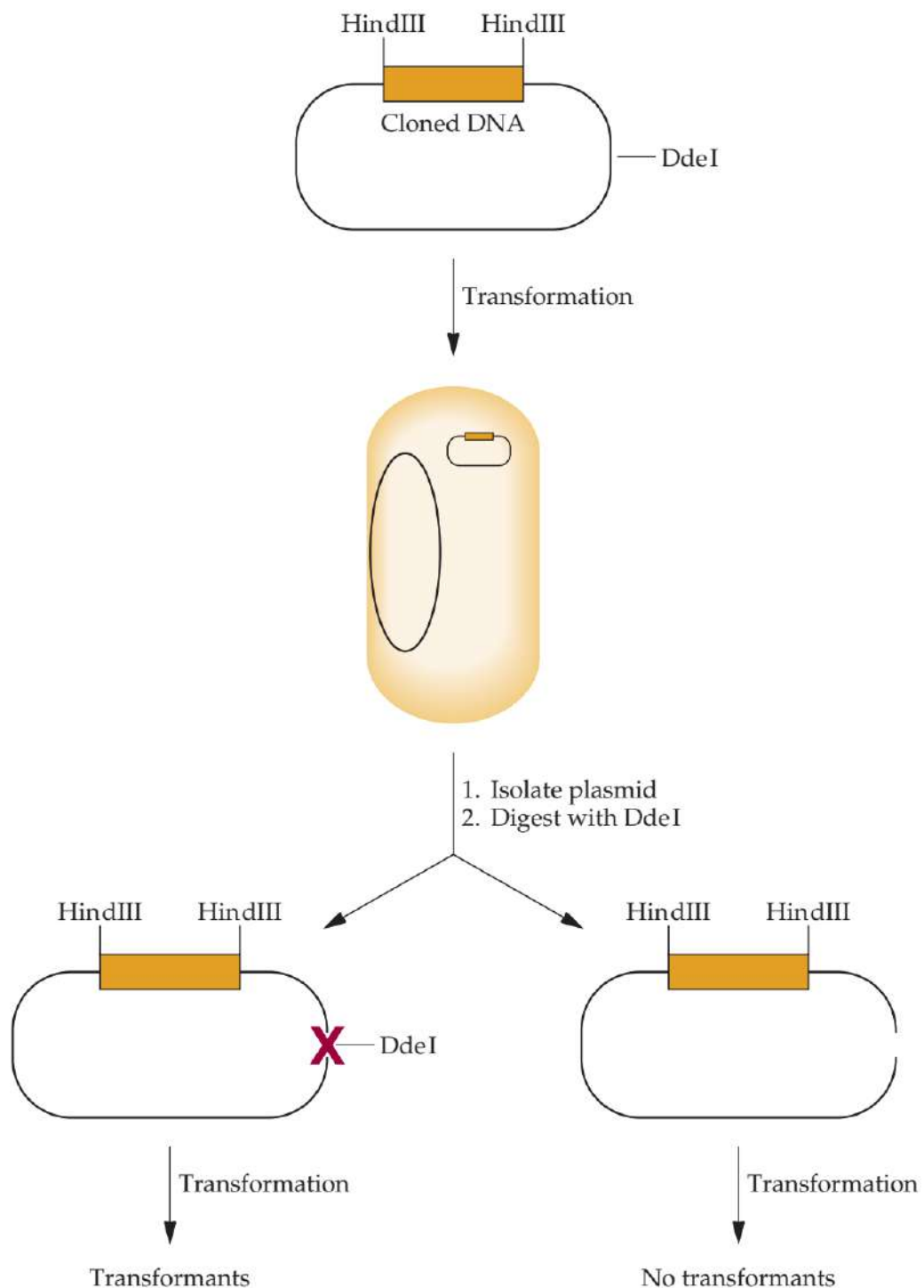


Рис. 2.2. Схема клонування ферменту модифікації DdeI. Пояснення в тексті. Червоний X вказує на те, що метильований сайт не розщеплюється рестриктазою DdeI. Запозичено з [24]

Потім плазмідну ДНК виділяли з трансформованих клітин, вирощених у рідкому середовищі за умов, специфічних для утримання плазміди. Зразок плазмідної ДНК обробляли цільовою рестриктазою – DdeI. Плазміди, які кодували та експресували фермент модифікації DdeI, не розщеплювалися ендонуклеазою рестрикції DdeI, оскільки 8 сайтів розпізнавання DdeI плазмідного вектора були метильованими.

Після обробки DdeI суміш плазмід використовували для трансформації *E. coli*. Тільки інтактні кільцеві плазміди забезпечили продукування трансформантів (рис. 2.2), адже вони мали ген для функціонального ферменту модифікації DdeI. Усі інші плазміди розщеплювались ендонуклеазою рестрикції. Потім отримані трансформанти перевіряли на активність ферменту рестрикції DdeI, щоб визначити, які саме клони мали гени як для ферменту модифікації, так і для рестриктази.

На практиці ця стратегія ефективна для будь-якого гена рестриктази, який розташований близько до свого гена ферменту метилювання (більшість рестриктаз кодуються на тому самому опероні, що і їх споріднений фермент модифікації), і клонований у плазмідний вектор, який має принаймні один сайт розпізнавання для цільового ферменту. Вищезазначений підхід був розроблений компанією, яка з часом стала одним із провідних світових постачальників ферментів рестрикції.

2.2. Отримання вітамінів

На сьогодні, основним методом продукування більшості вітамінів є **хімічний синтез**, однак при виробництві окремих вітамінів (кобаламіни, ергостерин (провітамін D2), каротин, деякі з групи В) ведуча роль належить **мікробному синтезу**.

Отримання L-аскорбінової кислоти (L-аскорбат, вітамін С). L-аскорбінова кислота, на сьогодні, комерційно синтезується за допомогою

коштовного процесу, що починається з D-глюкози і містить одну стадію мікробної ферментації, а також ряд хімічних стадій (рис. 2.3). Відповідно до **метода Рейхштейна-Грюснера** окиснення сорбітолу в сорбозу здійснюється іміобілізованими клітинами *Acetobacter suboxydans* (грамнегативна бактерія). При цьому необхідна постійна подача кисню до біореактора. У той же час, інші методи досі є ще більш економічно не вигідними. Останнім етапом цього процесу є каталізоване кислотою перетворення 2-кетогулонової кислоти (2-КГК) в L-аскорбінову кислоту (рис. 2.3).

Водночас деякі бактерії (*Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Erwinia*) можуть перетворювати глюкозу в 2,5-дикетогулонову кислоту (2,5-ДГК) за участі трьох ферментів, а інші (*Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Arthrobacter*) мають фермент 2,5-ДГК-редуктазу, який перетворює 2,5-ДГК у 2-КГК.

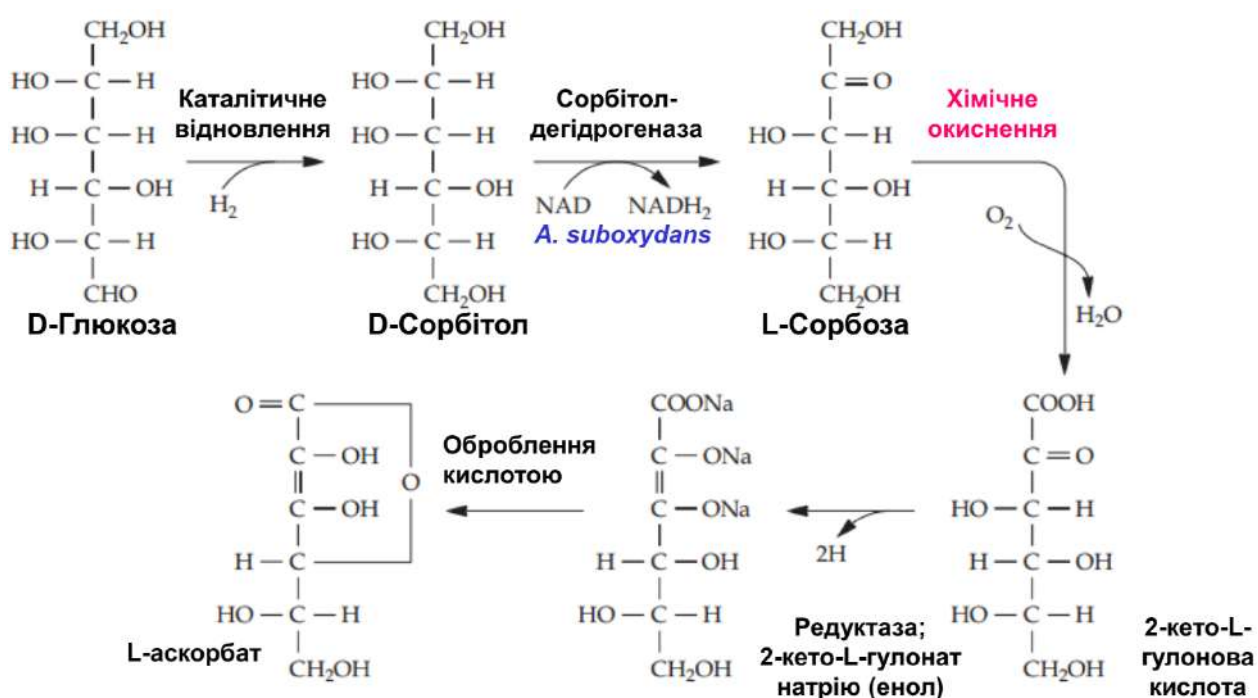


Рис. 2.3. Комерційний синтез L-аскорбінової кислоти. За винятком мікробного перетворення D-сорбіту в L-сорбозу, усі етапи є хімічними реакціями. Мікробну конверсію здійснює *Acetobacter suboxydans*, який виробляє фермент сорбітолдегідрогеназу. Адаптовано з [24]

Отже, вищезазначена процедура синтезу аскорбінової кислоти може бути покращена шляхом отримання 2-КГК з глюкози за допомогою коферментації з відповідними організмами (рис. 2.4).

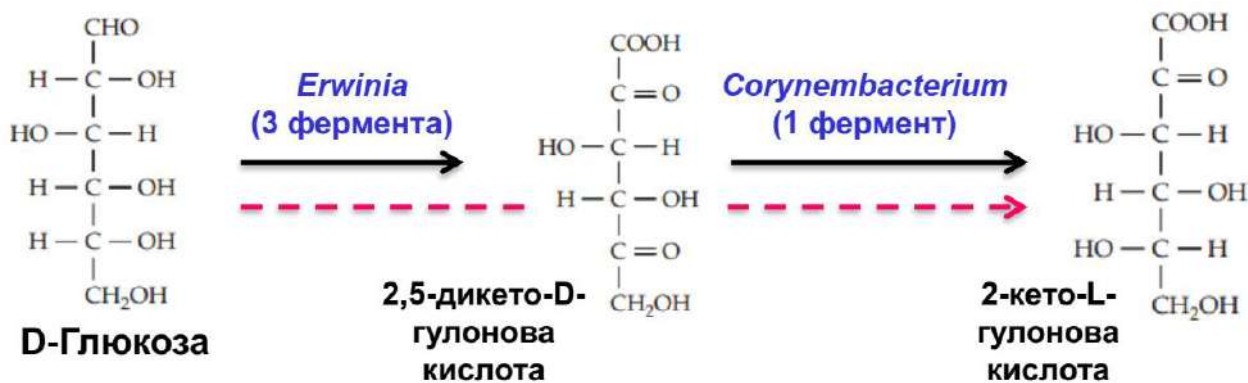


Рис. 2.4. Загальна схема отримання 2-кетогулонової кислоти з глюкози за допомогою коферментації з відповідними організмами. Пояснення в тексті. Адаптовано з [24]

Однак, на жаль, **кокультивація** має і свої власні труднощі. Наприклад, вимоги до середовища, оптимальні температури та рН, а також швидкість росту двох організмів розрізняються таким чином, що умови ферментації, оптимальні для одного організму, є неоптимальними для іншого, і це може призвести до так званого «вимивання» (виснаження або втрати) одного з організмів.

Існує альтернативний **метод Соноями (біотрансформація)**, який полягає в послідовному культивуванні двох мікроорганізмів, що перетворюють D-глюкозу в 2-КГК. У той же час, компанією «Genentech» був розроблений рекомбінантний штам *Erwinia herbicola*, який реалізував увесь процес конверсії D-глюкози в 2-КГК із подальшим окисненням до L-аскорбінової кислоти (рис. 2.5).



Рис. 2.5. Порівняння трьох методів синтезу L-аскорбінової кислоти.
Пояснення в тексті. Адаптовано з [77]

На жаль, ріст клітин цього штаму сповільнювався в присутності D-глюкози, тому зазначений метод отримання вітаміна С був визнаний економічно не вигідним.

Зважаючи на все вищезазначене, можна зробити висновок, що найкращий спосіб перетворити глюкозу в 2-КГК – це створити один мікроорганізм, який буде нести всі необхідні ферменти. Як було зазначено, перетворення D-глюкози в 2,5-ДГК *Erwinia herbicola* включає в себе кілька ферментативних стадій, у той час як перетворення 2,5-ДГК у 2-КГК *Corynebacterium sp.* вимагає лише одну стадію. Таким чином, найпростішою стратегією створення єдиного організму, здатного перетворювати D-глюкозу в 2-КГК, є виділення гена 2,5-дикетогулонатредуктази з *Corynebacterium sp.* з його подальшою експресією в *E. herbicola*. Першим кроком у клонуванні цього гена було очищення відповідного ферменту та визначення послідовності перших 40 амінокислот із N-кінцевого кінця молекули. На основі відомої амінокислотної послідовності були синтезовані два 43-нуклеотидних ДНК-гібридизаційних зонда, кожен з яких відповідав певній частині білкової молекули. За допомогою цих 2 зондів було проведено скринінг банку клонів ДНК *Corynebacterium sp.* Клон, який гібридувався з обома зондами, виділяли, а потім секвенували. Як і очікували, він містив необхідний ген 2,5-дикетогулонатредуктази.

Послідовності ДНК, які знаходились перед початком стартового кодона ATG, були видалені та замінені транскрипційними та трансляційними сигналами, які функціонують у *E. coli*, оскільки регуляторні послідовності від грампозитивних мікроорганізмів, таких як *Corynebacterium* spp., не можуть ефективно функціонувати в *E. coli*. Ця конструкція успішно синтезувала 2,5-дикетогулонатредуктазу в *E. coli* і згодом була переклонована на вектор із широким колом господарів, який використовувався для трансформації тепер уже *E. herbicola*, котра здатна використовувати транскрипційні та трансляційні сигнали *E. coli*.

Було показано, що трансформовані клітини *Erwinia* змогли перетворити D-глюкозу безпосередньо в 2-КГК. Ендогенні ферменти *Erwinia*, локалізовані у внутрішній мембрані бактерії, перетворювали глюкозу в 2,5-ДГК, а клонована 2,5-дикетогулонатредуктаза, локалізована в цитоплазмі, каталізувала перетворення 2,5-ДГК в 2-КГК (рис. 2.6).

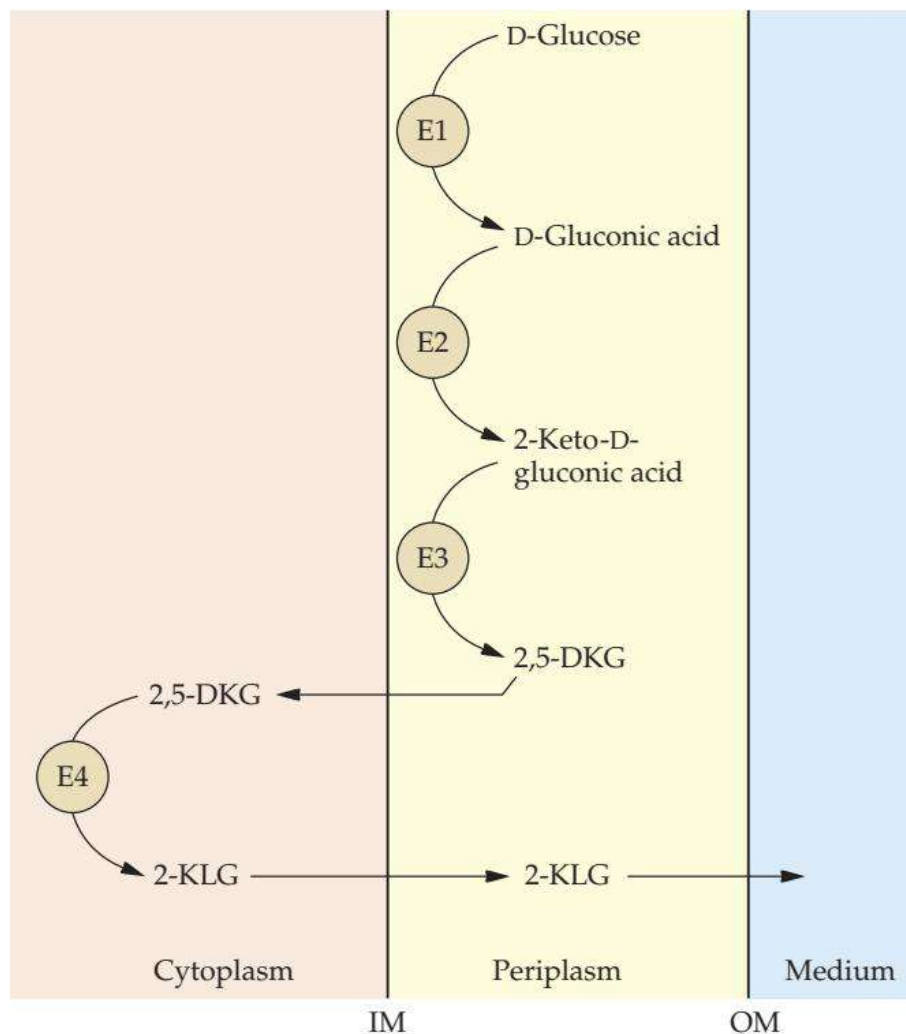


Рис. 2.6. Перетворення D-глюкози у 2-кето-L-гулонову кислоту рекомбінантною *E. herbicola*. Вказано місце розташування всіх відповідних ферментів. Ферменти позначаються буквою E і нумеруються послідовно. Фермент E4 – це заклонована 2,5-дикетогулонатредуктаза. Названі основні проміжні продукти на шляху. 2,5-DKG – 2,5-ДГК (2,5-дикето-D-глюконова кислота), 2-KLG – 2-КГК (2-кето-L-гулонова кислота). IM та OM – внутрішня та зовнішня мембрани відповідно. Запозичено з [24]

Таким чином, за допомогою генетичних маніпуляцій метаболічні характеристики двох дуже різnorідних мікроорганізмів об'єдналися в один організм, який зміг продукувати кінцевий продукт сконструйованого метаболічного шляху. Цей рекомбінантний організм повинен бути корисним як джерело 2-КГК для виробництва L-аскорбінової кислоти, тим самим замінюючи перші 3 етапи використовуваного на сьогодні процесу.

Реакція, що каталізується 2,5-дикетогулонатредуктазою, використовує відновлений нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат (НАДФН) як кофактор. Однак клітинна концентрація відновленого нікотинамідаденіндинуклеотиду (НАДН), зазвичай, приблизно в 10 разів більша, ніж НАДФН, тоді як фінансові витрати на НАДФН приблизно в 10 разів вищі, ніж на НАДН.

Щоб знизити вартість бактеріального виробництва аскорбінової кислоти, було б доцільним змінити специфічність ферменту, розробивши шляхом білкової інженерії аналог 2,5-дикетогулонатредуктази, яка використовувала б НАДН замість НАДФН. Єдиною структурною різницею між НАДН та НАДФН є наявність або відсутність фосфатної групи, приєднаної до 2-го місця аденінової частини. Дослідження *in silico* тривимірної структури 2,5-дикетогулонатредуктази, зв'язаної з НАДФН, показали, що 5 амінокислотних залишків взаємодіють безпосередньо з 2'-фосфатним залишком НАДФН. Після цього, за допомогою касетного мутагенезу в кожному з 40 сконструйованих мутантних клонів 1 із 5 вище згаданих амінокислотних залишків, було замінено на іншу амінокислоту (рис. 2.7).

Після експресії, очищення та кінетичного аналізу 40 мутантів *E. coli* було знайдено, що зміна трьох з п'яти вибраних амінокислот призвела до значущого збільшення активності 2,5-дикетогулонатредуктази з НАДН в якості кофактора. Більше того, після поєднання двох амінокислотних змін в одному білку, фермент, який виявив ще більшу активність із НАДН, мав заміну залишку лізину в положенні 232 на гліцин, а також зміну аргініну в положенні 238 на гістидин. Крім того, коли найкращий НАДН-активний мутант було поєднано з подвійним мутантом, що характеризувався поліпшеною здатністю до зв'язування субстрату, спостерігалось подальше поліпшення активності рекомбінантного НАДН-активного ферменту (рис. 2.7).

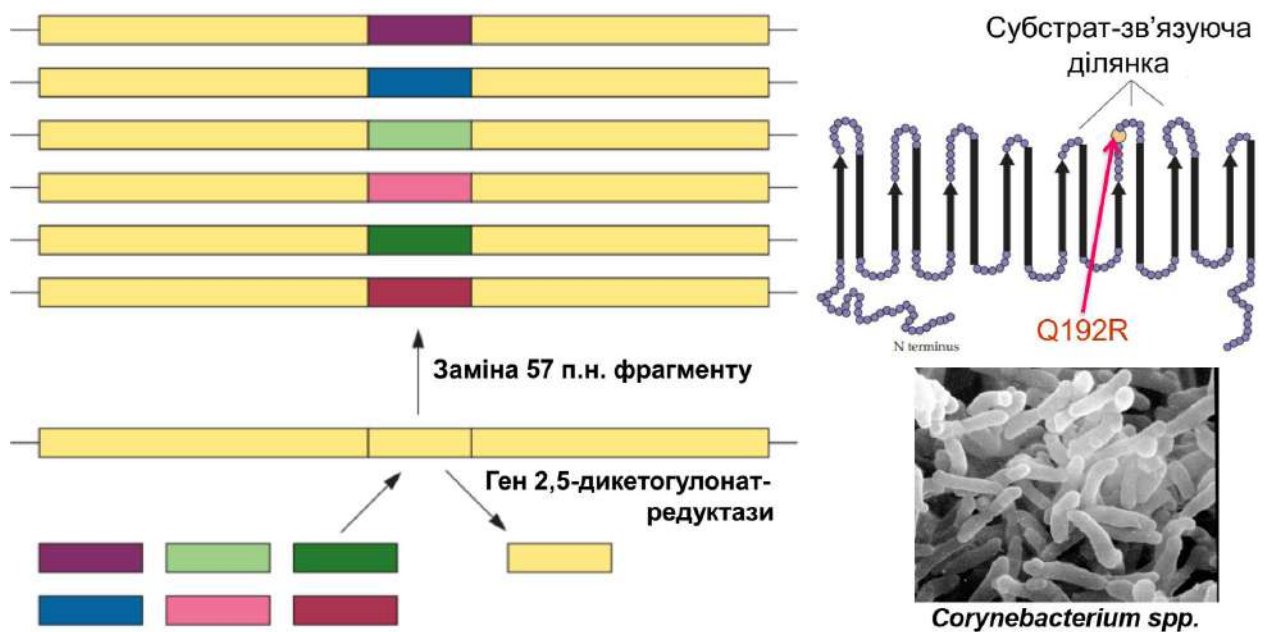


Рис. 2.7. Мутагенез гена 2,5-дикетогулонатредуктази з *Corynebacterium sp.* Пояснення в тексті. Адаптовано з [24]

Як показано на рисунку 2.7, відповідний ген на плазміді розрізали для видалення фрагмента ДНК завдовжки 57 п.н. Потім хімічно синтезовані фрагменти ДНК, довжиною 57 п.н., які містили заміни в послідовності ДНК (кожна заміненна послідовність кодувала одну із змінних амінокислот), вбудовували у зазначений ген, замість вихідного фрагмента. Крім того, кожен фрагмент у 57 п.н. (касета для мутагенезу) містив сайленс мутацію, яка нівелювала сайт ендонуклеази рестрикції PstI, але не змінювала амінокислотну послідовність. Така мутація полегшувала скринінг рекомбінантного клона.

Таким чином, шляхом множинного сайт-специфічного мутагенезу вдалось підвищити активність ензима з НАДН в 72 разів. Потрібно більш детально залишається з'ясувати, чи може цей модифікований фермент бути використаний як основа для економічно вигідного біологічного синтезу аскорбінової кислоти.

На тлі вищезазначених підходів, нещодавно було запропоновано численні нові способи отримання 2-КГК для виробництва L-аскорбінової кислоти шляхом біотехнологічних трансформацій. Відомо, що 2-КГК також може

продукуватися двоступінчастою ферментацією за допомогою інших мікроорганізмів (рис. 2.8). Так, першим етапом є утворення L-сорбози з D-сорбіту з використанням *Gluconobacter oxydans*. На другому етапі L-сорбоза перетворюється на 2-КГК за допомогою системи симбіозу, що складається з *Ketogulonicigenium vulgare* та *Bacillus megaterium*. Однак, через різні потреби в поживних речовинах та невизначене співвідношення двох штамів ця система симбіозу значно обмежувала оптимізацію ферментації, зокрема шляхом генної інженерії.

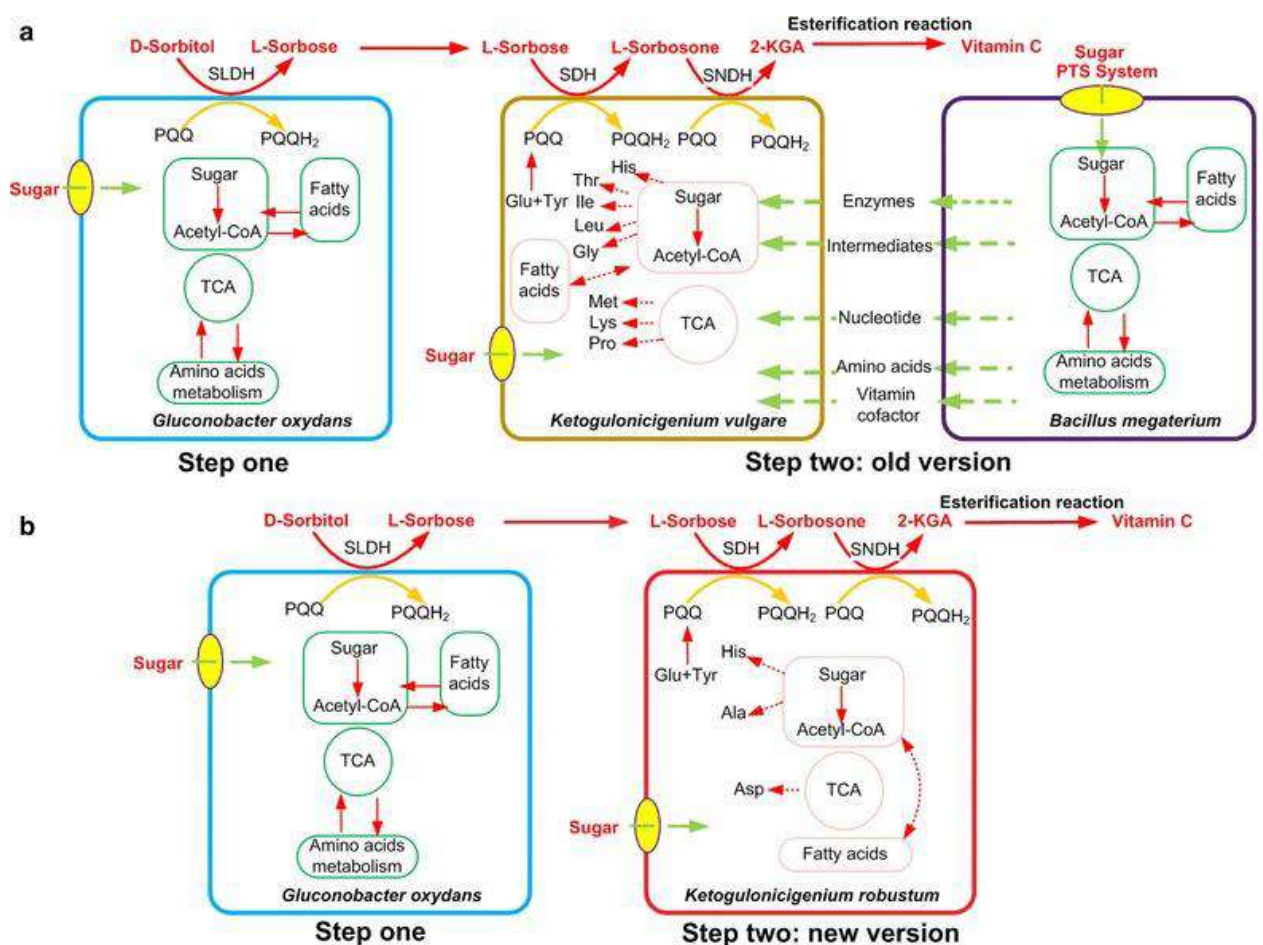


Рис. 2.8. Альтернативи двоетапного процесу ферментації вітаміну С. (а) Стара версія двоступеневого процесу ферментації. (б) Нова версія двоступеневого процесу ферментації. Пояснення в тексті. Запозичено з [85]

Тому було запропоновано використовувати лише *Ketogulonicigenium robustum* замість *K. vulgare* через здатність рости незалежно та виробляти

більше 2-КГК, ніж у *K. vulgare* в системі монокультури. У той же час, зникла потреба у використанні *Bacillus megaterium*, який у системі симбіозу зазвичай використовувався як супутній штам, що генерував метаболіти для сприяння росту *K. vulgare*, так як він гальмував бродіння через різні потреби в поживних речовинах порівняно з *K. vulgare*.

Повний геном *K. robustum* SPU_B003 було сиквеновано та проведено функціональний аналіз на основі отриманих даних для подальшого розуміння видових особливостей метаболізму. Порівняно з *K. vulgare*, *K. robustum* SPU_B003 містив більше як т-РНК, р-РНК, так і генів НАД, НАДФ, а також генів, пов'язаних із регуляцією та клітинною сигналізацією. Для подальшого посилення виробництва 2-КГК шляхом активування циклу Кребса, генерування різних проміжних сполук для біосинтезу амінокислот та забезпечення енергією був побудований інноваційний біосинтетичний шлях ацетил-КоА (експресію фосфокетолази та фосфотрансацетилази було індуковано промоторами, специфічними для виду). Врешті-решт, було досягнуто значного виробництва біомаси та продукування 2-КГК ($39,64 \pm 2,84$ г/л), що було значно вищим (у 8 разів) порівняно з *K. vulgare*.

Таким чином, у результаті пошуку нових продуцентів та дослідження їх генома, а надалі відповідних змін у ньому з метою покращення метаболічного шляху ацетил-КоА (і відповідно 2-КГК), було досягнуто зменшення вивільнення CO₂ та посилення окислювальної здатності у рекомбінантному штамі.

На сьогодні, продовжуються пошуки шляхів розроблення більш економічно вигідних підходів для отримання L-аскорбінової кислоти. Так, для синтезу 2-КГК з глюкози було запропоновано використання рекомбінантного штама *Glucanobacter japonicas*-*Aga5dh-1-ga2dh-A*. За допомогою гомологічної рекомбінації було здійснено нокаут гена глюконат-5-дегідрогенази *ga5dh-1* з конкурентного шляху та збільшено експресію гена *ga2dh-A* (кодує глюконат-5-дегідрогеназу). У результаті, було посилено виробництво 2-КГК на тлі зменшення, а надалі й повної відсутності накопичення побічних продуктів: 5-

кетод-Д-глюконової кислоти та Д-глюконової кислоти. Використовуючи режим періодичної подачі в 3-літровому ферментері, виробництво 2-КГК досягло 235,3 г/л із рівнем перетворення глюкози в 91,1 %. У той же час, у ферментері на 15 л продуктивність утворення 2-КГК сягала 2,99 г/л за год, що перевищувало виробництво у 3-літровому ферментері майже на 12 %.

На доданок, було показано, що окрім безпосереднього впливу на геном продуцента, можна також впливати на супутній штам, з метою підвищення синтезу необхідних продуценту сполук. Так, в одноетапній системі ферментації виробництва вітаміна С із *G. oxydans* та *K. vulgare* в *G. oxydans* був побудований функціональний модуль біосинтезу α -ліпоєвої кислоти. Конструйований *G. oxydans* спільно культивували з *K. vulgare* для посилення росту та виробництва 2-КГК у *K. vulgare*. У цій системі було виявлено зменшення гальмування росту моно-культури *K. vulgare* та фоні посилення виробництва 2-КГК – до 73,34 г/л (без заклонованого модуля біосинтезу α -ліпоєвої кислоти вихід становив – 59,09 г/л).

Отже, незважаючи на отримані результати, пошук як нових продуцентів, так і розробка ефективних підходів для подальшої оптимізації отримання вітаміна С триває.

Отримання рибофлавіну (вітамін В2). У промисловості рибофлавін отримують одним із трьох методів: **хімічним синтезом, ферментацією (біотрансформацією) або хіміко-ферментативним методом.** На сьогодні, саме ферментативні технології є домінуючими.

При біотрансформації основним штамом-гіперпродуцентом є ниткоподібний гриб – *Ashbya gossypii*. Вихід В2 при такому способі виробництва становив 15 г/л за 3 доби. Після видалення клітин рибофлавін очищували хроматографічно.

Хіміко-ферментативний метод полягає в хімічному синтезі алоксазинового кільця та хімічному приєднанні Д-рибози, синтезованої мутантним штамом *Bacillus pumilus* з меляси (рис. 2.9).

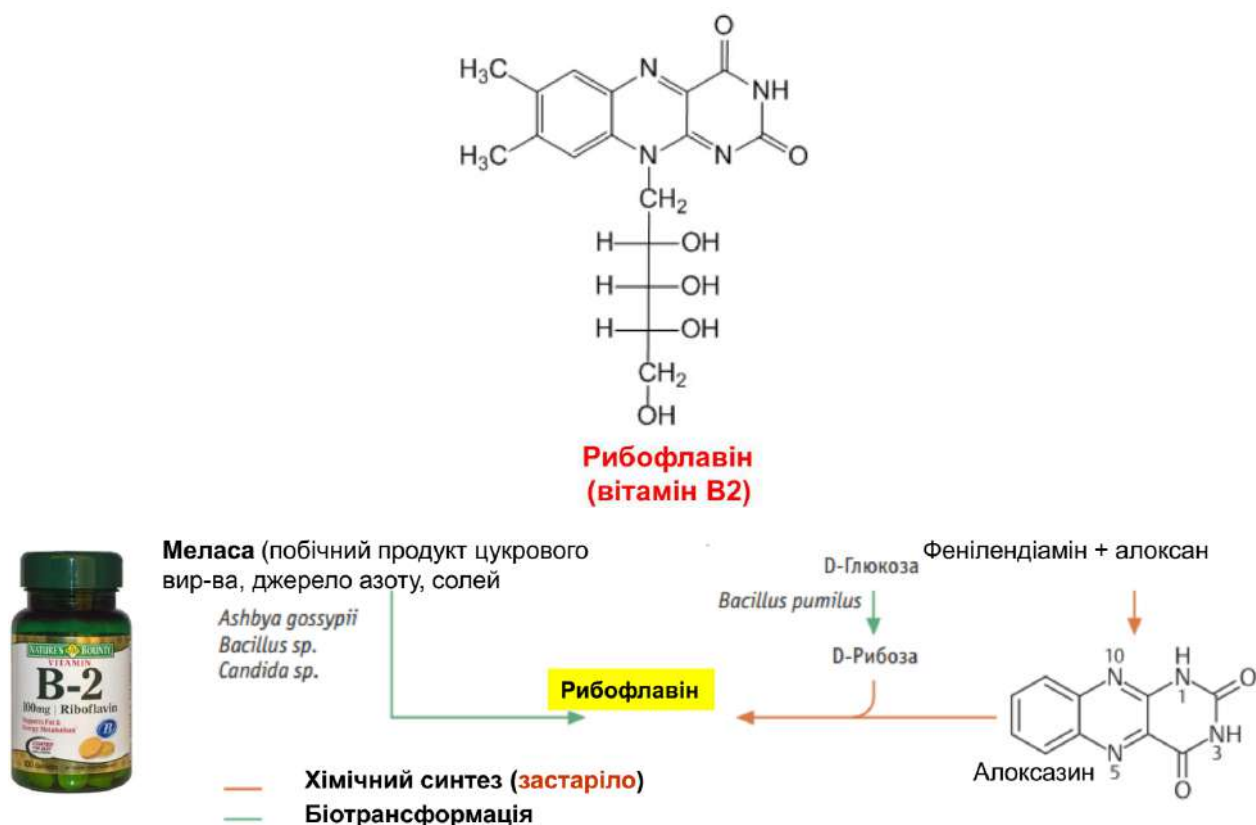


Рис. 2.9. Загальні схеми отримання рибофлавіну шляхом хімічного синтезу та біотрансформацією. Пояснення в тексті. Адаптовано з [77]

Отримання кобаламіну (вітамін В12). Промислове виробництво В12 (рис. 2.10) здійснюється **виключно шляхом ферментації** – за рахунок мікробного синтезу штамами бактерій *Propionibacterium shermanii* або *Pseudomonas denitrificans*. В якості сировини використовується меляса та амонійні солі, а також попередники – солі кобальту та 5,6-диметилбензімідазол. Вихід В12 становив до 150 мг/л за 5 діб. Також розроблені технології синтезу В12 на основі термофілів *Bacillus circulans*, де вихід був до 6 мг/л.

На сьогодні, усі гени *P. shermanii*, що залучені до синтезу В12, вже клоновано, до того ж ведуться розробки новітніх штамів-суперпродуцентів методами метаболічної інженерії.

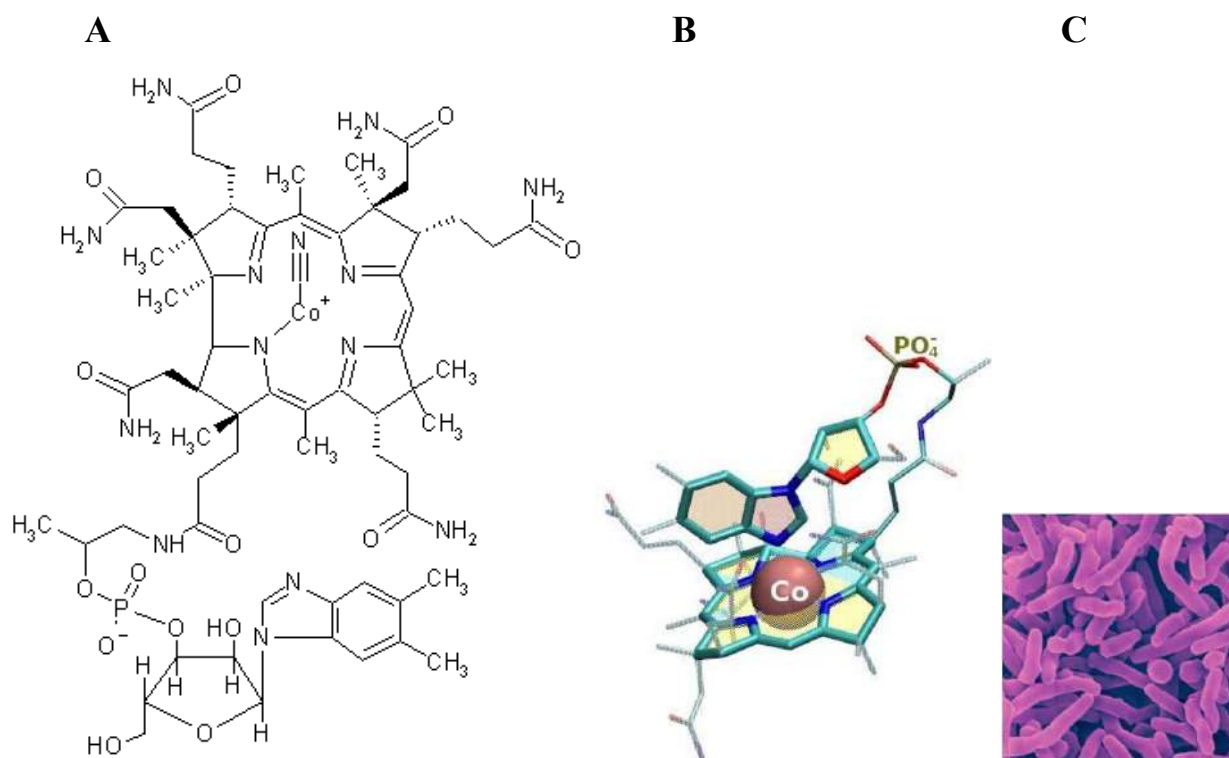


Рис. 2.10. (A) 5-дезоксіяденозилкобаламін – коферментна форма вітаміна. (B) Тривимірна структура вітаміна. (C) зовнішній вигляд бактерій *Propionibacterium shermanii*. Адаптовано з [24]

Отримання менахінону (вітамін K2). Вітамін K2 переважно синтезується в організмі людини сапрофітними бактеріями в тонкому відділі кишечника, а також клітинами печінки тварин. Його вперше виділено з гнилої рибної муки, де він синтезується мікрофлорою.

Довголанцюговий K2 на виробництві можна отримати за допомогою:

1) *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363 (рис. 2.11), при цьому найкращі показники виходу становили 125 нмоль/г (сухої маси клітини) та титр 95 нмоль/л середовища. Окрім цього, найбільший вихід при аеробному бродінні з фруктозою був у 3,7 раза більшим порівняно з ферментацією за допомогою глюкози.

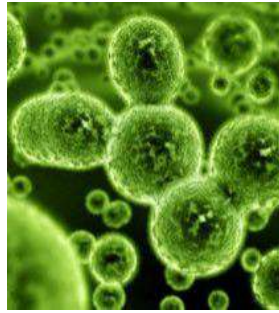


Рис. 2.11. Зовнішній вигляд бактерій *Lactococcus lactis cremoris*.
Запозичено з [58]

Отримання фолієвої кислоти (вітамін В9). Усі фолати мають спільну структуру, утворену птеридиновим кільцем, р-амінобензойною кислотою (рАВА) та хвостом гамма-зв'язаних L-глутаматів (рис. 2.12 а).

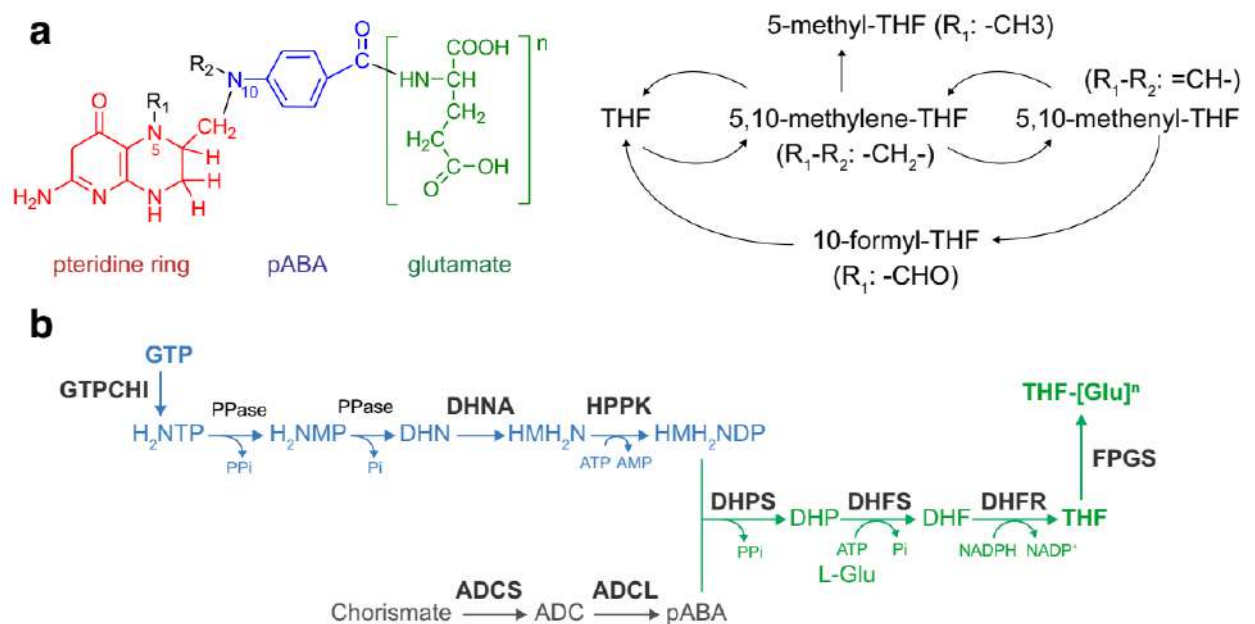


Рис. 2.12. (а) Будова фолатів. (б) Схематичний шлях біосинтезу фолатів. Пояснення в тексті. Запозичено з [73]

Як можна побачити на рис. 2.13 б, шлях біосинтезу фолатів містить наступні метаболіти: H_2NTP – 7,8-дигідронеоптерин трифосфат; H_2NMP – 7,8-дигідронеоптерин монофосфат; DHN – 7,8-дигідронеоптерин; HNH_2N – 6-гідроксиметил-7,8-дигідрооптерин; HNH_2NDP – 6-гідроксиметил-7,8-дигідронеоптерин дифосфат; ADC – 4-аміно-4-дезоксихорисмат; DHP – 7,8-

дигідроптероат; DHF – 7,8-дигідрофолат; THF – тетрагідрофолат. І ферменти: GTPCH1 – GTP циклогідролаза I; PPase – фосфатаза; DHNA – дигідронеоптерин альдолаза; HPPK – 2-аміно-4-гідрокси-6-гідроксиметилдигідроптеринпірофосфокіназа; ADCS – амінодезоксихоризматсинтаза; ADCL – 4-аміно-4-дезоксихоризматліаза; DHPS – дигідроптероатсинтаза; DHFS – дигідрофолатсинтаза; DHFR – дигідрофолатредуктаза; FPGS – фолілполіглутаматсинтаза.

На сьогодні, у промисловості фолати синтезується виключно **хімічним шляхом** (незважаючи на деякі побічні ефекти при його вживанні), оскільки не існує жодного біотехнологічного процесу для його виробництва у великих масштабах. Поки що розробляються та активно розповсюджуються 2 основні стратегії підвищення вмісту фолатів у продуктах: **біофортіфікація** (біозбагачення – заходи щодо поліпшення поживних якостей культурних рослин методами селекції з використанням генної інженерії) та вживання біодобавок.

Було запропоновано використовувати модифіковані *Bacillus subtilis*, *E. coli*, а також *Lactococcus lactis*. Проте отримані рівні синтезу вітаміна лишалися все ще низькими: не більше 200 мкг/л.

У той же час *Ashbya gossypii* (або *Eremothecium gossypii* – це ниткоподібний гриб або цвіль) природно може синтезувати 40 мкг/л фолатів, і після певних модифікацій здатна досягти 6595 мкг/л (тобто у 146 разів більше). Такі результати можна було отримати за допомогою надмірної експресії генів *FOL* шляхом делеції гена *MET7*, який кодує FPGS (каталізує поліглутаміляцію фолатів у їх гамма-карбоксильному залишку, і, можна припустити, що інгібування FPGS зменшує внутрішньоклітинне утримання, скасовуючи регуляцію зворотного зв'язку); а також за допомогою усунення конкуруючих шляхів (наприклад, для рибофлавіну та аденіну), що підвищує доступність GTP для біосинтезу фолатів: за рахунок зниження рівня *RIB1* та делеції гена *ADE12* (рис. 2.13).

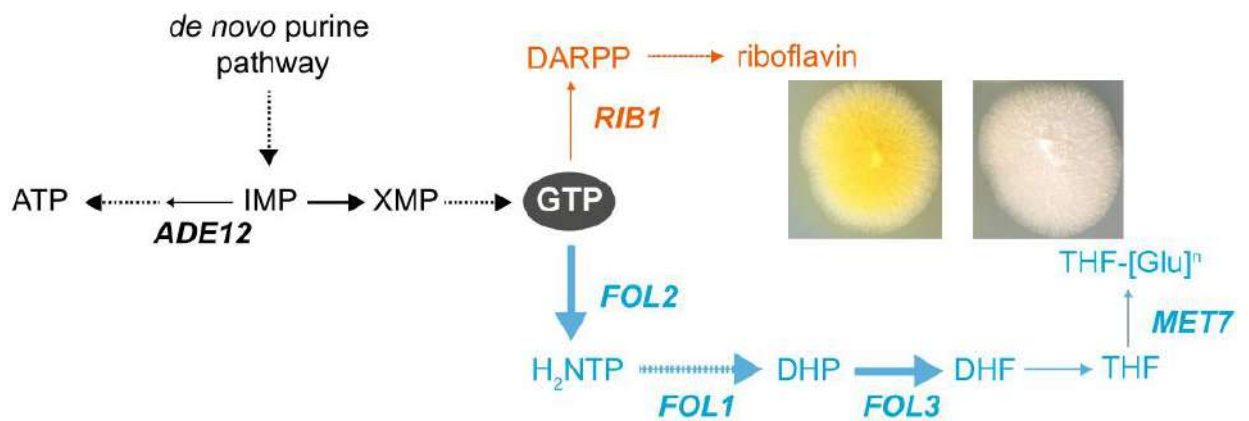


Рис. 2.13. Метаболічна інженерія для біопродукції фолатів в *Ashbya gossypii*. Перемикання метаболічного потоку в бік виробництва рибофлавіну або виробництва фолатів призводить до супержовтих штамів або світло-жовтих штамів відповідно. Пунктирними лініями позначені багатоступеневі шляхи; тонкі лінії вказують на зменшення метаболічного потоку; товсті лінії вказують на збільшення метаболічного потоку. Запозичено з [73]

Таким чином, поєднання вищезазначених модифікацій в одному штамі *A. gossypii* створило найкращого продуцента фолатів на сьогодні.

2.3. Отримання антибіотиків

З часу відкриття пеніциліну в 1928 році з різних мікроорганізмів було виділено понад 12000 антибіотиків (АБ) із різною специфікою та різноманітними способами дії. Універсальне використання антибіотиків для лікування бактеріальних захворювань призвело до значного поліпшення здоров'я людини і, безсумнівно, врятувало мільйони життів.

Антибіотики отримують з організмів різного рівня складності. На сьогоднішній день, понад 8000 антибіотиків виділені з **мікроорганізмів**, і ще понад 4000 отримані з інших джерел: **рослин** (антибіотики з вищих рослин, з яких отримані антибіотики новоіманін, сальвін, аренарин, цернуол), **грибів**, **лишайників**, **тварин** (наприклад, еритрин, що виділяється з еритроцитів

різних тварин, та екмолін, отриманий із тканин риб). Найбільш важливим класом продуцентів є **бактерії актиноміцети** (застаріла назва – променисті грибки; лат. *Actinomycetales*) та **грампозитивні ґрунтові бактерії роду *Streptomyces***. Промисловим шляхом отримують близько 200 антибіотиків.

У всьому світі виробляється понад 10000 тонн антибіотиків на рік. Щорічний валовий продаж становив близько 65 мільярдів доларів у 2014 році, включно з антибіотиками, що використовуються в кормі тварин для стимуляції їх росту (табл. 2.1).

Ринок антибіотиків визначається продажем **чотирьох провідних класів лікарських засобів: цефалоспоринів (27 %), макролідів (20 %), хінолонів (17 %) та пеніцилінів (17 %)**. Разом на ці 4 класи препаратів припадає понад 80 % світових продажів антибактеріальних препаратів

Антибіотики – це переважно низькомолекулярні речовини, що мають протимікробну дію. Абсолютна більшість діє на прокаріотичні організми, окремі представники – на найпростіших та нижчих еукаріот. Антибіотики є вторинними метаболітами мікроорганізмів та виділяються в невеликих кількостях (кілька мл/л середовища). Тому, на сьогодні, стоїть задача посилити рівень їх синтезу.

За оцінками, щороку виявляється від 200 до 300 нових антибіотиків, головним чином за допомогою трудомістких дослідницьких програм, у рамках яких проводиться скринінг багатьох тисяч різних мікроорганізмів, щоб знайти ті, які виробляють унікальні антибіотики. Однак, зважаючи на високі витрати на розробку та клінічне випробування, на ринок потрапляють лише ті сполуки, які мають значну терапевтичну та економічну перспективу.

Отже, лише близько 1-2 % щойно відкритих антибіотиків щороку додають до арсеналу боротьби із захворюваннями. Насправді, фармацевтична промисловість неохоче інвестує в дослідження та розробки в цій галузі, і багато компаній або відмовились, або зменшили свої зусилля з 1999 року.

Таблиця 2.1

Класифікація антибіотиків на основі хімічної будови. Адаптовано з [77]

№	Клас	Підкласи	Представники, сфера застосування
1	Вуглеводні антибіотики	Аміноглікозиди	Стрептоміцин (медицина), казугаміцин (фунгіцид)
2	Макроциклічні лактони	Макроліди, ансаміцини, полієнові АБ	Ерітроміцин (медицина), пімаріцин (сироваріння), ріфампіцин (лікування туберкульозу)
3	Хінонові антибіотики	Тетрацикліни Антрацикліни	Тетрациклін (медицина, консервант), оксорубіцин (протираковий препарат)
4	Амінокислотні та пептидні антибіотики	Похідні АК В-лактамі АБ Пептидні АБ Хромопептиди Глікопептиди	Циклоспорин (трансплантація) Пеніцилін, цефалоспорин (медицина) Бацитрацин (медицина) Актиноміцин (протираковий препарат) Ванкоміцин (медицина)
5	Азотвмісні гетероциклічні сполуки	Нуклеозидні АБ	Бластоцидин S (фунгіцид)
6	О-вмісні гетероциклічні сполуки	Поліетерні АБ	Монензин (птаководство)
7	Аліциклічні антибіотики	Похідні циклоалканів	Циклогексимід (фунгіцид)
8	Ароматичні антибіотики	Похідні бензолу	Хлорамфенікол (медицина)

Традиційний скринінг бактеріальних штамів із метою виявлення антимікробної активності здійснюється за їх впливом на поведінку контрольного штама (рис. 2.14). Після того, як на певному штамі було виявлено антибактеріальну активність (на рис. 2.14 можна побачити зони сповільненого росту конкретного мікроорганізму на агарі після внесення на чашку Петрі грибів, які синтезують антибіотик), відповідний антибіотик виділяють, очищують та аналізують його структуру.

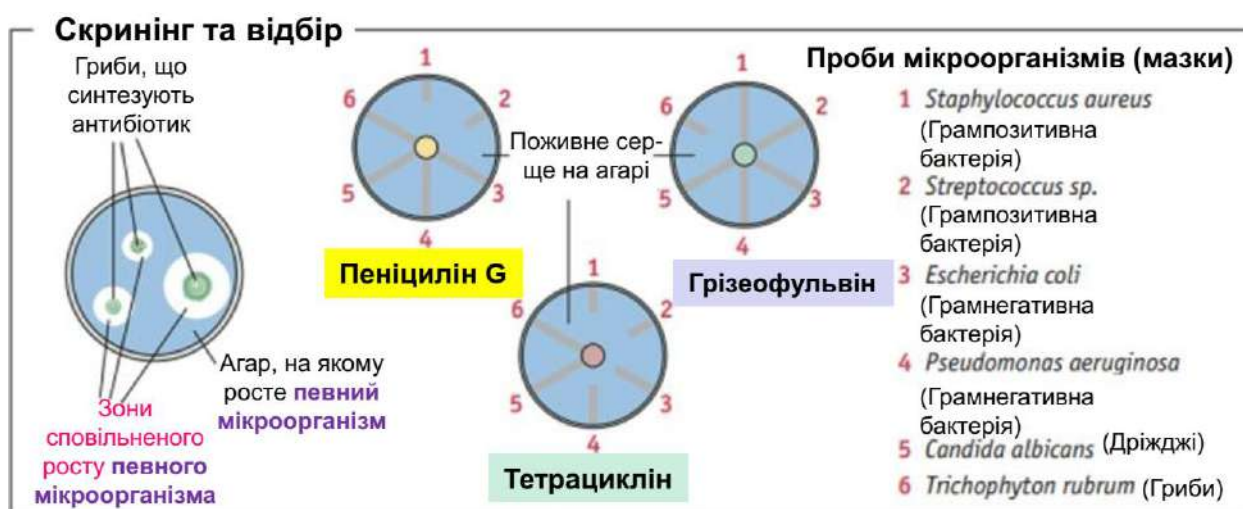


Рис. 2.14. Загальна схема скринінгу та відбору антибіотиків (тетрациклін, грізеофульвін і пеніцилін G) із метою виявлення антимікробної активності. Пояснення в тексті. Адаптовано з [77]

Щоб збільшити ефективність пошука штамів-продуцентів антибіотиків, розробляються нові методи скринінгу, наприклад, із використанням біохімічних чи біологічних чипів; застосовують нові хіміко-аналітичні підходи тощо.

Також штами-продуценти можуть бути вдосконалені. **Удосконалення штамів** полягає в багатократному повторенні актів класичного мутагенезу, селекції та «зворотного схрещування» – направлена еволюція (рис. 2.15). У гібридологічному аналізі може бути використане схрещування з одним із батьківських організмів. Таке схрещування першого покоління з формою, що

несе дану пару алелей (домінантних або рецесивних) у гомозиготному стані називають зворотним, або беккросом, а потомство позначають F_b .

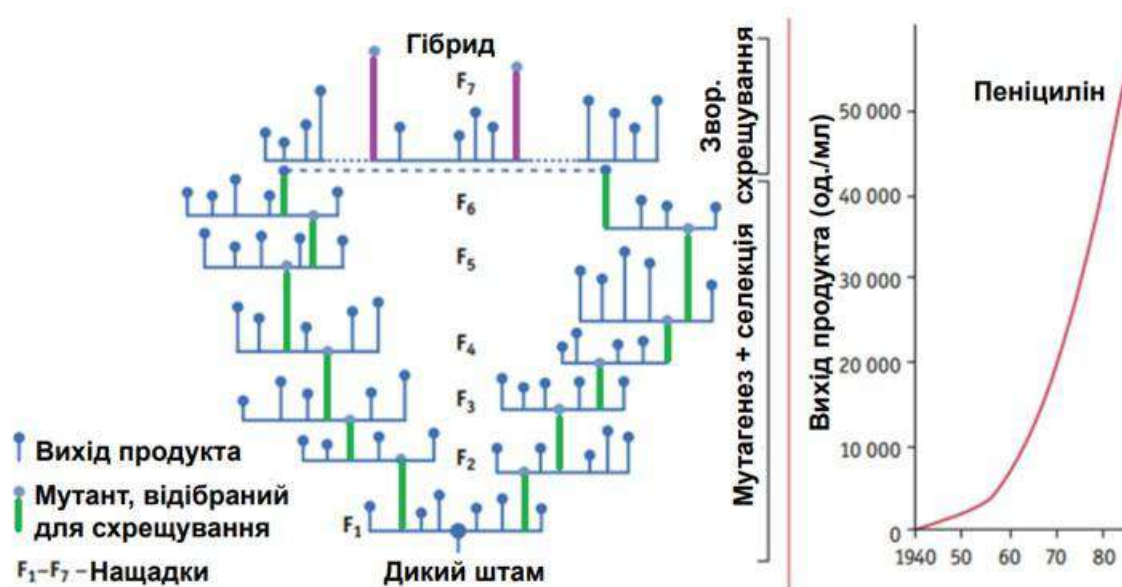


Рис. 2.15. Загальна схема вдосконалення штама-продуцента антибіотика на прикладі пеніциліна. Пояснення в тексті. Адаптовано з [77]

Отже, за допомогою цих методів можна відвищити вихід антибіотиків в 10^3 - 10^6 разів у порівнянні з диким штамом. Також є генно-інженерні підходи введення додаткових копій генів ферментів синтезу антибіотиків.

Незважаючи на те, що продуктивність антибіотиків із багатьох штамів значно покращилася: **оригінальний гриб, що продукує пеніцилін, виділений Олександром Флемінгом**, давав 2 од. на мл культури, тоді як використовувані, на сьогодні, штами синтезують приблизно 70000 од. на мл культури. Така оптимізація продуктивності зайняла багато років, вимагаючи використання значної робочої сили та фінансових ресурсів.

Технологія рекомбінантної ДНК може мати позитивний вплив на цю діяльність двома шляхами. По-перше, ця технологія може бути використана для розробки нових, структурно унікальних антибіотиків як із підвищеною активністю проти вибраних мішеней, так і із зменшенням побічних ефектів. По-друге, генетичні маніпуляції можна використовувати для відносно

швидкого та недорогого підвищення продукування і, отже, зниження собівартості виробництва існуючих антибіотиків.

Трансформація та селекція стрептоміцетів. Як уже було зазначено, більшість відомих антибіотиків ізолювано з грампозитивних ґрунтових бактерій роду *Streptomyces*. Для генетичної маніпуляції із *Streptomyces* важливо, щоб ці бактерії змогли трансформуватися і щоб трансформовані клітини могли бути легко відібрані. Однак, на відміну від *E. coli*, штами *Streptomyces* існують не як окремі клітини, а як розширені агрегати, які називаються міцеліальними нитками. Формування **протопластів** (не містять клітинну оболонку) є обов'язковою передумовою для проведення генетичних маніпуляцій зі стрептоміцетами (рис. 2.16).

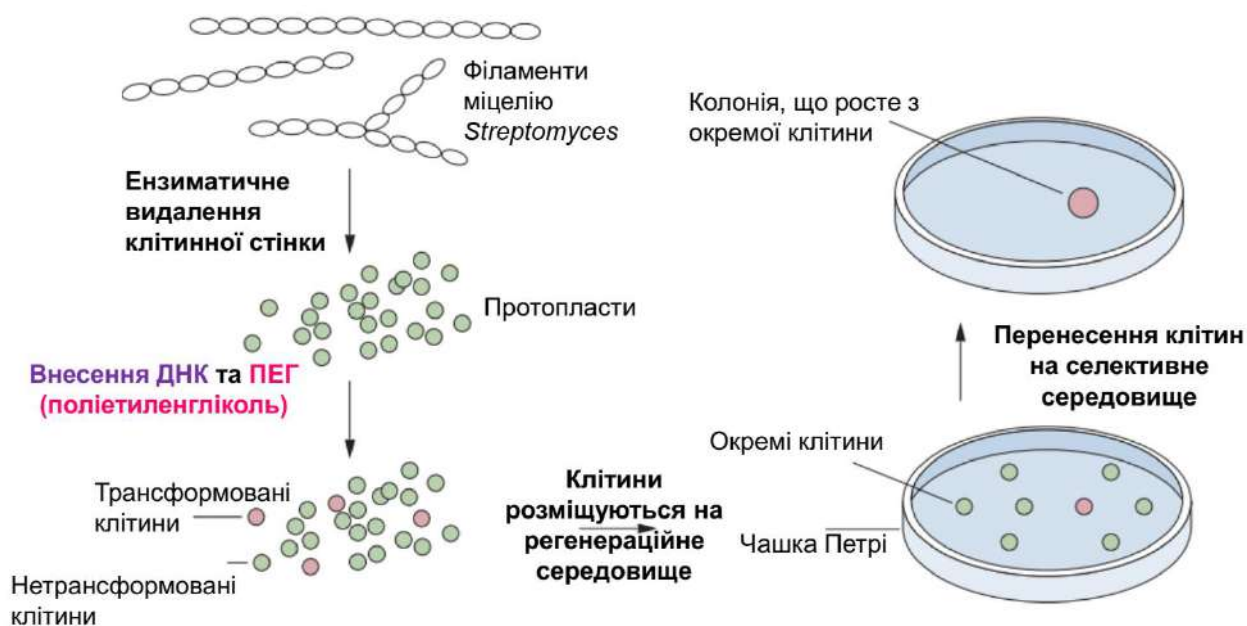


Рис. 2.16. Схематичне зображення трансформації та відбору трансформантів штамів *Streptomyces*. Рожеві кола являють собою трансформовані клітини, а зелені – нетрансформовані клітини. ПЕГ, поліетиленгліколь. Пояснення в тексті. Адаптовано з [24]

Без цього кроку неможливо відрізнити трансформовані від нетрансформованих клітин, оскільки кожна видима колонія на твердому середовищі починається з клітинної сукупності, а не з окремої клітини. Отже,

колонії, які вирости в присутності селективного антибіотика, містили б суміш трансформованих і нетрансформованих клітин. При утворенні протопластів до трансформації всі колонії в присутності селективного антибіотика містять лише трансформовані клітини. Потрібно відмітити, що поглинання плазмідної ДНК протопластами *Streptomyces* підсилюється додаванням поліетиленгліколю.

Після трансформації протопласти спочатку висівають на тверде середовище, щоб дати змогу клітинним стінкам регенерувати, а потім переносять із на них селективне середовище, яке часто містить або неоміцин, або тіострептон, які обидва діють як агенти відбору для трансформованих клітин.

Клонування генів біосинтезу антибіотика. Біосинтез антибіотика може включати від 10 до 30 окремих етапів, каталізованих ферментами, тому клонування всіх генів для синтезу певного антибіотика не є простим завданням.

Було запропоновано наступну стратегію виділення повного набору генів біосинтезу антибіотика: вводили банк ДНК клонів, побудований із хромосомної ДНК дикого типу, в мутантні клітини (не здатні синтезувати антибіотик); потім трансформантів перевіряли на здатність виробляти антибіотик. Після цього плазмідну ДНК із клону, що постачав функціональний ген і генний продукт, тобто доповнював мутантний штам, використовували як гібридизаційний ДНК-зонд для скринінгу іншого банку клонів хромосомної ДНК дикого типу (тобто такого, в якому середній розмір фрагмента становить близько 10 т.п.н.) для виділення клонів з областями, які перекривалися послідовністю зонда. Таким чином, можна було ідентифікувати та клонувати сегменти ДНК, які прилягали і, як правило, перевищували початкову комплементарну ДНК. Отже, за допомогою цього підходу повний кластер генів можна реконструювати з накладених клонів.

Як правило, гени біосинтезу антибіотиків розподілені у вигляді кластеру в одному місці хромосомної ДНК, так що гени, які прилягають до

комплементарного гена, також, ймовірно, можуть брати участь у біосинтезі цільового антибіотика.

Такий **підхід комплементачії (доповнення)** був використаний для виділення деяких генів біосинтезу антибіотика червоного кольору – ундецил-продигіозин – із *Streptomyces coelicolor* A3 (рис. 2.17). У цьому випадку аналіз наявності доповнення був простим, так як передбачав оцінювання кольору колоній. Колонії організмів дикого типу на відміну від колоній мутантів були червоними через наявність антибіотика. За рахунок комплементачії колонії також набували червоного кольору.

Як видно на рис. 2.17, хромосомна ДНК із клітин, що продукують антибіотик дикого типу, вбудовувалась у вектор для клонування в *Streptomyces*. Банк ДНК-клонів використовувався для трансформації нефарбованого (тобто не продукуючого антибіотик) мутанта дикого типу. Потім було відібрано червоних трансформантів (у яких відбулася комплементация) для подальшого аналізу послідовності ДНК-вставки на плазміді.

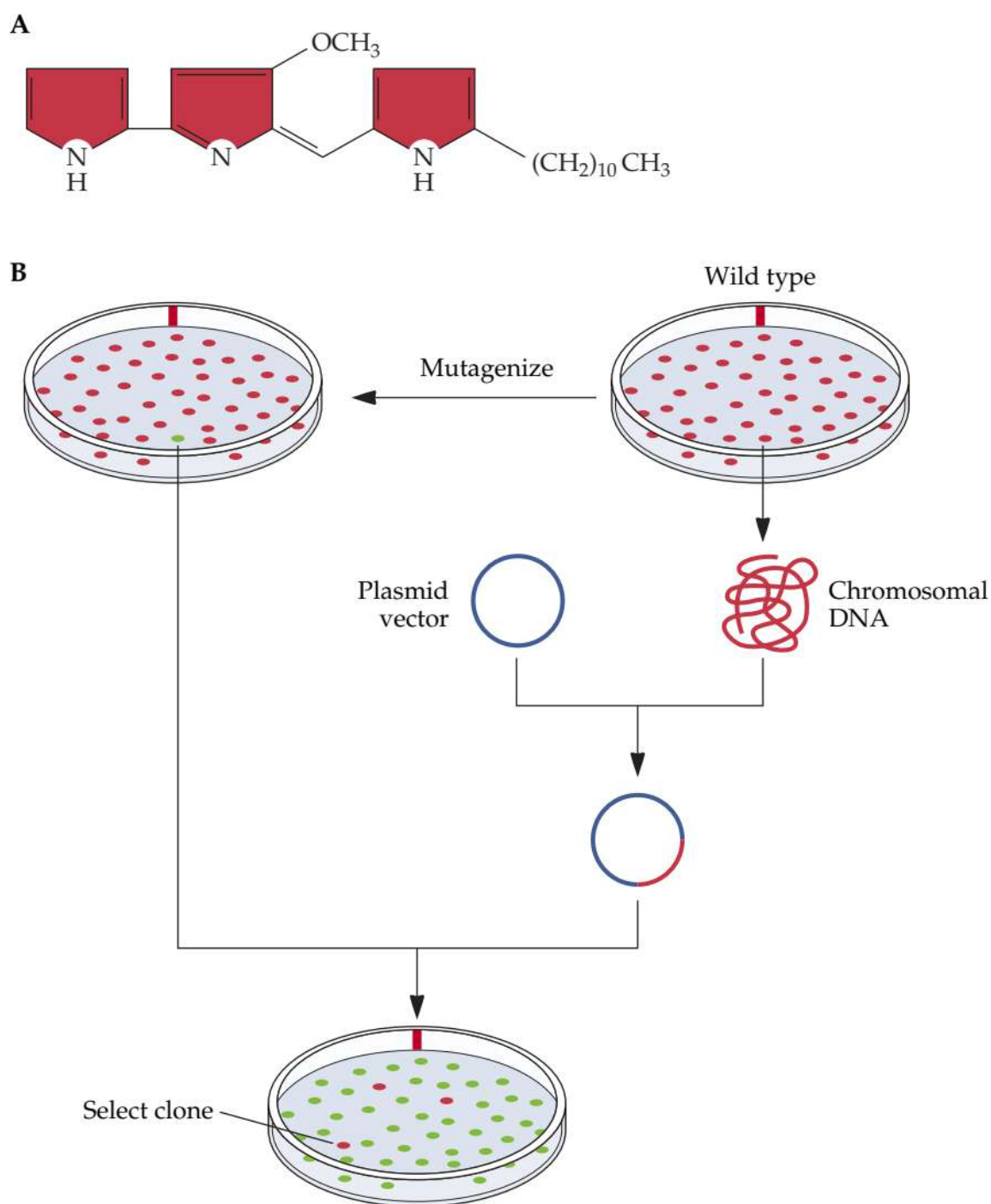


Рис. 2.17. (A) Хімічна структура забарвленого антибіотика ундецилпродигіозину. (B) Спосіб клонування генів, що беруть участь у біосинтезі ундецилпродигіозину. Пояснення в тексті. Адаптовано з [24]

На додаток до клонування генів біосинтезу антибіотиків шляхом комплементарії, можна застосовувати більш **прямі стратегії**. Один або кілька ключових ферментів у біосинтетичному шляху можуть бути ідентифіковані за допомогою генетичних або біохімічних досліджень, а потім очищені.

Потім можна визначити N-кінцеву амінокислотну послідовність ферменту, і з цією інформацією можна підготувати олігодезоксирибонуклеотидні зонди для гена. Цей підхід був використаний для виділення гена ізопеніциліну N-синтетази з *Penicillium chrysogenum*.

Незважаючи на труднощі, існує ряд прикладів клонування та перенесення великих фрагментів ДНК, що кодують цілі біосинтетичні шляхи антибіотиків. У цих випадках, зазвичай, необхідно використовувати вектор, який може приймати й зберігати інтактними послідовності ДНК розміром до 100 т.п.н. **Бактеріальні штучні хромосоми – BACs**, було розроблено для автономної реплікації в *E. coli* та, при введенні в *Streptomyces*, для інтеграції в хромосому.

Модуляція експресії генів у *Streptomyces*. Система експресії повинна гальмувати синтез цільового білка до того, як культура досягне високої щільності. Система повинна легко та дешево індукуватись, а також діяти на різні види роду *Streptomyces*. Одна з популярних генетичних конструкцій для продукування антибіотиків побудована на основі нітрилазного оперону (рис. 2.18). Ця система працює для *S. coelicolor*, *S. griseus*, *S. avermitilis* – штамів, що раніше використовувались для промислового продукування антибіотиків.

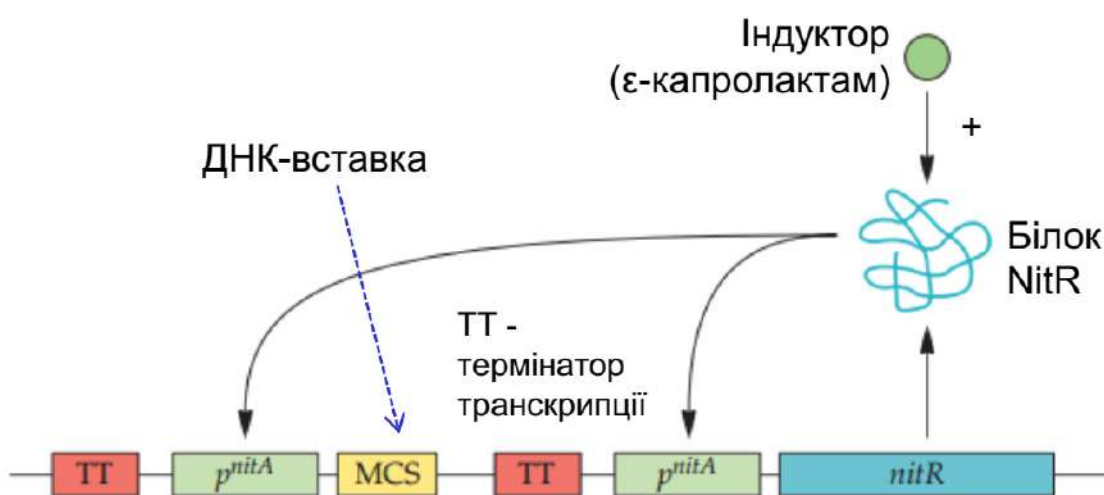


Рис. 2.18. Система експресії на основі нітрилазного оперону. *NitA* – ген промотора нітрилази, *NitR* – ген позитивного регулятора *NitA*, *p* – відповідний промотор, *MCS* – полілінкер. Пояснення в тексті. Адаптовано з [24]

Внаслідок індукції ϵ -капролактамом високий рівень позитивного регулятора NitR забезпечував потужне продукування цільових білків. В окремих випадках на долю цільового білка припадало до 40 % усіх розчинних білків клітини.

Виробництво тетрациклінів. Тетрациклін (лат. Tetracyclinum) – один із перших антимікробних препаратів – був отриманий у 40-х роках XX сторіччя. Це антибіотик широкого спектра дії, який добре всмоктуються та широко використовуються у фармацевтиці. У природі продукується актинобактерією *Streptomyces aureofaciens*. Окрім цього, тетрацикліни можна одержати шляхом:

- **ферментації бактерії *Streptomyces aureofaciens* і *S. rimosus*** (тетрациклін, хлортетрациклін та окситетрациклін);
- **напівсинтетичних процесів** (демеклоциклін, ролітетрациклін та метациклін);
- **синтетичних процесів** (доксидиноциклетні та метациклінові).

Біосинтез тетрациклінів вимагає великої кількості ферментативних етапів. Наприклад, у біосинтезі хлортетрацикліну є понад 72 проміжних продуктів. Генетичні дослідження *Streptomyces aureofaciens* показали, що при його синтезі шляхом ферментації хлортетрацикліну задіяні понад 300 генів. При такій великій кількості генів регуляція біосинтезу цього антибіотика є складною. Однак деякі ключові регуляторні сигнали відомі й були враховані у виробничій схемі. Синтез хлортетрацикліну пригнічується як глюкозою (регулювання транскрипції), так і фосфатом (тому середовище, що використовується в комерційному виробництві, містить відносно низькі концентрації фосфатів).

На рис. 2.19 наведено схему виробництва тетрацикліну та різні етапи, що ведуть до комерційного ферментатора (чашки Петрі з агаром, колби-качалки, преферментер) та фінального очищення отриманого антибіотика з відповідного бульйону. Як і у виробництві пеніциліну, використовують кукурудзяний лікер, але як джерело вуглецю застосовують сахарозу, а не лактозу.

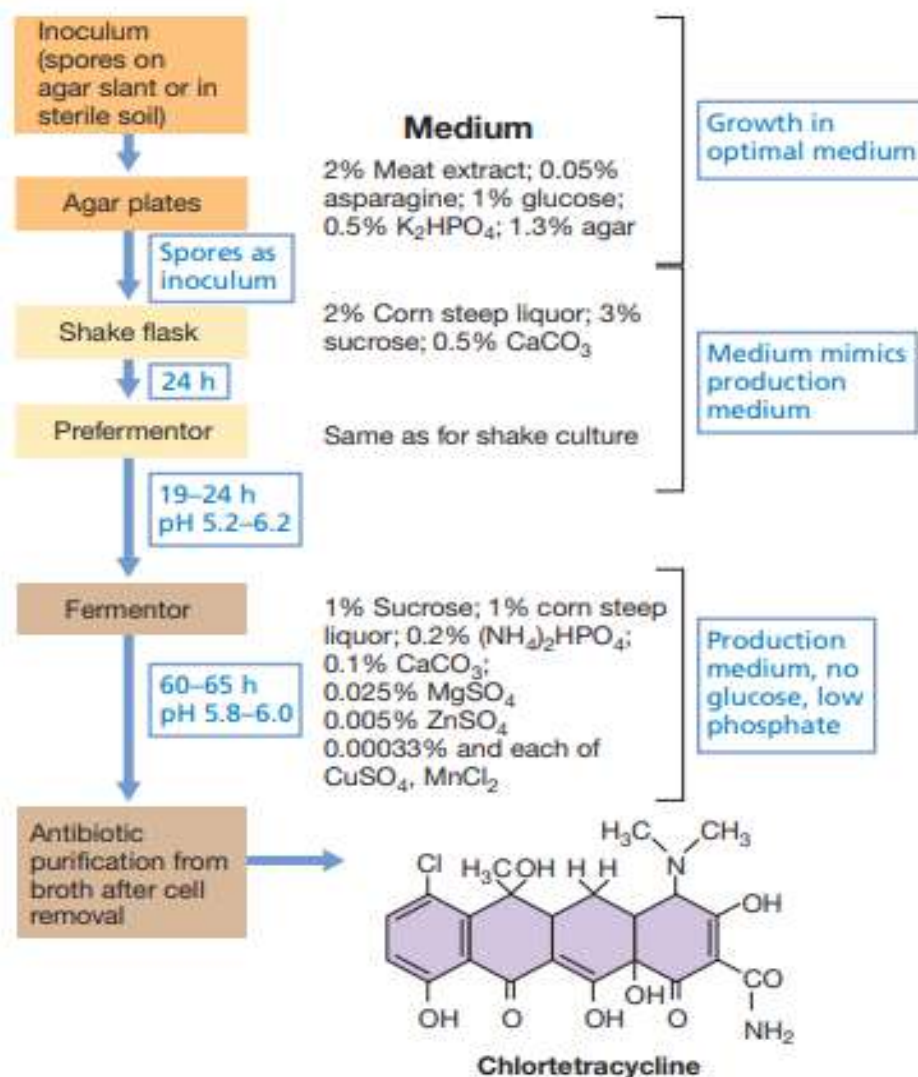


Рис. 2.19. Схема виробництва хлортетрацикліну з використанням *Streptomyces aureofaciens*. Структура хлортетрацикліну зображена праворуч унизу. Глюкоза використовується для вирощування посівного матеріалу, але не для комерційного виробництва. Запозичено з [61]

Комбінаторний синтез макролідних (полікетидних) антибіотиків. Термін «полікетид» визначає клас антибіотиків, які синтезуються шляхом послідовної ферментативної конденсації дрібних карбонових кислот, таких як ацетат, пропіонат та бутират. Полікетидні препарати включають антибіотик еритроміцин, імунодепресивний препарат FK506 та препарат ловастатин, що знижує рівень холестерину.

Хоча деякі полікетиди виробляються рослинами та грибами, більшість продукуються актиноміцетами як вторинні метаболіти. Полікетидні антибіотики синтезуються за складним ферментативним механізмом: кожен цикл конденсації призводить до утворення на зростаючому вуглецевому ланцюзі β -кето-групи – так само як синтез довголанцюгових жирних кислот.

Синтез полікетиду складається з ряду етапів, які повторюються по кілька разів, включно з кеторедукцією, дегідратацією та еноїлредукцією β -групи зростаючого полікетидного ланцюга. Повний синтез полікетидного антибіотика, як правило, вимагає участі кількох із багатофункціональних ферментів, що складають субодиниці полікетидсинтази (рис. 2.20).

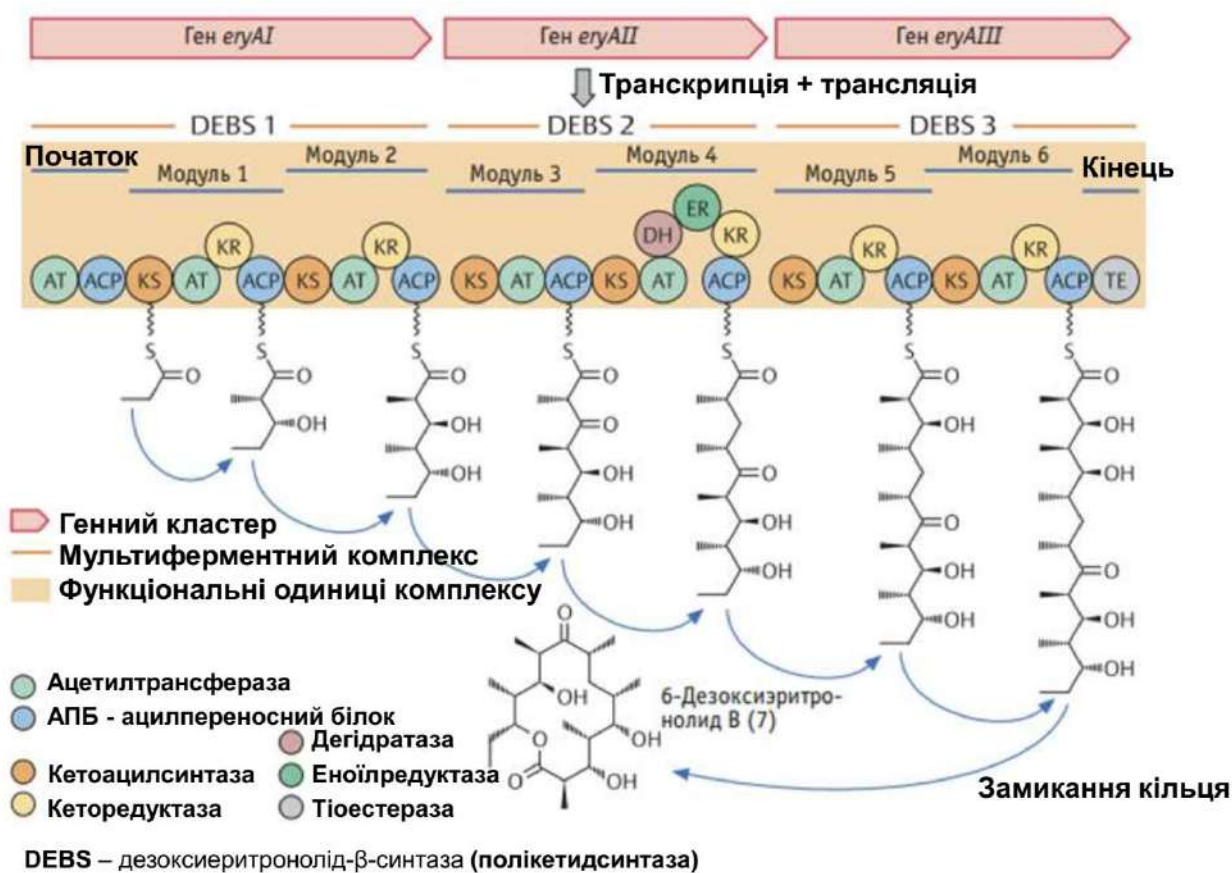


Рис. 2.20. Загальна схема комбінаторного синтезу макролідних (полікетидних) антибіотиків. Адаптовано з [77]

Усі генетичні кластери ароматичних полікетидів містять набір із 3 генів, що кодують так звану **мінімальну полікетидсинтазу**. Кожна мінімальна

полікетидсинтаза має активність для одного циклу подовження полікетидного ланцюга. Мінімальна полікетидсинтаза відповідає за синтез ароматичної основи полікетиду. Модифікації основної структури каталізуються іншими ферментами, які діють спільно з мінімальною полікетидсинтазою.

Порядок модулів у полікетид-синтазі визначає послідовність різних двовуглецевих одиниць, а кількість модулів визначає розмір полікетидного ланцюга. Гени, що кодують повний набір цих білків, зазвичай, організовані в єдиний кластер. Кожен кластер генів мінімальної полікетидсинтази кодує синтез певного антибіотика (рис. 2.21).

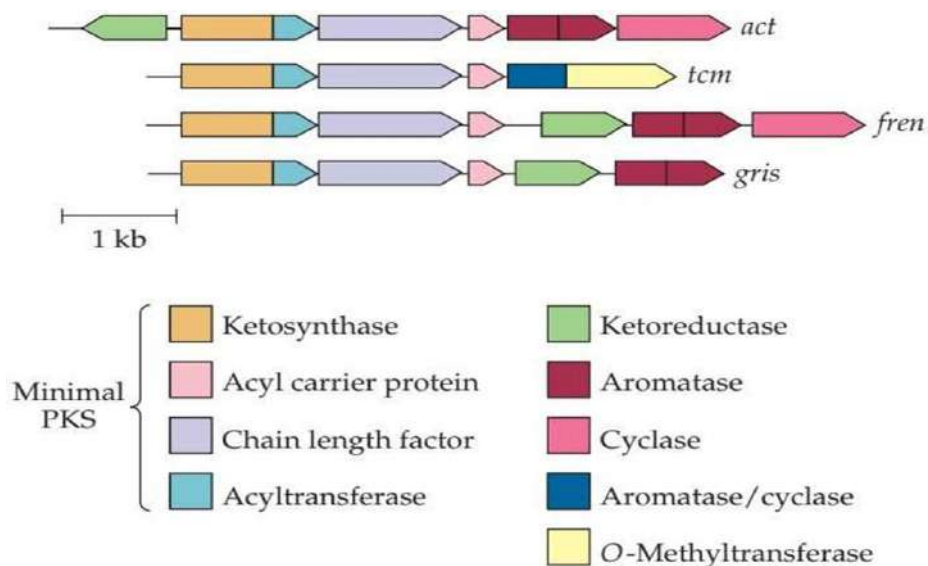


Рис. 2.21. Кластери генів для біосинтезу ароматичних полікетидних антибіотиків актинородину (*act*), тетраценоміцин (*tcm*), френоліцин (*fren*) та гризеузин (*gris*). Кожен ген показаний спрямованим у тому напрямку, в якому він транскрибується. PKS – мінімальна полікетидсинтаза. 1 kb – 1 т.п.н. Пояснення в тексті. Запозичено з [24]

Як видно на рис. 2.21, кожен кластер містить гени, що кодують мінімальну полікетидсинтазу, яка відповідає за синтез каркасу полікетиду. Ферменти, кодовані іншими генами, діють на зміну зростаючого полікетидного ланцюга. Змінюючи гени між кластерами, можна створити нові

ароматичні полікетидні антибіотики – підхід, який обіцяє значно прискорити процес відкриття нових антибіотиків (рис. 2.22).

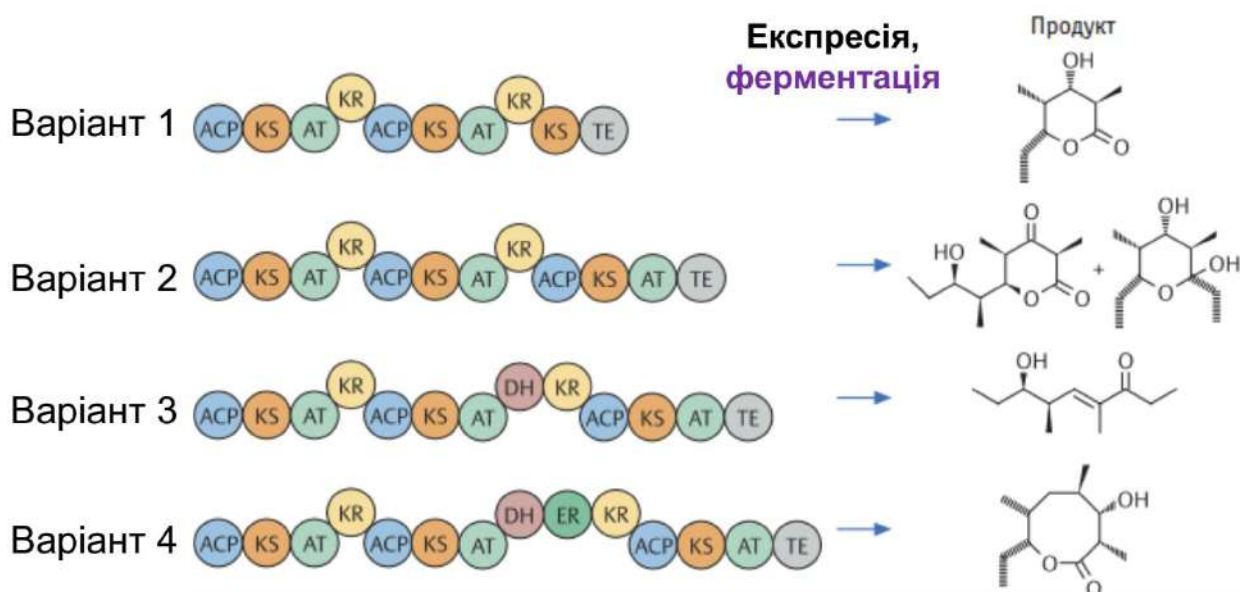


Рис. 2.22. Приклад численних варіантів макролідних антибіотиків, отриманих за допомогою комбінаторного біосинтезу. Пояснення в тексті. Адаптовано з [77]

Якщо кожна з ферментативних активностей, яка каталізується доменом на багатофункціональній субодиниці полікетидсинтази, каталізує лише одну біохімічну стадію на шляху синтезу, втрата якої-небудь однієї активності повинна впливати лише на одну стадію загального синтезу. Більше того, зміна каталітичного домену, функція якого встановлена, повинна дозволити дослідникам вносити передбачувані зміни в структуру синтезованого антибіотика. Так, було сиквеновано кластер генів *ery* (56 т.п.н.), що відповідає за синтез еритроміцину в *Saccharopolyspora erythraea*.

Після цього стало можливим змінити полікетидсинтазу еритроміцину двома різними способами: (1) ділянку ДНК, яка кодує β -кеторедуктазу, було видалено; (2) ділянку ДНК, що кодує еноїлредуктазу, було піддано мутагенезу. Після делеції β -кеторедуктази отримані проміжні продукти еритроміцину мали карбонільний фрагмент, а не гідроксильну групу на C5-вуглеці кільця. У

той же час, після внесення мутації в ген еноїлредуктази з'явився подвійний зв'язок в положенні C6 і C7 кільця (рис. 2.23).

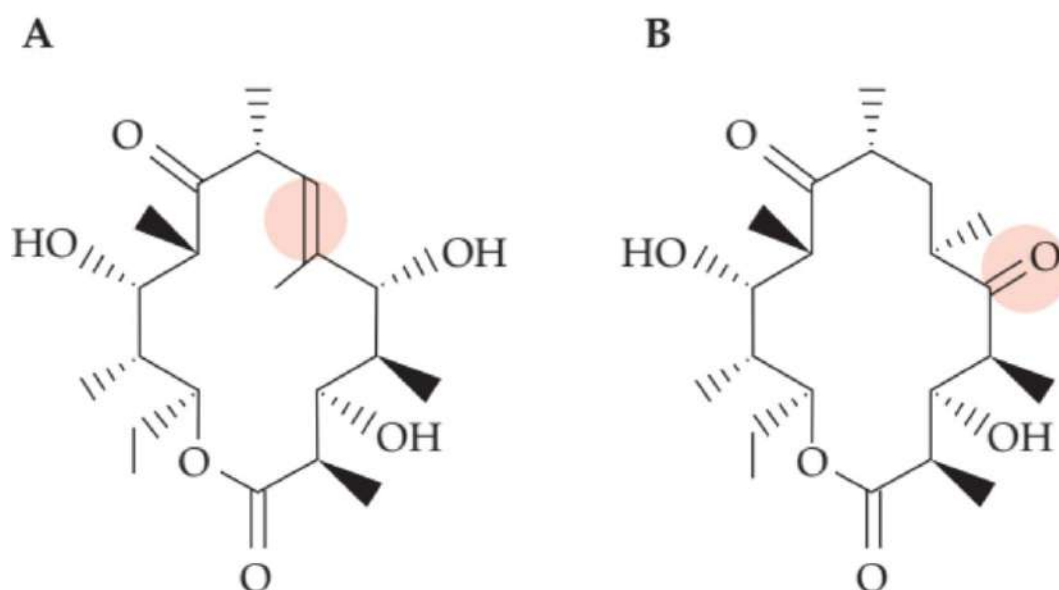


Рис. 2.24. Змінені похідні еритроміцину, отримані в результаті генетичних маніпуляцій. (А) Мутація гена еноїлредуктази призвела до введення подвійного зв'язку в положеннях C6 та C7 кільця (виділено). **(В)** Делеція гена β -кеторедуктази призвела до того, що еритроміцин мав карбонільний фрагмент, а не гідроксильну групу на C5-вуглеці кільця (виділено). Запозичено з [24]

Отже, після того, як кластер генів, що кодує біосинтез певного полікетидного антибіотика, був виділений та охарактеризований, можна, змінюючи конкретні фрагменти ДНК, модифікувати шлях біосинтезу антибіотика і тим самим змінити структуру антибіотика певним, передбачуваним чином. Більше того, можна розрізати та з'єднати фрагменти ДНК відповідним чином, тим самим переміщуючи домени полікетидсинтази один навколо одного для того, щоб створити нові полікетидні антибіотики.

Вдосконалення виробництва антибіотиків. Різноманітні підходи генної інженерії також можуть бути використаними для підвищення продукування вже відомих антибіотиків. Масштабне виробництво

антибіотиків *Streptomyces* spp. часто обмежене кількістю кисню, доступного клітинам. Нитчасті культури *Streptomyces* характеризуються дуже щільним ростом, що часто призводить до виснаження кисню живильного середовища, що, у свою чергу, зумовлює пригнічення росту клітин та зниження виходу антибіотиків.

Одним із способів подолання цієї проблеми є розробка шляхом генетичних маніпуляцій штамів *Streptomyces*, які можуть краще використовувати наявний кисень.

Наприклад, було показано, що клітини *S. coelicolor*, трансформовані плазмідним вектором із клонованим геном гемоглобіну аеробної бактерії *Vitreoscilla* (цей гемоглобін був функціонально схожим на еукаріотичний гемоглобін), були здатними поглинати кисень із середовища, а потім доставляти його до клітини. Внаслідок цього вони продукували в 10 разів більше актинородину на грам сухої маси клітин і мали більшу щільність клітин, ніж нетрансформовані клітини. Це загальний механізм отримання достатньої кількості кисню, щоб забезпечити проліферацію за інших обмежуючих умов.

Найпоширеніші антибіотики належать до β -лактамної групи. Бета-лактамні антибіотики (β -лактамні антибіотики, β -лактами) – група антибіотиків, які об'єднує наявність у структурі β -лактамного кільця (рис. 2.24). До бета-лактамів належать підгрупи **пеніцилінів, цефалоспоринів, карбапенемів та монобактамів.** Продуцентом пеніцилінів є гриб *Penicillium chrysogenum* (золотистий), тоді як продуцентом цефалоспоринів – *Acremonium chrysogenum*. Вони блокують утворення поперечних пептидних зв'язків у молекулі муреїну за рахунок інгібування ферменту транспептидази (здійснює утворення поперечних «межпептидних» зв'язків між лінійними ланцюгами муреїну).

Завдяки високій ефективності дії, низькій токсичності та наявності ефективних методів хімічного та ензиматичного отримання β -лактамні антибіотики різних поколінь (похідні пеніциліну та цефалоспорину) отримали

найширшого застосування в сучасній медицині. На сьогодні, світові масштаби виробництва перевищують 30000 т, у той час як лише на долю одного цефалоспориноу припадає понад 50 % усіх АБ.



Рис. 2.24. Загальна схема біосинтезу лактамних антибіотиків (пеніцилінів і цефалоспориноів). 1 – β -лактамне кільце, 2 – тiazолідинове кільце, 3 – дигідротiazолідинове кільце, 6-АРА – 6 β -амінопеніциланова кислота, 7-АСА – 7 β -аміноцефалоспорианова кислота, 7-АДСА – 7 β -амінодезацетоксицефалоспорианова кислота. Адаптовано з [77]

Пеніциліни та цефалоспоринои синтезуються за допомогою низки ферментативних реакцій, які утворюють трипептид δ -L- α -аміноадипіл-L-цистеїніл-D-валін і перетворюють цей трипептид у кінцеві молекули пеніциліну або цефалоспориноу (рис. 2.25). Один з ферментів, ізопеніцилін-N-синтаза, було кристалізовано та визначено його активний центр. Три гени *pcbAB*, *pcbC* та *penDE*, які беруть участь у біосинтезі пеніциліну, об'єднані в кластери в *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus nidulans* та *Penicillium nalgiovense*. Регуляцію біосинтезу пеніциліну з вуглецевого катаболіту здійснюють глюкоза та інші джерела вуглецю, які легко утилізувати, але не лактоза. Ефект глюкози посилюється завдяки високій концентрації фосфатів. Глюкоза пригнічує біосинтез пеніциліну, запобігаючи утворенню ферментів біосинтезу пеніциліну. Транскрипція генів *pcbAB*, *pcbC* та *penDE* у *P.*

chrysogenum значно пригнічується глюкозою, незважаючи на зміну рН у лужний бік.

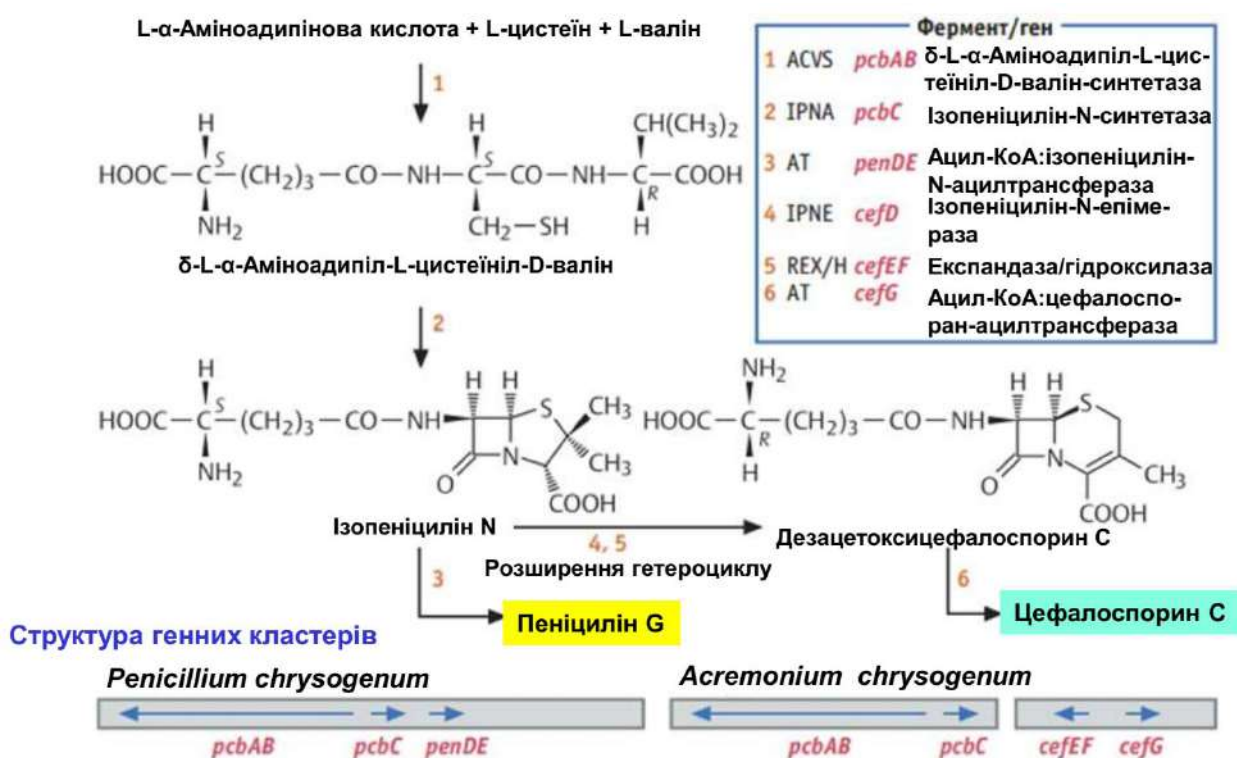


Рис. 2.25. Біосинтез та генні кластери пеніциліну і цефалоспориноу.

Пояснення в тексті. Адаптовано з [77]

Пеніцилін G та 6-амінопеніциланова кислота, яка утворюється з нього, є найважливішими проміжними продуктами при синтезі напівсинтетичних пеніцилінів та цефалоспоринів. З антибіотику цефалоспориноу C можна синтезувати 7-аміоцефалоспорианову кислоту, яка є вихідним матеріалом для хімічного синтезу ряду цефалоспоринів (рис. 2.24, 2.25).

Як видно на рис. 2.26, **промислове отримання β-лактамних антибіотиків шляхом мікробного синтезу** передбачає використання посівного матеріалу відповідних мікроорганізмів, преферментацію та ферментацію з додаванням певних агентів (лактоза, жирні кислоти; подача кисню тощо). Після певного інкубаційного періоду проводять первинну обробку, а далі як ферментативний гідроліз із утворенням 6-амінопеніциланової кислоти, так і реакції розширення кільця з наступним

синтезом 7-аміноцефалоспорової кислоти. Далі напівсинтетичні пеніциліни та цефалоспорины одержують шляхом приєднання ацильних бічних груп (реакція Шоттена-Баумана).



Рис. 2.26. Схема промислового отримання β -лактамних антибіотиків шляхом мікробного синтезу. Пояснення в тексті. Адаптовано з [77]

Потреба в новітніх стратегіях скринінгу антибіотиків. На сьогодні, стійкість бактерій до антибіотиків є однією з найбільш серйозних загроз для здоров'я людства, продовольчої безпеки тощо. Інфекційні хвороби, які спричиняють резистентні бактерії, важко, а інколи неможливо вилікувати. У цій ситуації видужання часто залежить тільки від внутрішніх можливостей імунної системи. Патогенні бактерії, які є стійкими до всіх відомих антибіотиків, називають «супербактеріями» (англ. *superbugs*).

Сам по собі антибіотик не є причиною появи резистентності. Резистентність може розвиватися природно в результаті природного добору випадкових мутацій. Як тільки такий ген виникає, бактерії можуть переносити генетичну інформацію за допомогою горизонтального переносу генів, зокрема

шляхом обміну плазмід. Якщо бактерія несе декілька генів стійкості, вона називається багатостійкою або мультирезистентною. Отже, на сьогодні, запропоновано різноманітні **підходи для пошуку й створення нових потужних антибіотиків**, а також удосконалення вже існуючих. Це:

- 1) Попередник-направлений біосинтез – напівсинтетичний метод, при якому в середовище росту продуцента додають речовини-попередники антибіотика.
- 2) Скринінг серед малодосліджених мікроорганізмів (лишайники, губки тощо).
- 3) Використання нового покоління мікрочипів для скринінгу.
- 4) Пошук проміжних продуктів біосинтезу АБ.
- 5) Генетична рекомбінація між різними продуцентами антибіотика.
- 6) Пошук попередників антибіотиків методами «зворотної генетики» – від гена до нової ознаки.
- 7) Рекомбінація генів синтезу антибіотика *in vitro* для синтезу *in vivo*.
- 8) Пошук нових мішеней дії антибіотика на основі аналізу геномів патогенів (наприклад, *Staphylococcus aureus*).

Унікальні антибіотики. Як уже було зазначено, в останні роки спостерігається колосальне поширення антибіотикорезистентних бактеріальних збудників. На сьогоднішній день, у США більше смертей пояснюється інфекціями, що викликані штамами *S. aureus*, стійкими до метициліну, ніж вірусом імунodefіциту людини/СНІДом.

Важливим компонентом вірулентності *S. aureus* є каротиноїдний пігмент **стафілоксантин**, який синтезується бактерією. Внаслідок наявності великої кількості спряжених подвійних зв'язків, якими володіє ця сполука, вона може детоксифікувати активні форми кисню (включно з пероксидами, супероксидом, гідроксильним радикалом, синглетним киснем), які часто виробляються імунною системою господаря у відповідь на бактеріальну інфекцію. Це свідчить про те, що порушення синтезу стафілоксантину *S.*

aureus може бути ефективною мішенню для запобігання розповсюдженню та токсичності цієї бактерії.

На першому етапі біосинтезу стафілоксантину в *S. aureus* фермент дегідрокваленсинтаза конденсує дві молекули фарнезилдифосфату з утворенням пресквалендифосфату – як при синтезі холестерину в людини.

Тому було запропоновано оцінити здатність інгібіторів синтезу саме холестерола людини гальмувати розвиток цих бактерій. За попередніми результатами, одна із зазначених сполук спричинила 98 % зменшення виживаності *S. aureus* та інфікованих мишей.

Бактеріальні рибоперемикачі – це регуляторні елементи, які розташовані в 5'-нетрансльованих ділянках деяких бактеріальних мРНК. Частина рибоперемикача містить **аптамероподібну молекулу** (олігонуклеотидні або пептидні молекули, що специфічно зв'язуються з певними молекулами-мішенями), яка зв'язується з певним метаболітом, таким як амінокислота, ферментний кофактор або певні іони. Коли метаболіт зв'язується з рибоперемикачем, індукується конформаційна зміна в частині мРНК, змінюючи тим самим експресію гена, що знаходиться нижче за рибовимикачем.

Рибофлавін (вітамін B2), який є необхідним для росту бактерій; як правило, синтезується *de novo*, але також може надходити з навколишнього середовища. Тому було запропоновано ідентифікувати сполуки, які могли б пригнічувати ріст *E. coli*, інгібуючи дію рибофлавіну.

Вчені з'ясували, що сполука **рибоцил** (яка не є близьким структурним аналогом флавінмононуклеотиду, ФМН) може зв'язуватися з рибоперемикачем (замість ФМН), який знаходиться вище гена ферменту синтази, який бере участь у біосинтезі рибофлавіну (рис. 2.27).

Зазвичай, коли ФМН зв'язується з цим рибоперемикачем, він перешкоджає синтезу синтази, зупиняючи додаткове продукування рибофлавіну, коли присутня достатня кількість ФМН (зворотне пригнічення

транскрипції). Хоча рибоцил не є структурним аналогом природного ліганду рибоперемикача, він стає функціональним аналогом.

В цьому випадку рибоперемикач стає унікальною мішенню для дії антибіотика. Таким чином, першовідкривачі рибоцилу попередньо продемонстрували, що націлювання на різні рибоперемикачи може надати новітні засоби скринінгу нових антибіотиків.

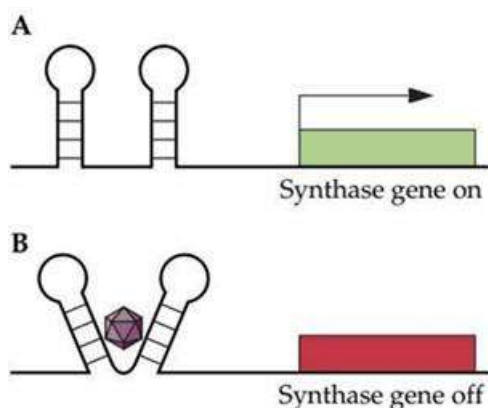


Рис. 2.27. Модуляція біосинтезу рибофлавіну трансляційним модулятором рибоперемикача, який є частиною мРНК. (А) За відсутності флавінмононуклеотиду (або рибоцилу) відбувається експресія гена синтази. Стрілка вказує напрямок транскрипції гена синтази. **(В)** При зв'язуванні з флавінмононуклеотидом або рибоцилом (зображено фіолетовим кольором) змінюється конформація рибоперемикача, що перешкоджає як транскрипції гена синтази, так і відповідно синтезу рибофлавіну. Запозичено з [24]

2.4. Отримання терапевтичних речовин

Отримання рекомбінантного інсуліну. Інсулін – гормон пептидної природи, що утворюється у бета-клітинах (β -клітинах) острівців Лангерганса підшлункової залози. Впливає на багато аспектів обміну речовин практично у всіх тканинах. Структура інсуліну майже не змінилась в еволюції вищих хребетних, зокрема інваріабельними є положення дисульфідних зв'язків,

аміно- та карбокситермінальні ділянки А-ланцюга, та гідрофобні амінокислоти біля С-кінця В-ланцюга (рис. 2.28).

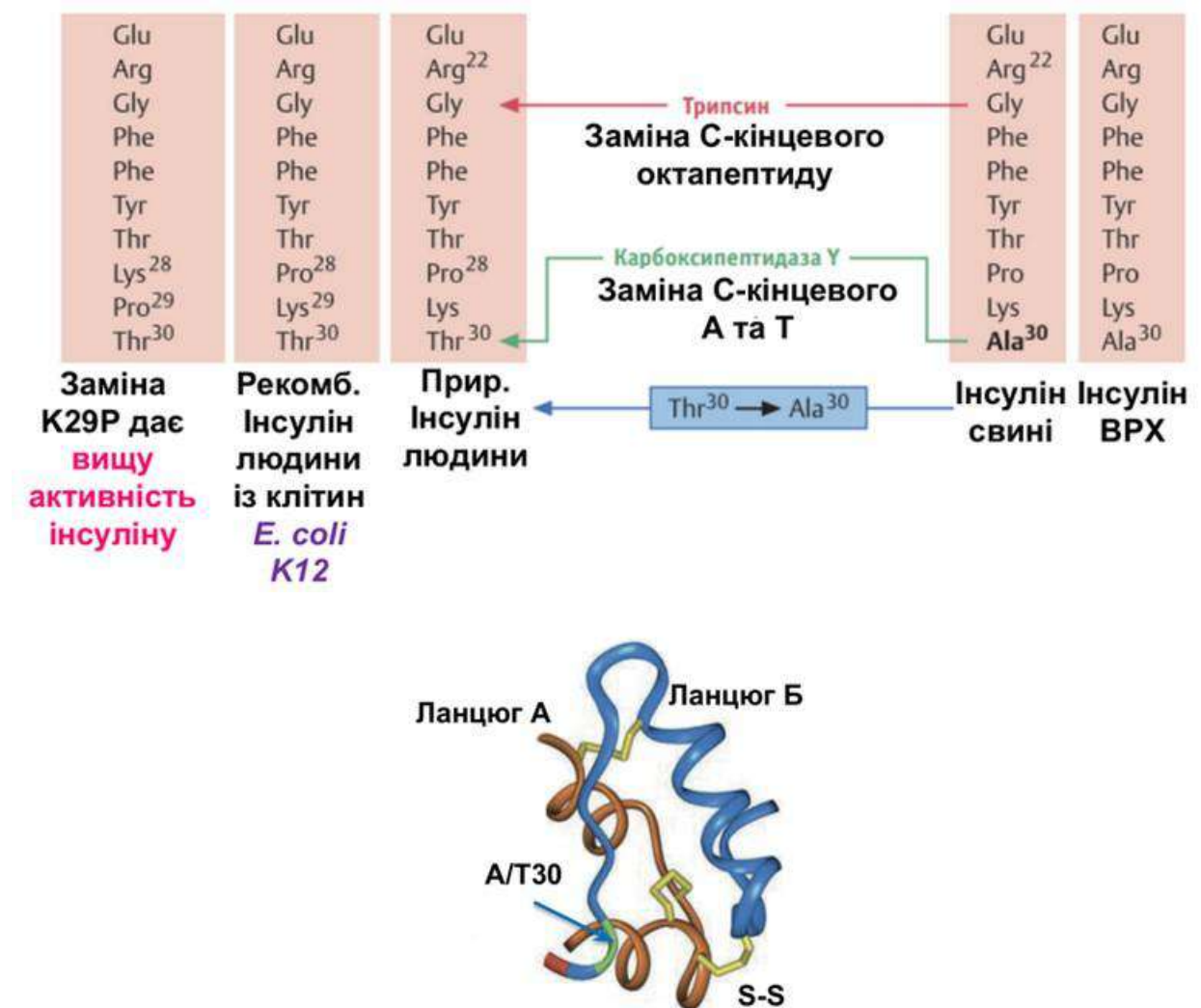


Рис. 2.28. Структура молекули інсуліну з різних джерел (С-кінець ланцюга Б). ВРХ – велика рогата худоба. Пояснення в тексті. Запозичено з [77]

Людський інсулін відрізняється від бичачого двома амінокислотними замінами в А-ланцюгу: у 8-му положенні треонін замість аланіну, а у 10-му ізолейцин замість валіну. Свинячий гормон ще ближчий до людського, він відрізняється всього однією амінокислотою: аланіном у 30-му положенні В-ланцюга замість треоніну (рис. 2.28).

Основна дія інсуліну полягає в зниженні концентрації глюкози в крові. Понад 170 млн людей у світі хворіє на діабет. Понад 2 % населення розвинених

країн мають діабет II типу. До 1985 року інсулін отримували з відходів м'ясної промисловості (підшлункова залоза великої рогатої худоби та свиней). Сучасна ж технологія заснована на використанні рекомбінантних штамів *E. coli* та *Saccharomyces cerevisiae* (пивні, пекарські дріжджі, один із видів дріжджів). На сьогодні, об'єм ринку інсуліну оцінюється в понад 5 млрд доларів та 8 т/рік.

З 1985 року стало можливим промислове отримання інсуліну методами геної інженерії. В якості клітин-хазяїв було обрано штам *E. coli* K-12. В умовах сучасного виробництва проінсулін синтезують у клітинах *E. coli* у вигляді білка, злитого з триптофансинтазою, яку далі видаляють протеолізом. Вектор має препослідовність для розщеплення за допомогою BrCN (бромід ціаногену), який ріже С-кінець метіоніну (рис. 2.29, 2.30).

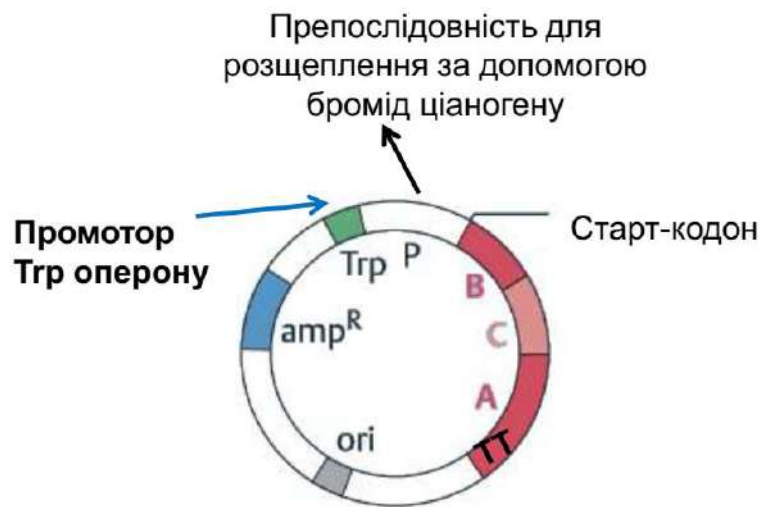


Рис. 2.29. Загальна структура вектора для синтезу інсуліна в клітинах *E. coli*. amp^R – ген стійкості до ампіциліну, *ori* – ориджин, ТТ – термінатор транскрипції. Пояснення в тексті. Запозичено з [77]

Вихід виробництва при використанні вищезазначеного вектора – до 100 г інсуліну на 40 м³ культури.

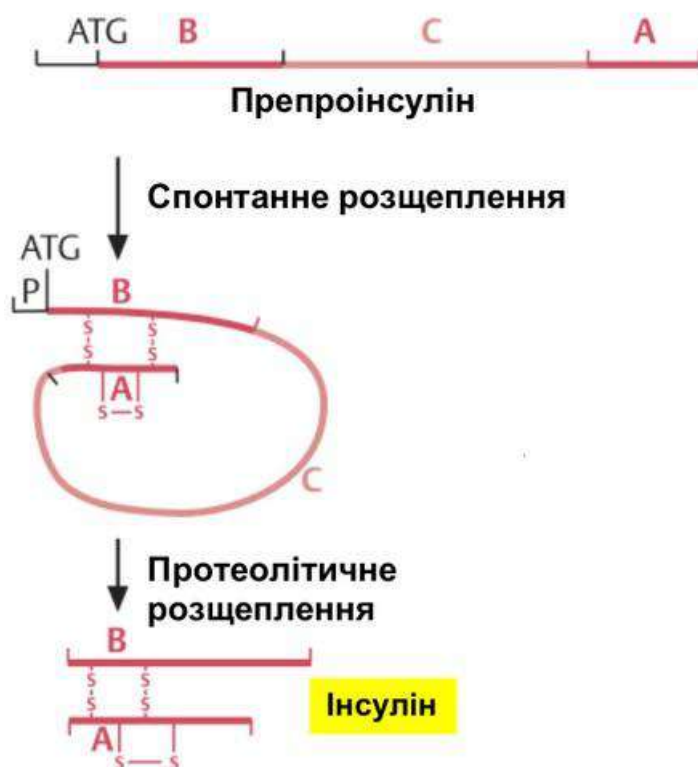


Рис. 2.30. Загальна схема біосинтезу активного інсуліну. Пояснення в тексті. Р – препослідовність для розщеплення за допомогою бромід ціаногену; ATG – старт кодон, що кодує метіонін. Запозичено з [77]

На сьогодні, існують новітні форми інсуліну, створені шляхом генної інженерії:

- Інсулін аспарт (P28D) – короткої дії;
- Інсулін лізпро (P28K + K29P) – швидкої дії;
- Інсулін гларгін (N21G) – тривалої дії.

Отримання людського соматотропіну. Гормон росту людини (соматотропін) – це 191-амінокислотний білок гіпофіза з молекулярною масою 22125 Da. Він стимулює вироблення інсуліноподібного фактора росту 1, важливого компонента стимулювання росту у дітей, а в дорослих він контролює обмін речовин. Генно модифікований (ГМ) гормон росту людини був одним із перших терапевтичних білків у світі, який було схвалено для використання пацієнтами.

Перший рекомбінантний гормон росту, який з'явився в 1985 році та вироблявся компанією «Genentech», називався «**Somatrem**» («**Protropin**») та мав амінокислотну послідовність, ідентичну послідовності гормону росту людини, за винятком того, що на N-кінці пептидного ланцюга був додатковий залишок метіоніну (який, як вважалося, продовжує період напіввиведення). «Соматрем» експресувався клітинами *E. coli* K-12, трансформованими плазмідним вектором із геном соматотропіну (рис. 2.31).



Рис. 2.31. Загальна схема виробництва соматотропіну в *E. coli*.
Пояснення в тексті. Адаптовано з [77]

Його виробництво було припинено наприкінці 1990-х. Лікування дітей передбачало щоденні ін'єкції протягом багатьох років. Витрати на ін'єкції становили 40000-50000 доларів на рік. У 2004 р. Управління з продовольства і медикаментів США (FDA) схвалило використання нового, розробленого, рекомбінантного гормону росту людини для осіб, низький зріст яких спричинявся не лише дефіцитом гормону росту.

Стратегія конструювання білка шляхом перемішування (**shuffling**) функціональних доменів або **спрямованого мутагенезу** була використана для посилення або зменшення його дії. Було показано, що природний гормон росту людини зв'язується як з рецептором гормону росту, так і з рецептором пролактину, які зустрічаються в ряді різних типів клітин. Щоб уникнути небажаних побічних ефектів під час терапії, було запропоновано так модифікувати людський гормон росту, щоб він міг зв'язуватися лише з рецепторами гормону росту.

Сайт-специфічний мутагенез клонованої кДНК гормону росту людини був використаний для зміни деяких бічних ланцюгів амінокислот, які діють як ліганди для Zn^{2+} (тобто His-18, His-21 та Glu-174), оскільки цей іон необхідний для високоафінного зв'язування людського гормону росту з рецептором пролактину (рис. 2.32).

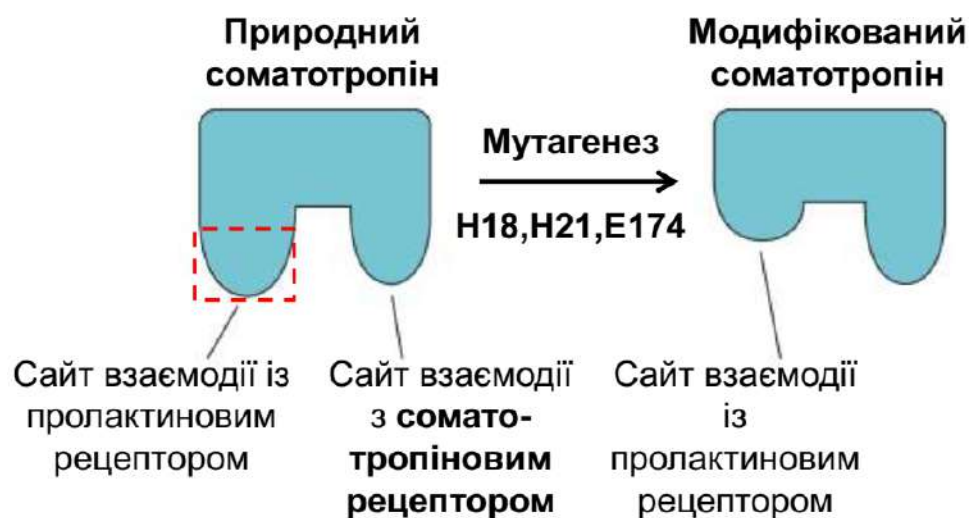


Рис. 2.32. Підвищення специфічності соматотропіну. Пояснення в тексті. Адаптовано з [24]

Ці модифікації створили похідні гормону росту людини, які зв'язувалися з рецептором гормону росту, але не з рецептором пролактину, і були перевірені на безпеку та ефективність терапії в людей.

Як наслідок відносно короткого періоду напіввиведення соматотропіну в плазмі, терапія гормоном росту людини вимагала підшкірних ін'єкцій один раз на день. Це лікування було як незручним, так і коштовним. Тому було запропоновано розробити **гормон росту людини тривалої дії**.

З цією метою позаклітинний домен рецептора гормону росту людини був злитий із гормоном росту людини за допомогою лінкового пептиду з 20 амінокислот, що складався з чотирьох повторів амінокислот Gly4Ser (рис. 2.33). Ця конструкція мала дуже сильну тенденцію до димеризації, оскільки частина гормону росту з однієї молекули зв'язувалася з рецепторною частиною іншої молекули, формуючи неактивний димер.

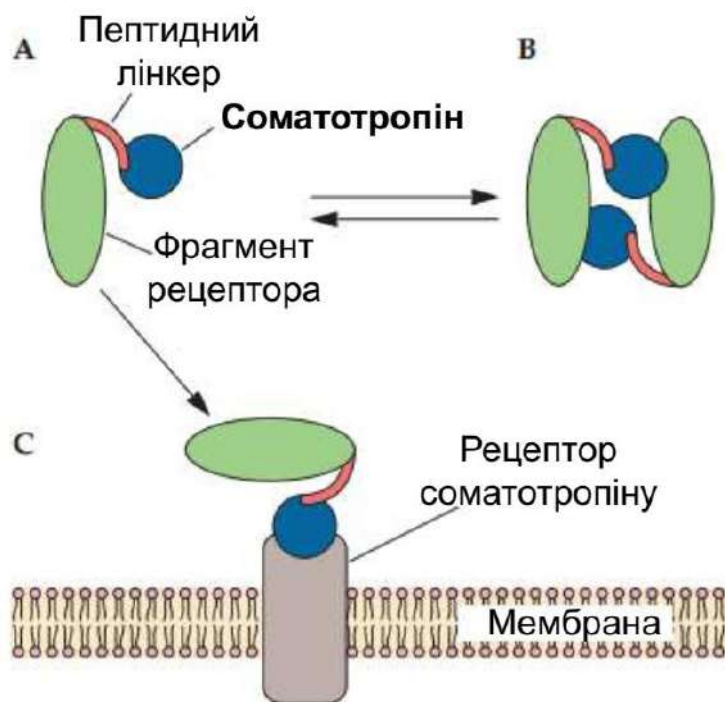


Рис. 2.33. Підвищення стабільності соматотропіну. Пояснення в тексті.

Адаптовано з [24]

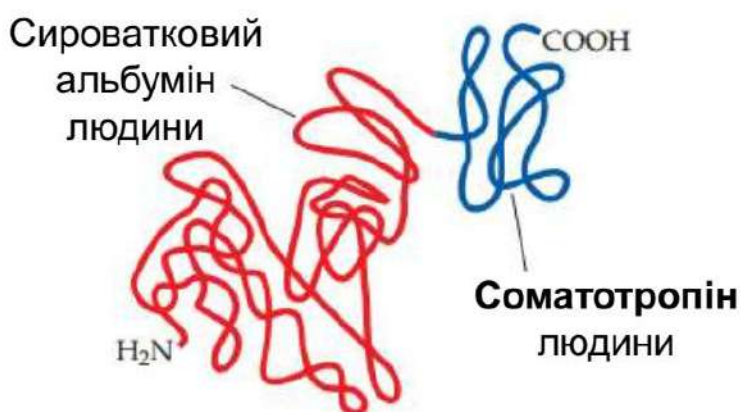
Як показано за рис. 2.33, за таких умов активна мономерна форма (А) повільно звільнялася від неактивного димерного гормону росту (В), що дозволяло їй зв'язуватися з рецептором гормону росту (С). Також було показано, що димеризація конструкції стабілізує гормон росту *in vivo*, завдяки чому він видаляється з плазми приблизно в 300 разів повільніше, ніж вільний соматотропін.

Тестування на щурах показало, що одна ін'єкція сприяла зростанню рівня соматотропіну в крові протягом 10 днів (порівняно із звичайною вимогою щодо щоденних ін'єкцій). Але зазначений підхід все ще потребує апробації на людському організмі. Так, нещодавно було сконструйовано та протестовано злитий білок, який не містив вищезазначеного пептидного лінкера. Завдяки цьому рівень гормону росту був в 1,7 раза вищим у порівнянні з даними, отриманими при використанні лінкера як частини конструкції.

Отже, усі наступні дослідження, включно з випробуваннями на людях, були спрямовані на тестування злитого білка без пептидного лінкера. Оскільки злитий білок є єдиним пептидом, який не потребує додаткових маніпуляцій,

витрати на його приготування значно зменшуються. Цей унікальний модифікований злитий білок гормону росту із сповільненим вивільненням зараз перебуває у фазі II клінічних випробувань.

Окрім вищезазначених, було розроблено наступний підхід для збільшення періоду напіввиведення гормону росту людини (рис. 2.34), що передбачав злиття кодуючих послідовностей С-кінця гормону росту людини (~ 22 кДа) з N-кінцем сироваткового альбуміну людини (~ 67 кДа).



злитий білок «Альбутропін»

Рис. 2.34. Підвищення стабільності гормону росту за рахунок злиття із сироватковим альбуміном людини. Пояснення в тексті. Адаптовано з [24]

Цей злитий білок називається «Альбутропін» («**Albutropin**»), він має молекулярну масу ~ 89 кДа і продукується штамом дріжджів, який був генетично модифікований таким чином, що білки, які він продукує, мають мінімальну кількість посттрансляційних модифікацій. Після злиття період напіввиведення «Альбутропіну» в сироватці крові становив близько 19 днів. Було виявлено ефективність цього препарату як у щурів, так і у мавп, в яких високий рівень білка в сироватці крові спостерігався через 5 днів після його введення. Більше того, «Альбутропін» успішно завершив фазу III клінічних випробувань. Проте, на сьогодні, як його подальші випробування, так і застосування припинено з огляду на недоцільність комерціалізації тощо.

2.5. Отримання амінокислот

Амінокислоти (АК) широко використовуються в харчовій промисловості як підсилювачі смаку, антиоксиданти та харчові добавки; у сільському господарстві як кормові добавки; у медицині в якості інфузійних розчинів для післяопераційного лікування; і в хімічній промисловості як вихідні матеріали для виробництва полімерів та косметики.

За підрахунками, у 2015 році у всьому світі було вироблено понад 2,5 мільйон тонн АК на суму понад 10 мільярдів доларів. Так, L-глутамінова кислота, яка використовується у виробництві підсилювача смаку глутамату натрію, становить майже половину загального обсягу виробництва.

Амінокислоти отримують шляхом гідролізу білків або ферментації. Існує 4 промислових методи отримання АК: **екстракція з гідролізату білка** (зокрема за допомогою хірального пулу – металоорганічного каталізу), **хімічний синтез**, **біотрансформація сполук попередників у клітинному реакторі або ферментері**, **мікробна ферментація** (рис. 2.35).



Рис. 2.35. Методи отримання амінокислот. Пояснення в тексті.
Адаптовано з [77]

Екстракцією з гідролізату можуть бути отримані наступні АК: L-цистеїн, L-цистин, L-лейцин, L-аспарагін, L-аргінін, L-тирозин. Сировиною є рослинні білки та відходи м'ясної промисловості, що піддаються кислотному гідролізу. Далі спиртовою екстракцією відділяють гідрофобні АК L-фенілаланін, L-лейцин, L-ізолейцин. Після цього проводять іонообмінну

хроматографію та розподіляють АК на основну, кислотну та нейтральну фракції, які далі перекристалізують та хроматографічно очищують.

Ферментацію проводять за допомогою клітин *Corynebacterium* (*C. glutamicum*) або *Brevibacterium* spp. – ґрунтових неспорулюючих грампозитивних бактерій, які здатні секретувати велику кількість АК у культуральне середовище.

Традиційно продуктивність цих організмів покращували завдяки мутагенезу та подальшому скринінгу на штами, які гіперекспресували певні амінокислоти. Але цей спосіб розвитку новітніх штамів виявився повільним та неефективним.

У той же час, використовуючи детальну біохімічну інформацію про ферменти, які беруть участь у біосинтезі амінокислот, буде набагато швидше виділити та маніпулювати конкретними генами, що кодують ключові компоненти певного шляху. Проте такий підхід генної інженерії теж вимагає певної оптимізації та налаштування. Також біосинтетичні шляхи АК, містять низку різних ферментів, кожен з яких може бути активованим або заінгібованим різними метаболітами, присутніми в клітині. Це ускладнює вибір ферменту для маніпулювання задля підвищення виходу кінцевого продукту.

Оскільки більшість плазмідних векторів широкого діапазону реплікуються лише в грамнегативних організмах, першим завданням було побудувати такий експресуючий вектор, який можна б було ефективно використовувати в *Corynebacterium* та *Brevibacterium* spp. Було запропоновано використовувати для клонування човникові вектори *E. coli* – *Corynebacterium*.

Як *E. coli*, так і *Corynebacterium* spp. є чутливими до антибіотиків тетрацикліну, левоміцетину або канаміцину, тому їх можна було використовувати як селективні маркери в обох організмах. Незважаючи на проведені маніпуляції по оптимізації, багато генів *C. glutamicum* не ефективно експресувалися в *E. coli*, а частота трансформації лишалась низькою як при застосуванні хімічного методу, так і за допомогою електропорації.

Ефективною виявилася лише трансформація *C. glutamicum* шляхом кон'югації або після утворення протопластів (додаванням поліетиленгліколю для полегшення засвоєння екзогенної ДНК плазмиди), тобто після видалення клітинної стінки лізоцимом.

Отримання L-глутамату. З 1909 р. розпочалося промислове виробництво L-глутамату з кислотного гідролізату клейковини пшениці та соєвого білка компанією «Ajinomoto». У 1957 р. було встановлено, що при вирощуванні *C. glutamicum* на цукровмісному середовищі накопичувався L-глутамат.

На рисунку 2.36 зображена схему біосинтезу L-глутамату з глюкози, зокрема, надано детальну інформацію про вихідні метаболіти, ферменти та реакції з регуляцією за типом репресії при синтезі цієї амінокислоти.

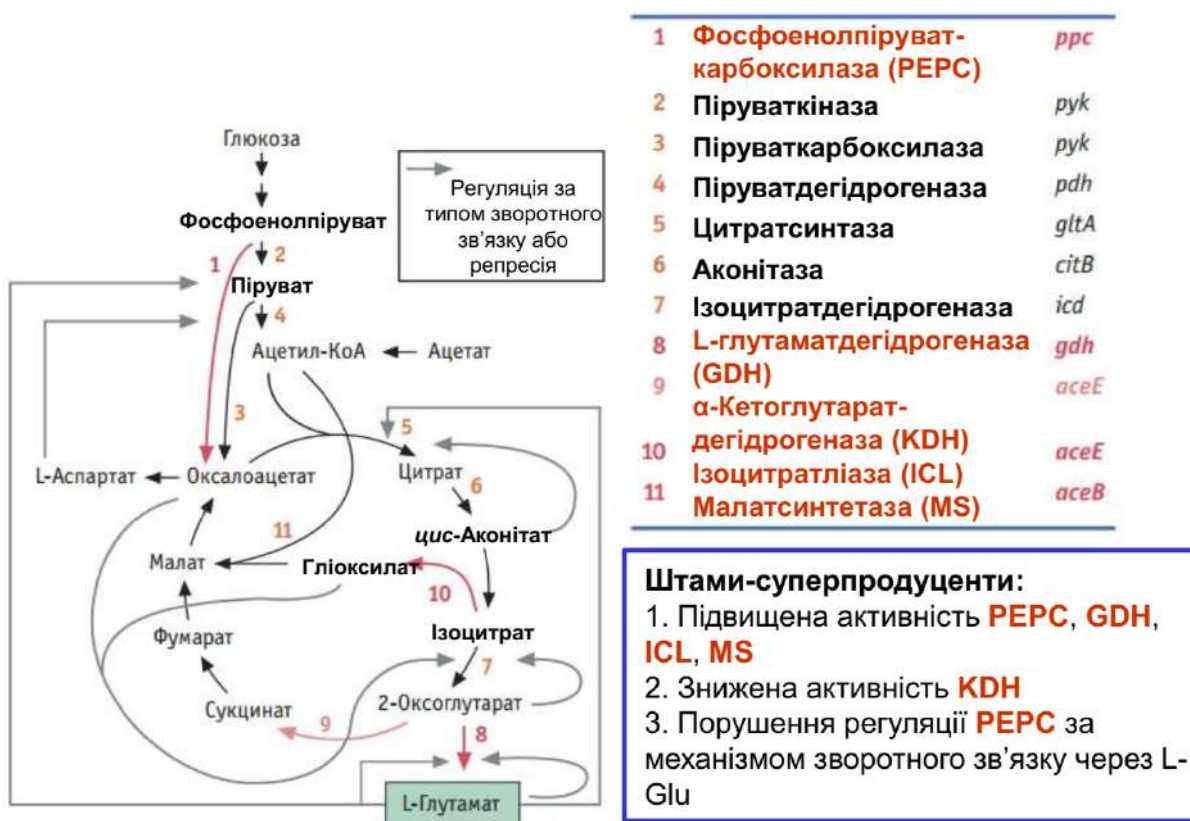


Рис. 2.36. Загальна схема біосинтезу та штамми-суперпродуценти L-глутамату. Пояснення в тексті. Адаптовано з [77]

Окрім цього, зазначено сучасні штам-супреродуценти, в яких методами мутагенезу було модифіковано (підвищено чи знижено) активність певних ферментів; або порушено регуляцію за типом зворотного зв'язку. За допомогою цього підходу, сучасні методи дозволяють отримувати до 150 г/л цієї амінокислоти (рис. 2.36).

В якості сировини для виробництва L-глутамату використовують мелясу або гідролізат крохмалю, солі амонію чи аміак. Важливою умовою є аерація культурального середовища. **Ферментацію** проводять у біореакторах до 500 м³. Також, як зображено на рис. 2.37, кількість L-глутамату залежить від швидкості його секреції в культуральне середовище, а отже, від проникності плазматичної мембрани.

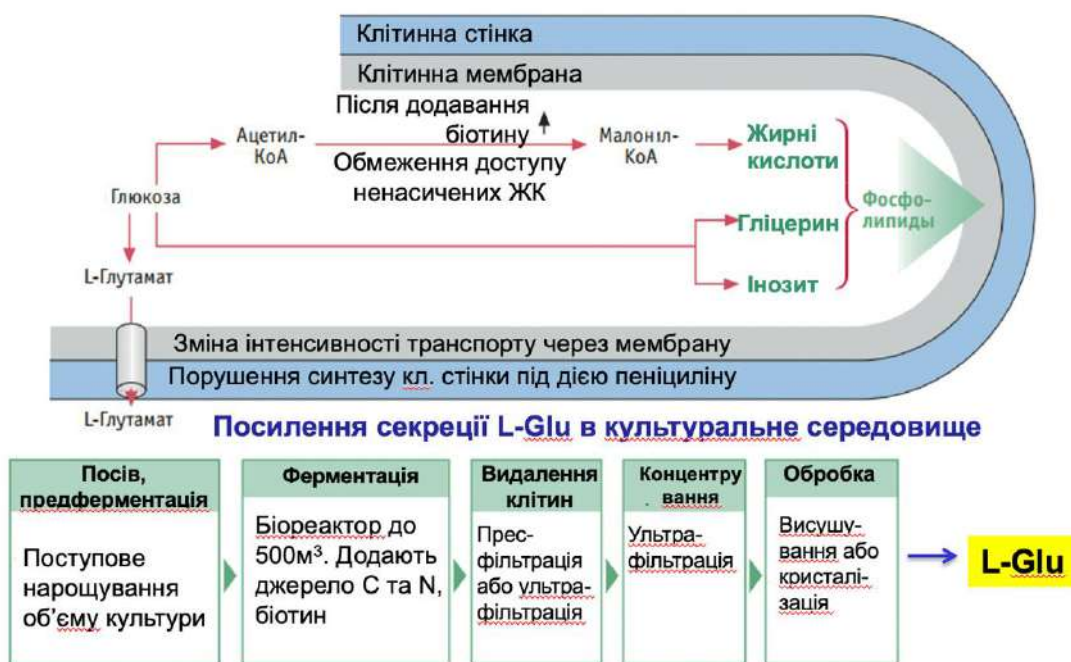


Рис. 2.37. Посилення секреції L-глутамату та загальна схема ферментації й первинної обробки. L-Glu – L-глутамат, ЖК – жирні кислоти. Пояснення в тексті. Адаптовано з [77]

Проникність мембрани може змінюватися. Так, для збільшення проникності обмежують надходження біотину, жирних кислот або гліцерину (для цього використовуються ауксотрофні штам-супреродуценти по жирним кислотам або

гліцерину відповідно). Додавання у середовище пеніциліну також призводить до зростання проникності клітинної стінки, так як ця речовина перешкоджає її утворенню.

Отримання L-амінокислот шляхом ферментативної біотрансформації. Використання **енантіоспецифічних ферментів** дозволяє синтезувати небілкові АК. Недолік методу в тому, що доводиться видаляти «неправильний» стереоізомер із середовища, повторно його **рацемізувати (перетворення оптично активної речовини)** та вводити в реакцію. Так, виділяють наступні типи реакцій:

1) **Енантіоселективний гідроліз або гідроліз рацемічних сумішей попередників** (рис. 2.38). При цьому використовують **гідролази** (наприклад, ацилазу, отриману з цвілевих грибів (*Aspergillus oryzae*)). Ферментативна реакція є простою, але кошовною, адже «неправильний» енантіомер потрібно повторно рацемізувати.

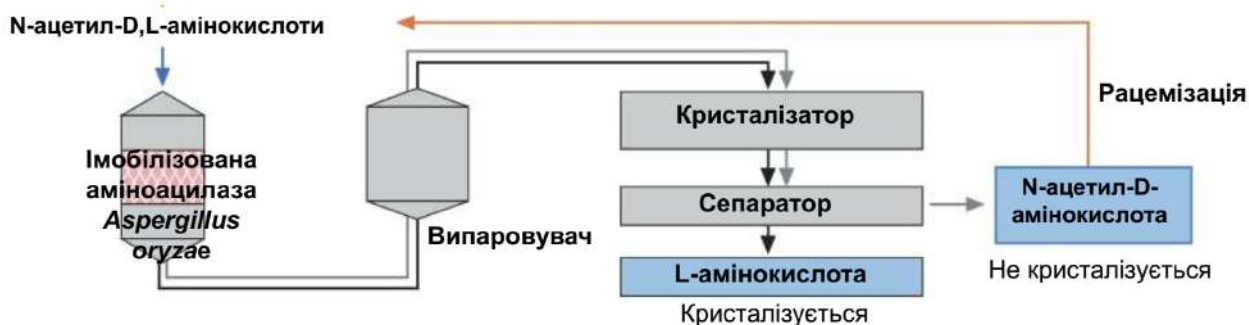


Рис. 2.38. Отримання L-амінокислот шляхом енантіоселективного гідролізу. Пояснення в тексті. Адаптовано з [77]

2) **Енантіоселективні реакції приєднання або приєднання HCN (синільна кислота) або NH₃ по карбонільній групі** (рис. 2.39). Застосовують ліази. Ферментативна реакція є простою з доволі кількісним виходом. Недоліком є відносно малий набір ферментів, необхідний для вищезазначених реакцій.

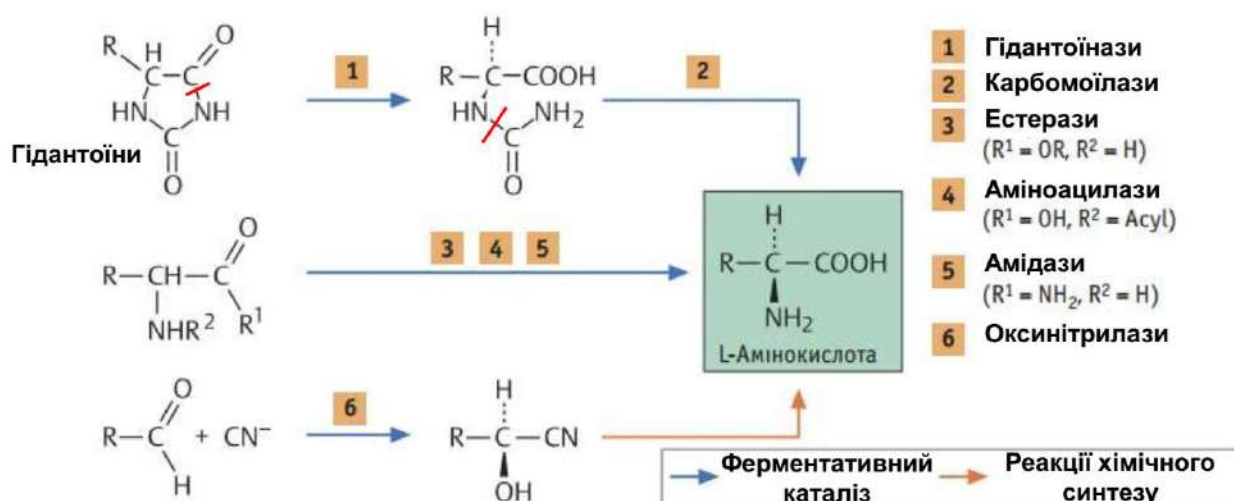


Рис. 2.39. Отримання L-амінокислот шляхом енантіоселективних реакцій приєднання. Пояснення в тексті. Адаптовано з [77]

3) **Енантіоселективні окісно-відновні реакції або відновне амінування α -кетокислот.** При цьому використовують оксидоредуктази. У ферментативній реакції утворюється лише один енантіомер, однак такий процес є коштовним через необхідність регенерувати коферменти.

Отримання L-цистеїну та інших амінокислот. Альтернативою виробництва амінокислот у *Corynebacterium* і *Brevibacterium* spp. було їх отримання в *E. coli*, де як метаболічні шляхи, так і підходи генної інженерії набагато краще охарактеризовані та оптимізовані.

L-цистеїн, який є однією з найважливіших амінокислот у ліках і продуктах харчування, донедавна традиційно отримували шляхом його **екстракції** з кислотних гідролізатів людського волосся та пір'я тварин. У той же час ряд мікроорганізмів здатні синтезувати цю амінокислоту, проте високі рівні не можуть бути отриманими з глюкози, адже L-цистеїн шляхом **ретроінгібування** пригнічує фермент серинацетилтрансферазу, яка каталізує один з етапів біосинтезу зазначеної АК (рис. 2.40).

Задля усунення такої небажаної регуляції, залишок метіоніну в положенні 256 в амінокислотній послідовності серинацетилтрансферази *E. coli* систематично замінювали на кожну з інших 19 амінокислот. Коли *E. coli* трансформували плазмідами з генами *cysE*, що кодували змінену

серинацетилтрансферазу, декілька трансформантів зі зміненими формами серинацетилтрансферази продукували вищі рівні L-цистеїну, ніж при дії ферменту дикого типу.

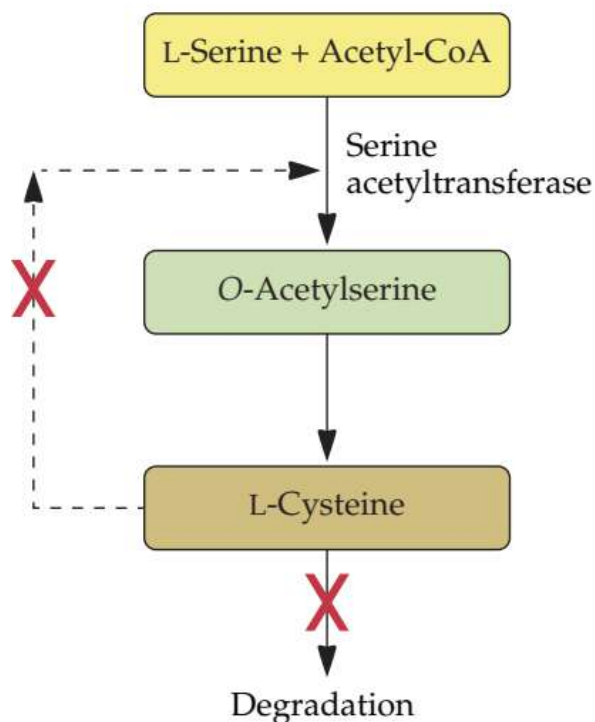


Рис. 2.40. Біосинтез та гіперпродукція L-цистеїну з L-серину та ацетил-КоА в *E.coli*. Пунктирна стрілка вказує на ретроінгібування. Червоний X, що веде до серинацетилтрансферази, вказує на те, що цей фермент був нечутливим до ретроінгібування. Червоний X від L-цистеїну до деградації (Degradation) вказує на те, що у відповідному штамі *E. coli* L-цистеїн не розкладався. Запозичено з [24]

Потім плазміди, що кодують найбільш ефективні похідні серинацетилтрансферази, використовували для трансформації певного штаму *E. coli*, який не розщеплював L-цистеїн.

Окрім цього, щоб покращити ці помірні надбання, кДНК, які кодували нечутливі до регуляції за типом репресії серинові ацетилтрансферази (із рослини *Arabidopsis thaliana*), експресувались у штамі *E. coli* (дефіцитному за серинацетилтрансферазою та такому, що не утилізував L-цистеїн. Було

показано, що отримані трансформанти продукували набагато вищий рівень цієї АК, ніж це було показано у попередніх, вищезазначених дослідженнях. Однак запропонований підхід все ще вимагає достеменного аналізу зазначених модифікацій на синтез L-цистеїну.

L-валін. Після обширної метаболічної інженерії *E. coli* (введення великої кількості мутацій у геном задля усунення дії ретроінгібування тощо) кінцевий штам був здатний продукувати 0,378 г L-валіну на г глюкози. Це є вищим ніж при застосуванні промислових штамів *C. glutamicum*, які були розроблені за допомогою повторних раундів випадкового мутагенезу та селекції. Крім того, на сьогодні, аналізуються й додаткові модифікації *E. coli* задля збільшення продуктивності L-валіну.

L-цитрулін, на сьогодні, більшою мірою виробляється у промислових масштабах шляхом **ферментації** штамів *Pseudomonas putida* або *Bacillus subtilis*. Намагаючись знайти більш ефективне джерело L-цитруліну, вчені генетично сконструювали штам *C. glutamicum*, бактерії, що найчастіше використовується у промисловому виробництві АК. Цей ГМ штам був здатний синтезувати високий рівень L-цитруліну з глюкози, або навіть використовуючи крохмаль, ксилозу та глюкозамін як джерело вуглецю.

На доданок, нещодавно було сконструйовано **новий *E. coli*-*C. Glutamicum* човниковий вектор експресії pLY-4** (промотор *tac* був замінений на *tacM* для підвищення ефективності експресії тощо), отриманий з вектора експресії pXMJ19 для можливого ефективного продукування **L-метіоніну**. Було показано, що вихід L-метіоніну збільшився на 33,96 %, що свідчить про потенційне застосування pLY-4 у промисловому виробництві цієї АК.

Модифікування *Corynebacterium*. До середини 2016 року повідомлялося про секвенування послідовності ДНК понад 30000 геномів бактерій. Під час вивчення цих даних стало очевидним, що більшість бактеріальних геномів містять 1 або більше **профагів** (повний або частковий геном бактеріофагів, введений у бактеріальну хромосомну ДНК).

Профаги, поряд із транспозонами, вважаються основними джерелами **бактеріальної геномної нестабільності**, оскільки вони можуть:

- 1) експресувати непотрібні та небажані гени,
- 2) сприяти горизонтальному переносу генів,
- 3) спричинювати втрату або інактивацію деяких бактеріальних генів.

Наявність профагів у *C. glutamicum*, який використовується для промислового виробництва АК, може мати значний негативний вплив на його промислові показники. Наприклад, один промисловий штам *C. glutamicum* містив 3 окремі профаги розміром 3,9, 13,5 та 187,3 т.п.н. відповідно (рис. 2.41).

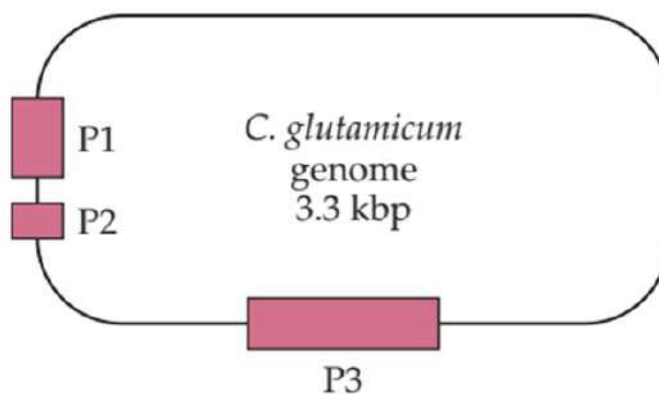


Рис. 2.41. Геном штаму *Corynebacterium glutamicum*, що містить 3 профаги (не намальовані в масштабі). Профаги позначаються P1, P2 і P3 для профагів 1, 2, 3. kbp – т.п.н. Пояснення в тексті. Запозичено з [24]

Було підраховано, що під час нормального росту бактерії більшість генів, кодованих профагом або не експресуються, або експресуються лише на дуже низькому рівні. Однак загальновідомо, що експресія генів профагів часто індукується в стресових умовах. Коли бактерії дикого типу вирощували в різних стресових умовах (зміна рН, окислювальний стрес, обмеження фосфатів, нестача заліза, осмотичний стрес та тепловий шок), експресія кількох білків (зокрема, система рестрикції-модифікації), кодованих у найбільшому профазі, посилювалась.

Щоб запобігти цьому небажаному явищу, було видалено 3 окремі профаги з генома *C. glutamicum* один за одним за допомогою гомологічної рекомбінації. Після цього модифікована бактерія мала геном на 6 % менший, а при вирощуванні в стресових умовах зростала приблизно на 15-20 % швидше, ніж дикий тип. Штам *C. glutamicum* зі зменшеним геномом міг трансформуватися з набагато вищою ефективністю та значно більшою продукцією рекомбінантних білків порівняно з диким типом.

Очікується, що модифікований штам буде більш ефективним для виробництва як чужорідних білків, так і метаболітів, таких як амінокислоти. Однак, на сьогодні, вищезазначені стратегії ще потребують детального вивчення.

2.6. Отримання біополімерів

Біополімери – це великі багатокомпонентні макромолекули, синтезовані мікроорганізмами, рослинами та тваринами. Деякі з таких полімерів мають фізичні та хімічні властивості, корисні для харчової, переробної та фармацевтичної промисловості тощо.

Здатність модифікувати організми за допомогою методів генної інженерії стимулювала дослідників розробляти нові біополімери, замінювати синтетичні полімери біологічними еквівалентами, модифікувати існуючі біополімери для підвищення їх фізичних та структурних характеристик та знаходити шляхи збільшення виходу та зменшення вартості продукування біополімерів, що виробляються в промислових процесах.

Отримання індиго. Індиго – барвник бавовни (у тому числі джинсів (рис. 2.42)) та хутра з найбільшим об'ємом продажів (15×10^6 кг і понад 250 млн. доларів/рік) у світі.



Рис. 2.42. Барвник індиго та приклад пофарбованих ним синіх джинсів. Пояснення в тексті

Спочатку його виділяли з рослин. На сьогодні, існують як **хімічні**, так і **мікробіологічні** способи синтезу, перший – більш економічно вигідний, на жаль. Здатність виробляти індиго з бактерій відкрило б можливість розробки ефективного та економічно вигідного комерційного мікробного процесу для його виробництва. Цей процес дозволив би уникати використання небезпечних сполук, таких як анілін, формальдегід і ціанід, які необхідні для хімічного синтезу індиго.

Бактерії роду *Pseudomonas* здатні рости на нафталені, толуені, фенолі тощо за рахунок генів, що містяться на великих (50-200 т.п.н.) природних плазмідах. Наприклад, плазміда NAH7 містить 2 оперони, що забезпечують утилізацію нафталену. Так, при трансформації клітин *E. coli* цією плазмідною було успішно отримано індиго, використовуючи 4 етапи синтезу (рис. 2.43 А):

1. Перетворення триптофану в середовищі росту в індол ферментом триптофаназою, який виробляється клітиною-господарем *E. coli*;
2. Окислення індолу до цизиндол-2,3-дигідродіолу нафталіндіоксигеназою, яка кодується ДНК, клонованою з плазміди NAH7;
3. Мимовільна дегідратація.
4. Окислення повітрям з утворенням індиго.

Подальші дослідження в іншій лабораторії показали, що введення гена ферменту ксилороксидази, закодованого в плазміді TOL (як частини

іншого шляху біодеградації), може перетворювати триптофан в індоксил, який потім спонтанно окислюється до індиго (рис. 2.43 В).

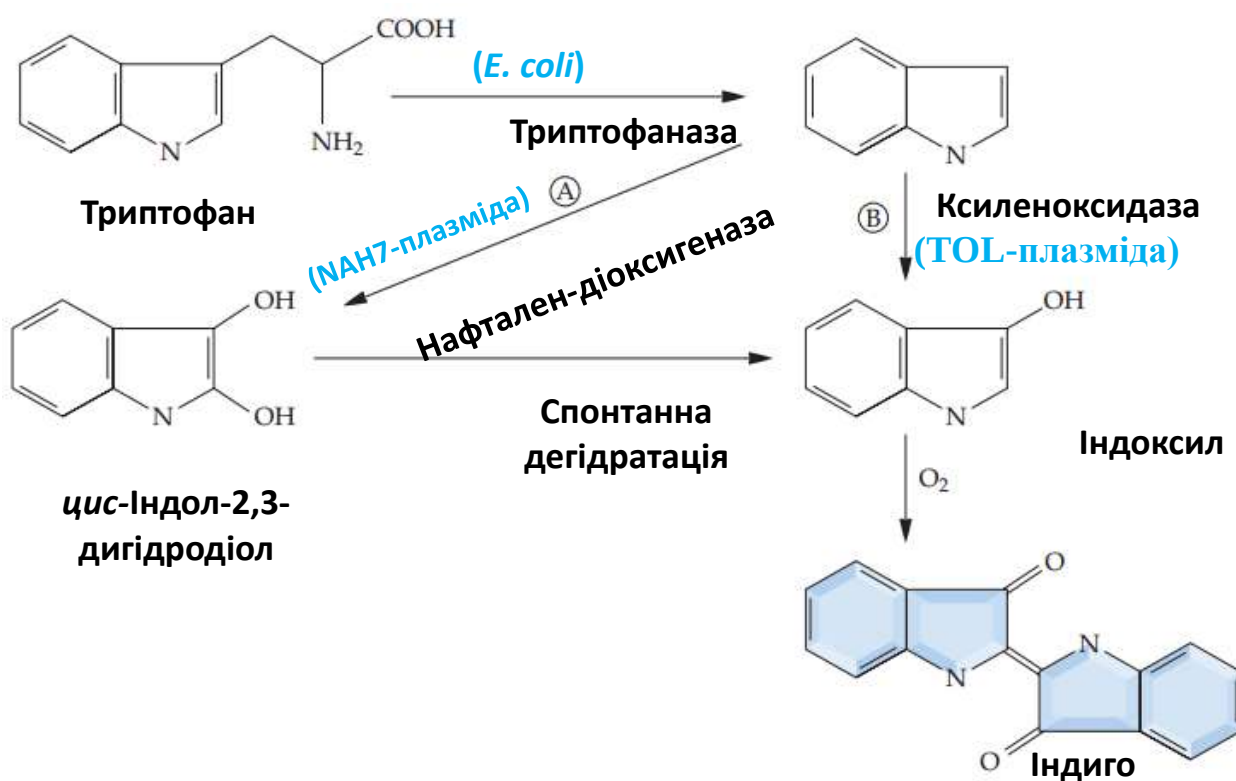


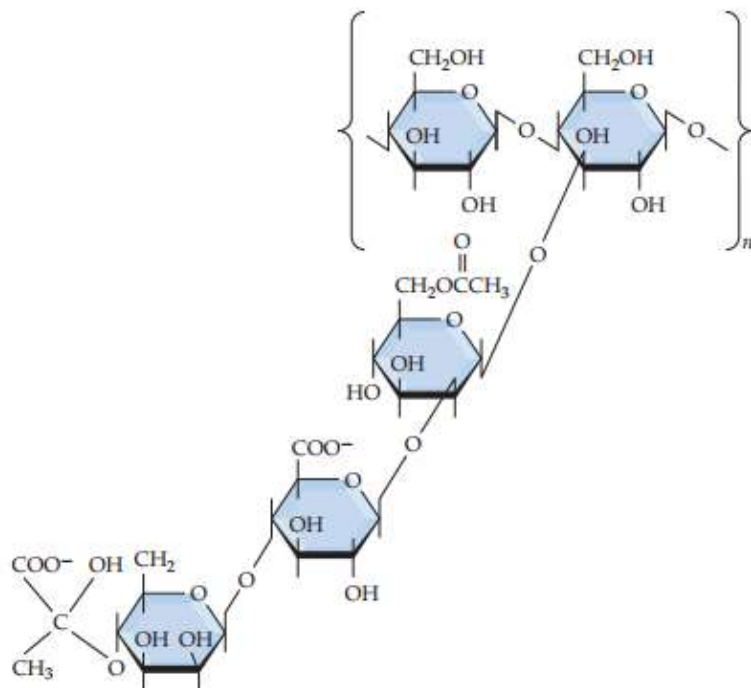
Рис. 2.43. Загальні схеми (В) та (А) біосинтезу індиго з триптофану в генетично сконструйованій *E. coli*. Пояснення в тексті. Адаптовано з [24]

На доданок, нещодавно було знайдено штам *Pandorea sp.*, що може продукувати індиго на достатньо високому рівні при додаванні в середовище індолу, таким чином, ймовірно, започатковуючи новий економічно-ефективний процес синтезу цього барвника.

Отримання ксантанової гуми. *Xanthomonas campestris*, грамнегативна облигатна аеробна ґрунтова бактерія, яка секретує як побічний продукт власного метаболізму комерційно важливий високомолекулярний екзополісахарид — **ксантанову гуму (ксантанова смола, ксантанова камедь)**. Цей біополімер має високу в'язкість, є дуже стабільним за екстремальних фізичних та хімічних умов, має фізико-хімічні властивості подібні до пластика. Широко використовується як стабілізатор, емульгатор,

загущувач. Кожен із бічних ланцюгів трисахаридів ксантанової гуми містить 1 залишок глюкуронової кислоти та 2 залишки манози, які приєднані до кожного другого залишку глюкози (рис. 2.44).

A



B



Рис. 2.44. Структура ксантанової гуми (A) та її вигляд (B). Пояснення в тексті. Запозичено з [24]

Було виявлено, що дикий тип *X. campestris* росте лише на глюкозі, сахарозі, крохмалі, тоді як **модифікований – на лактозі**, зокрема – на відходах від сироваріння – **сироватці**. Це відхідний побічний продукт процесу виробництва сиру, що складається з води (94 % до 95 %), лактози (3,5 % до 4 %) і невеликої кількості білка, мінеральних речовин та низькомолекулярних органічних сполук).

Молочна промисловість виробляє величезну кількість сироватки, і її утилізація є серйозною проблемою. У Північній Америці сироватку широко використовували як «наповнювач» у приготуванні готової їжі; однак, у зв'язку зі зростанням обізнаності про те, що велика кількість людей мають непереносимість лактози, вкрай необхідно знайти альтернативні способи

використання цього матеріалу. Крім того, утилізація сироватки шляхом зойвання її в річки та озера може спричинити зменшення кількості доступного кисню, що, у свою чергу, призведе до загибелі багатьох водних організмів. Транспортування сироватки на звалища надзвичайно дороге, і потенційне забруднення ґрунтових вод викинутою сироваткою викликає серйозне занепокоєння. Нарешті, витрати на видалення твердого компонента сироватки є непомірно високими. Отже, було розроблено та проаналізовано багато схем для пошуку ефективних підходів для використання сироватки.

Теоретично сироватку можна використовувати як **джерело вуглецю для вирощування промислово важливих мікроорганізмів**. З огляду на це, *X. campestris* був генетично модифікований для вирощування саме на сироватці. Так, гени *E. coli lacZY*, що кодують ферменти **β -галактозидазу** та **β -галактозидпермеазу** (пермеаза лактози, мембранний транспортний білок, який переносить лактозу всередину клітини), клонували в плазміді з широким колом господарів, під контролем промотора бактеріофага *X. campestris*. Цю конструкцію було введено в *E. coli*, а потім перенесено з *E. coli* до *X. campestris* шляхом тристороннього спарювання (рис. 2.45).

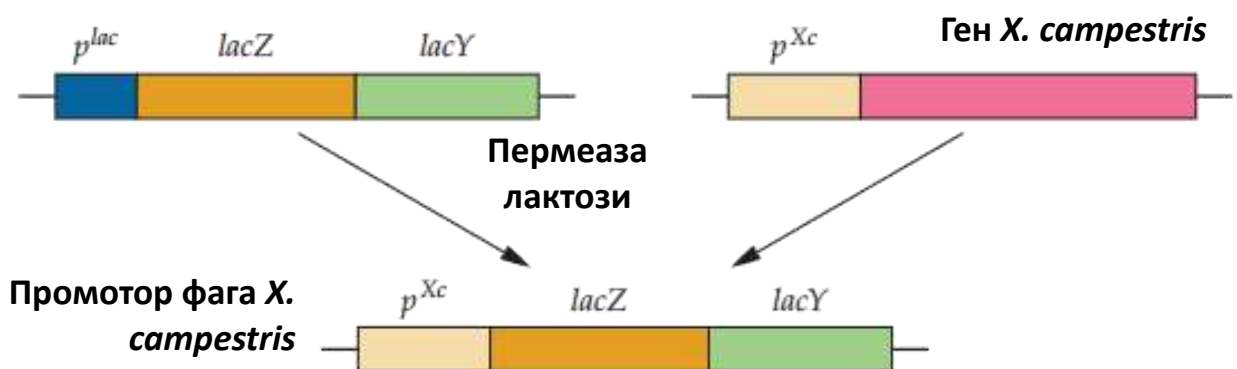


Рис. 2.45. Створення генетичної конструкції для конститутивної експресії генів *E. coli lacZ/lacY* у *X. campestris*. p^{lac} – промотор лактозного оперону. Пояснення в тексті. Адаптовано з [24]

Трансформанти з плазмідною експресували ферменти β -галактозидазу й пермеазу лактози на високому рівні та продукували велику кількість

ксантанової гуми, використовуючи лактозу (при додаванні розбавленої сироватки (10 %), яка містила приблизно 0,44 % лактози) як єдине джерело вуглецю. І навпаки, *X. campestris* дикого типу продукував велику кількість ксантанової камеді лише при вирощуванні на глюкозі.

Отже, оптимізація умов ферментації забезпечила виробництво приблизно в 10 разів більше ксантанової гуми, що збільшує перспективи комерціалізації цієї технології.

Отримання поліненасичених жирних кислот. Поліненасичені жирні кислоти (ЖК) – це довголанцюгові ЖК, які містять у своїй структурі більше одного подвійного зв'язку. Залежно від положення подвійних зв'язків, починаючи з гідрофобної (протилежної до карбоксильної групи) частини ЖК, їх класифікують як омега-3, омега-6 і омега-9 ЖК. За сучасною класифікацією до поліненасичених жирних кислот відносять: лінолеву, ліноленову, арахідонову, ейкозапентаєнову, докозагексаєнову кислоти. **Незамінні ЖК** (вітамін F) – це ті, які необхідні для оптимального здоров'я людини, але які не синтезуються організмом; вони повинні бути отримані з їжі. До складу **ω-3 жирів** (мають перший подвійний зв'язок у 3-му положенні) входять 3 незамінні ЖК: ейкозапентаєнова ($C_{20:5}$), докозагексаєнова ($C_{22:6}$) та α-ліноленова ($C_{18:3n3}$). Лінолева кислота ($C_{18:2n6}$) – омега-6 ненасичена ЖК.

На сьогодні, ці кислоти традиційно отримують із тварин і рослин: горіхи, оливкова, соєва, конопляна, лляна, ріпакова олії, морські водорості тощо. Однак основним джерелом поліненасичених ЖК є **риба** (жирна морська риба: тунець, сардини, лосось тощо; антарктичний криль (рис. 2.46)). Проте світові запаси такої риби поступово обмежуються, що призводить до неефективного виробництва, і як внаслідок до поганого смаку та запаху риб'ячого жиру.

Олійні мікроорганізми мають потенціал бути альтернативними джерелами поліненасичених ЖК для споживання людиною. Олійні види, такі як мікрководорості, водорості, гриби, нитчасті гриби, бактерії та дріжджі (рис. 2.46), можуть накопичувати ліпіди до більш ніж 20 % їх біомаси. За допомогою технології рекомбінантної ДНК можна покращити накопичення

таких кислот. Наступним кроком є створення більш ефективних мікроорганізмів, які виробляють поліненасичені ЖК за допомогою подальших генетичних маніпуляцій.

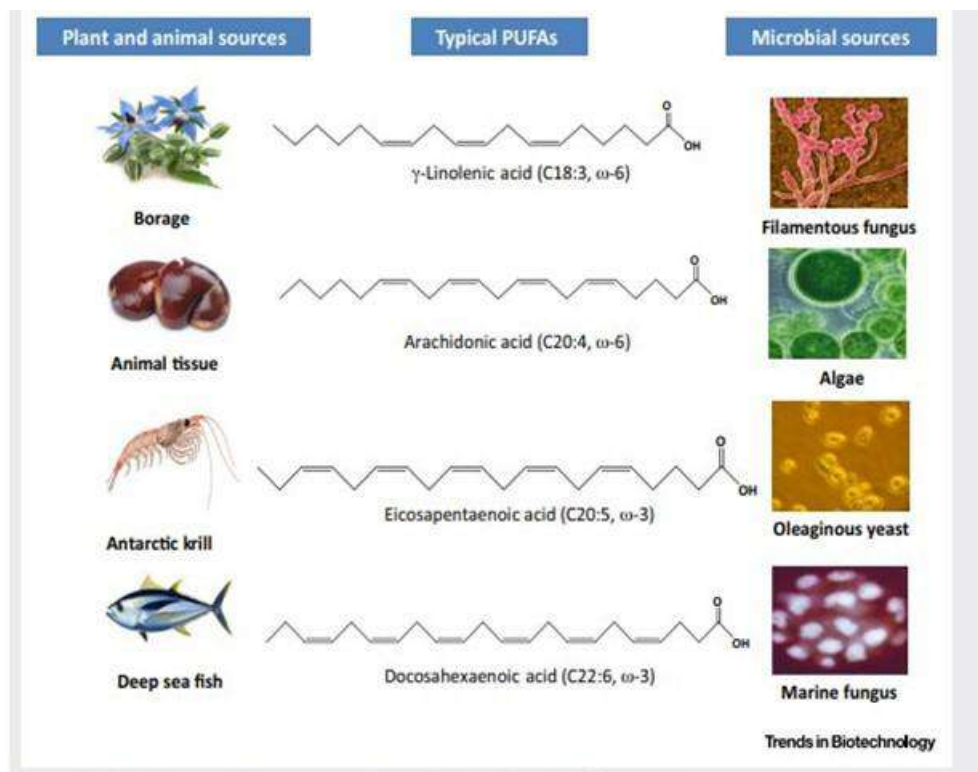


Рис. 2.46. Отримання поліненасичених жирних кислот. Пояснення в тексті. PUFAs – поліненасичені жирні кислоти. Запозичено з [47]

Полігідроксиалканоати (ПГА, polyhydroxyalkanoates (англ.)) – це клас полімерів, які біологічно розкладаються та утворюються різними мікроорганізмами, особливо *Alcaligenes eutrophus*, і використовуються як внутрішньоклітинний матеріал (мають термопластичні або еластичні властивості, залежно від складу полімеру) для зберігання вуглецю та енергії. З ПГА також можна отримувати гнучкі плівки різної товщини, у тому числі напівпроникні мембрани, нитки, гелі, клей тощо, які призначені, в основному, для виготовлення пакувального матеріалу й тари для побутових відходів; харчової промисловості, косметології, сільського господарства тощо. За оцінками, у 2015 році світовий ринок **біорозкладаного пластику** становив близько 2 мільярдів доларів на рік, і він постійно зростає.

Полі(3-гідроксимасляна кислота) є найбільш ретельно вивченим і охарактеризованим ПГА. Було охарактеризовано як сам полімер, так і гени грамнегативної бактерії *Alcaligenes eutrophus* (сучасна назва *Cupriavidus metallidurans*), які кодують його синтез. Полі(3-гідроксимасляна кислота), її кополімер [полі(3-гідроксибутират-3-гідроксивалерат)] та [полі(3-гідроксивалеріанова кислота)] (рис. 2.47) комерційно виробляються у Сполученому Королівстві шляхом **ферментації** *C. metallidurans*.

Хоча можна отримувати полі(3-гідроксимасляну кислоту) як побічний продукт росту *C. metallidurans*, цей організм росте доволі повільно, потребує відносно низької температури росту (так що ферментаційну ємність потрібно охолоджувати), його важко лізувати (що ускладнює очищення гранул полі[3-гідроксимасляної кислоти]) і використовує лише обмежену кількість джерел вуглецю для зростання (що робить виробничі витрати відносно високими).

З іншого боку, коли гени для біосинтезу цього полімеру були перенесені в *E. coli*, отриманий трансформант швидко ріс до високої щільності клітин і накопичував дуже великі кількості (до 95 % маси сухої клітини) цього ПГА.

Полі(3-гідроксимасляна кислота) синтезується з ацетилКоА в 3 стадії під дією трьох ферментів (рис. 2.47). Оперон, що містив ці гени, був клонований у плазміді як частину вставки розміром 5,2 т.п.н. На жаль, плазміді, що експресували оперон полі(3-гідроксимасляної кислоти) в *E. coli*, були нестабільними. За відсутності селективного тиску, такого як додавання антибіотиків до середовища росту, майже половина клітин *E. coli* втратила плазміді приблизно через 50 поколінь. Втрата плазміді такого масштабу, хоча і не є серйозною перешкодою для невеликих серійних культур, стає суттєвою проблемою для великомасштабних або безперервних культур.

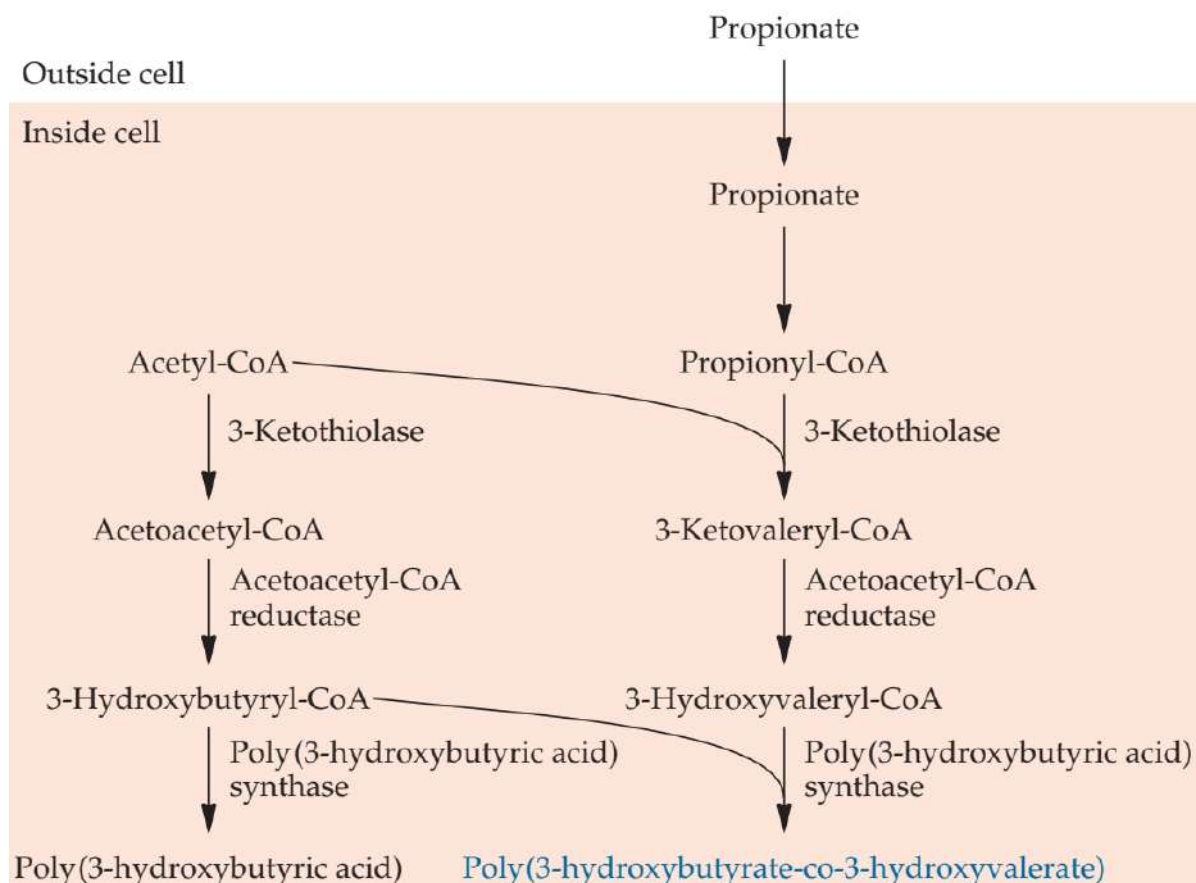


Рис. 2.47. Загальна схема бактеріального синтезу полімеру полі(3-гідроксимасляної кислоти) та (генно-модифікованого) кополімеру полі(3-гідроксибутират-3-гідроксивалерату). Пояснення в тексті. Запозичено з [24]

Цю проблему вдалося вирішити шляхом вставки генетичного локусу *parB* з іншої плазмід в плазмід, що містили оперон полі(3-гідроксимасляної кислоти). Цей ген опосередковує стабілізацію плазмід шляхом постсегрегаційного знищення вільних від плазмід клітин. Модифіковані плазмід були досить стабільними, навіть незважаючи на те, що полі(3-гідроксимасляна кислота) вироблялася конститутивно, що, у свою чергу, спричинювало метаболічне навантаження на клітини.

Додаткова перевага виробництва полі(3-гідроксимасляної кислоти) в *E. coli* замість *C. metallidurans* полягає в тому, що коли полі(3-гідроксимасляна кислота) відновлюється екстракцією лужним розчином гіпохлориту, полімер деградує значно меншою мірою, ніж коли він продукується в *C. metallidurans*. Можливо, це пов'язано з тим, що більша частина полі(3-гідроксимасляної

кислоти) в *E. coli* виробляється в кристалічному стані, тоді як у *C. metallidurans* вона аморфна. Тим не менш, полімери, виділені з двох організмів, мали ідентичні полімерні властивості. Крім того, трансформанти *E. coli*, які синтезували полі(3-гідроксимасляну кислоту), виробляли дуже мало ацетату (який може бути шкідливим для росту клітин), ймовірно, через те, що весь надлишок ацетил-КоА клітини перетворювався на полі(3-гідроксимасляну кислоту), а не на ацетат.

Кополімер полі(3-гідроксибутират-3-гідроксивалерат) має властивості, подібні до властивостей поліпропілену. Отже, існує значний комерційний інтерес до біологічного виробництва цього кополімеру. Однак штами *E. coli*, які експресували 3 вищезазначені біосинтетичні гени, синтезували лише полі(3-гідроксимасляну кислоту), а не її кополімер.

Це обмеження було усунено за допомогою клітин *E. coli*, які мутували як у локусах *fadR*, так і в *atoC*. Білок FadR є негативним регулятором біосинтезу ЖК, а мутант за геном *fadR* може активувати гліюксилатний шунт, підвищуючи здатність до енергетичного метаболізму та біосинтезу, що призводить до зменшення екскреції ацетату та покращення виходу біомаси. Продукт гена *atoC* є позитивним регулятором поглинання ЖК, а продукт гена з мутацією *atoC* запускає синтез білків, кодованих *atoA* і *atoD*, генні продукти яких полегшують поглинання пропіонату з середовища росту в клітину.

Пропіонат перетворюється на пропіоніл-КоА, а потім конденсується з ацетил-КоА з утворенням 3-кетовалерил-КоА, який може бути перетворений у 3-гідроксивалерил-КоА перед його введенням у кополімер (рис. 2.47). Кількість 3-гідроксивалерату в кополімері залежить від відсотка пропіонату, який додається під час ферментації, але він ніколи не перевищує 40 %.

На доданок до модифікації складу ПГА задля отримання полімерів із специфічними бажаними властивостями, також важливо регулювати довжину ланцюга цих полімерів. Деякі полімеризуючі ферменти дають, в основному, полімери з коротким ланцюгом, що містять приблизно 4 або 5 мономерних ланок 3-гідроксиалканоату, у той час як інші ферменти з різних бактерій,

включно з грамнегативною бактерією *Pseudomonas oleovorans*, виробляють полімери із середньою довжиною ланцюга: від 6 до 14 мономерних одиниць. Крім того, можуть бути створені бактерії, мутантні по різних стадіям окислення жирних кислот для отримання мономерних одиниць із зміненим складом порівняно зі штамом дикого типу. Такі модифіковані мономери потім можуть бути введені в ПГА. У результаті зазначених маніпуляцій було синтезовано широкий спектр ПГА із різними фізичними та хімічними властивостями.

Було б економічно вигідно, якби бактерії можна було модифікувати для ефективного виробництва ПГА, використовуючи **промислові відходи як джерело вуглецю**. Для досягнення цієї мети гени біосинтезу ПГА зі штаму грамнегативної бактерії-азотофіксатора *Azotobacter* sp. були вставлені в плазмиду під транскрипційним контролем промотора *lac* (рис. 2.48).

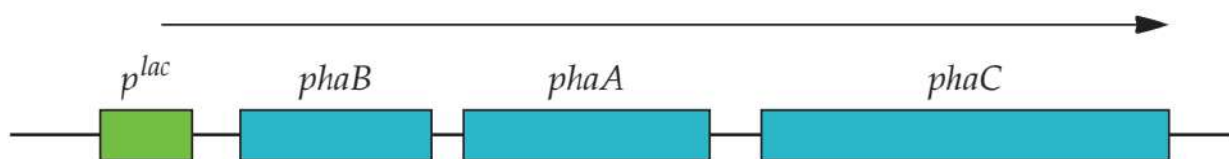


Рис. 2.48. *Azotobacter* sp. гени, що кодують ферменти, відповідальні за біосинтез полігідроксибутирату під транскрипційним контролем промотора *E. coli lac*. Стрілка вказує напрямок транскрипції. *phaA* – 3-кетотіолаза; *phaB* – ацетоацетил-КоА-редуктаза; *phaC* – полігідроксіалканоатсинтаза, *p^{lac}* – промотор лактозного оперону. Пояснення в тексті. Запозичено з [24]

Сконструйовану плазмиду вводили в штам *E. coli*, який містив гени поглинання та засвоєння лактози, але не кодував *lac* репресор. Таким чином, гени поглинання та асиміляції лактози, а також гени біосинтезу полігідроксибутирату експресувалися конститутивно. Штам *E. coli*, який містив сконструйовану плазмиду, був здатний рости на 25 % лактозі (побічний продукт виробництва сиру) або на кукурудзяному розчині (побічний продукт

обробки кукурудзи) і продукувати значний рівень полігідроксибутирату. Завдяки аеробному вирощуванню трансформованого штаму *E. coli* в **культурі з підживленням** (fed-batch (англ.), експлуатаційний метод у біотехнологічних процесах, коли одну або декілька поживних речовин подають у біореактор під час культивування і в яких продукт залишається в біореакторі до кінця циклу) через 24 год клітини накопичували полігідроксибутират до 73 % їх сухої маси клітин. Крім того, фізичні властивості отриманого полігідроксибутирату були подібні до властивостей полімеру, виділеного з *Azotobacter* sp. Отже, цей ГМ штам *E. coli* може бути придатним носієм для виробництва різноманітних полігідроксіалканоатів із промислових відходів.

Окрім цього, нещодавно було розроблено й запроваджено синтез кополімеру полі(3-гідроксибутират-3-гідроксигексаноату) як у *S. metallidurans*, використовуючи пальмову олію як субстрат, так і в *E. coli*, застосовуючи глюкозу як джерело вуглецю. Оскільки кополімер полі(3-гідроксибутират-3-гідроксигексаноат) є більш міцним і гнучким пластиком, ніж полі(3-гідроксимасляна кислота), цей полімер може слугувати корисним біорозкладаним пластиком.

Насправді, починаючи з 2010 року, вчені всього світу докладали значних зусиль для розробки широкого спектру поліалканоатів (рис. 2.49), синтезованих бактеріями, з багатьма різними властивостями, деякі з яких, як сподіваються, будуть корисними в промисловості.

Оскільки всі деталі підходів, схематично показаних на рис. 2.49, на сьогодні, уже розроблені, є всі підстави очікувати, що протягом наступних 5-10 років вчені зможуть синтезувати безліч нових **синтетичних біорозкладаних пластмас**.

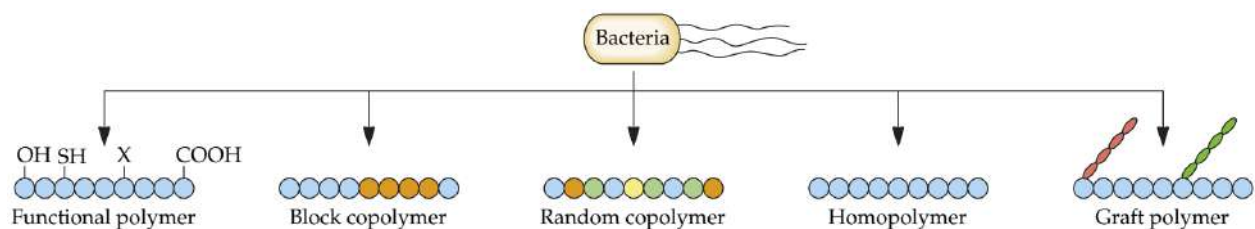


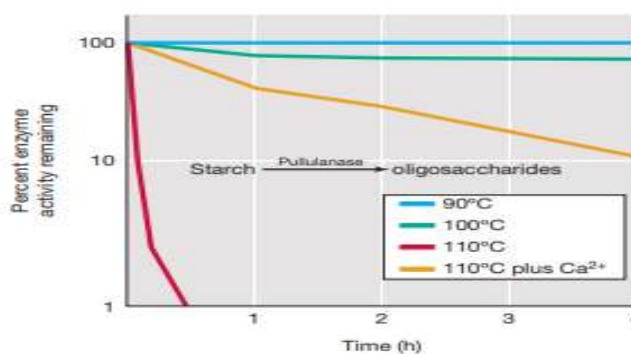
Рис. 2.49. Схематичне зображення деяких різних типів поліалканоатів, які можуть синтезуватися бактеріями. Гомополімер – це виключно один тип поліалканоату; прищеплений полімер (Graft) – це додавання однієї або кількох молекул, прищеплених до гомополімеру; функціональний полімер являє собою гомополімер, що містить один або кілька різних типів бічних ланцюгів; блок-кополімер складається з блоків (кожен з кількома ідентичними мономерами) двох або більше різних типів поліалканоатів в одному полімерному ланцюзі; і випадковий (random) кополімер складається з двох або більше різних поліалканоатів, випадково вставлених у той самий полімерний ланцюг. Запозичено з [24]

Екстремозими – це ферменти, отримані з екстремофільних мікроорганізмів, які здатні протистояти екстремальним умовам у промисловому процесі. Наприклад, кормова добавка з кислотостійкою ферментною сумішшю у шлунку птаха перетравлює волокнисті речовини в кормі, тим самим покращуючи харчову цінність корму та сприяючи більш швидкому зростанню (рис. 2.50).

Іншим прикладом є покращення термостабільності фермента пулуланази з *Pyrococcus woesei*, гіпертермофілу, оптимальна температура розвитку якого становить 100 °С. При температурі 110 °С фермент денатурує, але кальцій значно покращує термостійкість цього фермента (рис. 2.50).



(a)



(b)

Рис. 2.50. Приклади екстремозимів, які функціонують в екстремальних умовах. (a) Кислотостійка ферментна суміш, яка використовується як кормова добавка для птиці. (b) Термостабільність фермента пулуланизи з гіпертермофілу *Pyrococcus woesei*. Пояснення в тексті. Запозичено з [61]

Організми, які продукують екстремозими, називають **екстремофілами**. Багато промислових каталізаторів найкраще працюють при високих температурах, тому екстремозими з гіпертермофілів широко використовуються як в промисловості, так і в наукових дослідженнях. Окрім ДНК-полімераз *Taq* і *Pfu*, термостабільні протеази, амілази, ксиланази тощо були виділені з певного виду гіпертермофілів.

Холодоактивні ферменти (отримані від психрофілів), ферменти, які функціонують при високій солоності (одержувані від галофілів), і ферменти, активні при високому або низькому рівні рН (отримані з алкалофілів та ацидофілів, відповідно) також застосовуються комерційно.

Цікавим прикладом є започаткований в Іспанії Проект 2018 року «WoodZymes» (рис. 2.51), який має на меті забезпечити деревообробну промисловість «деревоперетворюючими ферментами», здатними працювати в екстремальних умовах експлуатації (тобто екстремозимами), необхідних для видалення або модифікації геміцелюлози та лігніну (без потужної та коштовної попередньої обробки вони, зазвичай, стійкі до ферментативної деградації), що захищають целюлозу в клітинній стінці рослин.

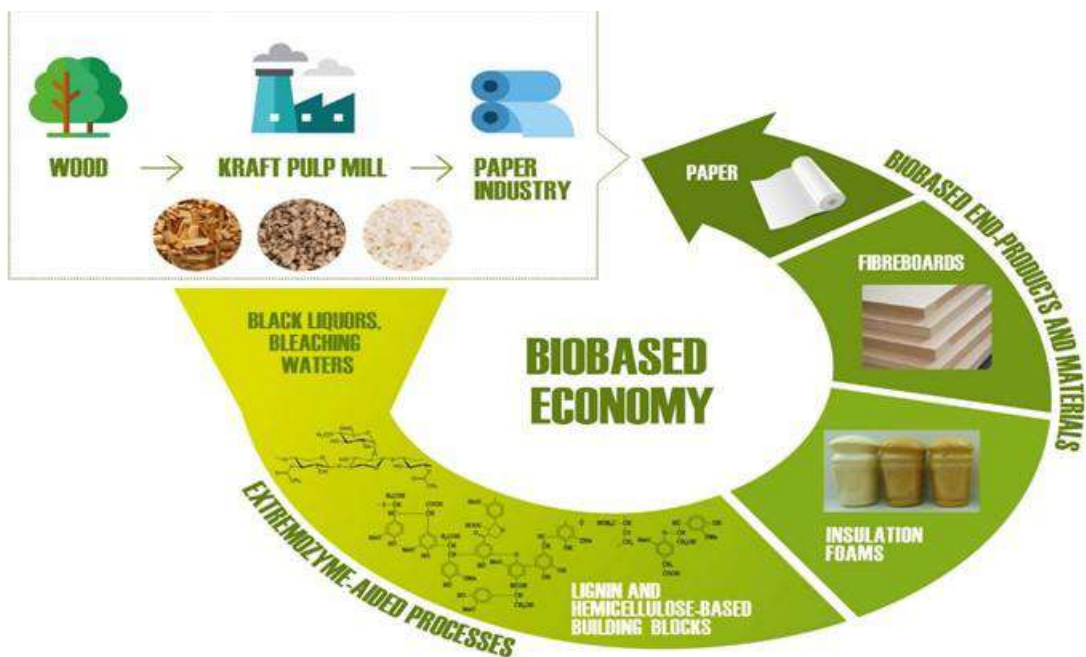


Рис. 2.51. Загальна схема Проекту 2018 року «WoodZymes». Пояснення в тексті. Запозичено з [45]

Етанол є найважливішим світовим **біопаливом**. Термін біопаливо вказує на те, що паливо було виготовлено за рахунок бродіння нещодавно вирощеного рослинного матеріалу, а не є викопним. Сировина, яка використовується для виробництва етанолу, була головним питанням у дискусіях щодо того, чи є біопаливо альтернативою у майбутньому.

Альтернативними вихідними джерелами, які демонструють гарну перспективу для виробництва етанолу, є різні швидко ростучі рослини (просо тощо), целюлозні стінки клітин яких можуть бути розщеплені до глюкози та ферментуватися до етанолу чи бутанолу за допомогою *S.cerevisiae* (рис. 2.52).

У США **бензохол** виробляють додаванням етанолу до бензину; при кінцевій концентрації 10 % етанолу його можна використовувати практично у всіх бензинових двигунах. При спалюванні утворюється менша кількість оксиду карбону та оксидів нітрогену, ніж чистий бензин, а значить, бензохол є паливом, що спалюється «чистіше». Крім цього, зростає рівень виробництва і більш багатого на етанол палива, такого як Е-85 (85 % етанолу та 15 % бензину). Але до тепер його можна використовувати лише у модифікованих

двигунах, адже це стандартне паливо для так званих «Flex-Fuel» машин, поширених, в основному, в Бразилії та США і меншою мірою – в інших країнах.



Рис. 2.52. Загальна схема продукування біоетанолу в Небрасці (США), використовуючи (a) *Saccharomyces cerevisiae*; (b) просо та (c) зелену водорість *Botryococcus braunii*. Пояснення в тексті. Запозичено з [61]

Основним недоліком виробництва етанолу є те, що, на сьогодні, для отримання літра етанолу потрібно приблизно на 25 % більше енергії, ніж є в етанолі. Однак, оскільки біоетанол є продуктом нещодавно фіксованого вуглецю, а не викопним паливом, його використання вважається більш стійким та екологічно чистим способом забезпечення потреб у рідкому паливі в осяжному майбутньому.

Окрім виробництва біоетанолу, ініціативи щодо **зеленої енергії** спонукали дослідження багатьох інших біопалив. Сюди входить виробництво спиртів із довгими ланцюгами, таких як бутанол, за допомогою ферментативних процесів, а також прямий синтез нафти зеленими водоростями. Наприклад, під час росту колоніальна зелена водорість *Botryococcus braunii* виділяє довголанцюгові (C_{30} - C_{36}) вуглеводні, які мають консистенцію сирої нафти (рис. 2.52).

Таким чином, очікується, що новітні запропоновані підходи будуть більш ефективним для отримання барвників і біополімерів. Однак, на сьогодні, вищезазначені стратегії ще потребують детального вивчення та оптимізації.

Підсумки. Таким чином, на сьогодні, рекомбінантні мікроорганізми використовуються для ефективного та економічно вигідного отримання (зокрема, і масштабного виробництва в біореакторах промислового розміру, > 1000 літрів) **рестриктаз, вітамінів, антибіотиків, різноманітних терапевтичних речовин, амінокислот, барвників, біополімерів.** Крім того, біосинтез бажаної сполуки часто може бути значно збільшений шляхом **модуляції певного ферментативного шляху організму** за рахунок включення одних метаболічних шляхів і блокування інших. Більше того, технологія рекомбінантної ДНК привела до розробки нових і більш ефективних шляхів синтезу для різних важливих сполук.

Окрім цього, розроблено та вдосконалюються генно-інженерні підходи для:

- **плодотворного одержання крохмалу, цукрів, етанолу, ліпідів (та інших сполук біопалива) і навіть водню за допомогою мікроорганізмів.** Використання подрібненого зерна та іншого рослинного матеріалу для виробництва спирту або фруктози вимагає ряду ферментативних етапів. Ферменти, які застосовують у цих процесах, часто використовуються лише один раз, а потім викидаються. Щоб посилити ферментативні перетворення та зменшити витрати, бактеріальні гени, що кодують ферменти, які є термостабільними, високоефективними в каталітичному відношенні або забезпечують толерантність до алкоголю, були клоновані, охарактеризовані та протестовані. Щоб покращити комерційне виробництво алкоголю, наприклад, було генетично трансформовано грамнегативну бактерію *Zyotomonas mobilis* за допомогою генів, які дозволяють їй використовувати широкий спектр сполук як джерела вуглецю;
- більш продуктивного одержання сполук, які містять вуглець (особливо **глюкозу**) з відходів рослинної переробки, наприклад, **лігноцелюлози** (комплекс лігніну, геміцелюлози і целюлози); без потужної та дорогої попередньої обробки лігноцелюлоза, як правило, стійка до ферментативної

деградації. Останні дослідження зосереджені на вивченні механізмів розщеплення целюлози до глюкози;

- ефективної та економічно вигідної **мікробної деградації – біоремедіації** ксенобіотиків («неприродні» або синтетичні; від грецького *xenos*, що означає «чужорідний», хімічні забруднюючі речовини), такі як гербіциди, пестициди, холодоагенти, розчинники та інші органічні сполуки. Багато представників роду бактерій *Pseudomonas* природно несуть плазміди, що кодують ферменти, здатні розщеплювати ароматичні та галогеновані органічні сполуки. У більшості випадків одна плазміда несе гени, що кодують ферменти певного шляху деградації. Комбінуючи плазміди з різних штамів *Pseudomonas* в одному господарі, можна створити організм зі здібностями до деградації численних ксенобіотиків. Крім того, за допомогою генетичних маніпуляцій можна розширити діапазон субстратів, які розщеплюються певним ферментативним шляхом;
- Вчені почали розробляти процедури **широкомасштабного виділення плазмідної ДНК**. Ці процедури повинні враховувати специфіку клітини-господаря: її метаболізм, розмір плазміди, методи клітинного лізису та повне видалення ряду потенційно забруднюючих клітинних компонентів.

Контрольні запитання:

1. Опишіть стратегію виділення гена ендонуклеази рестрикції EcoRI.
2. Окресліть стратегію клонування гена 2,5-ДГК-редуктази з *Corynebacterium* в *Erwinia*. Чому це може бути економічно вигідним?
3. Запропонуйте стратегію підвищення комерційної придатності клонованого гена 2,5-ДГК-редуктази.
4. Опишіть сучасні альтернативи двоетапного процесу ферментації вітаміну С.
5. Опишіть загальні схеми отримання рибофлавіну та кобаламіну.
6. Як індиго може вироблятися в *E. coli*?
7. Опишіть сучасний ринок антибіотиків.

8. Яким чином можна модифікувати геном *C. glutamicum*, щоб зробити його більш ефективною бактерією-господарем для посиленого виробництва різних амінокислот?

9. Чому важко генетично трансформувати різні *Streptomyces* spp.? Як можна подолати цю складність?

10. Запропонуйте стратегію виділення деяких генів, які беруть участь у біосинтезі червоного антибіотика ундецилпродігіозину, який зазвичай синтезується *S. coelicolor*.

11. Запропонуйте підхід до отримання модифікованих версій полікетидних антибіотиків, наприклад еритроміцину.

12. Які антибіотики належать до β -лактамної групи?

13. Що таке «супербактерії»?

14. Опишіть наявні підходи для пошуку й створення нових потужних антибіотиків та запропонуйте власні.

15. Як препарат, що знижує рівень холестерину, може зменшити інфекцію *S. aureus*?

16. Що таке бактеріальні рибоперемикачі? Чому вони можуть бути унікальними мішеннями для дії антибіотика?

17. Запропонуйте покращені шляхи отримання терапевтичних речовин (гормону росту, інсуліну).

16. Як можна отримати L-амінокислоти шляхом ферментативної біотрансформації?

17. Наведіть кроки створення генетичної конструкції для конститутивної експресії генів *E. coli lacZ/lacY* у *X. campestris*.

18. Запропонуйте схему отримання полі(3-гідроксимасляної кислоти) в *E. coli*.

19. Яким чином можна синтезувати різноманітні варіанти полігідроксіалканоатів?

20. Наведіть приклади екстремозимів та сфери їх застосування.

21. Запропонуйте схема продукування біоетанолу.

Розділ 3. Трансгенні рослини

3.1. Базові поняття

На сьогодні, визначено **3 основні причини для розвитку трансгенних рослин**. По-перше, додавання гена (генів) часто підвищує сільськогосподарську, садівничу або культурну цінність рослини. По-друге, трансгенні рослини можуть виступати в якості живих біореакторів для недорогого виробництва економічно важливих білків або метаболітів. По-третє, генетична **трансфекція** (хоча у випадку рослин частіше використовують термін **трансформація**) рослин надає потужні засоби для вивчення функціонування генів у процесі розвитку та інших біологічних процесів. **Трансфекція** – це процес введення екзогенної ДНК саме в еукаріотичні клітини (подібний до трансформації в прокаріотів).

Деякими з генетично детермінованих ознак, які можуть бути введені в рослини одним геном або невеликою кількістю генів, є інсектицидна активність, захист від вірусної інфекції, стійкість до гербіцидів, захист від патогенних грибів і бактерій, затримка старіння, стійкість до стресів навколишнього середовища, змінена пігментація квітів, поліпшення поживної якості білків насіння та збільшення терміну зберігання плодів після збирання.

Крім того, трансгенні рослини можуть бути використані для отримання різних корисних сполук. Наприклад, у лабораторних масштабах рослини використовувалися для отримання терапевтичних агентів (табл. 3.1), моноклональних антитіл і фрагментів антитіл (табл. 3.2), а також вакцинних антигенів (табл 3.3).

Таблиця 3.1.

Деякі фармацевтичні білки, які були отримані в трансгенних рослинах.

Адаптовано з [24]

Фармацевтичний білок	Рослина(и)	Застосування при патологічних станах
α -Трикозантин	Тютюн	Терапія ВІЛ
Алерген-специфічний Т-клітинний епітоп	Рис	Поліноз
Ангіотензин-1-перетворюючий фермент	Тютюн, помідор	Гіпертонія
Глюкоцереброзидаза	Тютюн	Хвороба Гоше
Людський $\alpha 1$ -антитрипсин	Рис, помідор	Муковісцидоз, захворювання печінки, крововиливи
Аполіпопротеїн людини	Сафлор	Зменшення зубного нальоту
Апротинін людини	Кукурудза	Інгібітор трипсину для трансплантаційної хірургії
Людський епідермальний фактор росту	Тютюн	Загоєння ран, контроль проліферації клітин
Еритропоетин людини	Тютюн	Анемія
Людський гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор	Тютюн	Нейтропенія
Гормон росту людини	Тютюн	Карликовість, загоєння ран
Людський гемоглобін	Тютюн	Замінник крові
Людський гірудин	Ріпак, тютюн	Інгібітор тромбіну, антикоагулянт

Людський гомотримерний колаген I	Тютюн	Синтез колагену
Людський інсулін	Картопля, Арабідопсис Таля, сафлор	Діабет
Людський інтерферон α	Рис, ріпа	Гепатит С та В
Людський β -інтерферон	Тютюн	Противірусний препарат
Людський інтерлейкін-2 і інтерлейкін-4	Тютюн	Імунотерапія
Лактоферин людини	Картопля, рис	Протимікробні засоби, діарея
Мускаринові холінергічні рецептори людини	Тютюн	Центральна та периферична нервова система
Плацентарна лужна фосфатаза людини	Тютюн	Ахонодроплазія або кретинізм у дітей
Людський білок С	Тютюн	Антикоагулянт
Сироватковий альбумін людини	Тютюн	Цироз печінки, опіки, хірургічне втручання
Соматотропін людини	Тютюн	Гормон росту
Ліпаза	Кукурудза	Муковісцидоз

У 2015 році вперше отримано моноклональне антитіло проти вірусу імунодефіциту людини (ВІЛ) із використанням генетично модифікованих рослин тютюну, успішно завершило клінічні випробування фази I у Сполученому Королівстві.

На сьогодні, генетично змінено більше 150 різних видів рослин, у тому числі багато видів сільськогосподарських і лісових видів, у більш ніж 50 країнах світу. Генна інженерія рослин має величезний вплив на програми селекції рослин, оскільки вона значно скорочує терміни не менш ніж на 10-15 років, які потрібні для розробки нового сорту з використанням традиційних методів селекції рослин.

Таблиця 3.2.

Приклади потенційно терапевтичних антитіл і фрагментів антитіл, які були отримані в рослинах. Адаптовано з [24]

Рослина-господар	Хвороба або антиген
Тютюн	38C13 В-клітинна лімфома миші
Тютюн	Сибірська виразка
Тютюн	В-клітинна лімфома
Тютюн	Рак молочної залози та товстої кишки
Тютюн	Протипухлинний засіб широкого спектру дії
Тютюн	Ботулізм
Тютюн	CD40 (білок клітинної поверхні)
Тютюн	Білок клітинної поверхні з В-клітинної лімфоми миші
Тютюн	Гепатит
Соя	Вірус простого герпесу
Тютюн	Карциноембріональний антиген людини
Горох	Поверхневий антиген ракових клітин людини
Тютюн	Поверхневий білок клітин CD40 людини
Тютюн	Креатинкіназа людини
Люцерна	Людський IgG
Тютюн	Сказ
Тютюн	Поверхневий антиген сальмонел
Тютюн	Поверхневий антиген клітин <i>Streptococcus mutans</i> SA I/II
Тютюн	Речовина Р (нейропептид)

Незважаючи на весь прогрес, досягнутий у розробці трансгенних рослин для найрізноманітніших цілей, частина населення в Північній Америці й особливо в Європі досі виступають проти використання цієї технології.

Проте, з кожним наступним роком, починаючи із середини 1990-х років, використання трансгенних культур продовжувало збільшуватися як з точки зору кількості гектарів посівів трансгенних культур, так і з точки зору числа країн, що використовують цю технологію.

Більше того, у 2014 року дослідниками в Італії, країні, де спостерігається високий рівень суспільної незгоди з використанням трансгенних культур, було опубліковано огляд. У ньому було опрацьовано більше 32000 наукових досліджень, в яких розглядалися різні аспекти безпеки трансгенних культур, і зроблено висновок, що немає ніяких доказів будь-яких значущих небезпек, пов'язаних із використанням трансгенних культур. Очікується, що в недалекому майбутньому більшість сільськогосподарських культур у всьому світі будуть трансгенними.

Таблиця 3.3.

Деякі потенційні вакцинні антигени, які були експресовані в рослинах/

Адаптовано з [24]

Хвороба або збудник	Рослина (и) або вектор
Гепатит В	Тютюн, картопля, жовтий люпин, салат
Малярія	Вірус
Сказ	Помідори, шпинат, вірус
Риновірус людини	Вірус
ВІЛ	Вірус
Кишкова паличка	Тютюн, картопля, кукурудза
Вірус Норуолка	Тютюн, картопля, кукурудза
Діабет	Тютюн, картопля, морква
Ящур	Арабідопсис Таля, люцерна
Холера	Картопля, рис

Цитомегаловірус людини	Тютюн
Карієс зубів	Тютюн
Респіраторно-синцитіальний вірус	Помідор
Вірус папіломи людини	Картопля, тютюн
Сибірська виразка	Тютюн
Атипова пневмонія (SARS)	Помідори, тютюн
Золотистий стафілокок (<i>Staphylococcus aureus</i>)	Коров'ячий горох
Кір	Салат
Вірус грипу	Тютюн
Туберкульоз	Арабідопсис Таля
Ротавірус	Люцерна

Примітка. У деяких випадках антиген клонувався в систему тимчасової експресії, таку як рослинний вірус, часто сприяючи високому рівню експресії протягом 1-2 тижнів

Генетично модифіковані рослини (ГМР) – це рослини, генетичний матеріал яких було змінено методами генетичної інженерії. Це один із варіантів **ГМО** – генетично модифікованих організмів.

Загалом, генетичні модифікації можуть бути наступними:

1. Трансгенні – у геном рослин вноситься генетичний матеріал інших видів навіть інших царств живого; на рис. 3.1 наведено приклад **біологічних інсектицидів**, які є найбільш вивченими, найефективнішими та найбільш часто використовуваними, високо специфічними до певних видів комах мікробними інсектицидами: у трансгенну рослину внесено **гени Bt** із *Bacillus thuringiensis*, які забезпечують стійкість до комах. Ця грампозитивна бактерія містить велику кількість штамів і підвидів, кожен з яких виробляє інший

токсин, який може вбивати конкретних комах: існує понад 350 різних відомих підвидів *B. thuringiensis*. Під час споруляції *B. thuringiensis* формує кристали **пептидних δ -ендотоксинів або інсектицидів (Cry токсини, Bt білки)**, що кодується геном *cry*. Ці токсини специфічно діють (сприяють колоїдосмотичному лізису шляхом зв'язування з епітеліальними клітинами середньої кишки личинок) проти видів рядів Лускокрилі (метелики), Двокрилі (комари, мухи), Жорсткокрилі (жуки). Тому Bt білки використовується для виробництва біологічних інсектицидів і стійких до комах генетично змінених рослин. У 2016 році фермери в 35 районах, які вирощували Bt баклажани, витратили на пестициди на 61 % менше порівняно з фермерами, які вирощували звичайні сорти. У 2018 році врожай Bt баклажанів був на 20 % вищим, ніж у звичайних баклажанів, а підвищення якості призвело до збільшення ціни лише на 10 %. Внаслідок цього дохід ферм збільшився на приблизно 700 доларів/га;



Рис. 3.1. Приклад трансгенної рослини: внесені гени *Bt* із *Bacillus thuringiensis* забезпечують стійкість до комах. Запозичено з [43]

2. **Цисгенні** – у геном рослин вноситься генетичний матеріал із рослин того ж або близького виду. Зокрема, введена послідовність ДНК містить ген інтересу, фланкований власним промотором і термінатором. У той же час, при **інтрагенезі** – ген інтересу може бути поєднаним із регуляторними елементами як самого виду, так і перехресно сумісних видів;

3. **Субгенні** – чужорідний генетичний матеріал не вноситься, натомість модифікується власний геном рослин.

3.2. Історичні, економічні та юридичні аспекти

У 1982 р. – створено першу ГМ-культуру – резистентний до антибіотиків табак (*Nicotiana tabacum*).

1986 р. – перші польові дослідження ГМР у США та Франції (резистентний до гербіцидів табак).

1987 р. – у Бельгії компанією «Plant Genetic Systems» створено резистентний до комах табак.

1992 р. – у Китаї вперше дозволили комерційне вирощування ГМ табаку (вірус-резистентного).

1994 р. – у США дозволено продаж ГМ томатів «FlavrSavr» (рис. 3.2).

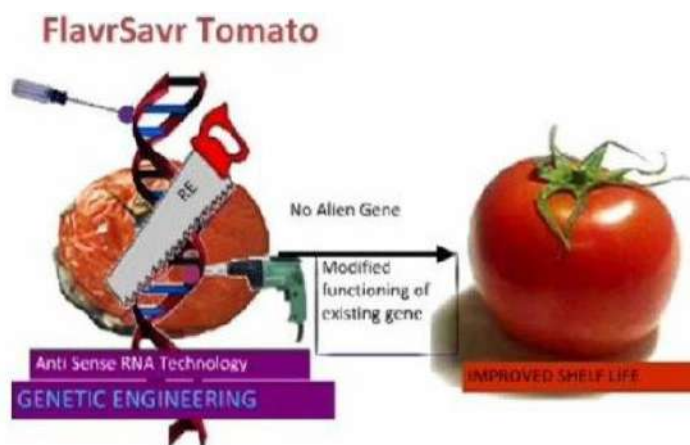


Рис. 3.2. Приклад генетично модифікованих томатів «FlavrSavr» – «зберігач смаку». Запозичено з [42]

У цьому сорті методом генної інженерії було заінгібовано антисенс олігонуклеотидом полігалактуроназу, яка розм'яшувала плоди, внаслідок чого вони довго залишалися міцними, свіжими та смачними. Однак, цей томат був на ринку лише до 1998 р. через побоювання деяких споживачів, невміння

транспортувати на великі відстані (томати виявилися не такими вже й твердими), а також через неконкурентоспроможні витрати на виробництво.

1994 р. – в ЄС дозволено вирощування та продаж генетично модифікованого тютюну, стійкого до гербіцидів.

1995 р. – масове ліцензування **Bt-рослин** (сої, картоплі, бавовни) у США – перші рослини, що були здатні продукувати біологічні інсектициди. На кінець 2018 року 23,7 мільйонів гектарів полів було засаджено культурами, які містять *Bt* ген. За перші 22 роки комерціалізації цієї технології прибуток від неї оцінюють в 97,4 мільйонів доларів США.

2000 р. – Міжнародний науково-дослідний інститут рису (International Rice Research Institute) створив шляхом **біофортіфікації (біозбагачення** – заходи щодо поліпшення поживних якостей культурних рослин методами селекції з використанням генної інженерії) **«золотий рис» (англ. Golden rice)** із підвищеним вмістом β -каротину через дефіцит вітаміну А у світі (рис. 3.3). Генетичну модифікацію було створено шляхом **трансгенезу**: внесено 2 гени біосинтезу β -каротину під контролем специфічного промотора (тому вони експресуються виключно в ендоспермі):

- 1) *psy* (фітоїнсінтаза) із нарциса.
- 2) *crtl* (каротиндесатураза) із бактерії *Erwinia uredovora*.

У 2005 р. – дослідниками із швейцарської компанії «Syngenta AG» («Сингента») створено «золотий рис 2» із в **23 рази вищим вмістом β -каротину**. Так, було внесено наступні гени:

- 1) *psy* (фітоїнсінтаза) із кукурудзи;
- 2) *crtl* із «золотого рису».



Рис. 3.3. Візуальне порівняння звичайного рису із «золотим рисом».
Запозичено з [40]

Дослідження показали, що β -каротин із «золотого рису» ефективно засвоюється, а сама рослина не наносить шкоди здоров'ю. Однак, незважаючи на зазначені вагомі результати, були проведені численні акти вандалізму проти золотого рису на Філіппінах тощо; а дебати, подібні акти та боротьба проти його вирощування не вщухають до сих пір (рис. 3.4).



Рис. 3.4. Приклад акту вандалізму проти вирощування «золотого рису». Пояснення в тексті. Запозичено з [40]

Загалом, фрукти, які були розроблені за допомогою генної інженерії, показані на рис. 3.5. Деякі сорти були схвалені, але не були в кінцевому підсумку комерціалізовані в країнах, або були випущені, проте згодом видалені з ринку. Як видно на рисунку, упродовж наступних років: **із 2006 по 2018 рр.** було розроблено й інші види ГМ плодів із різними поліпшеними

характеристиками. Це папайя, гарбуз спагеті (сквош, squash (англ.)), ананаси, баклажани, яблука (про які йтиметься далі).

Соціально-економічний вплив генетично модифікованих фруктів зростає разом із масштабами вирощування, хоча менше 0,01 % із 185,43 млн га культивованих генно-інженерних культур у 2018 році були представлені фруктами. Папайя, стійка до PRSV (вірус кільцевої плямистості папайї), є найбільш широко культивованим генетично модифікованим фруктом, за нею йдуть Bt баклажани, стійкі до вірусів кабачки, яблука «Arctic®» і ананас «Pinkglow™».

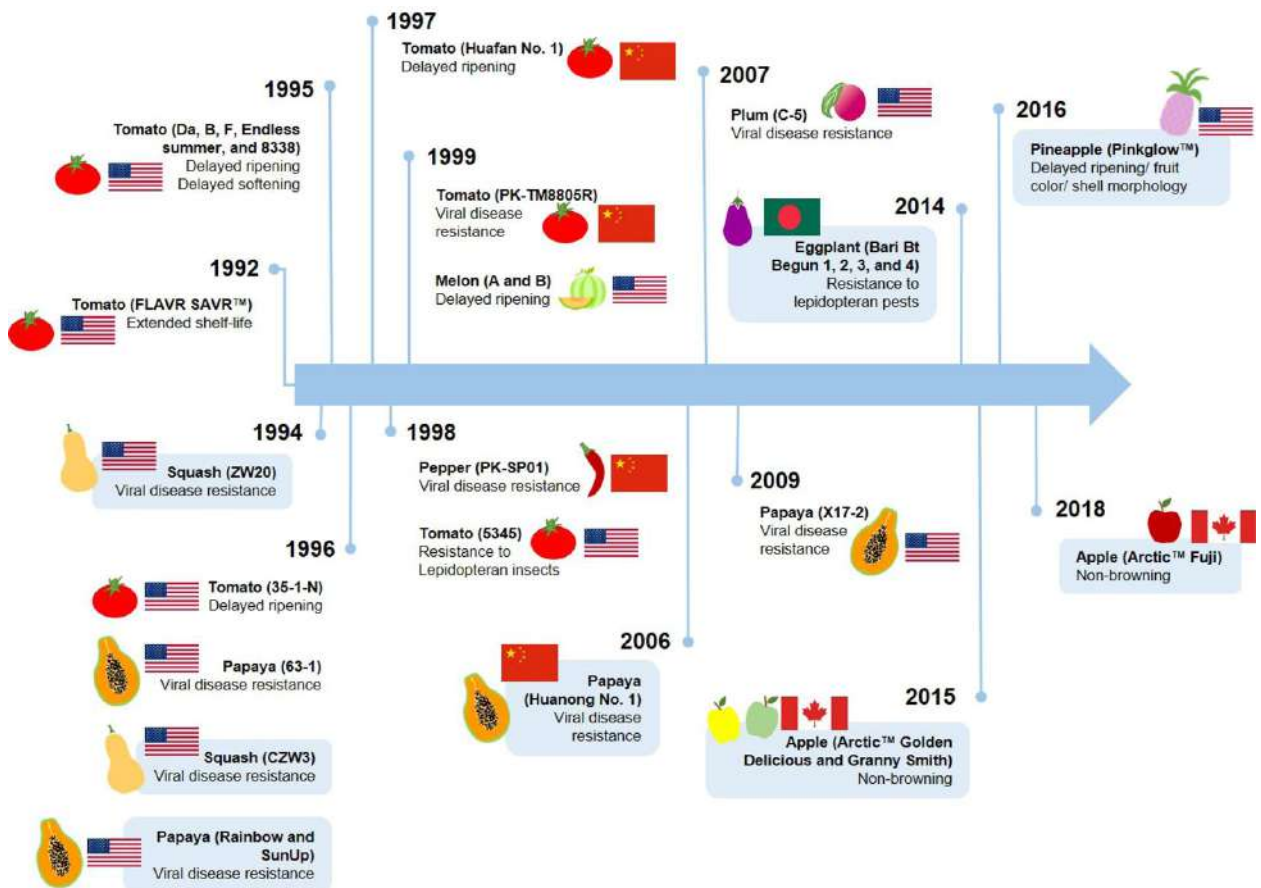


Рис. 3.5. Хронологія розвитку плодових культур з інженерними ознаками. Рік вказує на час першого затвердження. Фрукти, які, на сьогодні, представлені на ринку, позначені на світло-блакитному фоні. Пояснення в тексті. Запозичено з [54]

Чи завершилися дебати про генетично модифіковані культури? Рис – найважливіша культура у світі. У 2004 році Китай, найбільший у світі виробник рису, оголосив про збільшення зусиль щодо комерціалізації генетично модифікованого рису. Індія, другий за величиною виробник рису, швидко послідувала цьому прикладу. У зв'язку з тим, що 2 найбільші виробники рису у світі (з населенням ~ 40 % світової популяції) перейшли на виробництво ГМ рису, у решті світу, у кінцевому результаті, не залишається іншого вибору, окрім як прийняти трансгенні продукти харчування.

З 1996 по 2014 рік глобальні площі, відведені під трансгенні культури, збільшилися з 1,7 млн до 181,5 млн га, що представляє собою збільшення в 100 разів, менше ніж за 20 років. Наприклад, соєві боби становили половину всіх ГМ культур, висіяних у 2014 році. До 2014 р. близько 20 млн фермерів у всьому світі користувалися цією технологією, причому більше 80 % з яких були вихідцями з країн, що розвиваються.

У 2002 р. Продовольча і сільськогосподарська організація Об'єднаних Націй схвалила розробку й використання ГМ культур, адже африканському континенту були терміново потрібні підходи сільськогосподарської біотехнології, включно з трансгенними культурами, щоб поліпшити виробництво продуктів харчування. У той же час, голод дає критикам можливість пропагувати антибіотехнології, які призводять лише до того, що мільйони людей, які гостро потребують їжі, вмирають від голоду. Вчені закликали суспільство визнати різницю в потребах між Європою та Африкою. Європа, населення якої знаходиться під контролем, має надлишок їжі та не відчуває голоду, у той час як Африка, навпаки, відчуває масовий голод і смерть.

В африканській країні Буркіна-Фасо в 2014 році було проведено дослідження, яке показало, що трансгенна бавовна (сконструйована з урахуванням стійкості до комах) забезпечила фермерам зростання врожайності приблизно на 31 %. Крім того, це зробило Буркіна-Фасо країною номер один по виробництву бавовни в Західній Африці, де щорічно

продукують понад 700000 т бавовни. Окрім того, щорічно висаджуючи 0,5 млн га трансгенної бавовни, Буркіна-Фасо виділяє більше земель під трансгенні культури, ніж вся Європа, де все ще широко розповсюдженні публічні демонстрації проти генетично модифікованих культур. Аналогічним чином, у недавньому звіті про вплив трансгенної бавовни, резистентної до комах, в Індії було виявлено, що за шестирічний період врожайність бавовни збільшилася на 24 %, і що дрібні фермери, які займаються вирощуванням цих рослин, отримали 50 % прибутку в порівнянні з вирощуванням нетрансгенної бавовни.

Вражаючі приклади ГМР. Синя троянда, блакитна троянда – троянда із синіми (блакитними, ліловими) пелюстками. У природі троянди з пелюстками такого забарвлення не зустрічаються, проте технологія отримання синіх троянд за допомогою фарбування відома, принаймні, з XII століття.

У 2004 шляхом генетичної модифікації був отриманий **сорт троянд «Blue Moon»**, що містить пігмент дельфінідин (антоціанідін, основний рослинний пігмент родів *Viola* та *Delphinium*; присутній також у журавлині, гранатах, чорниці тощо); квітки рослин цього сорту мають пелюстки лілового забарвлення (рис. 3.5 А).

«Arctic» – це торгова марка **генетично модифікованих яблук**. Основна генетична зміна – м'якуш цих яблук не темніє при контакті з повітрям. Сорти цієї марки створені у канадській компанії «Okanagan Specialty Fruits, Inc». Зареєстровано 3 ГМ-сортів серії «Arctic»: «Arctic Granny Smith», «Arctic Fuji» та «Arctic Golden Delicious» (рис. 3.5, 3.6 Б, В).

З 2015 по 2018 рр. було підтверджено можливість вільного продажу сортів Arctic у США.

Генетичні зміни, внесені до сорту «Arctic»:

1) *PGAS PPO suppression gene* (джерело гена – яблуна домашня (*Malus domestica*)) знижує (пригнічує) виробництво ферменту поліфенолоксидази, відповідального за потемніння плода на зрізі;

2) *nptII* (джерело гена – *E. coli*), що продукує фермент неоміцин-фосфотрансферазу II, яка надає рослині стійкість до антибіотиків неоміцину та канаміцину.

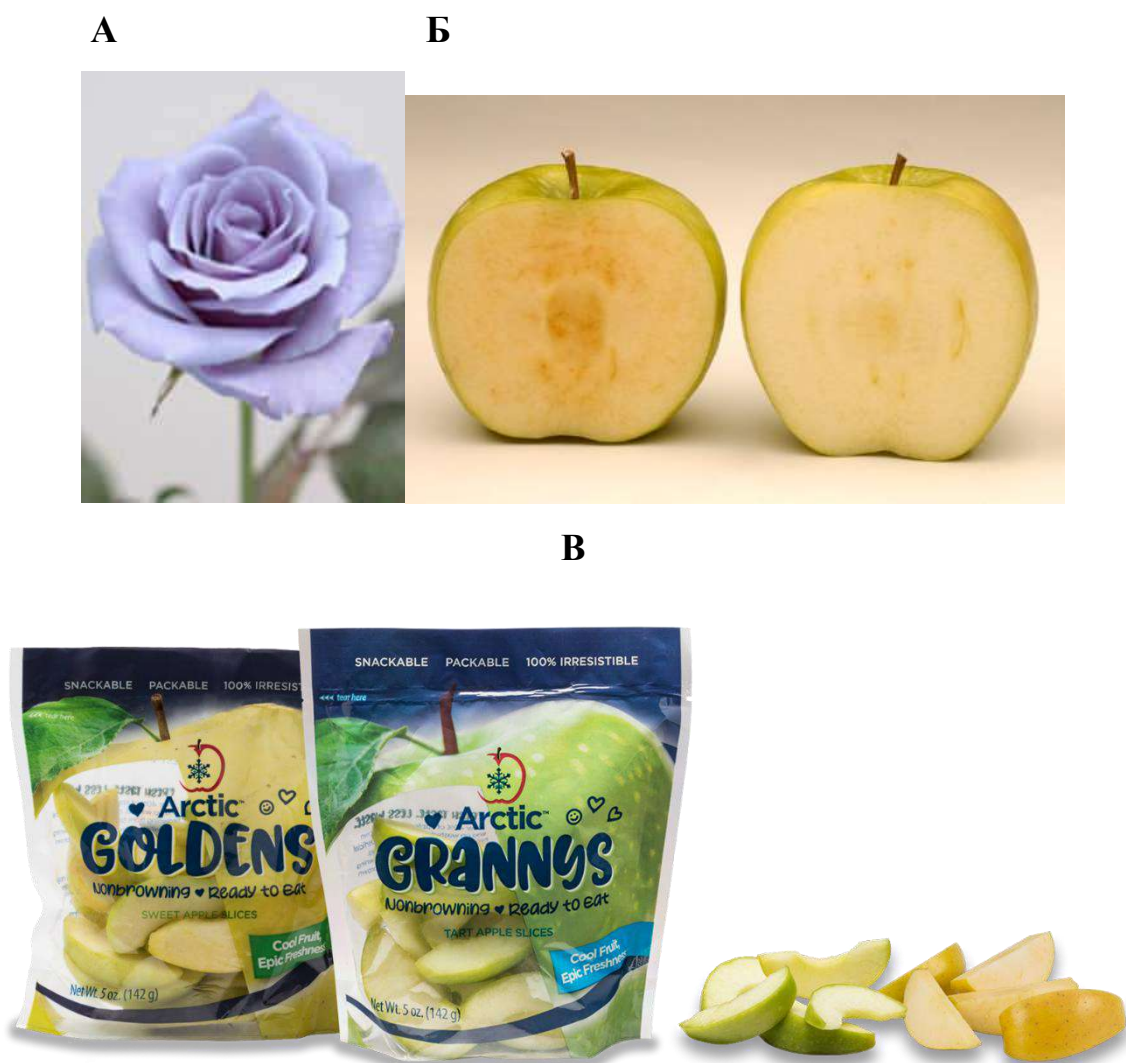


Рис. 3.6. Генетично модифіковані рослини: А. Сорт троянд «Blue Moon». Б. – Генетично модифіковане яблуко «Arctic» (справа) порівняно із звичайним яблуком. В – Скибочки різних сортів яблуків «Arctic», запаковані виробником для продажу. Пояснення в тексті. Запозичено з [29]

Потім технологія **РНК-інтерференції** (про яку йтиметься далі в підпункті **3.4.3.1.**) була використана для пригнічення чотирьох генів поліфенолоксидази яблука шляхом експресії хімерної змістові РНК, яка містила часткові кодуючі

послідовності генів *PPO2*, *GPO3*, *APO5* і *pSR7*, що і призвело до пригнічення експресії цього ферменту.

У 2019 році близько 3,6 млн кг «Arctic» яблук було вироблено для ринку США з планами щодо розширення продажів у громадському харчуванні.

На рисунку 3.7, наведено приклад ГМ капусти, яка виробляє скорпіонову отруту внаслідок вбудованого пестицида, що здатний паралізувати комах, але не впливає негативно на людину.



Рис. 3.7. Генетично модифікована рослина – капуста, що виробляє скорпіонову отруту. Пояснення в тексті. Запозичено з [29]

Першими «**їстівними вакцинами**» були трансгенні рослини тютюну та картоплі, які експресували поверхневий антиген вірусу гепатиту людини HbsAg. Спочатку було обрано саме **картоплю**, так як вона легко піддавалася генетичним маніпуляціям. Практично у всіх отриманих рослинах-продуцентах відбувалася збірка індивідуальних молекул антигену у вірусоподібні частки, які стимулювали розвиток як мукозної (слизової), так і загальної гуморальної імунної відповіді при згодовуванні експериментальним тваринам бульб такої картоплі.

Не дивлячись на отримані здобутки, зазначалося, що картопля ніколи не призначалась для використання в якості засобу доставки вакцин; адже для її вживання більшістю населення передусім її приготування, а приготування їжі, у свою чергу, інактивує більшість білкових антигенів.

Тому було запропоновано наступні рослини для доставки «їстівних вакцин» (рис. 3.8, А): **банани** (хоча для дозрівання бананових дерев потрібно кілька років), помідори (хоч помідори легко псуються), салат-латук, морква, арахіс, кукурудзу (на сьогодні, в основному для «вакцинування» тварин). Під час вживання сирих овочів і фруктів, що містять гени, які кодують синтез білків-вакцин, відбувається імунізація організму. Основними перевагами таких «їстівних вакцин» є економічність, безпека та доступність для потужної імунопрофілактики населення.



Рис. 3.8. Генетично модифіковані рослини: А. «Їстівні вакцини». Б. Інсулін-продукуючі рослини. Запозичено з [29]

Іншим, одним із перспективних напрямків ДНК-технологій рослин є створення **рослин-біореакторів**, здатних продукувати білки (наприклад, **інсулін** (рис. 3.8, В)), які є необхідними в медицині, фармакології тощо. До **переваг** рослин-біореакторів належить: відсутність необхідності в годуванні та утриманні, відносна простота створення та розмноження, висока продуктивність. Крім того, чужорідні білки не викликають імунних реакцій у рослині, чого важко досягти при використанні тварин.

Також існують певні **переваги використання в якості продуцентів саме рослинних клітин порівняно з клітинами тварин, людини та мікроорганізмів:**

1. значно менша кількість або повна відсутність небажаних вірусів і пріонів;
2. порівняна легкість очищення синтезованих рослинами фармацевтичних речовин;
3. відносно невисока вартість затратних матеріалів на проведення відповідних експериментів;
4. рослини забезпечують не лише синтез, але й до глікозилювання білків тварин, що є абсолютно необхідним для синтезу антитіл та інших функціонально повноцінних білків.

Першим практичним результатом у цій галузі слід вважати патент американської фармацевтичної фірми «Calgene» на **синтез інтерферону миші у клітинах рослин**. Згодом було показано можливість синтезу **імуноглобулінів** та інших білків людини й тварин у листках трансгенних рослин.

Так, вірусні вектори (рис. 3.9), які використовувались для отримання повнорозмірних антитіл IgG у рослинах, містили, окрім заклонованої вірусної реплікази та транспортного білка (MP), ген (кДНК) або легкого ланцюга (LC), або важкого ланцюга (НС).

Окрім цього, кожен ген антитіла контролювався промотором, сигнальним пептидом (для забезпечення секреції) та ділянкою термінації транскрипції відповідного вірусу. Віруси, що використовуються в таких підходах: вірус тютюнової мозаїки (ВТМ) і Х-вірус картоплі (ХВК). В обох випадках віруси не могли реплікуватися через відсутність білка вірусної оболонки. Рекомбінантні віруси вводили в рослини у складі Т-ДНК, яка переносилась при зараженні *Agrobacterium tumefaciens* (див. далі підрозділ 3.4.1).

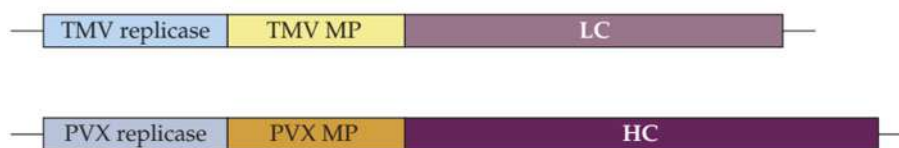


Рис. 3.9. Схематичне зображення частини вірусних векторів, які використовуються для отримання повнорозмірних антитіл IgG у рослинах. TMV (BTM) – вірус тютюнової мозаїки; PVX (ХВК) – Х-вірус картоплі; МР – транспортний білок із відповідних вірусів; LC – кДНК легкого ланцюга; НС – кДНК важкого ланцюга. Запозичено з [24]

На сьогодні, за допомогою бататьох рослин-біореакторів (тютюн, соя, люцерна, пшениця, картопля, люпин, кукурудза, рис тощо) забезпечується продукування антигенів та антитіл проти різних антигенів: стрептококовий антиген, вірус простого герпесу, вірус гепатиту В, вірус сказу, цитомегаловірус, вірус ящуру, ВІЛ-1 тощо як для діагностичних підходів, так і для терапії ракових захворювань (продукування ScFv – одноланцюгового варіабельного фрагмента тощо).

Цільові ознаки генетично модифікованих рослин. Потрібно зазначити, що, на сьогодні, **3 основні культури, які модифікують найчастіше, це – соя, кукурудза, бавовна.** Окрім цього, зазнають генетичних модифікацій картопля, цукровий буряк, папайя, гарбуз, рис, ріпак (канола (в українську мову це слово прийшло з англійської: CANada Oil-Low Acid – «CANOLA» (канадська олія з низьким вмістом кислот)), табак, троянди, баклажани, альфальфа (люцерна).

Донедавна **ГМ пшениця** не вирощувалась у жодній з країн світу. Уперше, у 2020 р., в Аргентині Міністерство сільського господарства повідомило про схвалення нового посухостійкого (зادля значного збільшення врожайності та через значні екологічні переваги) сорту пшениці НВ4, розробленого біотехнологічною компанією «Bioseres», Національною комісією з науки та технологій «CONICET» та Національним університетом. У 2023 р. Бразилія схвалила сорт пшениці НВ4 для комерційного вирощування.

Найчастіше **цільовими ознаками**, які за допомогою певних генно-інженерних підходів (про які йтиметься далі), вводяться в організм рослини, є:

1. **Стійкість до вірусних інфекцій** (наприклад, картопля, резистентна до Y-вірусу);

2. **Стійкість до антибіотиків та гербіцидів** (соя, бавовна, кукурудза тощо);
3. **Покращення харчової якості** («золотий рис», банани Кавендіш, нетоксична маніока (касава, їстівнівна рослина – тропічний корнеплід);
4. **Здатність продукувати цільові продукти (рослини-біореактори)** (CANOLA, терапевтичні рослини);
5. **Стійкість до шкідників** (Bt-рослини; картопля сорту «Désirée» (посуhostійка, резистентна до раку картоплі та вірусних захворювань, країна-виробник Нідерланди);
6. **Біоремедіаційні властивості** (комплекс методів очищення вод, ґрунтів та атмосфери з використанням метаболічного потенціалу біологічних об'єктів (рослин, бактерій тощо) або їх ферментів): ГМ ярутка лісова *Thlaspi caerulescens* тощо;
7. **Стійкість до абіотичних стресових чинників** («DroughtGard» кукурудза (у рослину введено гени бактерій, які пригнічують стресову реакцію);
8. **Підвищений термін зберігання** (томати «FlavrSavr», сорт яблук «Arctic»).

ГМР у сучасному світі. На 2015 р. ГМР вирощувались у 28 країнах. Ще у 34 країнах було дозволено імпорту ГМ продуктів. Ще 11 країн допускали проведення польових досліджень ГМР (рис. 3.10).

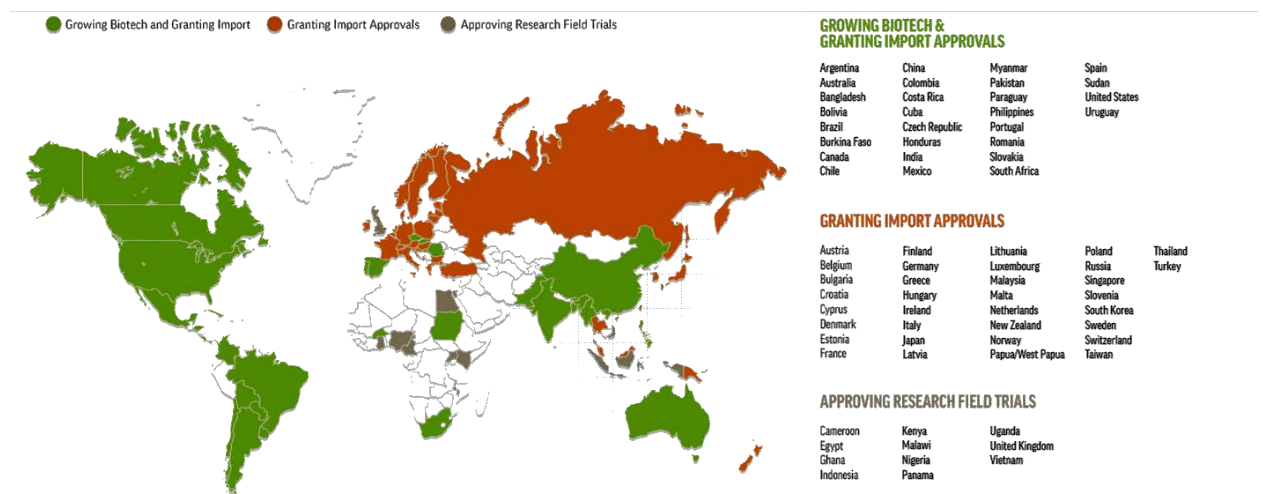


Рис. 3.10. Генно модифіковані рослини в сучасному світі на 2015 рік.

Зеленим позначено країни, де вирощували ГМР; коричневим позначено країни, в яких було дозволено імпортувати ГМ продуктів; сірим – країни, що дозволяли проведення польових досліджень ГМР. Запозичено з [30]

На той час основними виробниками трансгенних рослин були США (73,1 млн га), Бразилія (42,2 млн га), Аргентина (24,3 млн га), Індія (11,6 млн га), Канада (11,6 млн га), Китай (9 млн га), Парагвай (3,9 млн га), Пакистан (2,9 млн га), ПАР (2,7 млн га), Уругвай (1,6 млн га) і Болівія (1,0 млн га).

Юридичні аспекти. Юридичний статус ГМР істотно відрізняється в різних країнах. Станом на 2015 р. (рис. 3.10) вирощування та продаж ГМР були забороненими в 38 країнах (з них 19 – країни Європи; у тому числі, в Україні).

Як зазначено вище, у 28 країнах біотехнологічне використання ГМР було дозволено. Сумарно в усіх країнах було прийнято понад 1000 законодавчих актів стосовно обігу та використання ГМ продуктів. У 2020 р. ГМР вирощувались уже в 42 країнах. У 2023 р. – у 45 країнах.

У 64 країнах **маркування ГМО** є обов'язковим при частці ГМ > 0,9 %. Так, використовують написи «Без ГМО», «Non-GMO» і «Made without genetically modified ingredients». У США овочі й фрукти позначають PLU-кодом (price look-up code (англ.) – код пошуку ціни) із 5 цифр на ціннику. Код на трансгенних продуктах починається з 8.

Якщо звернути увагу на зовнішній вигляд продукту, то ГМ продукти є бездоганними на вигляд. Вони мають правильну форму, однаковий розмір та довго не псуються, через те що нові гени дозволяють їм бути стійкими до негативного зовнішнього впливу.

Якщо для людини є важливим не вживати ГМ продукти, потрібно запам'ятати: 78 % сої, 33 % кукурудзи, 64 % бавовни і 24 % ріпаку у світі, на сьогодні, є трансгенними. Їх додають у такі продукти, як: молочні й сирні продукти, ковбаса, сосиски, напівфабрикати та борошняні суміші, хліб,

кондитерські вироби, солодкі напої, бавовняне й арахісове масло, майонез, шоколадний сироп, сухі сніданки, каші швидкого приготування.

Натуральні продукти маркують наступним чином: «100 % organic», «Органічний» або «Made with organic ingredients». Таки позначки гарантують, що у товарі немає генетично модифікованих компонентів.

Юридичні аспекти питання – Україна. У 2009 р. в Україні було введено вимогу про обов'язкове маркування всієї харчової продукції написом «Без ГМО» або «З ГМО» (рис. 3.11).



Рис. 3.11. Приклади маркування продукції написом «Без ГМО» в Україні. Пояснення в тексті. Запозичено з [35]

У 2012 р. було здійснено спробу оптимізації законодавства про маркування продуктів відповідно до світової практики. Законопроект не було ухвалено. Чинний закон «Про інформацію для споживачів щодо харчових продуктів» (простіше – закон про маркування харчових продуктів) чітко зобов'язує виробників маркувати продукти, які містять ГМО за прикладом країн Євросоюзу. Тобто, якщо в продуктах харчування, кормах для тварин або ветеринарних препаратах є ГМО, і його вміст перевищує встановлену норму в 0,9 %, виробник зобов'язаний вказати це на упаковці. При цьому, ця норма діє для будь-якого інгредієнта харчового продукту. А позначка «Без ГМО», до якої вже звикли споживачі, не є обов'язковим елементом маркування. Її виробник може наносити на свій розсуд. Однак порядок залишається

незмінним – відсутність ГМО в продукті необхідно підтвердити в порядку закону про безпеку харчових продуктів (див. далі підрозділ 3.3).

На сьогодні, жодний ГМО в Україні поки не зареєстрований. Ввезення та обіг ГМО та продукції з ГМО в Україні по факту заборонені. Основний нормативно-правовий акт – Закон України «Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів» №1103 від 31.05.2007.

Створення, випробування, транспортування та використання ГМО в Україні є дозволеним лише для тих організмів, що внесені до державного реєстру за 2017 р. Але в Україні склалася ситуація, при якій реєстр дозволених до використання геномів є, але він до цих пір не заповнений. Реєстрація включає в себе генетичний аналіз, оцінювання впливу на навколишнє середовище тощо. Через те, що ця процедура одночасно є як тривалою, так і коштовною, до тепер жоден із видів ГМО так і не був офіційно зареєстрований. І тому в країні ніби як ГМО дозволено, але де-факто заборонено.

Таким чином, в Україні заборонено вирощувати ГМО з комерційною метою і в той же час не можна займатися вирощуванням для продажу сортів та ліній, що не внесені до Державного реєстру ГМО сортів сільськогосподарських рослин та порід тварин, створених на основі ГМО. Так як у вітчизняному реєстрі немає жодного такого сорту, то відповідно й вирощувати ГМО в Україні для продажу заборонено.

Водночас Законом «Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів» не забороняється створювати та досліджувати ГМО, проте лише у випадку наукового інтересу та у відділах науково-дослідних інститутів НАНУ.

Контролювати поширення ГМР досить складно. Існує ймовірність, що потрапивши в навколишнє середовище, вони можуть стати джерелом так званого генетичного забруднення. Рослини, що були модифіковані як стійкі до

гербіцидів, будуть у змозі передавати свої нові властивості диким родичам. Це може призвести до виникнення **«супер бур'янів»**.

Пилок рослин за допомогою вітру, комах і птахів може переноситися на великі відстані, запліднюючи рослини близьких видів і передаючи їм власний генетичний матеріал (**горизонтальне перенесення генів**). Окрім цього, генна інженерія може програмувати нездатність трансгенного організму до репродукції – ця технологія називається «термінатор» (наступне покоління не здатне до відтворення, адже вертикальне перенесення унеможливлено).

Чи несуть ГМ продукти загрозу здоров'ю людини? За останні 20 років був ряд голосних справ, що негативно вплинули на репутацію ГМ продуктів:

- 1) Справа Пустаї (1999 р.) – споживання ГМ картоплі нібито призводило до потовщення стінки ШКТ та послаблення імунітету в щурів.
- 2) Справа Bt-кукурудзи (2011 р.) – було заявлено, що використання такої ГМ кукурудзи призводило до накопичення пестицидного кристалічного білку Cry1Ab (Bt-токсин) в організмах жінок та ембріонів.
- 3) Справа Сераліні (2012-2014 рр.) – споживання ГМ кукурудзи нібито призводило як до ураження печінки, нирок і серця в щурів, так і до утворення пухлин.

Консенсусна думка наукової спільноти: Їжа з генетично модифікованих культур несе не більше загрози для людського здоров'я, ніж звичайна. Більше того, генетична модифікація дає меншу кількість непередбачених змін, ніж класичні методи селекції. Жодної офіційної смерті досі не зафіксовано від вживання ГМ рослин.

Нещодавно результати 90-денного годування щурів Спрег-Доули (англ. Sprague Dawley – лінія безпородних щурів-альбіносів виду *Rattus norvegicus* (Сірий щур), що широко використовуються в медичних дослідженнях) показали, що трансгенна кукурудза лінії GH5112E-117C так само безпечна для споживання, як і кукурудза дикого типу (Ні-ІІ).

Подібні результати було одержано в 2020 р. і при вивченні впливу на організм людини **«золотого рису»** (зокрема, у 2018 році він отримав дозвіл від

FDA на використання в їжу в США, Канаді, на Філіппінах). Так, було виявлено, що послідовності трансгенних білків: фітоїнсінтази та каротиндесатурази не були схожими на послідовності відомих алергенів або токсинів. Крім того, обидва білки швидко розпадалися в імітованому кислому середовищі травної системи, у той час як їх ферментативна активність інгібувалася тепловою обробкою. Тести на токсичність також показали, що білки не мали побічних ефектів, що свідчило про безпеку при вживанні такого рису.

Потрібно зазначити, що для досягнення більш високого споживчого сприйняття ГМР доцільно використовувати цисгенез, інтрагенез та сучасні підходи для редагування рослинних геномів (див. далі підрозділ **3.4.4**) на відміну від трансгенних культур.

3.3. Методи детекції генетичних модифікацій у зразках

Через відсутність дієвого державного контролю за ввезенням іноземними компаніями власних сортів рослин, у тому числі й генетично модифікованих, було виявлено їх значне несанкціоноване розповсюдження та використання, що спричиняє загрозу поступової втрати біологічної та генетичної безпеки країни.

Однак це не зупиняє вітчизняних фермерів від вирощування ГМО на власних полях (наприклад, ГМ культури, стійкі до гербіцидів: сою, ріпак, кукурудзу) та пошуку каналів збуту для виробленої продукції. Такий тіньовий ринок ГМ продукції приносить великі прибутки, продаючись як «чисті» культури. Так, за неофіційними даними, близько 80 % сої та 10 % кукурудзи вирощують в Україні з ГМ насіння. І оскільки це так, належних перевірок щодо вмісту в продукції ГМО ніхто не проводить. Українці споживають продукцію і навіть не знають, чи містить вона ГМО насправді чи ні. На тлі цієї ситуації в Україні сформувався величезний тіньовий ринок ГМО продукції, яка дешевше звичайної. Хоча, потрібно зазначити, що порушення вимог Закону України «Про державну систему біобезпеки при створенні,

випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів», а також прийнятих на його основі нормативно-правових актів тягне за собою як цивільну, адміністративну, дисциплінарну, так і кримінальну відповідальність.

У насінні, зерні та рослинах сільськогосподарських культур виявити ГМО можна лише за допомогою відбору проб та подальшої їх перевірки в акредитованих лабораторіях на визначення наявності ГМО в них.

Детекція ГМ у продуктах базується на визначенні **модифікованих /внесених нуклеотидних** (частіше) або **амінокислотних послідовностей** (рідше). Найчастіше застосовуються **методи кількісної ПЛР у реальному часі (qRT-PCR), мультиплексної ПЛР та ІФА (ELISA).**

За кордоном було запропоновано **3 основні варіанти ПЛР-детекції** (рис. 3.12) – **елемент-специфічна** (виявлення шляхом ПЛР модифікованого елемента), **конструкт-специфічна** (виявлення за допомогою ПЛР успішно інтегрованої в геном рослини-хазяїна специфічної конструкції) та **подіє-специфічна** (встановлення наявності певної події – вбудовання у відповідному місці в геномі рослини-господаря).

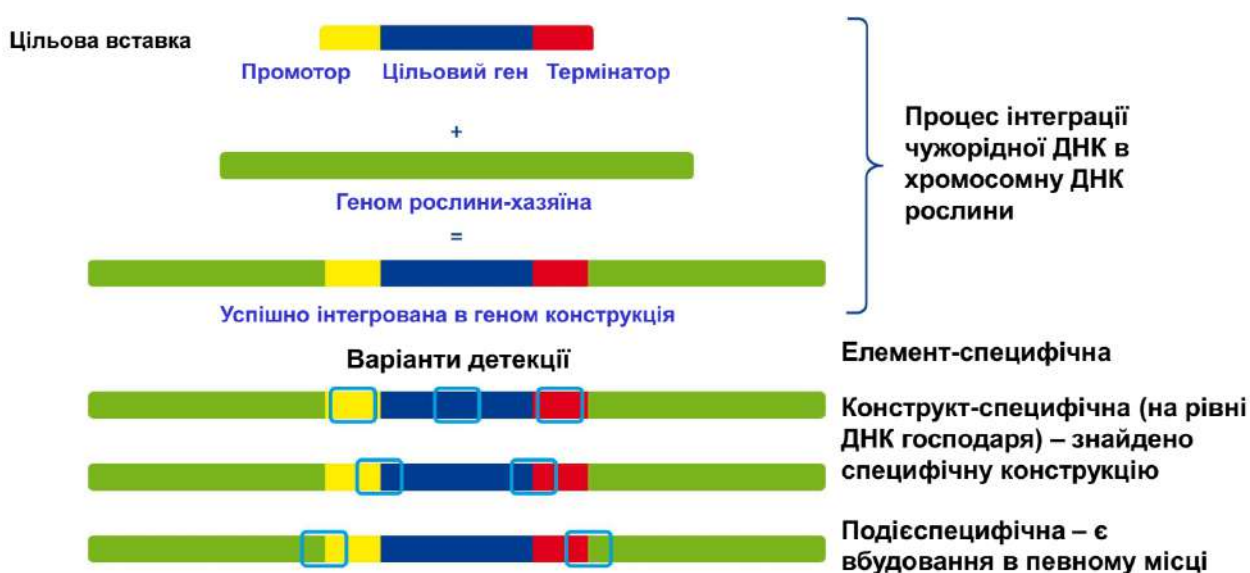


Рис. 3.12. Приклади детекції генних модифікацій у продуктах за допомогою ПЛР. Пояснення в тексті

Мультиплексна ПЛР (проведення декількох окремих реакцій ПЛР разом в одній реакції) дозволяє **ідентифікувати одразу декілька трансгенів у зразку** за рахунок використання одразу кількох наборів гено-специфічних праймерів чи проб (рис. 3.13).

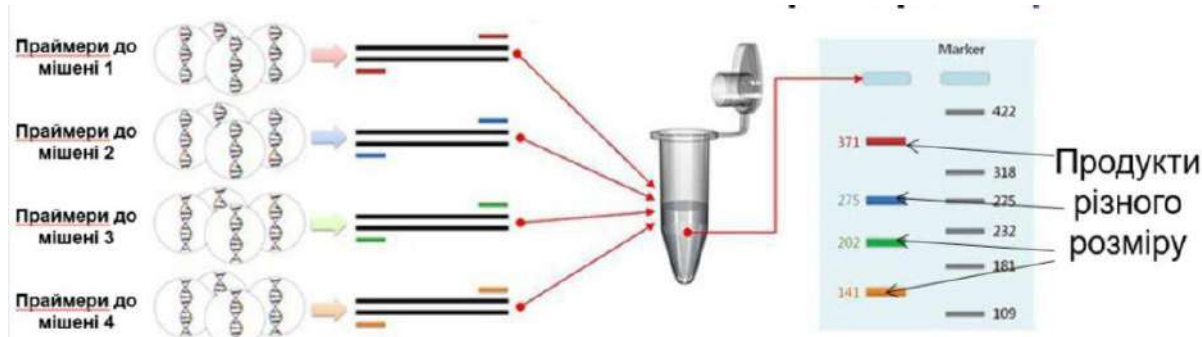


Рис. 3.13. Метод мультиплексної ПЛР для детекції внесених/модифікованих генів. Пояснення в тексті. Адаптовано з [37]

Температури відпалу для кожного з наборів праймерів повинні бути оптимізовані для правильної роботи в рамках однієї реакції, а розміри ампліконів (довжина їх пари основ) повинні бути досить різними, щоб формувати окремі смуги при візуалізації за допомогою **гель-електрофорезу**. Як альтернатива, якщо розміри ампліконів перекриваються, різні амплікони можна диференціювати та візуалізувати за допомогою праймерів, пофарбованих **флуоресцентними барвниками різного кольору**. На сьогодні, розроблено різні комерційні набори для такого мультиплексування, які використовуються в багатьох лабораторіях світу, а також системи автоматичного проведення гель-електрофорезу та гель-документації.

ПЛР у реальному часі або кількісна ПЛР (ПЛР-РЧ, Real-time PCR, qPCR) – це ПЛР, під час якої реєстрація накопичення певного продукту ампліфікації відбувається в ході реакції під час кожного циклу, тобто спостерігається «у реальному часі». Це дозволяє виміряти **кількісно вміст специфічного трансгена** в пробі за рахунок використання **флуорофорів**. Найпоширенішими інтеркаляційними барвниками є: **SYBR Green I, SYBR Gold, LCGreen, SYTO 9, Eva Green** тощо (найбільш широковживаним

варіантом барвника є SYBR Green I, який вбудовується в малу борозну ДНК або SYBR Gold).

Так, використання інтеркалюючих барвників є простим і дешевим варіантом фарбування ДНК за ПЛР у реальному часі. При вбудовуванні у дволанцюгову ДНК їх спроможність до флуоресценції зростає в десятки й сотні разів (рис. 3.14).

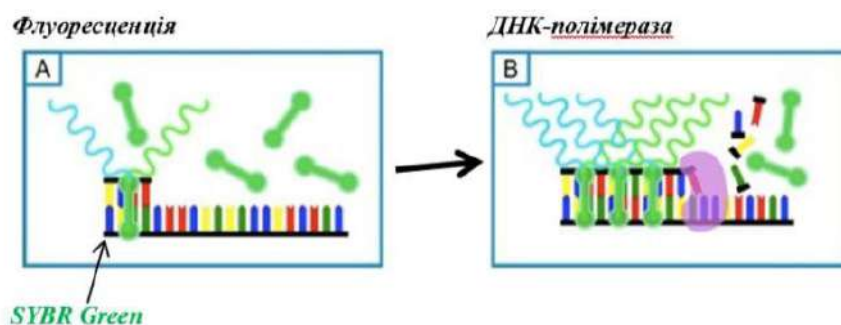


Рис. 3.14. ПЛР у реальному часі з використанням барвника SYBR-Green I для детекції внесених/модифікованих генів. Пояснення в тексті.
Адаптовано з [37]

До **недоліків** зазначеної системи детекції слід віднести те, що такі барвники можуть демонструвати накопичення будь-якої ДНК, включно з **димерами праймерів**. Специфічність отриманого продукту реакції можна перевірити застосуванням **кривих плавлення** (Melt curve analysis). Для цього після закінчення ПЛР пробірку повільно охолоджують від 25 °C до 95 °C (чи навпаки нагрівають) і одночасно реєструють зміни флуоресценції. Фрагменти ДНК різного розміру та складу будуть плавитися (гібридизуватися) за різної температури, що дозволяє оцінити склад реакційної суміші після ПЛР, проте роздільна здатність такого підходу не є високою.

У той же час, **специфічні системи детекції** дозволяють значуще зареєструвати накопичення фрагмента ДНК лише певної, визначеної послідовності. Так, мультиплексна ПЛР у реальному часі із використанням **сиквенс-специфічних зондів (мульти-проб)** на основі, наприклад, **вільних**

мічених проб (лінійні проби, що руйнуються, або TaqMan) дозволяє кількісно визначати декілька послідовностей внесених/модифікованих генів в одній пробірці (рис. 3.15).

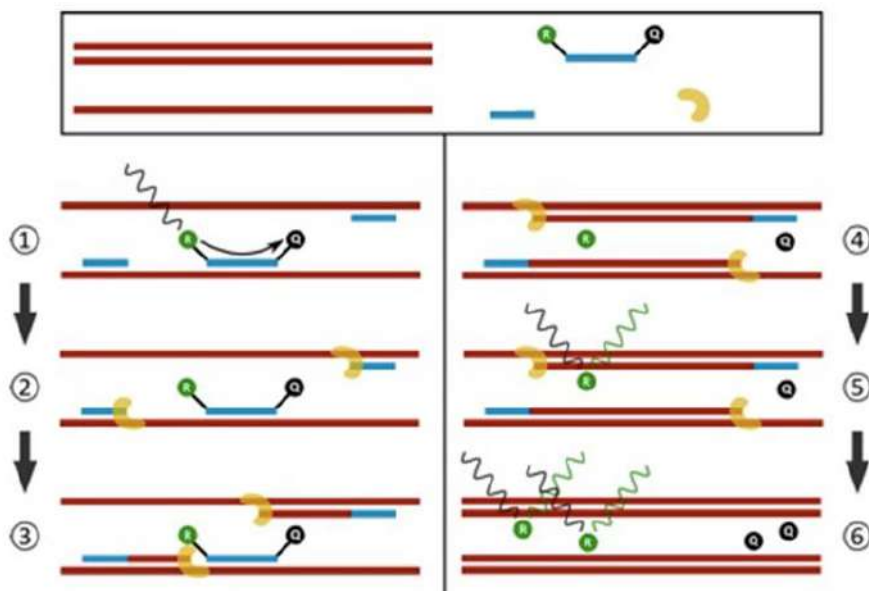


Рис. 3.15. ПЛР у реальному часі з використанням TaqMan проб для детекції внесених/модифікованих генів. Умовні позначення: R – флуоресцентна мітка, Q – гасник флуоресценції. Пояснення в тексті. Адаптовано з [37]

Як видно на рисунку 3.15, у цьому підході олігонуклеотид, комплементарний продукту ПЛР, мітять **флуорофором і гасником флуоресценції** (можливо використовувати як кінцеве, так і внутрішнє мічення). За відсутності мішені **флуорофор і гасник наближені** (за рахунок водневих зв'язків), і флуоресценція є пригніченою (за механізмом **флуоресцентно-резонансного переносу енергії (FRET)**). При накопиченні відповідного продукту реакції проба гібридизується на ампліфіконі, а потім відбувається її руйнування за рахунок 5'→3' екзонуклеазної активності *Taq*-полімерази, тобто зонд гідролізується на нуклеотиди. У результаті цього флуорофор і гасник потрапляють у розчин, де ймовірність знаходження цих речовин поряд буде невеликою, а флуоресценція відновиться. Інтенсивність

сигналу зростає з кожним циклом ПЛР пропорційно накопиченню ампліконів. В одній реакції (**мультиплексна ПЛР**) можна використовувати кілька зондів, у яких флуорофори мають різні спектри випускання світла.

Для детекції **білкових продуктів чужорідного походження** використовується **імуноферментний аналіз (ІФА, ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay (англ.))**. Найбільш зручним у постановці є **«сендвіч» - метод» (Sandwich ELISA)**. На першому етапі аналізу на полістироловому планшеті адсорбуються антигени або антитіла в заздалегідь обраній концентрації (рис. 3.16). При цьому реагенти, що не зв'язалися з твердою фазою, видаляються відмиванням. У сенсibiliзовані лунки вносяться досліджувані зразки. У лунки з позитивним і негативним контролем вносяться стандартні реагенти, які містять або не містять досліджуваний компонент на наявність генно-модифікованих білків. При необхідності аналізу кількісного вмісту білка вносяться калібрувальні розчини. Після цього планшет інкубують із використанням термошейкера або термостата. При цьому на поверхні твердої фази формуються імунні комплекси. Незв'язані компоненти видаляють відмиванням.

На наступній стадії в лунки планшета вноситься кон'югат антитіло-фермент або антиген-фермент (або, як зображено на рис. 3.16, молекула **стрептавідину**, яка на наступній стадії буде з'єднуватися з кон'югатом біотин-фермент), який і зв'язується з іммобілізованим імунним комплексом, при цьому активний центр фермента залишається доступним для подальшої взаємодії із субстратом. Подальша інкубація субстрату в лунках з іммобілізованим кон'югатом призводить до розвитку кольорової реакції. Цю реакцію можна зупинити на потрібній стадії та по оптичній щільності оцінити насиченість фарбування.

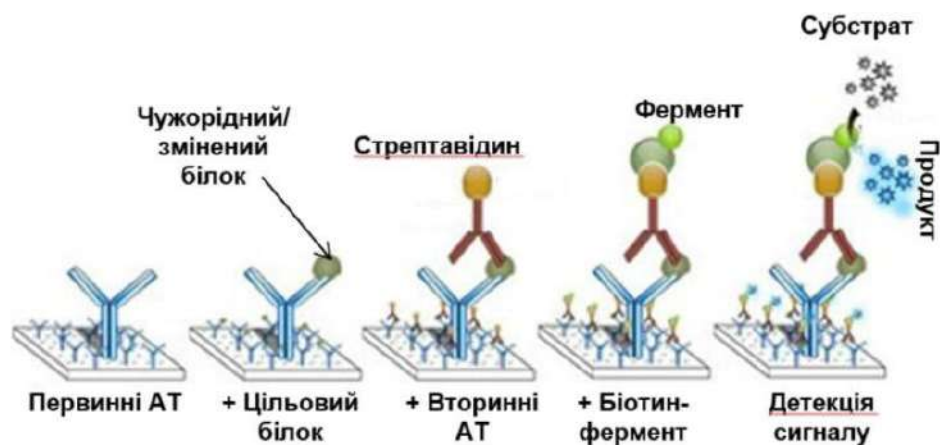


Рис. 3.16. Прямий «сендвіч»-ІФА для детекції білкових продуктів чужорідного походження. АТ – антитіла. Пояснення в тексті. Адаптовано з [37]

Незважаючи на наявність **валідованих підходів**, описаних вище, на сьогодні, лишаються невирішеними певні питання. **Основними недоліками сучасних підходів до детекції генетичних модифікацій є:**

- 1) низька ймовірність детекції неочікуваних або невідомих варіантів ГМ;
- 2) тестування є тривалим та фінансово затратним;
- 3) конструкт-специфічні та подієспецифічні методи детекції можуть встановити наявність одразу кількох варіантів ГМ, однак не дають точної інформації про те, які конкретно ГМ присутні в зразку;
- 4) низька продуктивність детекції (як правило, одна ГМ за раз);
- 5) при використанні методів на основі ПЛР необхідні високоочищені зразки ДНК, специфічне коштовне стаціонарне обладнання, яке повинно експлуатуватися спеціально підготовленим персоналом, що зможе правильно обслуговувати прилад і коректно інтерпретувати результати;
- 6) зростання відносної частки використання ГМ організмів потребує зручніших, дешевших і простіших методів детекції для застосування не лише у добре обладнаних лабораторіях.

Однак останніми роками розроблюються новітні високопродуктивні методи. Наприклад, виявити абсолютно всі генетичних модифікацій у зразку можна за допомогою **повногеномного секвенування**, що, у свою чергу, стає

дедалі більш економічно вигідним, адже бар'єр вартості секвенування генома людини продовжує знижуватися.

Окрім цього, різні модифікації реакції так званої **петле-опосередкованої ізотермічної ампліфікації (loop-mediated isothermal amplification – LAMP)** можуть стати в нагоді. Це спосіб ампліфікації ДНК та РНК послідовностей із залученням від двох до трьох пар специфічних праймерів, термолабільної полімерази (найчастіше **Bst**), яка активна за 65 °С. Ампліфікація ініціюється після інвазії у дуплекс одного з внутрішніх праймерів, і в процесі подальшої полімеризації транскрипту дуплекс повністю розпадається. Потім перший продукт витісняється синтезом, ініційованим із зовнішнього праймера, який відпалюється до верхньої цільової області. У міру його витіснення кінець транскрипту утворює петлю, що самогібридизується, за рахунок включення зворотної комплементарної послідовності у послідовність внутрішнього праймера. Цей цикл відпалу та переміщення повторюється на протилежному кінці цільової послідовності, і отриманий продукт є короткою гантелеподібною структурою, що буде матрицею у процесі подальшої експоненційної ампліфікації. Ця гантелеподібна структура містить безліч ділянок для ініціювання синтезу з трьох простих кінців відкритих петель і ділянок відпалу як для внутрішнього, так і для петельного праймерів (рис. 3.17).

У міру того, як ампліфікація ініціюється на цих множинних сайтах, кількість продуктів росте і вони утворюють довгі конкатемери, кожен з яких має ще більше сайтів для ініціації. Результатом є швидке накопичення дволанцюгової ДНК та побічних продуктів ампліфікації, які можна виявити різними методами. **Напівкількісне визначення в ході експерименту проводилося за допомогою гель-електрофорезу в агарозному гелі.**

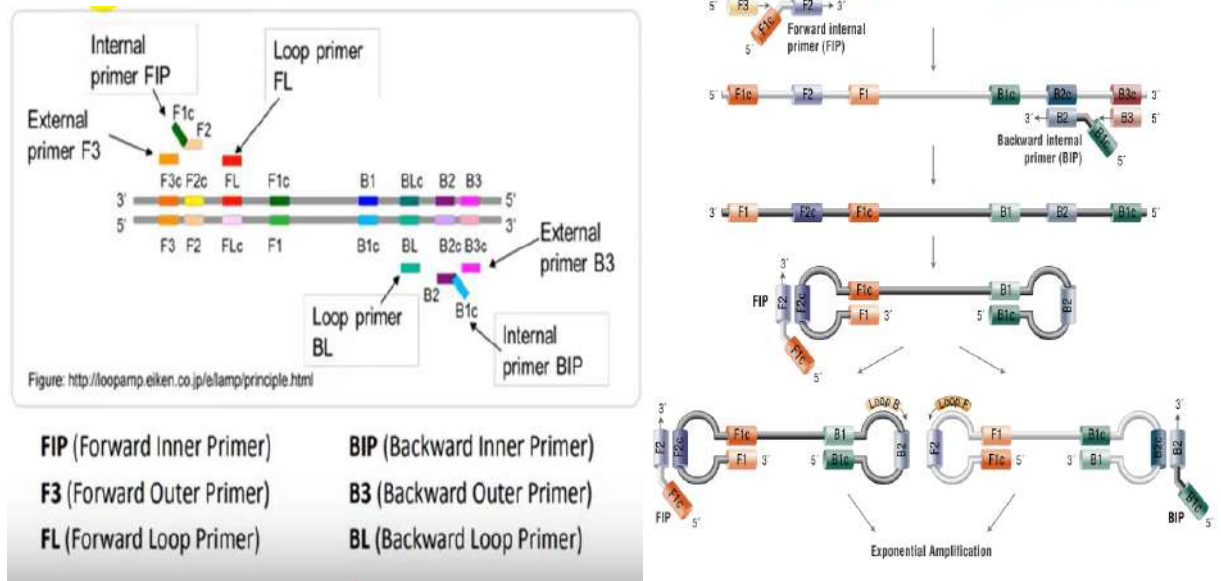


Рис. 3.17. Загальна схема LAMP-реакції для детекції внесених/модифікованих генів. Пояснення в тексті. Запозичено з [50]

У той же час, детекція ГМО за допомогою **біосенсорної системи «DaimonDNA»** («New England biolabs», 2019 р.) є швидшою, простішою, але не менш точною, ніж вищезазначені класичні методи. Загалом, система ця систему має досить просту будову (рис. 3.18).

Корпус системи складається з двох частин: суцільної полімерної оболонки реактору, що щільно закривається верхньою та нижньою кришками, та такої ж оболонки керуючої електроніки (схеми, виходів для живлення, сенсора та нагівача). Фізичні частини пристрою виготовляються за допомогою 3D-принтера («Ultimaker INC», Нідерланди) із полімолочної кислоти (PLA – синтетичний полімер).

Прилад повністю герметичний для запобігання випаровуванню зразків. Нагрівання зразків відбувається за допомогою елементів Пельтьє. Зміна температури фіксується сенсором, який подає інформацію на мікроконтролер, що й регулює нагрівання/охолодження елементів Пельтьє. Контроль зміни забарвлення зразків у ході реакції проводиться візуально через застклений прямокутний отвір у корпусі. Прилад живиться від мережі.

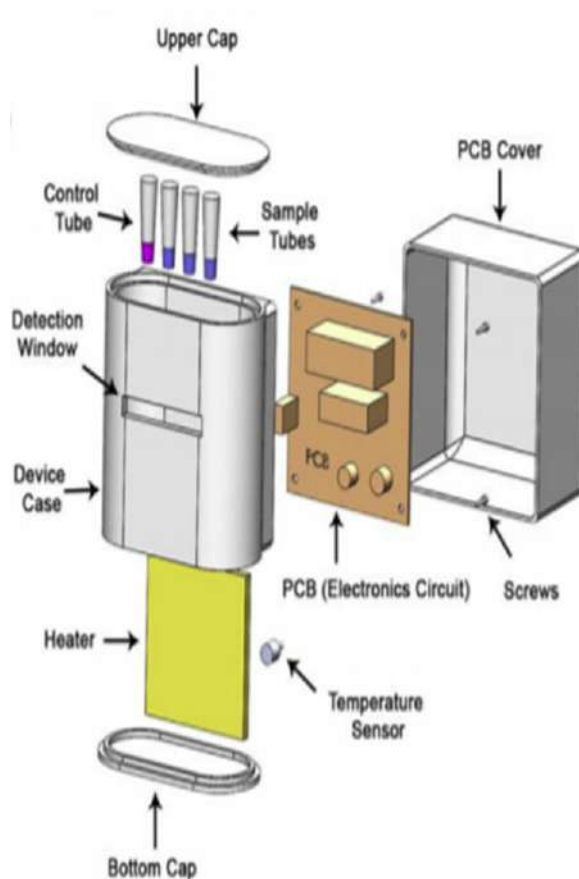


Рис. 3.18. Загальна схема біосенсорної системи «DaimonDNA» («New England biolabs»). Пояснення в тексті. Запозичено з [50]

Загальний принцип роботи. Перед початком роботи в розігрітий прилад завантажується максимум 3 дослідні пробірки типу «Еппендорф» («Eppendorf») та 1 контрольний, але вже після прогріву зразків до 95 °С, охолодження та додавання необхідної полімерази. Тривалість процесу ампліфікації становить 30 хв, температурні відхилення від 65 °С фіксує сенсор, і вони усуваються за допомогою мікроконтролера, що змінює напрямок струму та напругу через напівпровідникові частини елементів Пельтьє.

Зміна забарвлення зразків (**результати колориметрії**) стає помітною вже через 15-20 хв за рахунок зміни **pH реакційних сумішей** (рис. 3.19).

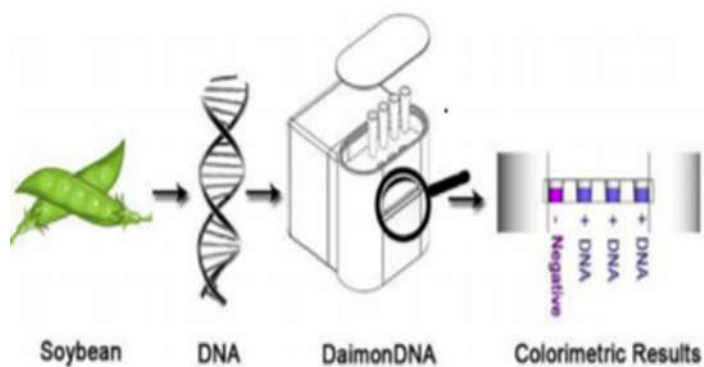


Рис. 3.19. Загальна схема постановки експерименту та детекції результатів на соєвих бобах за допомогою біосенсорної системи «DaimonDNA». Пояснення в тексті. «+» – позитивний результат, «-» (Negative) – негативний результат. Запозичено з [50]

Результати фіксують візуально за зміною забарвлення (негативний тест – фіолетовий, позитивний – синій). На цьому етапі розробки **колориметричне визначення є лише якісним**, але доволі чутливим для виявлення внесених/модифікованих генів навіть у малих концентраціях (до 0,1 %).

Переваги детекції ГМО за допомогою «DaimonDNA»:

1. На сьогодні, вартість одного визначення не перевищує 30 євро;
2. Детекція ГМО швидша, але не менш точна, ніж інші методи;
3. Розроблені окремі експрес-набори для виділення та очищення ДНК-зразків саме для використання у LAMP-експерименті;
4. Витрати на придбання приладу та на кожен окремий експеримент є на порядок меншими, ніж для популярних методик, що збільшує конкурентоздатність методу за рахунок доступності;
5. Є можливість спостерігати за процесом ампліфікації у реальному часі, але лише візуально;
6. Реакція дуже стабільна й менш чутлива до інгібіторів, ніж ПЛР, що дає можливість працювати із ширшим діапазоном матеріалів;
7. Перебіг ампліфікації в ізотермічних умовах, без потреби постійного підвищення та зниження температури реактивних сумішей
8. Підходить для преклінічної діагностики та харчової галузі.

Однак, **недоліками** детекції ГМО за допомогою «DaimonDNA» є:

1. необхідність підбору 2-3 пар специфічних праймерів;
2. реактиви коштовніші, ніж для звичайної ПЛР;
3. для промислового виготовлення прилад повинен пройти оптимізацію та сертифікацію.

3.4. Методи генетичної модифікації рослин

3.4.1. Векторні системи

Трансфекція рослин Ті плазмідною *Agrobacterium tumefaciens*. *Agrobacterium tumefaciens* – це грамнегативна ґрунтова бактерія, що є рослинним патогеном, спричинюючи утворення пухлини шийки кореня (рис. 3.20).

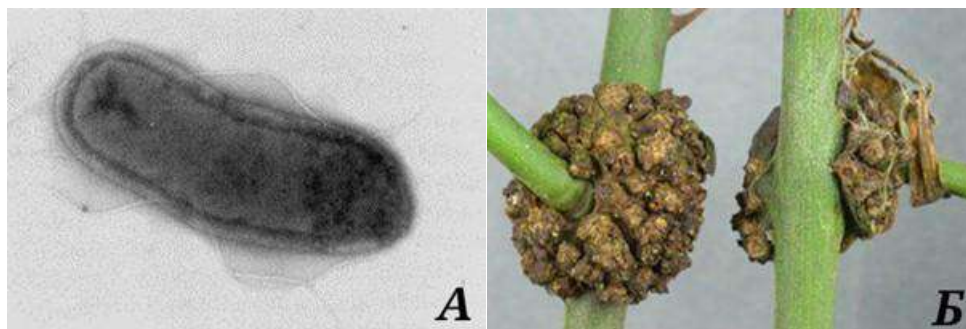


Рис. 3.20. (А) Зовнішній вигляд бактерії *Agrobacterium tumefaciens*. (Б) Приклад рослини, уражені патогеном. Пояснення в тексті. Запозичено з [34]

Формування такого **корончастого галла (пухлини)** є наслідком перенесення, інтеграції та експресії генів певного сегмента ДНК бактеріальної плазміди – так званої **Т-ДНК** (перенесеної ДНК) – у геном клітини рослини (рис. 3.21).

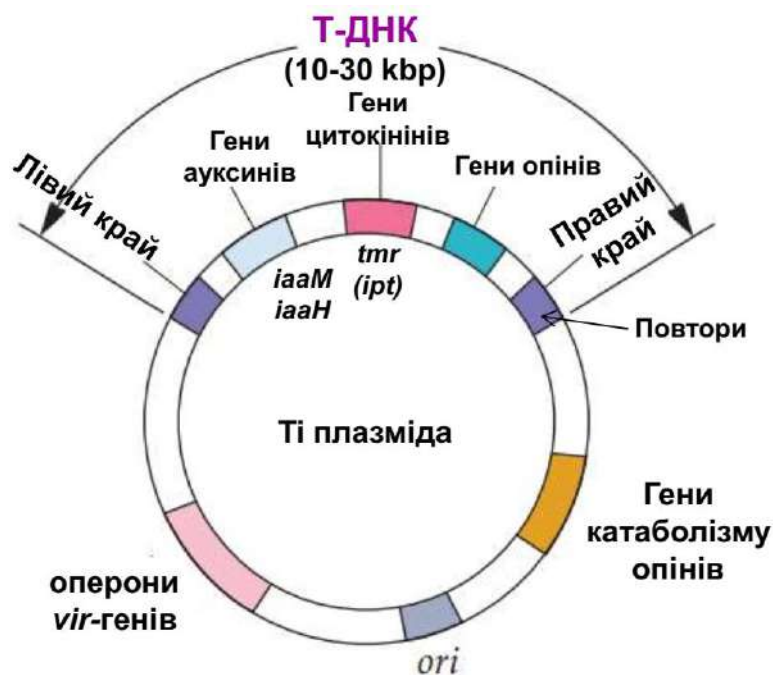


Рис. 3.21. Загальний вигляд Ті плазміди, зокрема Т-ДНК ділянки.
Пояснення в тексті. Адаптовано з [24]

Т-ДНК насправді є частиною «індукуючої пухлини» (Ті) плазміди (рис. 3.21), яка переноситься більшістю штамів *A. tumefaciens* за допомогою механізму T4SS. Це система секреції бактеріального типу IV, також відома як система секреції типу IV або T4SS, білковий комплекс, що міститься в грамнегативних бактеріях, грампозитивних бактеріях та археях. Така система здатна транспортувати білки та ДНК через клітинну мембрану. Отже, *A. tumefaciens* використовує VirB/VirD4 T4SS для доставки онкогенної ДНК (Т-ДНК) та ефекторних білків до рослинних клітин, викликаючи пухлинне захворювання.

Залежно від Ті плазміди, довжина області Т-ДНК може коливатися приблизно від 10 до 30 т.п.н. Штами *A. tumefaciens*, які не мають плазміди Ті, не можуть індукувати утворення вищезазначених пухлин.

Після початкового етапу прикріплення на місці відкритої рани *A. tumefaciens* виробляє мережу целюлозних фібрил, які щільно зв'язують бактерію з поверхнею клітин рослини. Малі фенольні молекули рослини

(ацетосирінгон, гідроксисирінгон) діють на індукцію генів вірулентності (*vir*), які переносяться на Ті плазміді.

Після того як клітина, що несе Ті плазмиду *A. tumefaciens*, прикріплюється до клітини рослини-хазяїна та індукуються гени *vir* (25 *vir* генів, розташованих у 7 оперонах), Т-ДНК переноситься за допомогою процесу, що подібний до переносу плазмиди від донора до клітин-реципієнтів під час кон'югації бактерій. Так, Т-ДНК переноситься у вигляді лінійної одноланцюгової молекули з Ті плазмиди, потрапляє в клітину рослини та з часом інтегрується в її хромосомну ДНК.

Утворення одноланцюгової форми Т-ДНК ініціюється специфічним розрізанням ланцюга ферментом, що кодується одним із *vir* генів, на обох межах інтактної ділянки Т-ДНК. 5'-кінець одноланцюгової Т-ДНК несе правосторонню послідовність, у той час як лівостороння послідовність знаходиться на 3'-кінці. Інтеграція Т-ДНК у геном рослини залежить від конкретних послідовностей на правому краю Т-ДНК. Цей край містить повторювану одиницю, яка складається з 25 п.н., хоча і лівий край також містить подібний повтор у 25 п.н. Незважаючи на послідовності правого та лівого країв ДНК, вставка Т-ДНК у рослинну ДНК відбувається у випадкових ділянках генома рослини.

Хоча вбудовування Т-ДНК у ДНК рослини відбувається в будь-якому місці, краї Т-ДНК мають деяку гомологію з послідовністю ДНК рослини в місці вставки. Гени, які знаходяться в межах послідовності Т-ДНК, активуються лише після інсерції Т-ДНК в геном рослини й відповідають за утворення пухлини шийки кореня. Це пояснює той факт, що це, в основному, рослинні гени, які не можуть бути експресовані в клітинах бактерій, оскільки ці організми мають різні транскрипційні та трансляційні регуляторні послідовності.

Регіон Т-ДНК містить гени *iaaM* та *iaaH* (рис. 3.21), що кодують ферменти, які синтезують рослинний гормон **ауксин** (індолоцтова кислота). Також регіон Т-ДНК несе ген *tmr* (також відомий як *ipt*), який кодує

ізопентинілтрансферазу – фермент, що додає ізопентиніловий боковий ланцюг до 5'-АМР, формуючи ізопентеніладенозин-5-фосфат. Ця реакція є першим етапом синтезу цитокініну ізопентиніладеніну. Унаслідок гідроксилування цих 2 молекул рослинними ферментами утворюються цитокіни трансзеатин та транскрибозилзеатин відповідно. Як ауксин, так і **цитокініни** регулюють ріст та розвиток рослинних клітин. Але в надлишку вони можуть спричиняти утворення пухлинних утворень у рослин, таких як пухлини шийки кореня.

Ділянка Т-ДНК з кожної специфічної Ті плазмід несе ген, відповідальний за синтез молекули під назвою **опін** – унікальний і незвичайний продукт конденсації або амінокислоти й кетокислоти, або ж амінокислоти й вуглеводу. Опіни синтезуються й виділяються клітинами пухлини шийки кореня, і можуть бути використані *A. tumefaciens* (але не іншими ґрунтовими мікроорганізмами) як джерело карбону, а іноді й нітрогену завдяки тому, що бактерії містять Ті плазмиду з геном, відповідальним за катаболізм певного опіну. Гени катаболізму опіну знаходяться на Ті плазміді, але не в ділянці Т-ДНК.

Отже, еволюційно розвинувся унікальний набір механізмів, завдяки якому кожен штам *A. tumefaciens* генетично змінює рослинні клітини, щоб перетворити їх на біологічні фабрики по виробництву карбонових сполук, які тільки ці бактерії зможуть використовувати.

Вектори на основі Ті плазмід. Найлегший спосіб використати здатність Ті плазмід генетично трансформувати рослини – **вставити бажану послідовність ДНК у регіон Т-ДНК** і потім застосовувати Ті плазмиду й *A. tumefaciens*, аби доставити й вставити ці гени в геном сприйнятливої рослинної клітини.

Хоча Ті плазмід є ефективними знаряддями в якості природних векторів, вони мають деякі **вагомі обмеження** як типові вектори для клонування:

1. продукція фітогормонів трансформованими клітинами, які ростуть у культурі, не дає їм розвинути до дорослих рослин. Тому необхідно видаляти гени ауксину й цитокінінів з усіх векторів на основі Ті плазмід;

2. ген, що кодує ферменти синтезу опіну, також не корисний для трансформантів, оскільки продукція цієї молекули спрямовує всі ресурси рослини на вищезазначений процес, що може зменшити кінцевий вихід продукту. Тому цей ген також має бути видалений;

3. Ті плазмідні великі (приблизно 180-210 т.п.н.). Однак для експериментів із рекомбінантною ДНК краще застосовувати менші конструкції, тому великі фрагменти ДНК, які неважливі для клонуючого вектора, мають бути видалені з плазмід;

4. не містять унікальних сайтів рестрикції, що ускладнює вставку чужорідної ДНК прямо в плазмід;

5. оскільки Ті плазмідні не здатні реплікуватися в *E. coli*, маніпуляції з ними в клітинах цієї бактерії є неможливими.

Аби подолати ці обмеження, були використані технології рекомбінантної ДНК, щоб сконструювати велику кількість векторів на основі Ті плазмід. Ці вектори однаково організовані й містять **наступні компоненти**:

1. **селективний маркер**, наприклад неоміцинофосфаттрансфераза, що надає трансформованим рослинним клітинам стійкості до канаміцину. Оскільки ген неоміцинофосфаттрансферази, як і багато інших селективних маркерів, що застосовуються для трансформації рослин, прокаріотичного походження, важливо помістити його під контроль рослинних (еукаріотичних) транскрипційних регуляторних сигналів, додаючи промотор та термінальну полі-А послідовність, щоб забезпечити ефективну експресію в трансформованих рослинних клітинах;

2. **ориджин реплікації**, що забезпечує реплікацію плазмід в клітинах *E.coli* (у деяких векторах також був доданий ориджин, що забезпечує реплікацію і в *A. tumefaciens*);

3. **крайова послідовність із правого боку Т-ДНК регіону**, яка необхідна для інтеграції Т-ДНК у ДНК рослинної клітини; хоча більшість векторів для клонування містять як праву, так і ліву крайові послідовності;

4. **полілінкер**, аби забезпечити інсерцію клонованого гена в регіон між крайовими послідовностями Т-ДНК.

Методами генетичної інженерії **створено рекомбінантні вектори на основі Ті плазміди**, які містять усі вищезазначені компоненти (рис. 3.22).

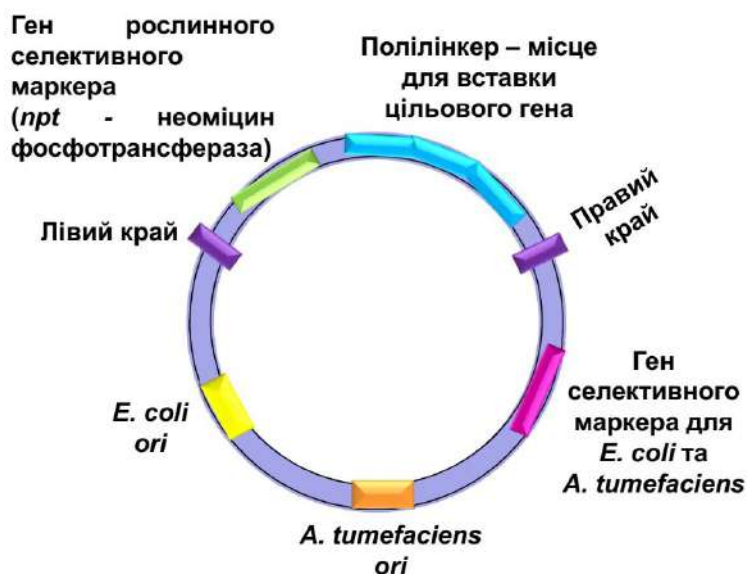


Рис. 3.22. Загальний вигляд рекомбінантного вектора на основі Ті плазміди. *E. coli ori* – ориджин для роботи в клітинах *E. coli*; *A. tumefaciens ori* – еукаріотичний ориджин. Пояснення в тексті. Адаптовано з [24]

Як видно на рис. 3.22, створений вектор **не містить *vir*-гени**. Отже, через відсутність цих генів були потрібні **особливі стратегії** доставки рекомбінантних плазмід у рослинні клітини:

1. **Бінарна векторна система:** використовуються 2 плазміди – **основна** (несе цільову вставку; є по суті човниковим вектором) та **допоміжна** (дефектна хелперна або «обеззброєна» (defective or disarmed (англ.)) плазміда, яка сприяє інтеграції в геном рослини. Усі початкові етапи клонування проводяться в клітинах *E. coli*, після чого плазміда переноситься в клітини агробактерій, що містять дефектну Ті-плазмідку, яка допомагає інтегрувати цільовий ген у геном рослини (рис. 3.23);

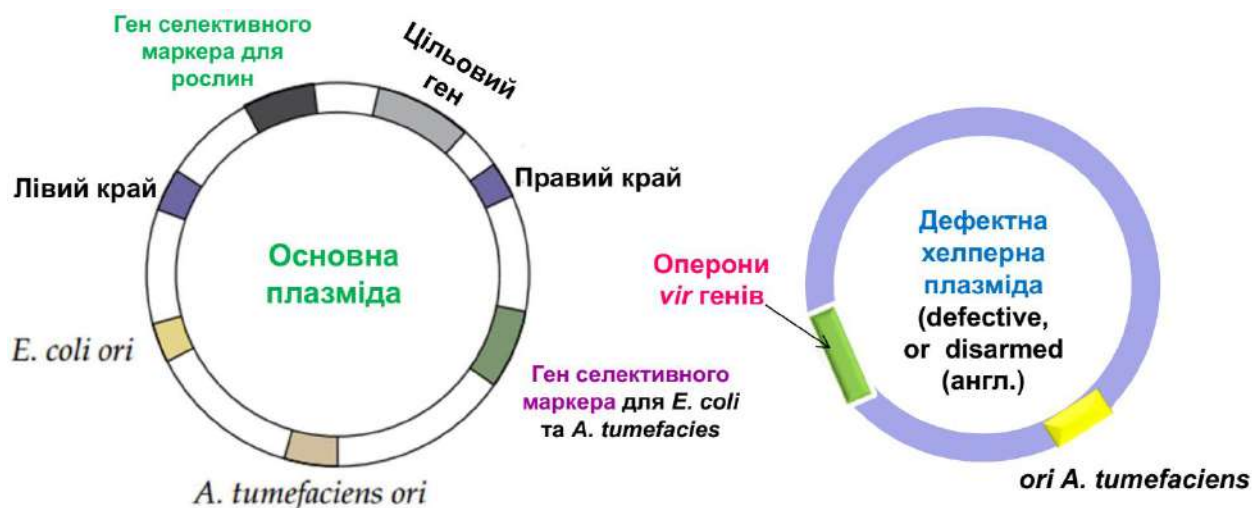


Рис. 3.23. Загальний вигляд бінарної векторної системи на основі Ti плазмід. *E. coli ori* – ориджин для роботи в клітинах *E. coli*; *A. tumefaciens ori* – еукаріотичний ориджин. Пояснення в тексті. Адаптовано з [24]

2. **Коінтегрована векторна система** нагадує попередню, але в цьому випадку відбувається фізичне об'єднання векторів: як **коінтегруючого вектора для клонування**, так і **дефектної плазмід** з утворенням **рекомбінантної плазмід** (рис. 3.24).

У багатьох випадках було б бажано трансформувати рослини деякими чужорідними генами, наприклад такими, що кодують цілий біохімічний каскад реакцій. Хоча цей підхід усе ще широко не використовується та знаходиться в стадії розробки, тим не менш, можна вносити велику кількість чужорідної ДНК у клітини рослин. Хоча ефективність трансфекції низька, рослини були успішно трансфіковані великими фрагментами ДНК розміром від 30 до 150 т.п.н.

Окрім цього, було показано, що під час трансфекції рослини за допомогою *Agrobacterium* виділяється етилен, що значно зменшує ефективність перенесення генів у рослинний геном. У той же час, внесення гена-інгібітора синтезу етилену, який кодує аміноциклопропан-1-карбоксилатдеаміназу, підвищує частоту трансфекції для великої кількості різних рослин.

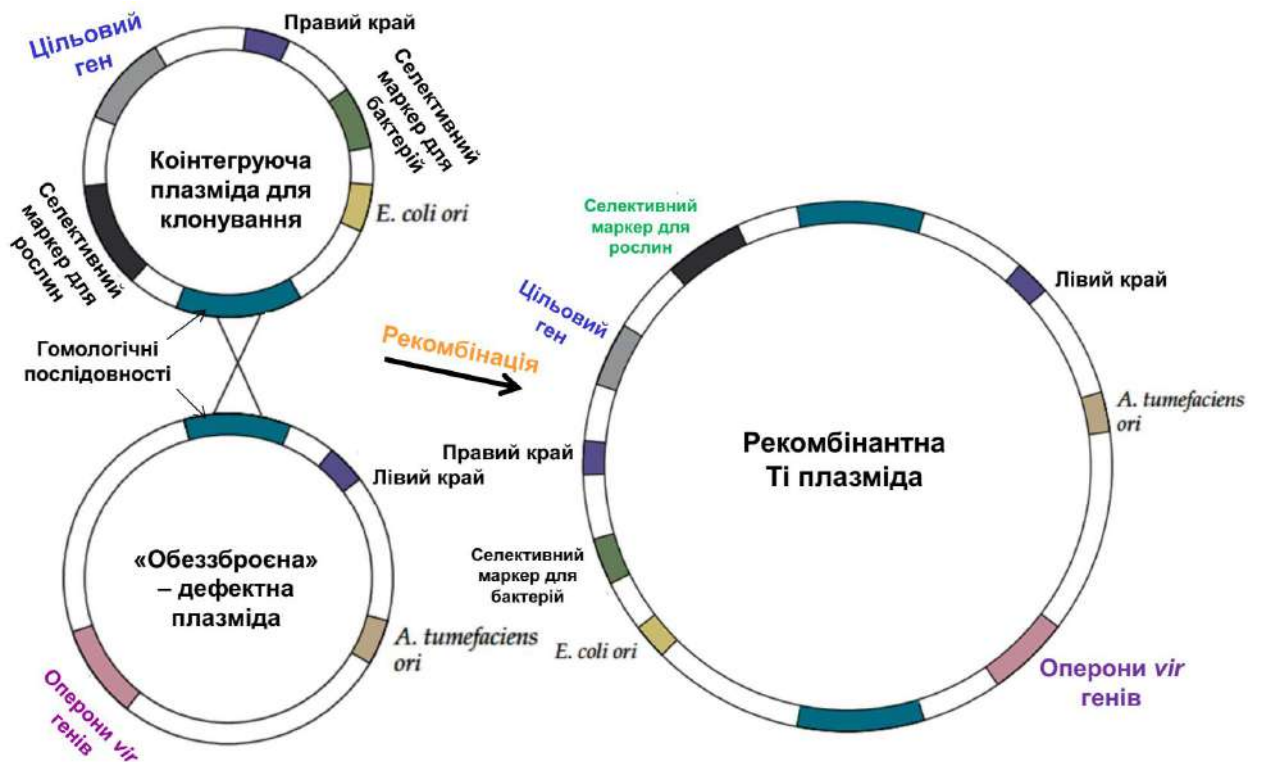


Рис. 3.24. Загальний вигляд коінтегрованої векторної системи на основі Ті плазмиди. *E. coli ori* – ориджин для роботи в клітинах *E. coli*; *A. tumefaciens ori* – еукаріотичний ориджин. Пояснення в тексті. Адаптовано з [24]

Модифікації векторних систем. Як показала практика, бінарні вектори є дещо завеликими для зручної роботи в умовах *in vitro*, окрім того, через великі розміри в них мало унікальних сайтів рестрикції. Було проведено модифікацію та створено **міні-вектори**, приклад одного з них наведено на рис. 3.25. Як видно з рисунка, більше ніж половина елементів може бути вилучена, але вектор усе ще буде повністю функціональним.

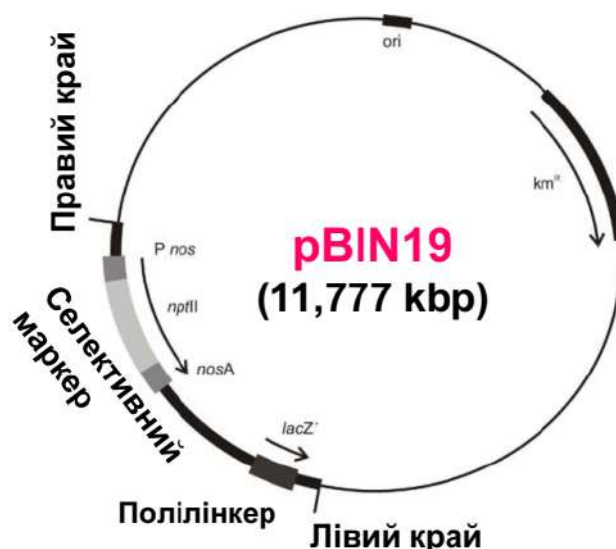


Рис. 3.25. Загальний вигляд міні-вектора pBIN19. Пояснення в тексті. *ori* – ориджин для роботи в клітинних *E. coli*; *km^R* – ген стійкості до канаміацину; *lacZ'* – 5'-частина послідовності гена лактозного оперону, що кодує N-фрагмент β-галактозидази; *nptII* – ген неоміцинофосфотрансферази II; *P nos* – нопаліновий промотор; *nptII* – ген неоміцинофосфаттрансферази II; *nosA* – сигнал поліаденілювання мРНК. Адаптовано з [36]

Різновиди *Agrobacterium*-опосередкованої трансфекції. Незважаючи на те, що системи трансформації, опосередковані *A. tumefaciens*, ефективні в деяких видах, **однодольні рослини**, включно з головними світовими зерновими культурами (рис, кукурудза та пшениця) не так легко трансфекувати за допомогою *A. tumefaciens*. Однак, завдяки певним підходам по оптимізації та вдосконаленню класичних методик були розроблені протоколи для трансформації й таких рослин, і навіть водоростей.

Також, збираючись трансформувати новий вид рослини, необхідно визначити, які саме штам *Agrobacterium* і ті плазміді найкраще підходять для цієї конкретної рослини. Крім того, було виявлено, що, модифікуючи умови культивування тканин шляхом додавання антиоксидантів під час трансформації винограду, рису, кукурудзи або сої, можна збільшити частоту трансфекції цих рослинних клітин. На сьогодні, за допомогою *Agrobacterium*

можна трансформувати сім'ядольні листки, калус, протопласти та суспензійні культури.

Нижче, як приклад, наведено ключові етапи *Agrobacterium* – опосередкованої трансфекції томатів. Трансформація томатів синтетичною ізоформою *cry* генів була проведена за використання штаму *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404, який здатний інфікувати й переносити послідовності Т-ДНК у геном більшості дводольних рослин. У штамі було клоновано плазмідний вектор pRD400 (рис. 3.26), який містив вставку синтетичної ізоформи гена *cry1C* (Cry-токсини – Bt білки). Стійкість до канаміцину трансформованого організму забезпечував вбудований ген неоміцинофосфотрансферази II (*nptII*).

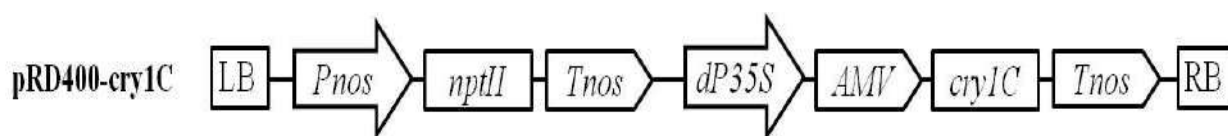


Рис. 3.26. Загальна схема плазмиди pRD400 із вставкою гена *cry1C* – pRD400-*cry1C*. LB та RB – лівий та правий край Т-ДНК; *Pnos* – нопаліновий промотор; *nptII* – ген неоміцинофосфаттрансферази II; *Tnos* – термінатор нопалінсинтетази; *dP35S* – промотор вірусу мозаїки цвітної капусти; *AMV* – ампліфікатор трансляції вірусу мозаїки люцерни; *cry1C* – синтетична ізоформа *cry* генів. Запозичено з [57]

На рис. 3.27, як приклад, наведено детальну схему ключових етапів *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації рослин, які починаються підготуванням насіння шляхом стерилізації та завершуються висадкою пагонів, трансформованих за допомогою агробактерій із відповідною плазмідною, у ґрунт. Як видно на рисунку, використовуються **експланти** – група клітин, відокремлена від материнського організму (вони використовуються в біологічних дослідженнях, пов'язаних із мікроклональним розмноженням рослин; у дводольних рослин, експлантами можуть бути, наприклад, частини гіпокотилів, стебел, коренів, сім'ядолі тощо).

Потрібно відмітити, що тривалість ко-культивування експлантів з *Agrobacterium* може становити від 1 до 5 діб, проте в більшості випадків складає від 48 до 72 год. Ко-культивування більше 5 діб може призводити до надмірного розвитку бактерії, пригнічення регенерації та подальшої загибелі експлантів.

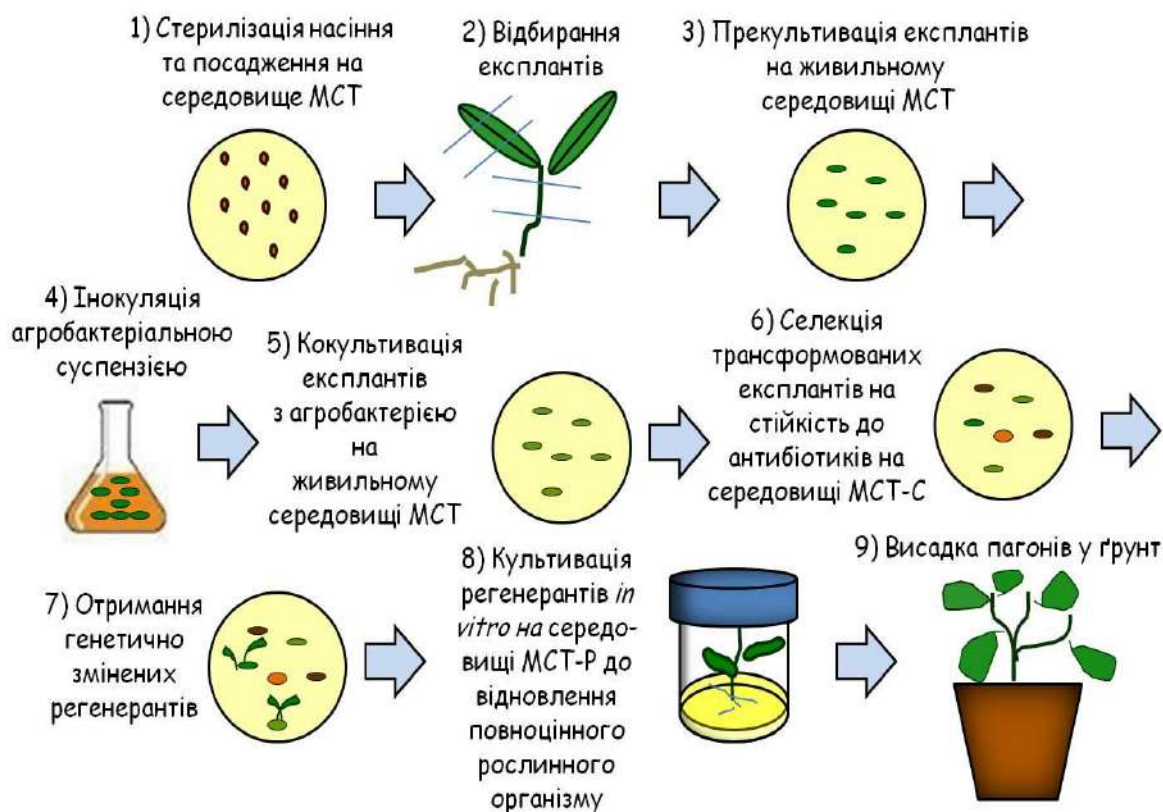


Рис. 3.27. Ключові етапи *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації томатів. МСТ, МСТ-Р – спеціальні поживні середовища. Адаптовано з [57]

Ri плазмід *Agrobacterium rhizogenes*. *A. rhizogenes* аналогічно до *A. tumefaciens* володіє здатністю інфікувати рослини, однак, на відміну від неї, містить **Ri плазмиду** (Root inducing (англ) – стимулювання коренів) та викликає утворення «бородатих коренів» («волохатих»), які слугують відповідним маркером (рис. 3.28). Отже, для плазмідних векторів на основі цієї плазмиди не потрібні інші маркери.



Рис. 3.28. Приклади утворення «бородатих коренів» *Agrobacterium rhizogenes*. Пояснення в тексті. Запозичено з [82]

Рі плазміда містить 24 гени вірулентності (*vir*) і щонайменше 11 відкритих рамок зчитування, подібних до еукаріотичних, які мають необхідні елементи промоторів та сигнали поліаденілювання (рис. 3.29).

Ці гени не мають відомих гомологій, також присутня Т-ДНК *A. tumefaciens*.

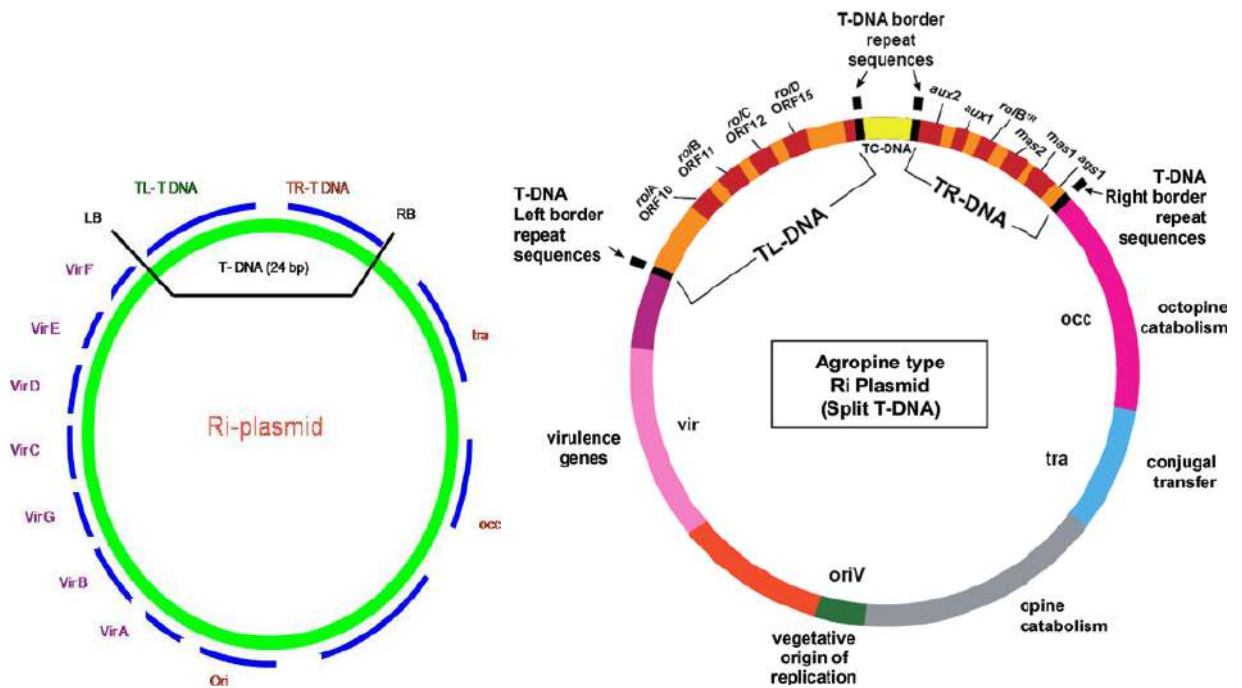


Рис. 3.29. Загальний вигляд Ri плазміди, зокрема Т-ДНК ділянки.

Пояснення в тексті. LB та RB – лівий та правий краї лівої та правої Т-ДНК, розділеної послідовністю повторів; *occ* – гени катаболізму опінів; *tra* – ділянка, що відповідає на транспортні/кон'югативні властивості; *vir* – гени вірулентності; *ori* – ориджин реплікації. Запозичено з [72]

Вектори на основі Ri-плазміди. Першочергово ці вектори використовувалися для трансформації в тих випадках, коли виникали складнощі при регенеруванні цілою рослини з окремих клітин. Рослини багатьох видів можуть регенерувати з культури коренів, індукованих *A. rhizogenes*. Також часто *A. rhizogenes* можна використовувати для введення в рослину бінарних векторів, що містять додаткову Т-ДНК.

Взаємодію *A. rhizogenes* із різними видами рослин, типами тканин і конкретними органами чи окремими частинами активно досліджують, заражаючи листя, стебла, черешки, сім'ядолі, верхівкові пагони, корені, бульби й протопласти. Основна проблема використання *A. rhizogenes* – поява в регенерантів фенотипових змін, спричинених активністю Т-ДНК Ri плазміди.

Однак можливе використання цього підхода трансформації саме для отримання культури «бородатих» коренів із метою її використання в якості біопродуцента. Так, було показано використання білків і вторинних метаболітів, утворених із культури волохатих коренів, для детоксикації забрудненого навколишнього середовища, а також задля підвищення посухостійкості різних рослин.

Окрім цього, іншим несподіваним практичним застосуванням стала можливість **модифікації декоративних сортів рослин**. Зазвичай, фенотипові зміни у регенерантах є негативною рисою *A. rhizogenes* опосередованої трансформації, однак її використання може мати сенс для отримання нових форм декоративних культур. Встановлено, що фенотипові зміни викликають *rol* гени, які знаходяться в Т-ДНК *Ri* плазмід. Так, ген ***rol-A*** викликає формування вкорочених «кущистих» пагонів, зморшкуватих листків та специфічну морфологію квіток. ***Rol-B*** викликає підвищений ріст та від'ємний геотропізм коренів; ***rol-C*** – формування рослин із вкороченими міжвузлями, підвищеним апікальним домінуванням, ланцетоподібними листками, дрібними квітами та зниженою фертильністю. ***Rol-D*** відповідає за формування пост-ембріональної меристеми та додаткових бутонів.

3.4.2. Методи доставки чужорідної ДНК

Особливості рослин як об'єкта модифікації. На сьогодні, існують генетичні модифікації понад 150 видів рослин. Генні модифікації дозволяють суттєво скоротити затрати часу та грошей на створення нових сортів.

Перед тим, як розпочати застосовувати різні трансфекційні методи, потрібно пам'ятати, що 1) рослинному організму притаманна **тотипотентність** – здатність клітини шляхом поділу дати початок будь-якому клітинному типу організма; 2) **наявність клітинної стінки** (вона є істотною перешкодою для трансформації, тому частіше працюють із **протопластами**

(рослинна клітина містить лише клітинну мембрану й протоплазму)) і **пластид** вимагає використання специфічних підходів або модифікації вже існуючих; або, з іншого боку, надає певні переваги, про що йтиметься далі.

Коли труднощі при трансформації деяких видів рослин за допомогою *A. tumefaciens* уперше стали очевидними, було розроблено низку процедур, які могли діяти як альтернатива цього методу трансфекції. Однодольні рослини раніше вважалися стійкими до *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації оскільки вони не виділяють із пораних тканин ацетосирінгон – специфічну фенольну сполуку, яка активує гени вірулентності Ti-плазмиди у агробактерій. Тому, щоб вирішити цю проблему, ацетосирінгон та/або відповідні антиоксиданти безпосередньо додають в середовище для ко-культивування рослинних клітин і бактерій.

Потрібно зазначити, що деякі із вищезазначених методів **вимагають видалення клітинної стінки рослини для утворення протопластів** (табл. 3.4). *In planta*, чи *in-planta* (від англ. plant – «рослина»), – це термін, що означає метод прямої трансфекції рослин. Він є корисним для тих рослин, в яких відсутня тканинна культура та система регенерації. Безперечною перевагою трансформування *in planta* є: отримання великої кількості трансгенних рослин та накопичення високої концентрації загального розчинного білка за короткий час.

У цілому, відомо декілька варіантів використання методу трансформації *in planta*, такі як вакуумна інфільтрація, мікроін'єкції суспензією *Agrobacterium*, «pollen tube pathway» та «floral dip». Найбільш поширений – спосіб вакуумної інфільтрації, суть якого полягає у зануренні рослинної тканини в суспензію агробактерії, які далі піддають дії вакууму, що робить клітини рослин більш сприйнятливими до агробактерії (застосовувався для трансформації цукрової тростини). У випадку пшениці ефективним був метод «pollen tube transformation», який може бути здійснений трьома способами: мікроін'єкціями, прямим нанесення Т-ДНК на маточку та запиленням квіток пилком, попередньо обробленим агробактерією. Окрім цього методу, для

трансформації пшениці *in planta* використовують метод «floral dip» (просте занурення квіткових тканин у відповідний розчин, що містить *A. tumefaciens* тощо). Це досить простий, зручний у використанні та економний метод, який дозволяє уникнути бактеріальної контамінації експлантів, що характерно для культури тканин *in vitro*. Проте метод має деякі недоліки, зокрема відносно невисоку ефективність трансфекції, потребу у великій кількості рослинного матеріалу, відсутність конкретної тканини-мішені для трансформації, а також певну видову обмеженість.

Таблиця 3.4.

Переваги та недоліки різних методів трансфекції рослин

Метод	Особливості
Перенесення у складі Ті плазміди: лабораторна інфільтрація через шприц або вакуумна інфільтрація (дія слабкого вакууму 10-20 с) <i>A. tumefaciens</i> – агроінфільтрація	Якісна та високоефективна система, але працює для обмеженого кола рослин (труднощі з однодольними). Але коштовна.
Бомбардування мікрочастинками	Дешевий та простий метод, що працює для широкого кола рослин.
Електропорація	Потребує протопластів, які можна регенерувати в повноцінну рослину.
Мікроін'єкція	Низька продуктивність методу; потребує висококваліфікованого персоналу.
Пряме перенесення генів у протопласти	Потребує протопластів, які можна регенерувати в повноцінну рослину.
Ліпофекція (Liposome fusion (англ.))	Потребує протопластів, які можна регенерувати у повноцінну рослину.

Вірусні вектори	Низькоефективний спосіб доставки генів у рослинні клітини.
На основі вірусних векторів: рекомбінантна вірусна ДНК (гени, відповідальні за інфекційність, реплікацію, складання вірусних частинок, видалені) і ген інтересу потрапляють за допомогою <i>A. tumefaciens</i> інфекції або вакуумної інфільтрації – « магніфекція », що є більш оптимальним підходом (рис. 3.30)	Транзйєнтна експресія. Не потрібні приміщення для вирощування рослин; система дуже ефективна та недорога, і її легко масштабувати. Регулювання вивільнення вірусних часток з агробактерій на стадії розробки.

Протопласти рослин можна підтримувати в культурі як клітини, що незалежно ростуть, або за допомогою спеціального поживного середовища можна формувати нові клітинні стінки та регенерувати цілі рослини.

Однак, завдяки оптимізації протоколів трансформації на основі Ті плазмід, так і внаслідок розроблення нового успішного методу – **бомбардування мікрочастинками**, інші методи трансформації рослин нині використовуються рідше.

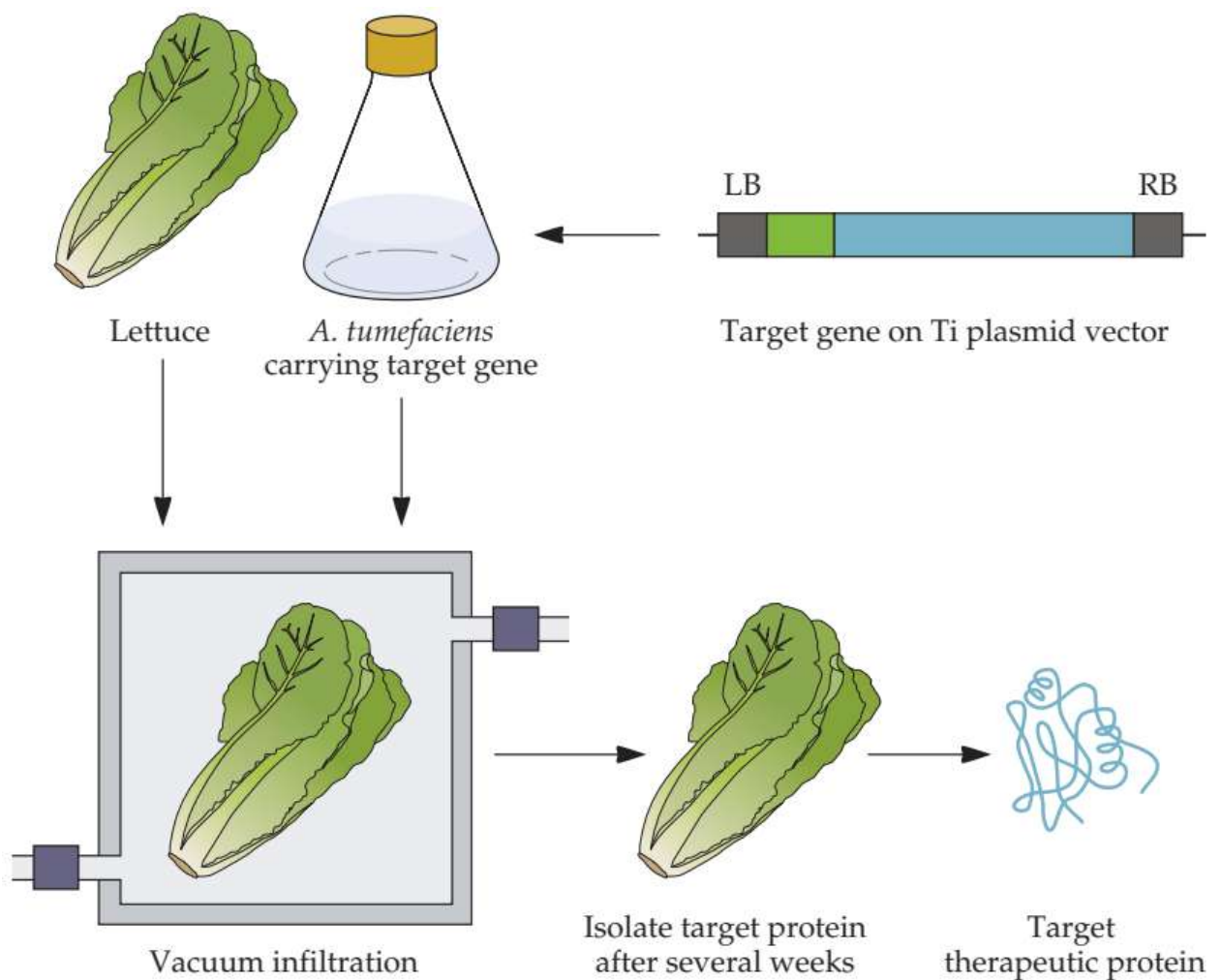


Рис. 3.30. Трансфекція головки салату Т-ДНК, що несе вірусну ДНК і специфічний цільовий ген, із використанням штаму *A. tumefaciens* та вакуумної інфільтрації. Після інкубації та вакуумної інфільтрації цільовий білок може бути вилучений із транзійтно трансформованого салату протягом одного до кількох тижнів. LB і RB, лівий і правий краї відповідно. Запозичено з [24]

Електропорація. До суспензії клітин короткочасно (4,6 мс) прикладається висока напруга (100-200 В), що призводить до формування тимчасових гідрофільних пор у мембранах задля потрапляння вільних цільових генів (рис. 3.31).

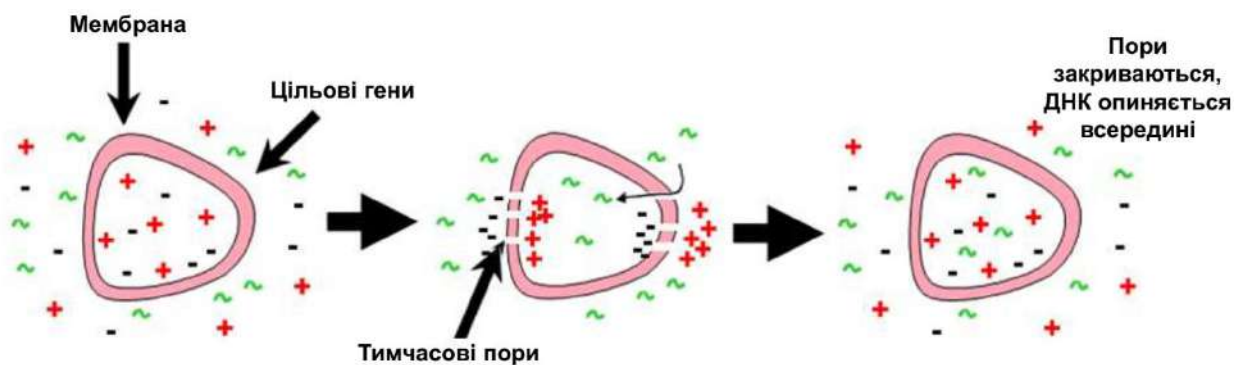


Рис. 3.31. Загальна схема перенесення цільових генів в рослинну клітина за допомогою електропорації. Пояснення в тексті. Адаптовано з [24]

Отже, на сьогодні, для доставки ДНК у клітини рослин найчастіше використовують **вектори на основі Ті плазмід** або бомбардування **мікрочастинками**. У світі велика кількість різних рослин була генетично трансформована саме за допомогою вищезазначених методів.

Бомбардування мікрочастинками (біолістика, біобалістика). Цей підхід є, безумовно, найважливішою альтернативою системам доставки Ті плазмідної ДНК до рослин. Осаджену ДНК (преципітація з CaCl_2 , спермідином або поліетиленгліколем) наносять на сферичні мікрочастинки (0,4-1,2 мкм у діаметрі або приблизно як розмір деяких бактеріальних клітин) золота або вольфраму, які за допомогою спеціального приладу – **«генної гармати»** – вистрілюються ($V = 300\text{-}600$ м/с) у рослинний матеріал (рис. 3.32). Оригінальна версія «генної гармати» використовувала невелику кількість порошу для забезпечення рушійної сили. Сучасний пристрій використовує гелій під високим тиском як джерело руху частинок.

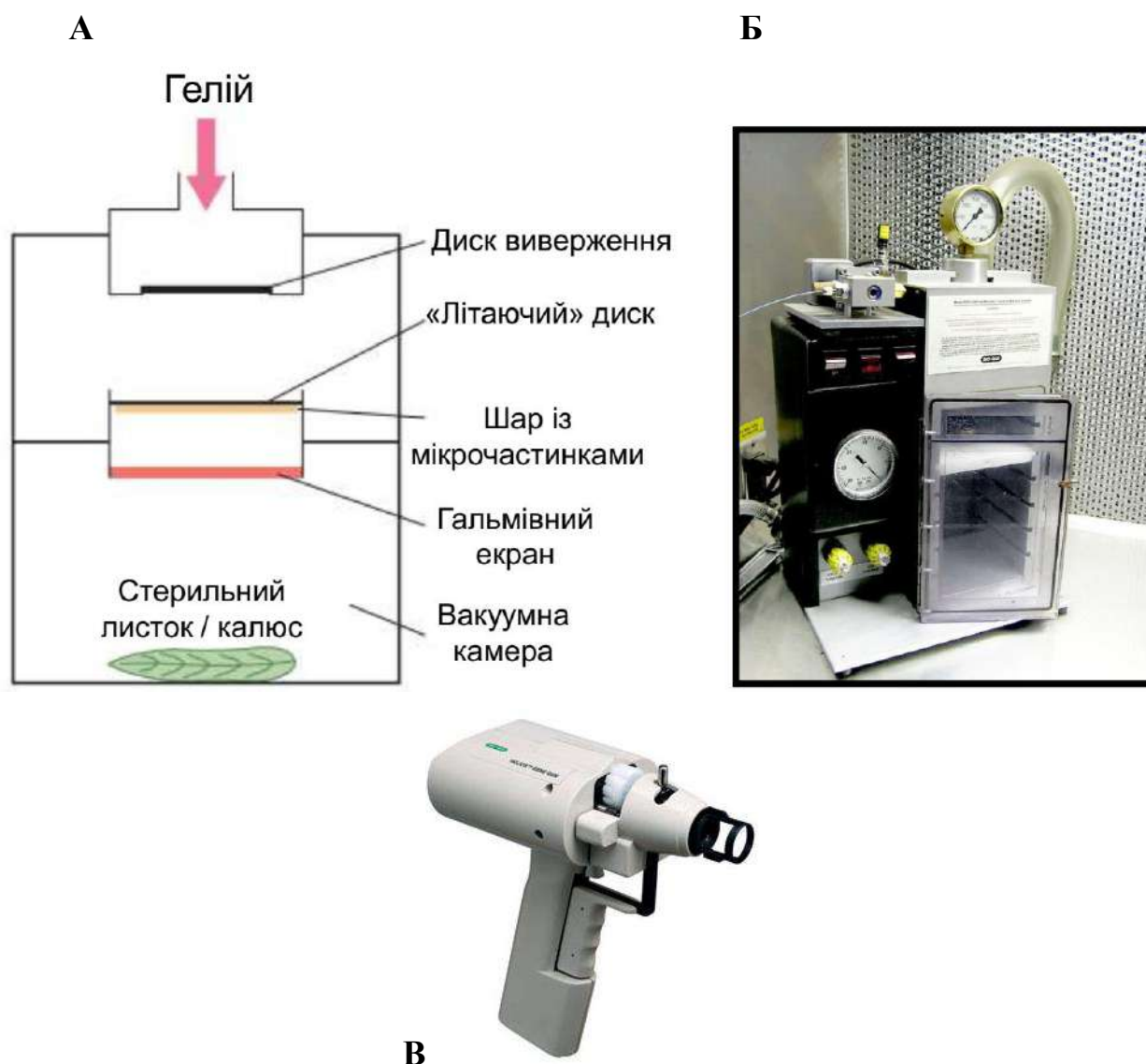


Рис. 3.32. Схема (А) та приклади біолістичних приладів (стаціонарний (Б) та портативний (В)). Коли тиск гелію наростає до певної межі, пластиковий диск виверження лопається, і газ, що виділився, розганяє «літаючий диск» із золотими частинками, покритими ДНК, на його нижній стороні. Частинки золота проходять запірний екран, який стримує «літаючий диск», і проникають у клітини стерильного листка. Адаптовано з [24] та запозичено з [37]

Такі покриті частинки можуть проникати крізь стінки та мембрани рослинних клітин; однак використовувана щільність частинок не завдає значної шкоди клітинам. Ступінь проникнення частинок у клітини рослини-мішені можна контролювати, змінюючи інтенсивність вибуху диска

виверження, змінюючи відстань, яку повинні пройти частинки, перш ніж досягти цільових клітин, або використовувати частинки різного розміру.

Потрапляючи всередину клітини, ДНК видаляється з частинок, а в деяких клітинах може навіть інтегруватися в ДНК рослини. Цей метод може використовуватися для введення чужорідної ДНК у **суспензії рослинних клітин, культури калюсу, меристематичні тканини, незрілі ембріони, колеоптилі, пилки** тощо у широкому діапазоні різних рослин, включно з однодольними та хвойними, які менш чутливі до *Agrobacterium*-опосередкованого перенесення ДНК. Крім того, цей підхід також використовується для доставки генів у **хлоропласти та мітохондрії**, дозволяючи введення екзогенних (чужорідних) генів у ці органели.

Як правило, плазмідна ДНК, розчинена в буферному розчині, осідає на поверхнях мікрочастинок. Використовуючи цю процедуру, можна збільшити частоту трансформації за рахунок збільшення кількості плазмідної ДНК. Однак занадто багато плазмідної ДНК може призводити до гальмування трансфекції. За допомогою біобалістики можна одержувати приблизно 10000 трансформованих клітин.

Клітини, які можуть бути трансформованими на підставі експресії маркерного гена, часто лише тимчасово експресують введену ДНК. Якщо ДНК не буде інтегровано в геном рослини, чужорідна ДНК зрештою деградує в клітині. Було встановлено, що трансформація ефективніша, коли використовується **лінійний вектор**, а не кільцева ДНК. Більше того, великі плазміди (>10 т.п.н.), на відміну від маленьких, можуть фрагментуватися при бомбардуванні мікрочастинками, і, отже, давати нижчі рівні експресії чужорідних генів.

Окрім цього, великі сегменти ДНК можуть бути введені в рослини з використанням **штучних хромосом дріжджів (YAC)**. YAC були сконструйовані таким чином, щоб вони містили й селективні маркери рослин, на доданок до вже заклонованих маркерів селекції дріжджів. YAC загальним розміром до 150 т.п.н. можуть бути перенесеними до рослинних клітин, у той

час як гени інтересу з таких векторів, у свою чергу, здатні **стабільно інтегруватися в рослинний геном**. Отжн, можливе отримання трансгенних рослин, що містять кілька чужорідних генів. Зокрема, **цілі біосинтетичні шляхи** можуть бути введені в рослинні клітини.

Інженерія хлоропластів. Середня рослинна клітина має 50-100 хлоропластів (їх білки кодуються ядерною та хлоропластною ДНК), у кожному з яких міститься 10-100 копій дволанцюгової кільцевої ДНК. Таким чином, у той час як одна копія чужорідного гена, вбудована в хромосомну ДНК рослин, присутня в одній копії на рослинну клітину, одна копія того ж гена, вставлена у ДНК хлоропластів, буде присутня в кількості від 500 до 10000 копій на рослинну клітину.

Наявність багатьох копій хлоропластної ДНК у кожній рослинній клітині передбачає, що набагато вищі рівні експресії чужорідного гена мають бути досягнуті, коли введений ген присутній як частина хлоропластної ДНК. Так, було показано, що цільовий білок (активний соматотропін людини) експресувався на рівні від 1 % до 7 % розчинного білка. Це в **10–100 разів вище рівня експресії білка**, який, зазвичай, отримується, коли чужорідна ДНК інтегрується в геномну ДНК рослин.

Хлоропласти успадковуються виключно по лінії жіночої статі (відсутні в пилку), що унеможлиблює нецільове поширення трансгенів, зменшуючи кількість занепокоєнь деяких критиків генної інженерії рослин.

Є 2 основні варіанти внесення генетично модифікованих продуктів у хлоропласти:

1) Введення чужорідних генів **безпосередньо в геном хлоропластів**. У цьому випадку чужорідна ДНК, як правило, вводиться в геном хлоропласта шляхом **бомбардування мікрочастинками з плазмідним вектором**, який має відповідну генетичну конструкцію.

Плазміда, як правило, містить як чужорідну ДНК, так і хлоропластний маркер селекції, фланкований специфічними послідовностями хлоропластної ДНК (рис. 3.33). Такі маркери селекції хлоропластів розроблені для експресії

тільки в хлоропластах, а не в цитоплазмі. Гомологічна рекомбінація є поширеним способом інтеграції ДНК у геном хлоропластів, і у цьому випадку інтеграція спрямована на ділянку ДНК, яка не кодує білки (міжгенна область).



Рис. 3.33. Загальний вигляд генетичної конструкції для ведення чужерідних генів безпосередньо в геном хлоропластів. Регуляторні послідовності, що контролюють експресію генів маркера селекції, не показані. 5'-НТД і 3'-НТД ділянки, що не транлюються. Пояснення в тексті. Адаптовано з [24]

2) Введення чужерідних генів (злитих із додатковими амінокислотами, які спрямовують транспорт білка до органел) **в ядерний геном** за допомогою системи *A. tumefaciens*-Ті плазміда.

Після синтезу рекомбінантного білка його можна транспортувати в хлоропласти за допомогою специфічного націлювального/транзитного пептида (рис. 3.34).



Рис. 3.34. Загальний вигляд генетичної конструкції для ведення чужерідних генів (злитих із Cp-транзитною послідовністю) в ядерний геном за допомогою системи *A. tumefaciens*-Ті плазміда. Пояснення в тексті. Запозичено з [24]

Повертаючись до **першого підходу**, потрібно зазначити, що ефективна експресія чужорідних генів у хлоропластах вимагає використання не лише відповідної (специфічної для хлоропласта) промоторної послідовності, а також наявності правильних послідовностей у ділянках, що не транлюються: 5'-НТД і 3'-НТД. Отже, потрібно заклонувати промотор, злитий на рівні ДНК із трансляційними контрольними послідовностями, які функціонують тільки в хлоропласті, а не в цитоплазмі, за яким слідує ген інтересу, а також і 3'-нетрансльована область хлоропласту, що містить структуру типу «стебло-петля», яка, як очікується, діятиме як сигнал термінації транскрипції. Додатковою перевагою вставки гена-мішені в хлоропластний геном є те, що оскільки транскрипція в хлоропластах є прокаріотичною, **кілька генів можуть бути введені одночасно як частина одного оперону**.

Так, за допомогою такого підходу було отримано дуже високий рівень експресії терапевтичного бактеріофаг-літичного білка (лізину), який діє як антибіотик проти патогенних бактерій (стрептококів групи А і групи В), у хлоропластах тютюну. Для забезпечення достатнього рівня експресії промотор був із генів хлоропластної рРНК. Також було введено лідерну послідовність, що була сильним сайтом зв'язування рибосом із бактеріофага Т7. Ген маркера селекції хлоропластів надавав стійкості до антибіотика спектиноміцину. Послідовності хлоропластної ДНК на плазмідному векторі забезпечували вставку гена інтересу шляхом гомологічної рекомбінації в міжгенну область хлоропластів. Конструкцію вводили в стерильне листя

тютюну шляхом біолистики. Отже, рекомбінантні білки можуть експресуватися з високим виходом у хлоропластах. Однак білки, синтезовані в хлоропластах, **не глікозильовані**, що є проблематичним для багатьох терапевтичних білків.

У той час як фотосинтетичні тканини, такі як зелене листя, містять хлоропласти, інші тканини містять інші типи пластид. Наприклад, плоди томата містять велику кількість **хромопластів**. Таким чином, так само, як чужорідна ДНК може експресуватися як частина генома хлоропластів, можна підібрати оптимальні умови для її експресії і в хромопластах.

Використання репортерних генів у трансформованих рослинних клітинах. Важливим компонентом успішної системи трансформації рослин є наявність відповідних маркерів селекції, які полегшують відбір та аналіз клітин із трансгенними хлоропластами. Більш того, при вивченні як регуляторних сигналів транскрипції рослин, так і функціонування цих сигналів у конкретних тканинах рослин (таких як листя, коріння та квітки) дуже часто є необхідним **кількісно визначити рівень експресії певного гена**, продукт якого, наприклад, буде мати ферментативну активність, яку легко візуалізувати. У цьому випадку **репортерні гени** – це гени, що кодують продукт, який легко піддається ідентифікації.

З цією метою, в якості гіпотетичних репортерів для трансформації, було протестовано ряд різних генів, зокрема такі, які можна використовувати як **домінантні маркери селекції**; і гени, білки яких **генерують специфічну реакцію при використанні відповідної системи детекції** (табл. 3.5).

Багато із цих репортерних генів є **бактеріальними**, тому їх було оснащено специфічними рослинними регуляторними послідовностями для експресії в рослинних клітинах. Селекція за домінантним маркером забезпечує прямий підхід для одержання лише трансформованих клітин у культурі. Наприклад, у присутності антибіотика канаміцину можуть зростати тільки ті рослинні клітини, які експресують ген неоміцінфосфотрансфери.

Таблиця 3.5.

Приклади генів репортерів і маркрів селекції, що використовуються в трансгенних рослинних клітинах. Адаптовано з [24]

Продукт гена – фермент	Селективний маркер	Репортерний ген	Продукт гена – фермент	Селективний маркер	Репортерний ген
Неоміцинофосфотрансфераза	+	+	Гігроміцинофосфотрансфераза	+	+
Дигідрофолат-редуктаза	+	+	Хлорамфеніколацетил-трансфераза	+	+
Гентаміцинацетил-трансфераза	+	+	Непалінсинтаза	-	+
Октопінсинтаза	-	+	β -глюкуронідаза	-	+
Стрептоміцинофосфотрансфераза	+	+	Резистентність до блеоміцину	+	-
Люцифераза комах	-	+	Люцифераза бактерій	+	+
Треоніндегідратаза	+	+	Металотіонеїн II	+	+
β -галактозидаза	-	+	Ацетолактатсинтаза	+	-
Бромоксиніл-нітрилаза	+	-	GFP (Green fluorescent protein, англ.)	-	+

Зрозуміло, коли експресія репортерного гена заважає нормальному функціонуванню рослини, його не можна використовувати. Окрім цього, наявність деяких репортерних генів та їх продуктів може зіпсувати комерційний продукт. У цьому випадку найкраще буде видалити репортерний ген після того, як було відібрано трансформанти з бажаними ознаками, особливо у сільськогосподарських рослин.

Деякі продукти репортерних генів, такі як β -D-глюкуронідаза (GUS), люциферази як світлячків, так і бактерій, а також зелений флуоресцентний білок (GFP), можуть бути виявлені *in situ* в інтактних тканинах рослин.

Однією з найпопулярніших таких систем є ген *uidA E. coli* (котрий кодує GUS). Ген GUS кодує стабільний фермент, який, зазвичай, не присутній у

рослинах і каталізує розщеплення ряду β -D-глюкуронідів. Активність GUS у трансформованих рослинних тканинах можна локалізувати за наявністю синього забарвлення, яке утворюється після гідролізу незабарвленого синтетичного субстрату 5-бром-4-хлор-3-індоліл- β -D-глюкуронової кислоти. В якості альтернативи активність GUS у рослинних екстрактах можна кількісно оцінити за допомогою флуориметричного аналізу, який включає гідроліз субстрату 4-метилумбелліферил- β -D-глюкуроніду з утворенням флуоресцентного продукту.

GFP є ідеальним маркером *in vivo* для моніторингу трансгенних рослин, оскільки він флуоресціює зеленим кольором при збудженні ультрафіолетовим або синім світлом і не вимагає додавання будь-яких субстратів чи кофакторів. Зазвичай, рослини дикого типу (які не містять гена GFP) флуоресціюють червонувато-фіолетовим кольором, коли вони опромінюються ультрафіолетовим або синім світлом. Більш того, були сконструйовані похідні гена, який кодує білок GFP, що мають інші спектральні властивості та підвищений рівень флуоресценції - потужніші модифікації. Важливо відзначити, що експресія GFP не впливає на виживаність та зростання трансформованих рослин у польових умовах.

3.4.3. Управління експресією рослинних геномів

Рослинні промотори. Упродовж років оригінальні дослідження проводились із **конститутивними сильними промоторами** (наприклад, **сильний промотор 35S вірусу мозаїки цвітної капусти**), тоді як зараз відомо та створено цілу низку сильних регульованих промоторів. Так, замість зазначеного промотора 35S, який експресується в усіх тканинах дводольних рослин (і меншою мірою в однодольних рослинах) і протягом усього життя рослини, дослідники використовували промотор для малої субодиниці фотосинтетичного ферменту рибулзобісфосфаткарбоксилази, який активний лише у фотосинтезуючих (зелених) тканинах, таких як листя.

Аналогічно, промотори рослин, активні лише в певних тканинах (коріння, насіння або квіти) або під час стресу (промотори, зв'язані з патогенезом), використовувалися для контролю експресії деяких чужорідних генів. Щоб звести до мінімуму будь-який можливий шкідливий вплив експресії чужорідних генів на ріст рослин, необхідно регулювати експресію введених генів, просторово та в часі, а також кількість виробленого чужорідного білка.

У рослинах для забезпечення **ініціації транскрипції** РНК-полімераза II, так само як і бактеріальна РНК-полімераза, потребує загальних факторів ініціації (спеціалізованих білків, що сприяють або заважають такому зв'язуванню), зокрема **факторів транскрипції та/або білків, що зв'язуються з енхансерами** (рис. 3.34).

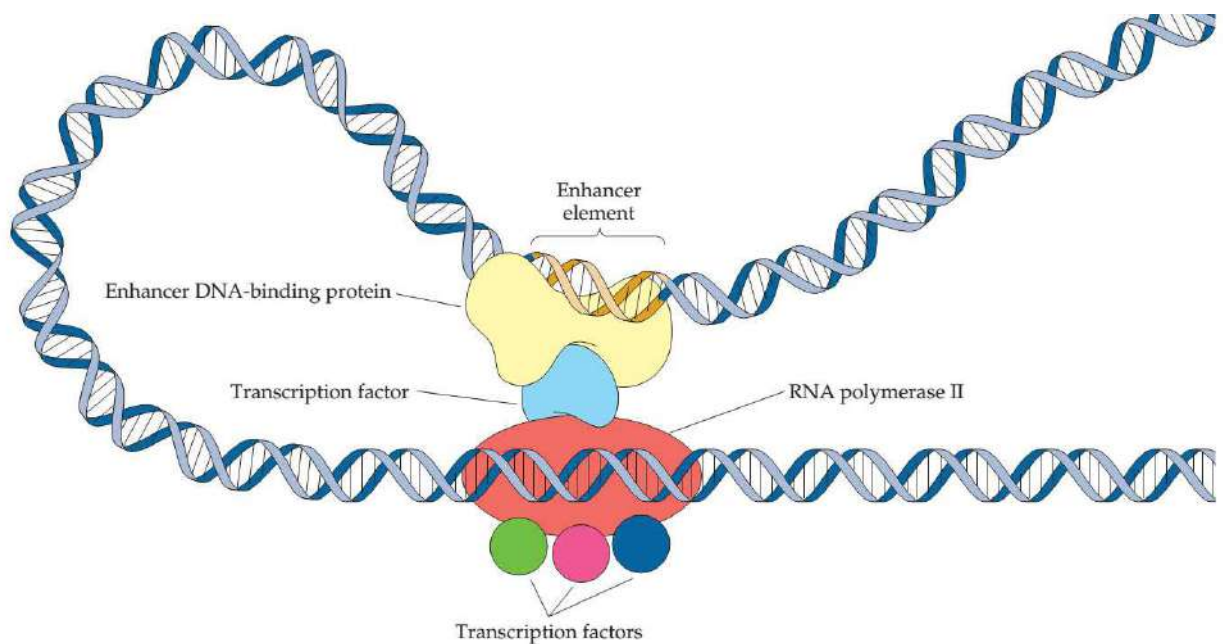


Рис. 3.34. Схематичне зображення рослинного комплексу транскрипції РНК. У комплекс входить РНК-полімераза II, зв'язана з ТАТА боксом (суттєва частина еукаріотичного промотора), різні фактори транскрипції, пов'язані з полімеразою, та енхансер-зв'язувальний білок, з'єднаний з енхансерним елементом на ДНК, який знаходиться на деякій відстані від промоторної послідовності. Запозичено з [24]

Енхансерними елементами є ділянки ДНК, які зв'язуються з енхансер-зв'язувальними білками, що, у свою чергу, взаємодіють із факторами транскрипції та РНК-полімеразою, задля підвищення рівня транскрипції з певного промотора. Енхансерні послідовності, зазвичай, вважаються важливими детермінантами тканинної експресії генів у певні проміжки часу. Незважаючи на те, що важливість послідовностей промоторів та енхансерів була визнана, досі відсутнє повне розуміння того, як ці та інші елементи регулюють експресію генів рослин.

Тим не менш, аналізуючи безліч різних промоторів, вчені змогли підібрати певні підходи як для **тканино-специфічної експресії генів**, так і експресії генів на досить високому рівні.

3.4.3.1. РНК-інтерференція

Введення дволанцюгової РНК у тваринну або рослинну клітину може знизити рівень синтезу певного білка, закодованого в послідовності РНК-мішені (комплементарної до доданої дволанцюгової РНК). Це **«мовчання генів» (нокдаун)**, яке може специфічно знижувати концентрацію мРНК-мішені до 90 %, є оборотним, оскільки не відбувається змін у вмісті або складі ДНК клітин-мішеней. Це явище отримало назву **РНК-інтерференції (РНКі; (англ. RNA interference, RNAi)** і зустрічається практично у всіх еукаріотів.

Хоча, на сьогодні, різні біологічні ролі РНК-інтерференції ще повністю не висвітлені, наявні дані вказують на те, що РНК-інтерференція захищає як тварин, так і рослини від вірусів та від накопичення транспозонів (**транспозон** – це послідовність ДНК, здатна вбудовуватися в нове положення у геномі).

На рисунку 3.35 наведено загальну схему функціонування РНКі, яку було розроблено з урахуванням численних експериментів. Так, після введення дволанцюгової молекули РНК у клітину ця РНК розщеплюється **ферментом Dicer**, подібним до РНКазы III, на одноланцюгові фрагменти РНК довжиною

приблизно від 21 до 23 нуклеотидів, які називаються **малими інтерферуючими РНК (міРНК, англ. siRNA)**.

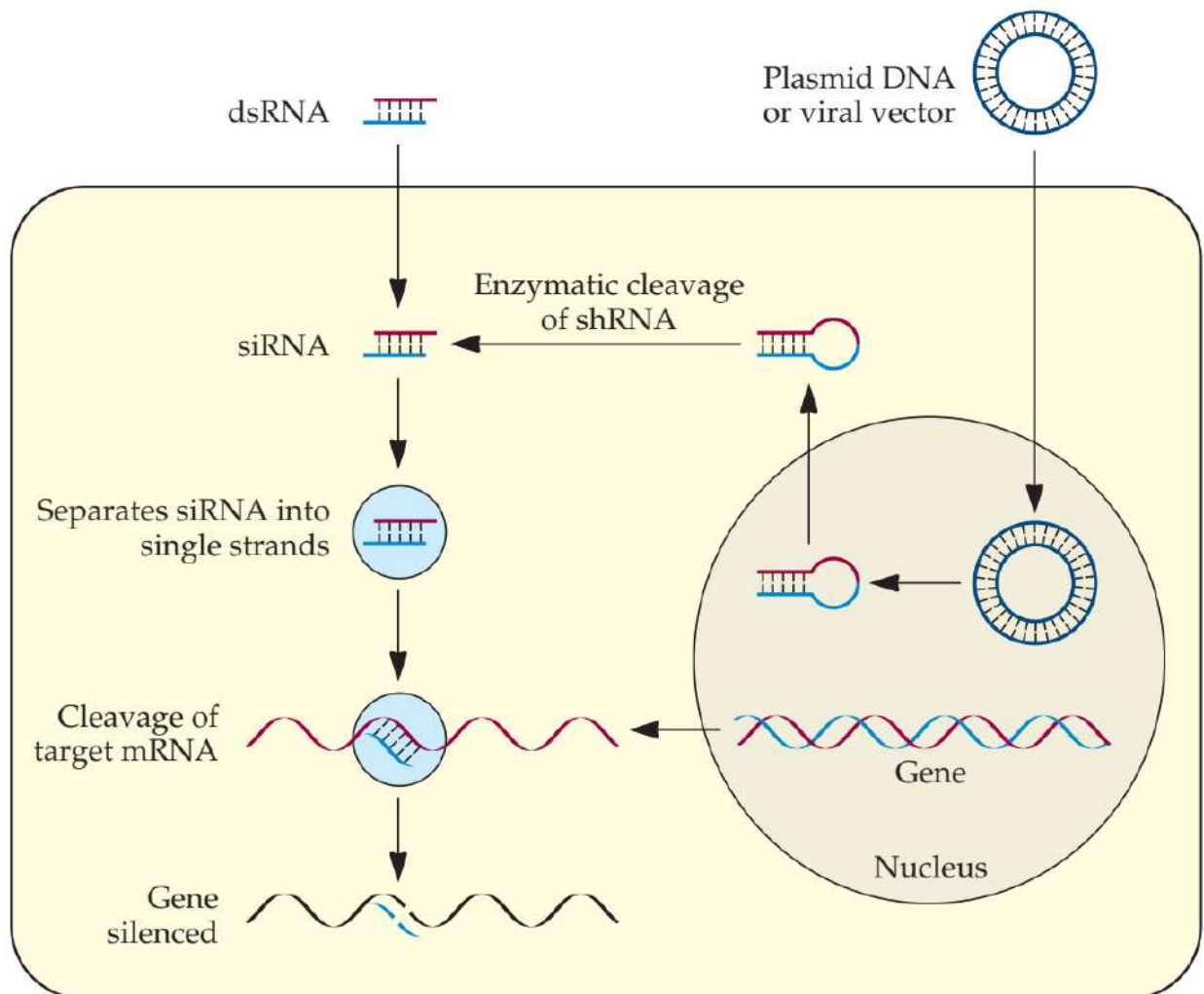


Рис. 3.35. Схематичне зображення пригнічення експресії специфічного гена за допомогою міРНК (мала інтерферуюча РНК, siRNA) або shРНК (shRNA, мала шпилькова РНК), яка розщеплюється на міРНК ферментом Dicer. Цільовий ген у ядрі позначений як «Gene». Цільова мРНК (target mRNA) розщеплюється RISC. dsRNA, дволанцюгова РНК. Запозичено з [24]

Антизмістовий ланцюг міРНК залучений до **РНК-індукованого комплексу сайленсингу (RISC – RNA-induced silencing complex)**, який містить кілька інших білків, зв'язується з мРНК, а потім розщеплює її. Специфічне зв'язування міРНК із мРНК засноване на комплементарності двох

послідовностей РНК. Сайт розщеплення мРНК-мішені знаходиться між нуклеотидами 10 і 11 щодо 5'-кінця напрямного (антизмістового) ланцюга міРНК.

Незважаючи на те, що багато аспектів РНКі до кінця ще не вивчені, цей підхід може стати основою для розробки нових терапевтичних агентів. Використання **коротких дуплексів РНК або плазмід, що кодують малі РНК, які утворюють шпильки (малі шпилькові РНК - мшРНК, shRNA (англ.), штучно розроблені молекули РНК), і здатні бути процесованими з утворенням міРНК (рис. 3.35), може, зрештою, забезпечити альтернативний підхід до пригнічення генів порівняно з використанням антизмістових олігонуклеотидів або рибозимів.**

Слід зазначити, що такі **мшРНК насправді є одноланцюговими РНК**, згорнутими самі по собі в структуру, подібну до шпильки (структура типу «стебло-петля»), яка містить як одноланцюгові, так і дволанцюгові ділянки.

Вчені сподіваються, що вищеописаний феномен РНКі сприятиме розробці широкого спектру противірусних сполук і методів лікування з використанням специфічних міРНК, які можна буде доставити до відповідної клітини-мішені.

Аналогічно, експресія ендегенних генів еукаріотів може бути пригнічена плазмідною експресією мшРНК, які за структурою подібні до **мікроРНК** (зазвичай регулюють експресію генів в еукаріотичних клітинах). У цьому випадку **фермент Dicer** спочатку видаляє петлю шпильки із мшРНК, щоб перетворити її на міРНК. На сьогодні, існує ряд повідомлень про використання міРНК або мшРНК для пригнічення реплікації вірусу в культурі тканин та *in vivo*.

На відміну від міРНК, **мшРНК експресуються *in vivo* як частина генетичної конструкції, яка містить промоторну послідовність.** Це означає, що мшРНК необхідно вводити за допомогою стратегій, відмінних від тих, що використовуються для міРНК.

Таким чином, мшРНК, як правило, доставляються до клітин-мішеней за допомогою **вірусних векторів**. Вірусні вектори, зокрема **лентивіруси**, які інтегруються в хромосомну ДНК, зазвичай використовуються, коли потрібний стійкий і тривалий нокдаун експресії генів.

До появи ГМР для **боротьби з комахами**, які шкодять культурам рослин, використовували хімічні пестициди, які є відносно дорогими та потенційно небезпечними. **Біологічні інсектициди**, як було зазначено вище, є зазвичай високо специфічними до певних видів комах, безпечні для людей та інших вищих ссавців.

Однак, все частіше науковці стикаються з проблемою, що за великого використання Bt технологій у рослин виробляється резистентність до цього токсину, саме тому розробляються стратегії запобігання виробленню у комах резистентності до Bt токсину:

1) **Вирощування на полі 20 % нетрансгенних культур**. На 80 % поля вирощуються трансгенні культури, де 99,9 % комах не виживає. На інших 20 % виживає набагато більше комах, у яких відсутні гени резистентності. Тож принцип полягає в тому, що гени резистентності втрачаться при багаторазових схрещуваннях комах на одному полі;

2) **Використання двох (наприклад, Cry1Ac + Cry2A тощо) або більше Bt токсинів в одній рослині** (іноді називають **стекінгом генів**), або злиття частин активних ділянок двох різних генів токсинів для створення нових гібридних білкових інсектицидних токсинів. Резистентність одразу до двох токсинів є менш вірогідною;

3) **Трансформація рослин одночасно двома шляхами**. Bt токсин та інший біологічний інсектицид. Це, наприклад, може бути **інгібітор α -амілази**; **інгібітори протеаз (трипсин), лектини; холестеролоксидаза** (руйнує епітеліальну мембрану середньої кишки комах, таким чином вбиваючи їх). Рослини в ході еволюції здобули свої власні механізми захисту від комах, але в природі вони не є такими сильними та ефективними, тому було розроблено ряд стратегій, які ґрунтуються на принципах природної резистентності рослин до

комах. Рослинний ген резистентності ізолюють, додають сильний промотор і створюють трансгенну культуру рослин, яка продукує високі рівні захисних білків, наприклад, інгібіторів протеаз. Після того, як комаха проковтнула один із цих інгібіторів, вона не здатна перетравлювати їжу (рослини), оскільки інгібітор перешкоджає гідролізу крохмалю або рослинних білків. Таким чином, комаха буде менше харчуватися і з часом загине (зокрема, для підвищення безпеки, ген можна клонувати в тканини рослин, які не вживаються людиною в їжу). Ця стратегія передбачає, що стійкість до двох абсолютно різних методів контролю навряд чи розвиватиметься одночасно.

4) **Поєднання хімічних і біологічних методів.** Створення трансгенних рослин з геном Bt токсину, але додаткове розприскування невеликих кількостей хімічних інсектицидів.

5) **Експресія токсину у трансгенних рослин протягом короткого періоду** – специфічні індукцйбельні промотори - це повинно знизити тиск відбору для стійких комах.

6) **Розробити підходи на основі характеристик підвиду *israelensis* B. *thuringiensis* (B. *thuringiensis* subsp. *israelensis*).** Адже бактерії цього підвиду є високоефективними патогенами комах, можливо, тому, що містять не лише кілька інсектицидних білків, але також білок, який діє як рецептор для цих інсектицидних білків.

7) **Збільшення зв'язування інсектициду з цільовим клітинним рецептором кишечника за допомогою створення злитого білка,** що зменшує ймовірність набуття резистентності.

Не зважаючи на досить ефективні підходи стратегії запобігання вироблення у комах резистентності до Bt токсину, на сьогодні, досліджуються більш новітні методи.

Тому, **ін'єкції чи мікроін'єкції дволанцюгової РНК (РНКі)** в організм комах і деяких хробаків можуть бути використані для замовчування в них певних генів.

Було проведено дослідження, де 290 різних дволанцюгових РНК, які відіграють важливу функцію в комах, були синтезовані з використанням спеціальної комерційної системи транскрипції *in vitro*, а потім введені (згодовані) личинкам західного кукурудзяного жука (*Diabrotica virgifera* LeConte). Було виявлено, що 67 вищезазначених РНК заінгібували ріст комах, деякі навіть мали летальну дію. На основі цих досліджень було створено трансгенну культуру кукурудзи, яка експресувала одну з дволанцюгових РНК (вбудовану в Ті-плазмідний вектор), націлену на **транскрипт вакуолярної АТФази цього жука** (рис. 3.36).

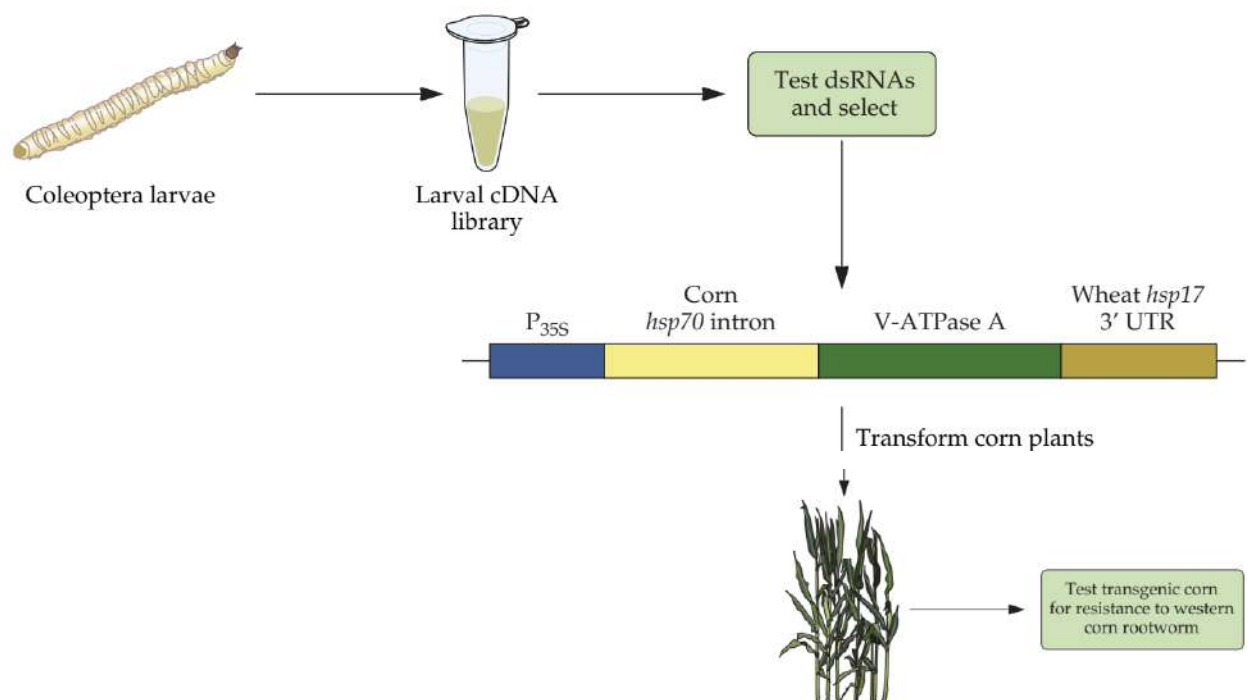


Рис. 3.36. Загальна схема використання РНК-інтерференції для захисту рослин від комах-шкідників. dsRNA, дволанцюгова РНК; UTR – НТД, ділянки, що не транслуються. Пояснення в тексті. Запозичено з [24]

Таким чином, здатність твердокрилих забезпечувати процес РНКі після перорального введення дволанцюгової РНК є важливим першим кроком у розробці абсолютно нового підходу до створення широкого спектра стійких до комах рослин, включно зі стійкістю до деяких комах, несприйнятливих до інсектицидного токсину *B. thuringiensis*.

На доданок, нещодавно було показано, що **трансгенна пшениця** (*Triticum aestivum* L.), яка містить заклоновану міРНК, має **подвійну стійкість проти синергетично взаємодіючих вірусів** смугастої мозаїки пшениці та вірусу мозаїки пшениці.

Окрім цього, розробляється технологія **«Plin-amiR» на основі РНКі** для боротьби з рослиноїдними комахами-шкідниками. Транскрипти пре-мікроРНК комах (pre-miR) були піддані певним модифікаціям, внаслідок чого вони містили **штучні мікроРНК** (artificial microRNAs, amiRs), спрямовані на гени комах.

Так, було знайдено, що штучні фрагменти мікроРНК проявляли дуже високу специфічність до певних видів комах. Така технологія є досить дієвою проти представників ряду Твердокрилі (серед яких колорадський жук). Цей підхід може набути широко використання, так як ця технологія є специфічною до окремих представників, а не до цілого ряду комах, що зменшує вплив на екосистему та робить її більш ефективною у порівнянні з іншими стратегіями. Також, розглядається можливість поєднання «Plin-amiR» з конструкціями на основі Vt-токсину для посилення всесвітньо прийнятої стратегії захисту рослин від комах-шкідників.

3.4.4. Сучасні методи редагування рослинних геномів

Цілеспрямоване (цільове) редагування генома рослини може дати величезні переваги перед традиційними методами розведення рослин для створення нових сортів з вигідними комбінаціями алелів, особливо коли для покращення врожаю потрібно кілька ознак. Традиційні методи розведення рослин покликані поєднувати бажані алелі різних генів, але вони використовують надзвичайно трудомісткі генетичні схрещування та відбір за бажаним фенотипом, і часто, як і у випадку з тісно пов'язаними локусами,

традиційні методи не можуть бути використані для отримання бажаного результату.

Хоча можливість створення трансгенних рослин вирішила деякі з цих проблем, споживачі та регуляторні органи в ряді країн, особливо в Європі, висловили **серйозні занепокоєння та застереження щодо їх комерціалізації**.

З іншого боку, **модифікація *in situ* існуючого рослинного гена** повинна дозволити деяким спеціально зміненим рослинам швидше вийти на ринок цих країн тощо. Адже при цільовій стабільній модифікації геномів у рослину не потрапляє чужорідна ДНК.

На жаль, до недавнього часу цільове редагування генів у рослин було вкрай неефективним. У той же час використання **сучасних інженерних нуклеаз**, такі як **мегануклеази**; **нуклеази із цинковими пальцями (ZFN, Zn-finger nucleases (англ.); ефекторні нуклеази, подібні до транскрипційних активаторів (TALENs)** та **система CRISPR/Cas**, відкриває цілком нові можливості в генетичній модифікації рослин (рис. 55).

Ці нуклеази є високо специфічними та піддаються тонкому налаштуванню. Внесені ними **модифікації є перманентними**, на відміну від попередніх підходів, таких як РНК-інтерференція.

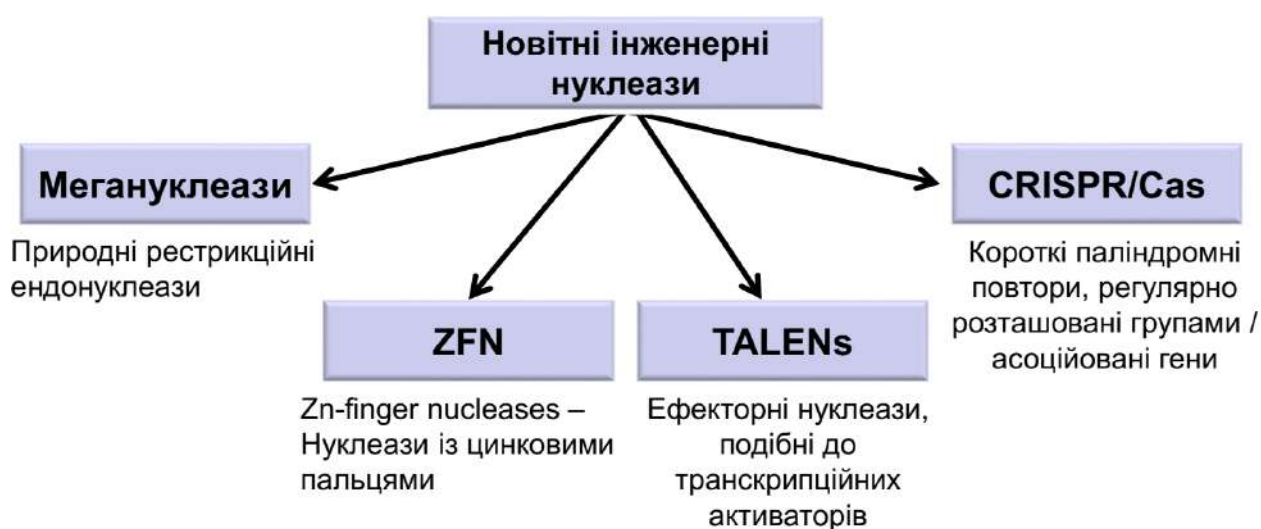


Рис. 3.37. Сучасні інженерні нуклеази. Пояснення в тексті

Основа методів модифікації геномів рослин за допомогою інженерних нуклеаз. Фундаментальною основою редагування геномів нуклеазами є клітинні системи репарації дволанцюгових розривів. **Процес негомологічного з'єднання кінців (NHEJ, Non-homologous end joining)** – призводить до накопичення мутацій, тоді як **гомологічна рекомбінація (HR, Homologous recombination)** – ні. Але остання потребує гомологічного шаблону, адже точна репарація дволанцюгового розриву ДНК можлива лише під час реплікації, коли розірвана ділянка може бути відновленою лише завдяки використанню сестринської молекули як матриці за механізмом гомологічної рекомбінації (рис. 3.38).

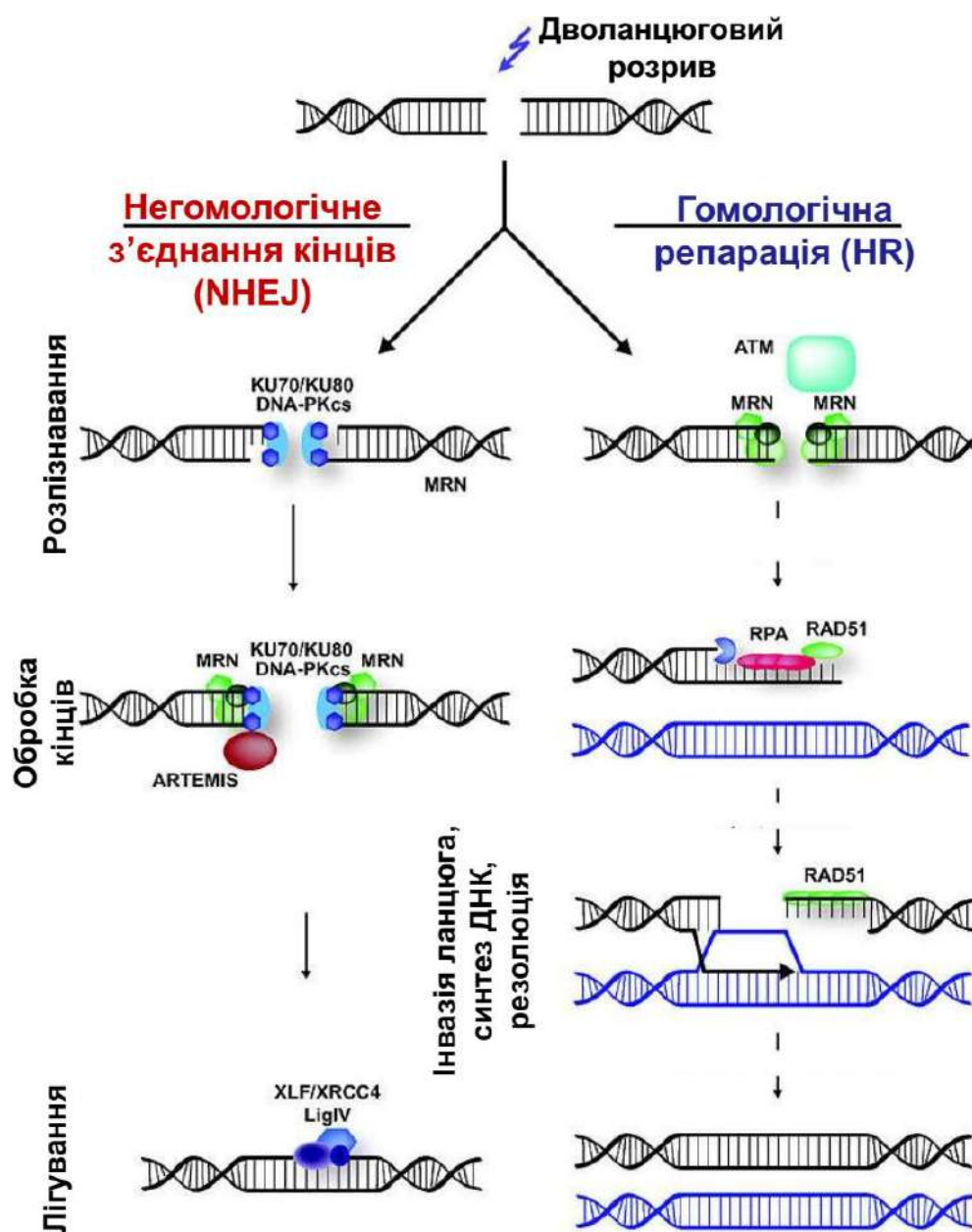


Рис. 3.38. Загальний принцип модифікації геномів за допомогою інженерних нуклеаз. Пояснення в тексті. Адаптовано з [19]

Використовуються нуклеази, в яких сайти розпізнавання та каталізу відрізняються. Типово – **рестриктаза FokI**. Ця ендонуклеаза рестрикції, походить з грамнегативної бактерії *Flavobacterium okeanokoites* і є дещо незвичною рестриктазою для II-го типу, підкласу IIS. Вона складається з N-кінцевого ДНК-зв'язуючого домену та неспецифічного домену розщеплення ДНК (ендонуклеазного домена) на С-кінці. Після того, як фермент зв'язується

з дуплексною ДНК через свій ДНК-зв'язуючий домен у сайті розпізнавання 5'-GGATG-3', домен розщеплення ДНК активується й гідролізує послідовності, але без додаткової специфічності: перший ланцюг через 9 нуклеотидів від сайту впізнання, а другий ланцюг – на 13 нуклеотидів вище від цього сайту. Ендонуклеазний домен FokI використовувався в кількох дослідженнях після комбінації з різними ДНК-зв'язуючими доменами, такими як цинковий палець (див. далі нуклеази із цинковими пальцями) або неактивний (дефектний) Cas9 (див. **3.4.4.1. Система CRISPR/Cas**).

Мегануклеази. Це найбільш специфічні рестрикційні ендонуклеази в природі, оскільки вони розпізнають сайти розміром 12-40 п.н. Є 2 основні родини: **інтронні ендонуклеази** та **інтеїнові ендонуклеази** (рис. 3.39).

Вони кодуються мобільними генетичними елементами у археїв, бактерій, фагів, грибів, дріжджів, водоростей і деяких рослин. Поширеними представниками є: I-SceI, I-CreI, I-DmoI. Найбільш розповсюджені **інженерні мегануклеази**: DmeCre, E-DreI.

В основі підходів до створення нових мегануклеаз :

- 1) Зміна специфічності існуючих мегануклеаз;
- 2) Створення химерних ферментів.

Але, не дивлячись на позитивні аспекти використання таких нуклеаз (відсутність небажаних побічних мутацій), лишаються певні **недоліки**: обмежений репертуар ферментів, важкість інженерії, низька ймовірність знайти фермент із цільовою специфічністю.

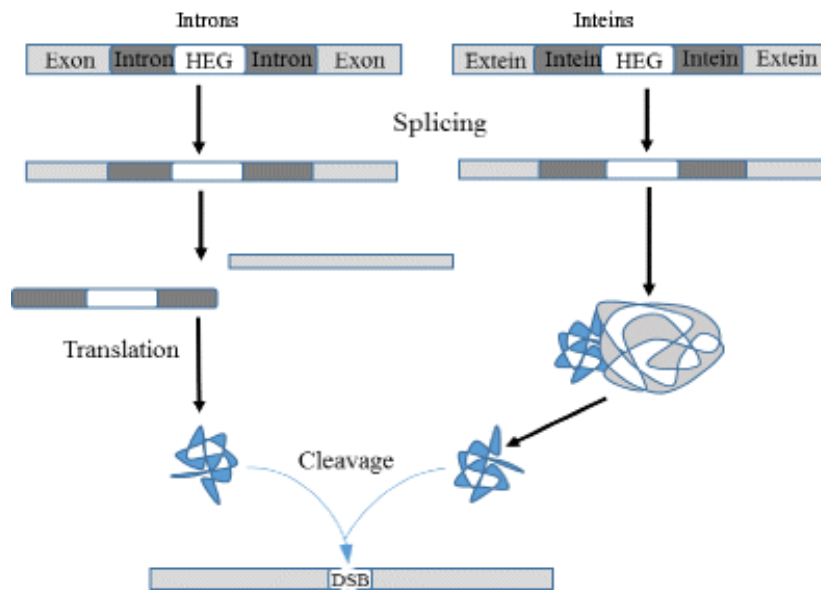


Рис. 3.39. Загальний принцип дії мегануклеаз. Експресія гена самонавідної ендонуклеази (HEG) з інтронів (introns) та інтеїнів (inteins) мобільної групи I, її процесинг в ендонуклеазу для розщеплення ДНК-мішені (DSB (double-strand breaks, дволанцюговий розрив)) та подальшої репарації. Пояснення в тексті. Запозичено з [19]

Нуклеази із цинковими пальцями (ZFNs). Це штучні нуклеази, які складаються з двох функціональних доменів – ДНК-зв’язуючого (містить Zn-пальці, кожен з яких розпізнає унікальну послідовність гексамера ДНК) та нуклеазного з рестриктази FokI. Коли домени, що зв’язують ДНК, і домени, що розщеплюють ДНК, зливаються разом, створюється високоспецифічна пара «геномних ножиць» (рис. 3.40).

Перевагами використання цих нуклеаз є: мутації є перманентними та спадковими; працюють із великим діапазоном клітин; не потрібно селективні маркерів для скринінгу; швидка інтеграція чи руйнування цільових ділянок генома; ефективність до 20 %.

Зазначений підхід був найбільш вживаним із новітніх методів редагування рослинних геномів. Наприклад, було створено сою з покращеним профілем олій. Однак, TALENs приблизно у 200 разів більш коштовні за систему CRISPR/Cas, про яку йтиметься далі.

Не дивлячись на певні успіхи, на сьогодні, вищезазначені методи лишаються досить трудомісткими, не досить ефективними й коштовними: для кожного нового локус-мішені потрібна розробка, експресія та перевірка абсолютно нової пари поліпептидів, що значно обмежує сферу застосування цих методів.

3.4.4.1. Система CRISPR/Cas

Зазначений підхід розглядається як нова ера в молекулярній біології та генній інженерії. **Печериця** – перший харчовий продукт, модифікований за допомогою цієї системи у 2015 році. **Редагування генома без введення трансгенів** покращує потенціал комерціалізації модифікованих культур (включно з фруктами), оскільки касета CRISPR/Cas9 не вставляється в геном, і в багатьох юрисдикціях отриманий сорт регулюється таким же чином, як і звичайні культури, лише з певними застереженнями.

Короткі паліндромні повтори, регулярно розташовані групами (CRISPR – Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) – це прямі повтори й унікальні послідовності в ДНК бактерій та архей, що розділяють їх, які спільно з асоційованими генами (**Cas**, англ. CRISPR-associated genes) забезпечують захист клітини від чужорідних генетичних елементів (бактеріофагів, плазмід). **Повтори** мають довжину від 24 до 48 п.н.; вони мають бівалентну симетрію, але, як правило, не є істинними паліндромами. Повтори розділені варіабельними ділянками ДНК, **спейсерами**, приблизно однакової довжини. Спейсери відповідають по нуклеотидній послідовності певним фрагментам ДНК чужорідних генетичних елементів

(протоспейсерам). У зв'язку із цим було запропоновано, і потім показано, що послідовності, які розділяють повтори, походять із послідовностей геномів бактеріофагів і, відповідно, забезпечують захист клітин від інфекцій.

Цікаво, що робота систем CRISPR-Cas має **багато спільних принципових моментів із роботою імунної системи ссавців**. Так, імунізацію CRISPR (тобто вставку нового спейсера) може викликати навіть дефектний бактеріофаг – подібно до того, як імунна відповідь ссавців може розвинути і при введенні вбитого патогену. Отже, основна функція цієї системи – в **адаптивній імунності** бактерій (40 %) та археїв (90 %).

Системи CRISPR/Cas можна розділити на **2 класи**: клас 1 і клас 2 (рис. 3.42). Представники класу 1 мають ефекторний комплекс **crPHK** (crRNA (англ.), коротка CRISPR PHK, **спрямовуюча crPHK**, яка містить унікальну послідовність, комплементарну певній мішені) із кількома з білками Cas, тоді як для класу 2 характерний 1 багатодомений білок, який утворює **crPHK-зв'язуючий комплекс**.

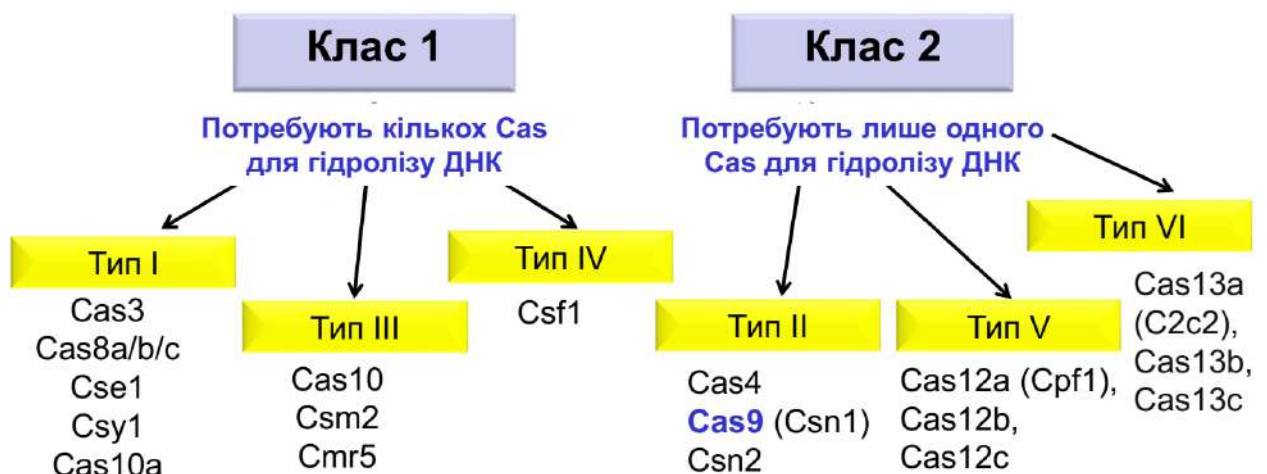


Рис. 3.42. Загальна класифікація системи CRISPR/Cas. Пояснення в тексті. Адаптовано з [49, 60, 62]

Зазначені вище класи надалі поділяються на **6 типів** (тип I–VI), також підрозділяючись на кілька **підтипів** (різну кількість для кожного з типів) (рис.

3.43). Клас 1 включає типи I, III і IV, у той час як клас 2 включає типи II, V і VI. Така класифікація ґрунтується на механізмі дії системи CRISPR/Cas.

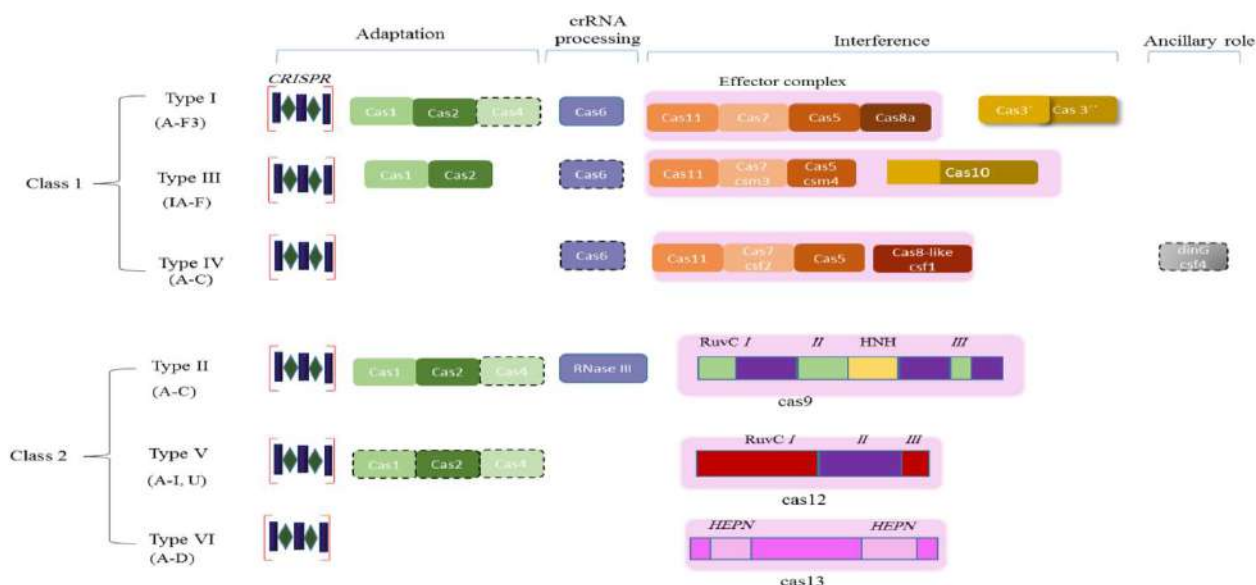


Рис. 3.43. Детальна класифікація та функціональні модулі системи CRISPR-Cas. Ефекторний комплекс у класі 1 складається з кількох білків Cas, тоді як у класі 2 один багатодомений білок утворює crРНК-зв'язуючий комплекс. Компонент, який відсутній у деяких підтипах, представлений пунктирними контурами. Запозичено з [49]

Системи типу I, II і V розпізнають і розщеплюють ДНК, тип VI може редагувати РНК. Так, комбінація CRISPR/Cas13a (раніше C2c2) (клас 2, тип VI-A) із бактерії *Leptotrichia shahii* більш специфічна до РНК, що використовується в цільовому редагуванні РНК. Тип III редагує як ДНК, так і РНК. Яким чином система типу IV впливає на ДНК або РНК, досі невідомо.

Хоча білки Cas дуже різноманітні між собою, усі вони можуть бути згруповані в 4 функціональні категорії: нуклеази/рекомбінази, які формують спейсер; рибонуклеази, що каталізують процесинг спрямовуючих crРНК; безліч білків, які зв'язуються із crРНК, що призводить до утворення рибонуклеопротеїнових комплексів CRISPR для здійснення моніторингу мішеней; і, нарешті, нуклеази, які руйнують ДНК або РНК-мішені.

Механізм дії системи CRISPR/Cas включає **3 стадії** (рис. 3.43-3.44): **придбання чи адаптація; експресія та дозрівання; інтерференція** (разом утворюють **ефекторний модуль**).

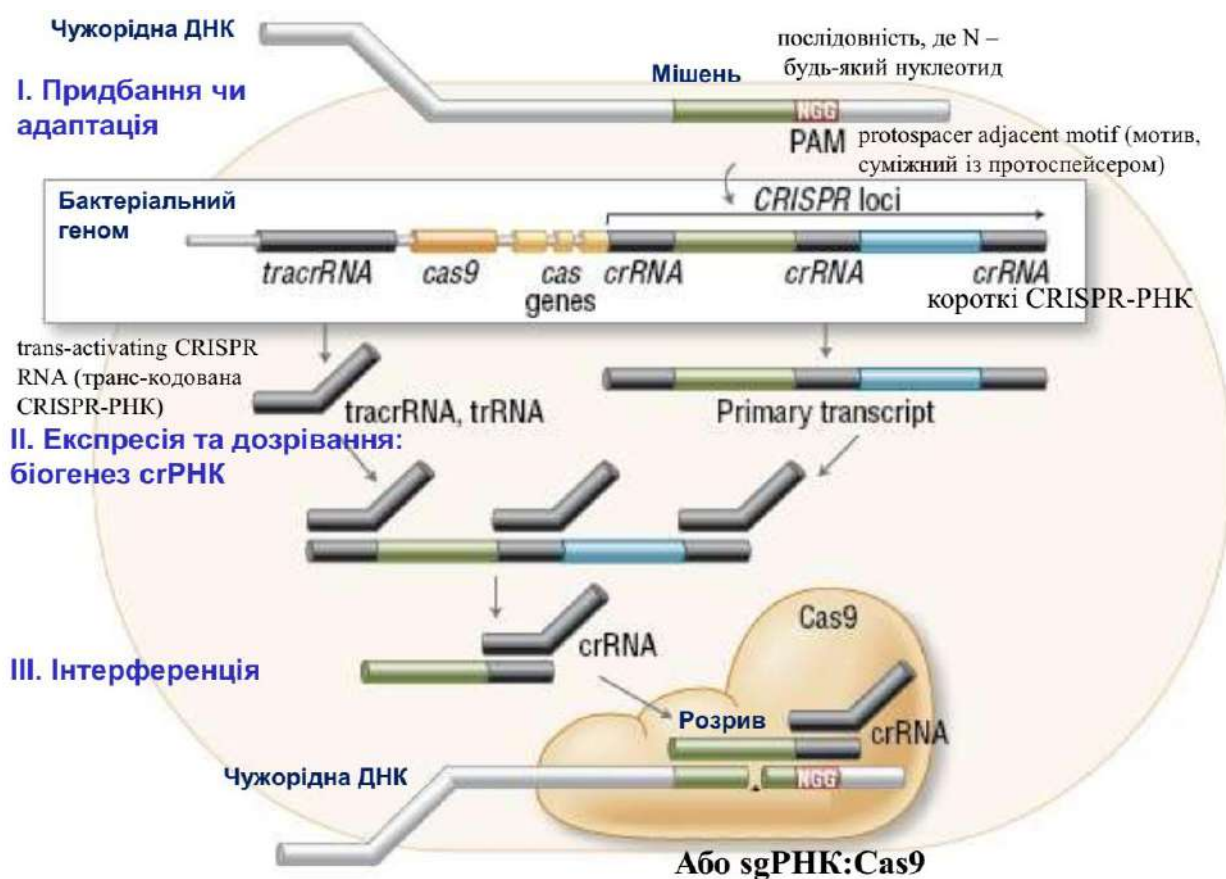


Рис. 3.44. Загальний принцип роботи системи CRISPR/Cas, тип II. NGG, де N – будь-який нуклеотид. Пояснення в тексті. Запозичено з [31]

Більшість даних про молекулярні механізми придбання нових спейсерів було отримано при вивченні системи CRISPR типу I в *E. coli* та типу II в *Streptococcus thermophilus*. На етапі придбання (адаптація) у CRISPR вбудовується новий спейсер, утворений із стороннього генетичного елемента, що проник у клітину. У системах типів I та II може відбуватися вставка спейсера лише від тих інородних елементів, у яких до протоспейсеру прилягає особлива **послідовність PAM** (англ. protospacer adjacent motif – мотив, суміжний із протоспейсером). PAM (це послідовність ДНК із 2-6 п.н., що безпосередньо слідує за послідовністю ДНК, на яку спрямована нуклеаза Cas9)

компонентом вірусу-загарбника, але не міститься в геномі бактеріального хазяїна і, отже, не є компонентом бактеріального локусу CRISPR. Cas9 не буде успішно зв'язуватися або розщеплювати цільову послідовність ДНК, якщо за нею не йде послідовність PAM. PAM є важливим компонентом націлювання, який відрізняє власну бактеріальну ДНК від невластивої, таким чином, запобігаючи націлюванню та руйнуванню локусу CRISPR, пов'язаного з CRISPR нуклеазою. Крім того, бактерія повинна відрізнити іногородний генетичний матеріал від свого власного, щоб не вставити як спейсер фрагмент власної хромосоми і не націлити систему CRISPR-Cas на свій геном, що було б фатальним для клітини.

На стадії **експресії (дозрівання)** відбуваються транскрипція CRISPR та процесинг **crPHK**, націлених на певну мішень. Спочатку ряд повторів і спейсерів CRISPR транскрибуються в єдиний довгий транскрипт – **пре-crPHK**, який далі розрізається на короткі crPHK. Більшість повторів у CRISPR є паліндромами, тому відповідні їм ділянки пре-crPHK формують шпильки. У багатьох випадках саме ці **шпильки розпізнаються білками Cas, що процесують пре-crPHK у crPHK.**

Як правило, транскрипція CRISPR залежить від лідерної послідовності та відбувається постійно, але з низькою швидкістю. Однак швидкість значно збільшується в стресових умовах або при зіткненні клітини з фагами, забезпечуючи їй швидкий та ефективний захист. Так, промоторні елементи було знайдено не лише в лідерній послідовності, але й у повторах.

Під час **інтерференції** рибонуклеопротейновий комплекс crPHK-Cas розпізнає НК-мішень за рахунок комплементарного спарювання основ мішені з crPHK, після чого розрізає мішень завдяки ендо- та/або екзонуклеазній активності білків Cas.

Хоча **мішенями, переважно, є дволанцюгові ДНК**, деякі системи CRISPR-Cas можуть руйнувати комплементарні одноланцюгові РНК. Системи CRISPR-Cas, що розпізнають дволанцюгові ДНК, вимогливі до сусідніх із протоспейсером послідовностей: зокрема, в системах типів I і II розпізнаються

тільки мішені, що містять мотив РАР (вимога наявності РАР може слугувати для захисту від розрізання системою CRISPR-Cas клітинного генома). У систем, які працюють з **одноланцюговими РНК**, подібних вимог немає. Після початкової ендонуклеолітичної атаки (внесення розриву в мішень) Cas, подальша руйнація мішені може відбуватися під дією інших нуклеаз.

На сьогодні, **тип II** (містить 3 підтипи: I-A, II-B, та II-C) вивчено найкраще, адже він потребує лише **одного Cas-білка – нуклеази Cas9** (рис. 3.42-3.43). Ефективність методу надзвичайно висока – інколи сягає 70 %.

Це найбільш проста й «дружня» з усіх систем точного редагування геномів. Більше того, в біогенезі crРНК беруть участь додаткові елементи, що є унікальними для систем типу II. Системи II типу зустрічаються тільки в бактерій і є найменш поширеними серед інших систем.

Серед систем типу II на підставі наявності та послідовностей асоційованих генів cas виділяють 3 підтипи: II-A, II-B та II-C (рис. 3.43). Крім генів *cas1* і *cas2*, властивих усім системам типів I-III, системи типу II мають додатковий ген *cas9*, який кодує ендонуклеазу Cas9. Cas9 бере участь у придбанні нових спейсерів, накопиченні crРНК та інтерференції. Крім цього, системи II-A містять ген *csn2*, чий білковий продукт бере участь у придбанні спейсерів. У системах II-B цей ген замінено геном *cas4* (рис. 3.43).

Довжина Cas9 варіює у різних підтипах, причому для систем II-C, зазвичай, характерні найкоротші **ортологи** (гомологічні білки). К'орова частина Cas9, яку складають нуклеазний домен і характерний для цього білка збагачений аргініном кластер, найімовірніше кодується генами, що походять від мобільних генетичних елементів, ніяк не пов'язаних із CRISPR. Зважаючи на значну схожість у послідовностях амінокислот між Cas9 та його гомологами, які не пов'язані із системами CRISPR-Cas, Cas9 не можна розглядати в повному розумінні як сигнатурний білок систем типу II. Проте його можна вважати характерною ознакою цих систем.

Біогенез crРНК у системах типу II має низку унікальних особливостей. Зокрема, для нього необхідний процесинг РНКазою III і зв'язування з пре-

crPHK особливих невеликих **tracrPHK** – **транс-кодованих CRISPR PHK** (tracrRNA (trRNA), trans-activating CRISPR RNA, транс-активуюча crPHK). У складі tracrPHK присутня ділянка, частково комплементарна тій області crPHK, яка була транскрибована з повтору CRISPR. У ході процесингу crPHK tracrPHK зв'язується з ще не вирізаними crPHK у складі пре-crPHK. Таким чином, утворюється дуплекс PHK. Він розщеплюється РНКазою III, РНК-специфічною рибонуклеазою, з утворенням **гібриду crPHK-tracrPHK**. Цей гібрид діє як провідник для ендонуклеази Cas9, яка розщеплює нуклеїнову кислоту вірусу-загарбника (рис. 3.45).

Утворений зрілий комплекс **crPHK-tracrPHK-Cas9** містить коротку crPHK, у якої 20-24 нуклеотидів комплементарні 3'-кінцю спейсера і 20-24 нуклеотидів комплементарні 5'-кінцю повтору. Перший етап процесингу пре-crPHK відбувається в ділянках, комплементарних повторам CRISPR; у результаті чого утворюється 3'-кінець crPHK (рис. 3.45).

Наступна стадія обрізання 5'-кінця невідомими нуклеазами відбувається всередині послідовностей, що відповідають спейсерам CRISPR. Для накопичення crPHK у клітинах необхідний білок Cas9, хоча невідомо, чи це викликано участю Cas9 у процесингу crPHK або стабілізацією crPHK за допомогою Cas9 після процесингу, або ж тим та іншим.

Комплекс **crPHK-tracrPHK-Cas9** розпізнає ДНК-мішені, які комплементарні crPHK і містять РАМ. Відсутність РАМ у локусах CRISPR оберігає клітинну ДНК від розрізання. Спочатку Cas9 розпізнає РАМ, а потім прилегла ДНК перевіряється на комплементарність crPHK. Розрізання ДНК-мішені здійснюється шляхом внесення двох одноланцюгових розривів ніказними доменами RuvC і HNH білка Cas9, внаслідок чого утворюється дволанцюговий розрив із тупими кінцями в ближньому до РАМ кінці протоспейсера, у **Р-петлі** (особлива структурна конформація НК, що утворюється при гібридизації РНК із комплементарним ланцюгом дволанцюгової ДНК; утворення дуплекса РНК:ДНК при цьому призводить до

вितеснення некомплементарного ланцюга ДНК з утворенням петлі), за три нуклеотиди до PAM (рис. 3.44-3.45).

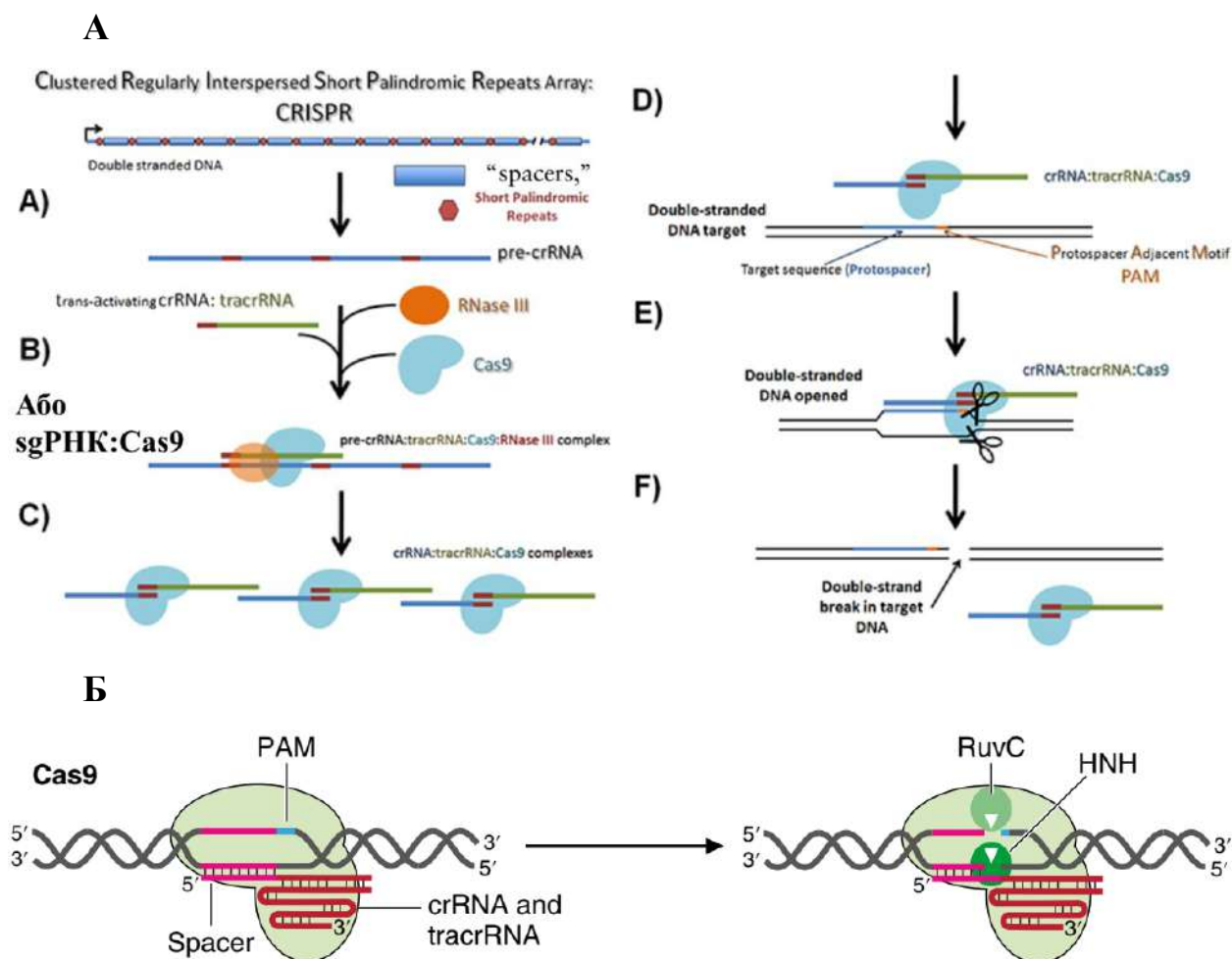


Рис. 3.45. Детальна схема роботи системи CRISPR/Cas, тип II (А) та механізми зв'язування й розщеплення ДНК нуклеазою Cas9 (Б). Пояснення в тексті. Запозичено з [17, 31]

Застосування системи CRISPR/Cas у генній інженерії рослин. Сучасні технології CRISPR-Cas використовують білок Cas9, однаковий для всіх локусів-мішеней, а специфічність дії системи визначається не білком, а crPHK: залежить від **crPHK/sgPHK** (sgPHK, сконструйована маленька спрямовуюча PHK), адже їм можна задавати будь-які бажані послідовності.

Вищезазначені методи, засновані на ZFN і TALEN, використовуються і до сьогодні і навіть є кращими для певних клінічних досліджень, проте

простота, ефективність, майже необмежена гнучкість локалізації, економічність тощо методів, що використовують систему CRISPR-Cas9 (рис. 3.46), вивели їх на перше місце серед методів для спрямованого редагування генома, а також зв'язування з ДНК

	Мегануклеази	ZFN	TALEN	CRISPR/Cas9
Гнучкість локалізації	Майже необмежена, але важко досягається	Обмежена	Середня	Майже необмежена
Конструювання нуклеаз	Висока складність	Помірна складність	Помірна складність	Просто
Тестування <i>in vitro</i>	Висока складність	Помірна складність	Помірна складність	Просто
Ефективність	Недостатньо даних	Лімітуючий фактор	Середня	Висока
Побічні мутації	Дуже рідко	Часто	Часто	Часто
Мультиплексність	Ні	Ні	Ні	Так
Затрати часу	Великі	Помірні	Помірні	Низькі
Вартість	Висока	Середня	Середня	Низька

Найкращий метод

Рис. 3.46. Редагування геномів інженерними нуклеазами: порівняльна характеристика. Пояснення в тексті

Методи, засновані на CRISPR-Cas9, близькі до природних механізмів дії цих систем: для розпізнавання послідовності-мішені, яка розташовується поруч із РАР, використовується РНК, і нуклеаза Cas9, що нею направляється, яка і робить дволанцюговий розрив у сайті-мішені. При редагуванні генома еукаріотів, втім, результатом роботи CRISPR-Cas9 є не руйнація всієї молекули ДНК, а репарація дволанцюгового розриву, спричиненого Cas9.

Як було зазначено вище, репарація може проводитись як за рахунок негомологічного з'єднання кінців (NHEJ), так і шляхом гомологічної рекомбінації. У результаті репарації, що супроводжувалась негомологічним з'єднанням кінців, часто виникають невеликі інсерції або делеції, здатні

зруйнувати рамку зчитування білок-кодуючих генів, що, у свою чергу, призводить до втрати функції гена-мішені. Викликавши безліч дволанцюгових розривів, можна досягти появи **великих делецій** і навіть **інверсій** (рис. 3.47).

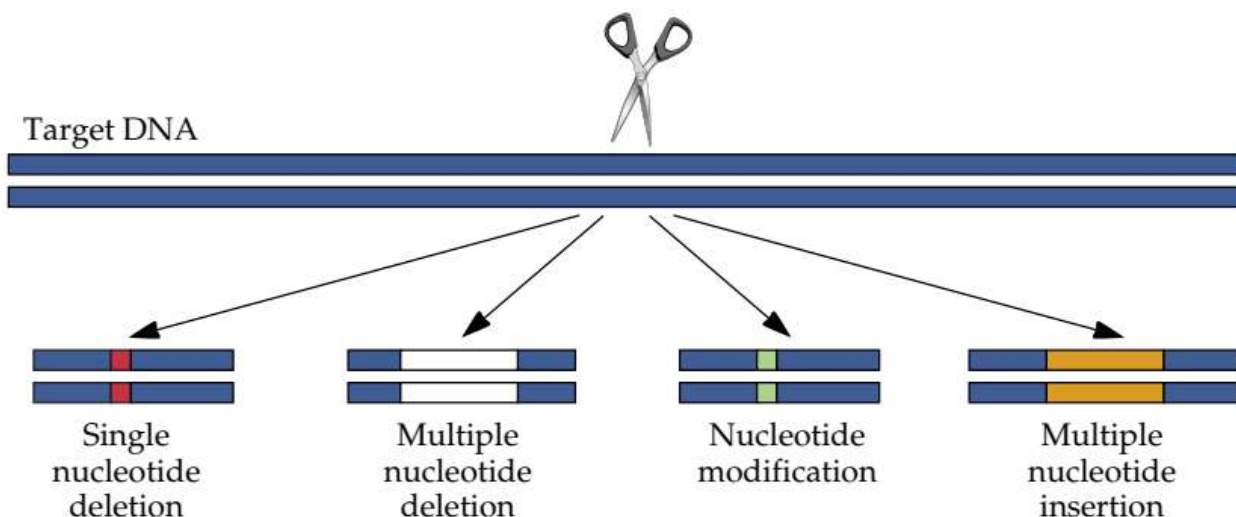


Рис. 3.47. Схематичне зображення шляхів редагування генома рослин за допомогою CRISPR-Cas9. Ножиці являють собою комплекс CRISPR-Cas9. Делеція одного або кількох нуклеотидів призводить до нокаутної мутації, яка більше не кодує синтез вихідного білка. Мутація нуклеотидної модифікації призначена для отримання білка зі зміненою активністю. Багатонуклеотидна вставка може, залежно від конкретної залученої послідовності, кодувати білок зі зміненою активністю або може нокаутувати ендогенний ген, замінюючи його екзогенним геном. Запозичено з [24]

Репарація шляхом **гомологічної рекомбінації**, навпаки, передбачає заміну видаленої послідовності новою послідовністю, комплементарною матриці репарації, яку створює сам дослідник. Таким чином, гомологічна рекомбінація може використовуватися для видалення небажаних мутацій, створення нових алелей, вставки або злиття функціональних доменів (рис. 3.48).

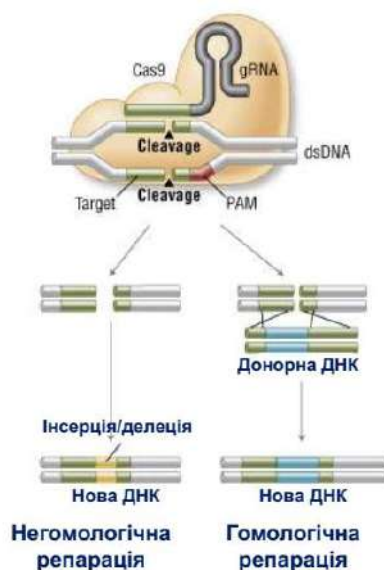
Мутаційна інактивація домена RuvC або HNH Cas9 перетворює цей білок на РНК-спрямову ніказу (рис. 3.45), що робить не дволанцюгові, а одноланцюгові розриви (Cas9n).

Інактивація обох доменів перетворює Cas9 у ДНК-зв'язуючий білок, який спрямовується РНК, але не розрізає мішені, – dCas9 («мертва», дефектна Cas9). У цьому випадку до ДНК-зв'язуючого домену можна приєднати домен з іншими функціями, що, у свою чергу, може викликати різні зміни в локус-мішені: активацію або репресію транскрипції, модифікацію хроматину, посилення утворення петель тощо.

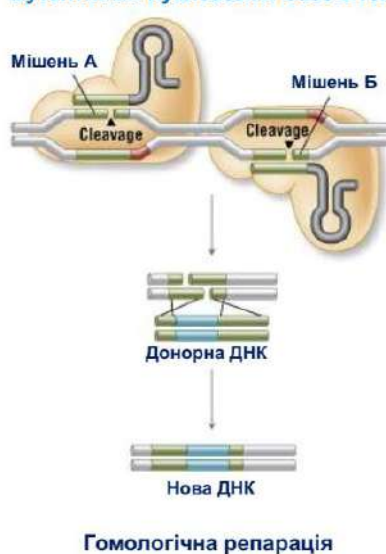
Крім того, така інактивована форма Cas9 (dCas9) є основою нових дослідницьких прийомів: наприклад, візуалізації за допомогою флуоресценції (рис. 3.48) – CASFISH (флуоресцентної гібридизації *in situ*, опосередкованої CRISPR-Cas9); або створення міток для подальшої фізичної ізоляції локусів.

Також до dCas9 можна пришивати штучні ендонуклеази рестрикції, а також ферменти, що вносять епігенетичні зміни (ДНК-метилтрансферази, гістонацетилтрансферази) та за рахунок цього регулюють активність генів-мішеней.

I. Редагування геному із wtCas9



II. Редагування геному шляхом подвійного нікування спареними мутантними нуклеазами Cas9 D10A



III. Локалізація за допомогою дефектної нуклеази dCas9

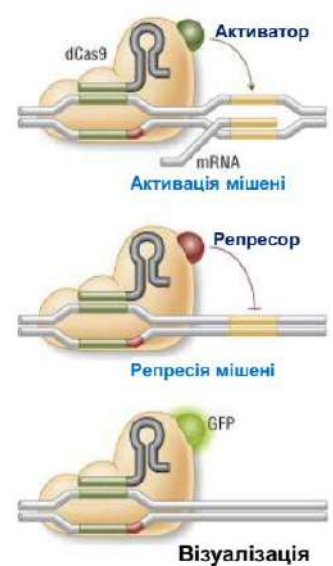


Рис. 3.48. Схематичне зображення шляхів редагування генома за допомогою різних Cas9 системи CRISPR-Cas9. wtCas9 – інтактний білок, дикого типу. Пояснення в тексті. Адаптовано з [31]

На доданок, dCas9 може бути з'єднана з **мономером ендонуклеази FokI**, що функціонує у вигляді димерів. Димери FokI можуть вносити **дволанцюгові розриви** у послідовності-мішені. Для спрямування dCas9, зшитої з мономером FokI, використовуються **2 sgРНК**, що значно збільшує точність системи. Коли 2 мономери, кожен з яких спрямовується своєю sgРНК, розташовуються на відстані близько 30 пар основ один від одного, то FokI димеризується й вносить дволанцюговий розрив.

Незважаючи на ефективність використання систем CRISPR-Cas, походження Cas9 накладає деякі обмеження на вибір ДНК-мішеней: наприклад при використанні білка **Cas9 (SpyCas9) *Streptococcus pyogenes*** (піогенний стрептокок групи А) як мішені можна вибирати тільки послідовності, за якими слідує РАМ, а саме 5'-NGG (де N – будь-який нуклеотид). Перед використанням в генетичних конструкціях ген *Cas9* повинен бути попередньо оптимізований за кодонами, що використовуються відповідно до організму, геном якого передбачається модифікувати: ген *Cas9 S. pyogenes* відрізняється низьким GC-складом (35 %), і для організмів, чий геном має високий GC-склад, може бути потрібна оптимізація кодонів Cas9. У той же час, Cas9 із *Staphylococcus aureus* (**SaCas9**) відрізняється від SpCas9 з точки зору специфічності протоспейсерного сусіднього мотиву (РАМ), але має подібну ефективність редагування. Він використовувався в кількох модельних видах рослин, а також нещодавно в цитрусових, продемонструвавши більшу універсальність завдяки розширенню діапазону потенційних геномних цілей.

На сьогодні, ведеться розробка альтернативних білків Cas9, які дозволять збільшити сферу застосування CRISPR-Cas. Наприклад, укорочені форми Cas9 можуть розпізнавати різні РАМ послідовності.

Хоча редагування генома можна ефективно здійснювати за допомогою crPНК і tracrPНК, що транскрибуються окремо, розробка технології **єдиної направляючої PНК (sgPНК)** дозволила спростити цю систему. І тут **чотирикомпонентна система PНКаза III:crPНК:tracrPНК:Cas9** замінюється на **двокомпонентну системою sgPНК:Cas9**. У тому числі і для білка **Cas9 (SpyCas9)**. На сьогодні, sgPНК (лише 20 нуклеотидів у sgRNA потрібно змінити, щоб надати їй певні цільові специфічності) використовується значно частіше, ніж роздільні crPНК та tracrPНК.

Нарешті, ведуться розробки щодо поліпшення специфічності Cas9 та зменшення побічних ефектів. На початку 2016 року було опубліковано результати роботи американських дослідників, яким вдалося **знижити кількість помилок практично до нуля**.

Існують різні системи CRISPR/Cas та численні варіанти їх доставки. Доставку sgPНК і Cas9 у клітини-мішені забезпечують різними способами. Наприклад, для цього можна використовувати **плазмід, що кодуєть sgPНК та Cas9**, і потім проводити ними **трансфекцію** (або **трансформацію**, у разі прокаріотів) цільових клітин. Такі плазмід можна доставляти до клітин за допомогою **електропорації**. У деяких випадках виявляється більш зручним використовувати **плазмід, що кодуєть Cas9**, а PНК доставляти у вигляді **напрацьованих за допомогою ПЛР ампліконів**. Для клітин, що важко піддаються трансфекції, використовуються **вірусні вектори** (лентівіруси, аденовіруси, аденоасоційовані віруси).

У 2015 році був запропонований новий спосіб доставки sgPНК та Cas9 у клітину всередині спеціальних **наноклубків**. Такий наноклубок складається з одного, щільно обвитого ланцюга ДНК, одна з ділянок якого є комплементарною sgPНК, що переноситься; таким чином, комплекс sgPНК:Cas9 закріплюється всередині клубка. Більше того, наноклубок здатний до самоскладання. До одного наноклубку можна приєднати безліч різних комплексів sgPНК:Cas9. При контакті з клітиною наноклубок потрапляє в

ендосому, проте особливий полімер, що покриває наноклубок, забезпечує руйнування ендосоми і дає можливість sgРНК: Cas9 досягти ядра.

Поширеним методом доставки CRISPR/Cas9 у рослини є трансфекція на основі *Agrobacterium* Т-ДНК (агроінфільтрація). Cas9 та sgРНК-експресійні касети клонують на Ті плазміди, якими трансформують агробактерії для трансфекції рослин.

Восени 2015 року було запропоновано новий метод, альтернативний CRISPR-Cas9 – **CRISPR-Cpf1**, заснований на використанні **нової нуклеази. Cas12a** (раніше Cpf1) – це ендонуклеаза, що є ефекторним білком систем CRISPR-Cas **типу V**. Вона **дрібніша**, ніж Cas9 (що підвищує ефективність мультиплексного редагування), а для її функціонування потрібна лише crРНК, але з tracrРНК. Також Cas12a з грамнегативних бактерій *Prevotella* та *Francisella* spp. розпізнає Т-багатий PAM і генерує сумісні когезійні кінці з виступаючими кінцями в 4-5 нуклеотидів, що відрізняються від тупих кінців, введених Cas9. Це, у свою чергу, підвищує ефективність інтеграції ДНК **нокін (knock-in (англ.))** – це нуклеотидна заміна послідовності гена-мішені, яка призводить до зміни амінокислотної послідовності закодованого білка; або інсерція певної послідовності, що була відсутньою в локусі).

У 2020 р. метод CRISPR-Cpf1 був використаний для редагування гена *PDS* (кодує фермент фітоендесатуразу, який бере участь у шляху біосинтезу каротиноїдів) у цитрусових, підтверджуючи можливість опосередкованого Cpf1 редагування у плодових культурах.

У 2015 році був запропонований також новий **метод CRISPR, здатних до самоклонування** (англ. self-cloning CRISPR). У цьому випадку в клітини вводять плазмиду, що містить паліндромну sgРНК, здатну до **самоклонування**, а також коротку дволанцюгову ДНК, яка містить послідовність, що кодує необхідну sgРНК. Коли плазміда транскрибується, sgРНК, що утворюється, у комплексі з Cas9 комплементарно зв'язується з послідовністю у плазміді, що кодує цю sgРНК. Cas9 вносить дволанцюговий розрив, який репарується шляхом гомологічної рекомбінації з використанням

введеної дволанцюгової ДНК як матриці; у результаті плазміда знову містить послідовність, що кодує потрібну sgРНК. На відміну від стандартного методу CRISPR, для якого потрібне тривале та трудомістке напрацювання спеціальних плазмід для кожного нового локус-мішені, метод самоклонів CRISPR, здатних до самоклонування, дозволяє скоротити час експерименту з шести днів до трьох годин і зменшити його вартість у 6 разів.

Також, на сьогодні, інтенсивно розробляються **хімічні методи контролю роботи CRISPR-Cas**: дози, часу дії, специфічності та інших параметрів

Досліджуються можливості застосування систем CRISPR-Cas у культурних рослинах для **створення противірусного імунітету**. Віруси рослин часто значно зменшують врожайність. Генну інженерію використовують для розробки вірусостійких трансгенних рослин. Так, ГМ рослини експресують **ген білка оболонки (coat protein) вірусу** (який може заражати ці рослини при вірусній інфекції), і згодом здатність вірусу інфікувати рослини та систематично поширюватися сильно знижується.

Антивірусний ефект виникає на початку циклу реплікації вірусу і, як наслідок, перешкоджає синтезу будь-якої значної кількості вірусу. Ця особливість зменшує ймовірність появи спонтанних мутованих вірусів, які можуть подолати резистентність та реплікуватись у присутності вірусного білка оболонки. Запобігання розмноженню рослинних вірусів та пошкодженню рослинних тканин відбувається шляхом створення трансгенних рослин, що синтезують **антизмістову РНК**, комплементарну до мРНК гена білка оболонки вірусу (на кшталт РНКі), хоча, зазвичай, важко досягти повної вірусної резистентності.

Окрім цього, можна використовувати **мікроРНК та одноланцюгові антитіла Fv**. Останні розпізнають загальні епітопи РНК-залежних РНК-полімераз декількох різних вірусів, що може бути ефективним засобом пригнічення реплікації РНК-вірусів. Фрагмент антитіла може зв'язуватися з РНК-полімеразами та блокувати їх діяльність, роблячи трансгенні рослини, які експресують ці одноланцюгові Fv-антитіла, стійкими до таких вірусів. Не

дивлячись на успіхи, цей підхід забезпечує стійкість до невеликої кількості різних вірусів (внаслідок мінливості вірусних білків оболонки).

Гемінівіруси – це велика родина (7 родів і 325 видів) вірусів, які реплікуються в ядрах рослинних клітин та для своєї репродукції використовують ДНК-геном (кільцеву одноланцюгову ДНК). Під час реплікації гемінівірусу його одноланцюгова ДНК перетворюється на проміжну дволанцюгову ДНК, з якої потім утворюється нова одноланцюгова ДНК під час реплікації за типом «кільця, що котиться». Ці віруси завдають значної шкоди низці дводольних культур, зокрема томату, маніоці, бавовнику, цукровому буряку, перцю тощо.

Нещодавно група вчених використала **CRISPR-Cas9**, щоб специфічно націлити цю систему на дволанцюгову ДНК певного гемінівірусу **буряка** для пригнічення реплікації вірусу та надання стійкості від цього вірусу рослинам-господарям (рис. 3.49).

Хоча ефективність цього підходу ще потрібно продемонструвати в польових умовах, його перспективний результат свідчить про можливість застосування системи CRISPR-Cas9 для захисту рослин від низки гемінівірусів.

Таким чином, на сьогодні, технологія CRISPR-Cas успішно застосовується в генній інженерії рослин, у тому числі **модельних організмів** (арабідопсис Таля, табак Бентхама); та **декоративних рослин** (наприклад, петунії тощо).

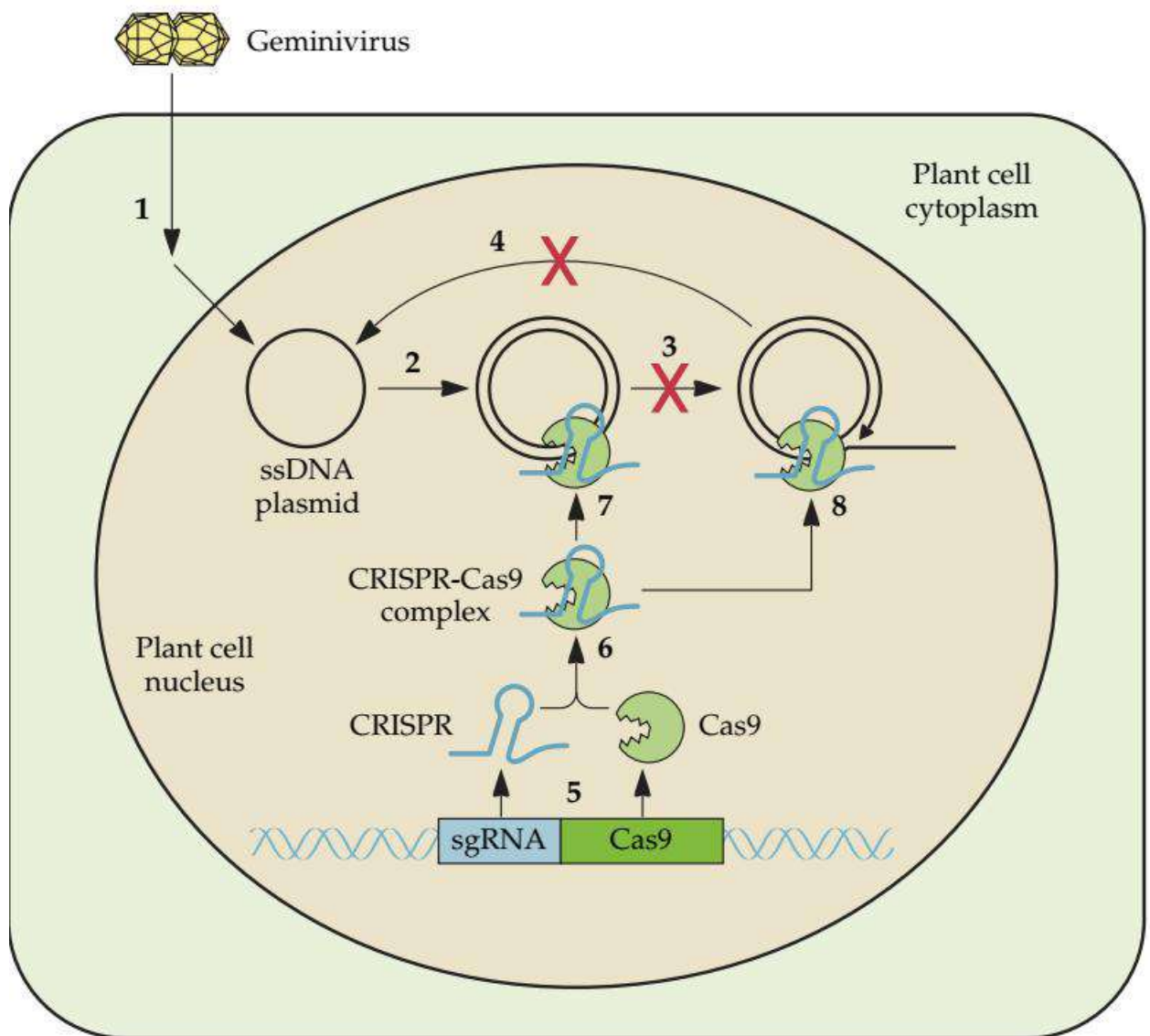


Рис. 3.49. Використання системи CRISPR-Cas9 для захисту рослин від гемівірусів. (1) Генот одноланцюгової кільцевої ДНК гемівірусу проникає в ядро рослинної клітини. (2) Синтезується реплікативна форма дволанцюгової ДНК. (3) і (4) Додаткові копії одноланцюгової генотної ДНК отримують під час реплікації за типом «кільця, що котиться». (5) sgРНК і білок Cas9 синтезуються в ядрі з екзотенної ДНК, яка раніше була вбудована в генотну ДНК рослини. (6) Комплекс CRISPR-Cas9 зібраний. (7) і (8) Комплекс CRISPR-Cas9 може розрізати дволанцюгову вірусну реплікаційну форму до або під час реплікації ДНК. Розщеплення реплікативної форми дволанцюгового вірусу запобігає утворенню одноланцюгової вірусної ДНК. Запозичено з [24]

Редагування генома є, мабуть, найважливішою нещодавною розробкою в селекції сільськогосподарських культур, і протоколи, засновані на універсальній системі **CRISPR/Cas9**, були оптимізовані для **риса, сої, пшениці, сорго, кукурудзи, томату, апельсина, яблука** тощо, щоб підвищити ефективність редагування. При розробці ГМ **огірка, лісової суниці та кавуна** (2017-2018 рр.) конструкція CRISPR/Cas9 була інтегрована як частина **Т-ДНК**, але сегрегацію було досягнуто шляхом зворотного схрещування.

Основною проблемою для комерційного розвитку модифікованих сортів є **успішна передача цільових мутацій через зародкову лінію**. Цього особливо важко досягти для **деревних порід**, у тому числі **фруктових дерев**, оскільки вони розмножуються вегетативно. **Зворотне схрещування** може тривати десятиліттями (залежно від виду) і може призвести до ненавмисного **ауткросингу** (outcrossing (англ.), ненавмисне схрещування особин різних ліній одного виду) відредагованого гена. Також важко досягти **гомозиготності** в редагованому локусі в межах бажаного генетичного фону, тому що більшість фруктових дерев є самонесумісними і, таким чином, потребують обов'язкового ауткросингу. Такі характеристики перешкоджають введенню таких змін генома, які є стабільними та спадковими.

Тому, на доданок до нових, вищезазначених CRISPR-асоційованих нуклеаз, було запропоновано декілька **модифікацій** оригінальної системи редагування CRISPR/Cas9, покликаних прискорити розробку та комерціалізацію культур зі зміненим геномом.

CRISPR/Cas9 рибонуклеопротейн (РНП) технологія (CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein (RNP) technology). Редагування генома без трансгенів покращує потенціал комерціалізації модифікованих культур (включно з фруктами), оскільки касета CRISPR/Cas9 не вставляється в геном, і в багатьох юрисдикціях отриманий сорт регулюється таким же чином, як і звичайні культури, лише з певними застереження. Ця технологія дозволяє уникнути трансгенної інтеграції шляхом **доставки очищених РНП, що містять Cas9 і**

sgPНК, у **протопласти** для подальшої регенерації рослин. У 2016 р. цей підхід було використано на **яблуні** та **винограді** для введення мутацій, що надавали стійкості від борошнистої роси, спричиненох паразитними грибами родини борошнистороссяних (*Erysiphaceae*).

На додаток до **рибонуклеопротейнів** Cas9, **CRISPR/Cpf1-РНП** також було успішно протестовано для редагування генів у протопластах **сої** та **тютюну**, прокладаючи шлях для майбутнього використання в інших культурах, у тому числі, в у фруктах та овочах. Подальші експерименти з оптимізації цієї технології дозволили регенерувати рослини з протопластів і покращили протокол трансфекції для протопластів винограду, зменшивши кількість часу, необхідного для доставки **РНП** і редагування генома, до менш ніж трьох тижнів. Цілком ймовірно, що подальша оптимізація протоколу для виду і навіть сорту буде необхідною для досягнення задовільного ефекту редагування, оскільки основною перешкодою є не доставка **РНП** через мембрану протопласта, а подальше відновлення та регенерація фертильних рослин.

Редагування основ нуклеотидів цитидину та аденозину за допомогою CRISPR (CRISPR base editing, CRISPR cytidine and adenosine base editors (CBEs/ABEs)). У той час як звичайне редагування CRISPR/Cas9 має тенденцію до введення коротких інсерцій або делецій у цільовому локусі, **редагування основ цитидину та аденозину** полегшує цілеспрямоване введення одонуклеотидних замін шляхом прямого перетворення основ С на Т або А на Г відповідно. У 2018 р. цю технологію було успішно продемонстровано на **кавуні**: редагування цитидину в гені *ALS* призвело до однієї амінокислотної заміни, якої було достатньо для надання спадкової стійкості до низки комерційних гербіцидів.

Фліпаза CRISPR (CRISPR flippase). Flp/*FRT* – це дріжджова сайт-специфічна рекомбіназна система, в якій рекомбіназа Flp (фліпаза (мембранний фермент, що переносить молекули фосфоліпідів між двома сторонами ліпідного бішару клітинних мембран)) каталізує рекомбінацію між

двома копіями сайту **FRT** (кожен із них 34 п.н.), що призводить до вирізання або інверсії інвазійної ДНК, залежно від відносної орієнтації сайтів **FRT**. У 2019 р. система Flp/**FRT** була використана для видалення маркерів селекції в яблука, абрикоса, цитрусових і винограду, лишаючи 1 **FRT** сайт.

Ці роботи заклали основу для дослідження 2020 р., в якому система Flp/**FRT** була поміщена під контроль промотора теплового шоку та заклонована в плазмиду із вбудованою системою CRISPR/Cas9, дозволяючи як редагування певного гена сприйнятливості до **фітофторозу** (захворювання, викликане ооміцетами роду *Phytophthora*) в яблука, так і подальше видалення касети CRISPR/Cas9. На сьогодні, цю технологію ще не було протестовано в інших плодових культурах, але вона є багатообіцяючою, враховуючи ефективність редагування та видалення Т-ДНК.

3.6. Очищення рекомбінантного рослинного білка

Трансгенні рослини мають деякі **переваги перед бактеріями в якості систем експресії чужорідних білків**. Наприклад, трансгенні бактерії, як правило, вирощуються в дорогих біореакторах у точно визначених умовах і вимагають висококваліфікованого персоналу для спостереження за повним процесом вирощування. З іншого боку, рослини можуть вирощуватися в **польових умовах** при набагато нижчих витратах і в більш-менш необмежених кількостях. Таким чином, однією з головних переваг експресії чужорідного білка в трансгенній рослині є те, що вирощувати рослини у великих масштабах відносно недорого.

Розглядаючи будь-який організм в якості продуцента, потрібно пам'ятати, що після росту такі продуценти мають бути зібраними та обробленими певним чином, перш ніж можна буде очистити рекомбінантний білок. Було розроблено різноманітні протоколи для очищення білків, отриманих у трансгенних бактеріях і тваринних клітинах, внаслідок чого такі білки, на сьогодні, успішно присутні на ринку. Однак ГМ рослини виробляють

набагато меншу кількість чужорідних білків; тому очищення різних цільових білків, вироблених трансгенними рослинами, все ще вимагає **особливих стратегій і підходів** для їх комерційного виробництва.

Олеозини. Новим способом полегшення очищення рекомбінантного рослинного білка є злиття **чужорідного білка з рослинними олеозинами**. **Олеозини**, або **білки олійного тіла (oil body proteins)**, містяться в **насінні** широкого кола рослин. Вони досить гідрофобні і, в основному, занурюються в невеликі крапельки олії (діаметром від 0,6 до 2 мкм), які називаються **рослинними олійними тілами**, таким чином, стабілізуючи олійні тіла як дискретні органели для зберігання нейтральних ліпідів.

Однак N- і С-кінцеві ділянки олеозинів є більш гідрофільними, ніж решта білка, і взаємодіють із водним середовищем. Тому можна розробити певні підходи для злиття олеозинів та водорозчинних білків на рівні ДНК, очікуючи, що злитий білок буде спрямовуватися в рослинні олійні тіла, що, у свою чергу, зробить порівняно легкою процедуру його очищення (рис. 3.50).

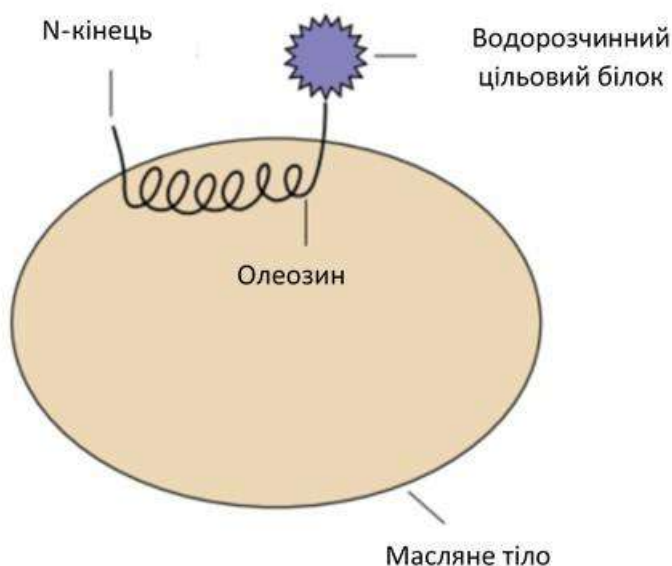


Рис. 3.50. Схематичне зображення злитого білка, що містить олеозин і водорозчинний цільовий білок, занурений в олійне тіло рослинного насіння. N- і С-кінці олеозина та білка-мішені є гідрофільними і тому взаємодіють із водним середовищем. Адаптовано з [24]

У цьому випадку водорозчинний цільовий білок не буде зануреним в олійне тіло, а буде оточеним водним середовищем.

Оскільки екстаргувати олійні тіла з насіння рослин порівняно легко, очищення рекомбінантного білка спрощується. Адже між олеозином і цільовим білком клонують **лінкерну послідовність**, розрізавши яку, можна відокремити рекомбінантний білок від тагової білкової послідовності. Зазначений підхід для експресії та очищення цільового білка має суттєве практичне значення, так як рекомбінантні білки можуть стабільно накопичуються; у той час як насіння зберігаються без деградації перед відповідними процедурами переробки.

Отже, ця система може значно знизити витрати на очищення цільових білків, що виробляються в рослинах.

Ризосекреція. Збір різноманітних білкових продуктів, які можуть продукуватися в трансгенних рослинах, може бути складним, оскільки вони, як правило, локалізовані в рослинних клітинах, які повинні бути порушеними перед їх очищенням. Більше того, оскільки витрати на очищення рекомбінантного білка можуть становити до 90 % від загальної вартості виробництва цього білка в рослині-біореакторі, дуже важливо, щоб витрати на очищення були мінімальними.

Один із способів вирішення цієї проблеми: за допомогою технології рекомбінантної ДНК сконструювати **рослини, здатні до секреції чужорідних білків за допомогою коріння, безпосередньо в живильне середовище** (гідропонна культура без ґрунту), під час процесу, який був названий – **ризосекреція**.

Зазвичай, коріння секретуює велику кількість дрібних молекул, таких як цукри та амінокислоти; однак вони виділяють лише відносно невелику кількість білків. Малі органічні молекули спочатку спрямовуються в міжклітинний простір кореня (апопласт), а потім виділяються/секретуються корінням (рис. 3.51).

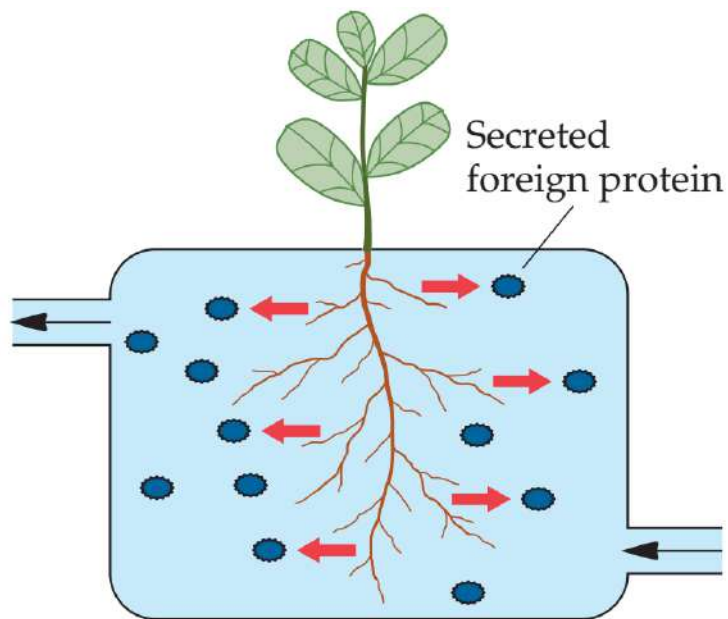


Рис. 3.51. Схематичне зображення рослини в гідропонній культурі, що виділяє в середовище білки та дрібні молекули (червоні стрілки). Стрілки біля вхідного та вихідного отворів вказують напрямок потоку доданих поживних розчинів. Цільові білки (позначено синіми кружечками), що секретуються корінням, концентруються та збираються з гідропонного середовища, а потім очищаються. Запозичено з [24]

В одній серії експериментів 3 різні білки: **ксилаза** з термофільної анаеробної грампозитивної бактерії *Clostridium thermocellum*, **зелений флуоресцентний білок (GFP)** з медузи *Aequorea victoria* та **лужна фосфатаза** з плаценти людини були протестовані, щоб встановити, чи можуть вони бути секретовані за допомогою ризосекреції. Зазначені білки спрямовували до кореневого апопласту за допомогою трьох різних сигналів секреції.

Кожен білок ефективно виділявся корінням трансгенних рослин **тютюну**, адже генетична конструкція містила послідовність ДНК, що кодувала сигнальний пептид (навіть не рослинного походження), який було розміщено на 5' кінці гена, білковий продукт якого мав секретуватися коренями. Окрім цього, було заклоновано послідовності як промотора 35S (експресується в усіх типах рослинних клітин), так і промотора *mas2'* (переважно експресується в

коренях), які забезпечували синтез значної кількості цільового білка в кореневій тканині (рис. 3.52).

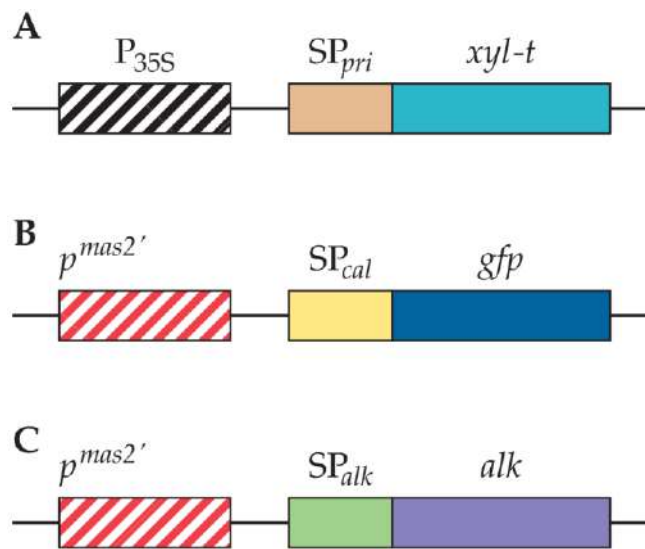


Рис. 3.52. ДНК-конструкції білків, призначені для секреції в апопласт тютюну. (А) Укорочений ген ксиланази (*xyl-t*) з *C. thermocellum* транскрипційно контролюється промотором 35S вірусу цвітної капусти (P_{35S}); продукт якого спрямовується в апопласт сигнальним пептидом інгібітора протеїнази тютюну (SP_{pri}). **(В)** Ген GFP (*gfp*) з *A. victoria*, контрольований сильним модифікованим промотором манопінсинтази *Agrobacterium* ($p_{max2'}$), який переважно активний у коренях рослин; GFP спрямовується в апопласт сигнальним пептидом інгібітора кальретикулінової протеїнази *Nicotiana plumbaginifolia* (тип тютюну) – SP_{cal} . **(С)** Укорочений ген лужної фосфатази людини (*alk*), контрольований сильним модифікованим промотором манопінсинтази з *Agrobacterium* ($p_{max2'}$), який переважно активний у коренях рослин; продукт цього гена спрямовується в апопласт сигнальним пептидом лужної фосфатази людини (SP_{alk}). Запозичено з [24]

Потрібно зазначити, що за допомогою промотора 35S чужорідний білок також можна було б відновити з **гутаційної рідини** (ексудат листя – клейкі крапельки каламутної жовтуватої рідини, що виділяються через водяні продиhi (гідатоди)). Однак, враховуючи легкість збору кореневого ексудату

порівняно з ексудатом листя, цей підхід є найбільш перспективним на сьогодні.

Глікозилювання. Велика кількість білків ссавців, включно з потенційно терапевтичними молекулами, **глікозилювані** (тобто вони містять специфічні цукри, приєднані до гідроксильної групи серину або треоніну, або амідної групи аспарагіну). У той час як додавання гліканів (полісахаридів), що містять високі рівні маннози, до певних залишків аспарагіну білків, спочатку ідентичне в клітинах ссавців і рослин, подальші модифікації призводять до утворення складних N-гліканів, структури та властивості яких значно відрізняються в цих різних організмах.

Хоча відмінності в глікозилюванні можуть безпосередньо не змінювати активність білка, інші властивості, такі як **згортання, стабільність, розчинність, сприйнятливості до протеаз, антигенність тощо можуть суттєво змінюватися.**

Щоб уникнути вищезазначених проблем, які виникають внаслідок неправильного глікозилювання білків ссавців, що виробляються в рослинних клітинах, можна **модифікувати рослину так, щоб уникнути додавання небажаних залишків вуглеводів.**

Наприклад, коли **водну рослину** з підродини ряскових (*Lemna minor*) було генно модифіковано для отримання легких і важких ланцюгів, що входять до складу моноклональних антитіл людини, одночасно її було трансфіковано конструкцією для **РНК-інтерференції**, яка специфічно інгібувала експресію ензимів α -1,3-фукозилтрансферази та β -1,2-ксилозилтрансферази.

Антитіла, вироблені цією ГМ рослиною, містили **1 основний вид N-глікану** без будь-яких рослинних специфічних залишків N-глікану (рис. 3.53 А). Не дивлячись на те, що ці вкорочені бічні ланцюги глікану не були ідентичними гліканам, які утворювались, коли моноклональні антитіла людини синтезували в культурі клітин яєчника китайського хом'яка (СНО), вони мали однакові к'орові молекули.

Окрім цього, при тестуванні моноклональних антитіл людини, одержаних із модифікованих рослин, було показано кращу як антитіло-залежну клітинно-опосередковану цитотоксичність, так і активність зв'язування рецепторів ефекторних клітин, порівняно з антитілами, які продукувались у клітинах СНО.

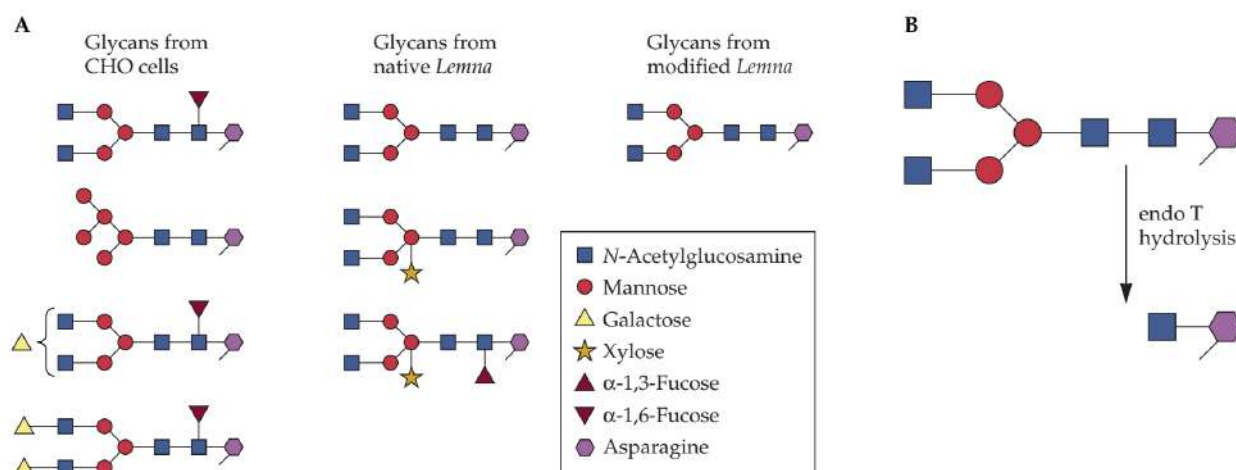


Рис. 3.53. (А). Структури бічних ланцюгів N-глікану білків, синтезованих клітинами СНО; природна форма водної рослини *L. minor* та генетично модифікована форма *L. minor*. **(В).** Розщеплення бічних ланцюгів білка N-глікану за допомогою ендо Т для отримання бічних ланцюгів білка лише з одним залишком N-ацетилглюкозаміну. Пояснення в тексті. Запозичено з [24]

Таким чином, за допомогою цієї системи можна отримати широкий спектр білків ссавців, у яких бічні ланцюги гліканів більше не обмежують використання кінцевого білка. Крім того, виробництво білків ссавців у трансгенних рослинах має бути набагато дешевшим, ніж у культурі клітин ссавців.

Для подальшого вдосконалення вищезазначеної системи ген, що кодує фермент ендо-N-ацетил- β -D-глюкозамінідазу (ендо Т) з гриба *Hyphocrea jecorina*, був введений у геном рослини *Arabidopsis thaliana* (арабідопсис Таля) під транскрипційним контролем специфічного для насіння промотора з

Phaseolus vulgaris (квасоля звичайна). Фермент було спрямовано в апарат Гольджі клітин насіння, де багато білків піддавалися глікозилюванню.

У досліджах використовували мутантний штам *A. thaliana*, в якого був відсутній фермент N-ацетилглюкозамінілтрансфераза-I; і це призвело до накопичення білків із високим вмістом гліканів маннози у бічних ланцюгах, які можуть бути використані як субстрати для ферменту ендо Т. Ендо Т гідролізував зв'язки між сусідніми залишками N-ацетилглюкозаміну в гліканах деяких білків, залишаючи лише внутрішній залишок N-ацетилглюкозаміну (рис. 3.53 В).

Ця система, яка отримала назву «**GlycoDelete**», забезпечує утворення **білків лише з одним залишком N-ацетилглюкозаміну**, приєднаним до амідної групи аспарагіну. Зазначені модифікації усувають потенційні труднощі в очищенні цільового білка, які, в іншому випадку, могли б виникнути в результаті гетерогенного глікозилювання (із різноманітними глікозилюваними білками, які мають дещо різні фізичні та біохімічні властивості) і не заважають функціонуванню цільових білків.

Більше того, розробники цієї технології стверджують, що лікарські засоби рослинного виробництва, які синтезуються в насінні, можуть стабільно зберігатися як частина насіння, поки не знадобиться виділити саме білковий продукт. Наступним кроком у розвитку цього підходу буде модифікація рослин із набагато більшим розміром насінням, ніж у *A. thaliana*, як, наприклад, у бобових.

3.7. Створення трансгенних рослин без маркерів селекції

Відомо, що одночасно з чужорідним геном у рослину вводиться також і **селективний маркерний ген (маркер селекції)**. Хоча жоден із таких генів та їх продуктів не продемонстрував негативного впливу як на живі організми, так

і на навколишнє середовища, все одно їх внесення до складу трансгенних рослин викликало певні занепокоєння спільнот.

Наприклад, не виключено, що продукти деяких маркерних генів можуть бути **токсичними** або **алергенними**. Крім того, гени стійкості до антибіотиків, які використовуються як селективні маркери, можуть передаватися патогенним ґрунтовим мікроорганізмам. Невідомо, чи передаються вони до кишкових мікроорганізмів або клітин людини. Звісно, це вважається малоімовірним, проте все ж таки існують деякі ризики, тому в багатьох місцях світу залишаються невирішеними проблеми як нормативного, так і громадського характеру.

Більше того, наявність селективного маркера ускладнює технічну трансфекцію трансгенної рослини з додатковими чужорідними генами, оскільки **один і той же селективний маркер не можна використовувати більше одного разу**.

Отже, щоб усунути вищезазначені занепокоєння, були розроблені стратегії виробництва трансгенних рослин без будь-яких маркерних генів.

Видалення маркерних генів з ядерної ДНК. Було запропоновано наступний підхід для отримання трансгенних рослин без маркерів селекції, який передбачав **котрансфекцію рослин двома окремими ДНК: одна з яких містила маркерний ген, а інша несла цільовий чужорідний ген**.

Відомо, що при застосуванні котрансфекції приблизно від 30 до 80 % модифікованих рослин містять обидва гени. Однак, оскільки 2 гени інтегровані в **різні місця хромосомної ДНК**, традиційні методи селекції можуть бути використані для видалення з трансгенної рослини селективного маркера (рис. 3.54).

Отже, зазначені 2 гени відокремлюються один від одного завдяки **хромосомній сегрегації (розходження) протягом декількох раундів спаровування**. Таким чином, селективний маркер видаляється з генома рослини під час сегрегації та рекомбінації, що відбуваються саме під час статевого розмноження.

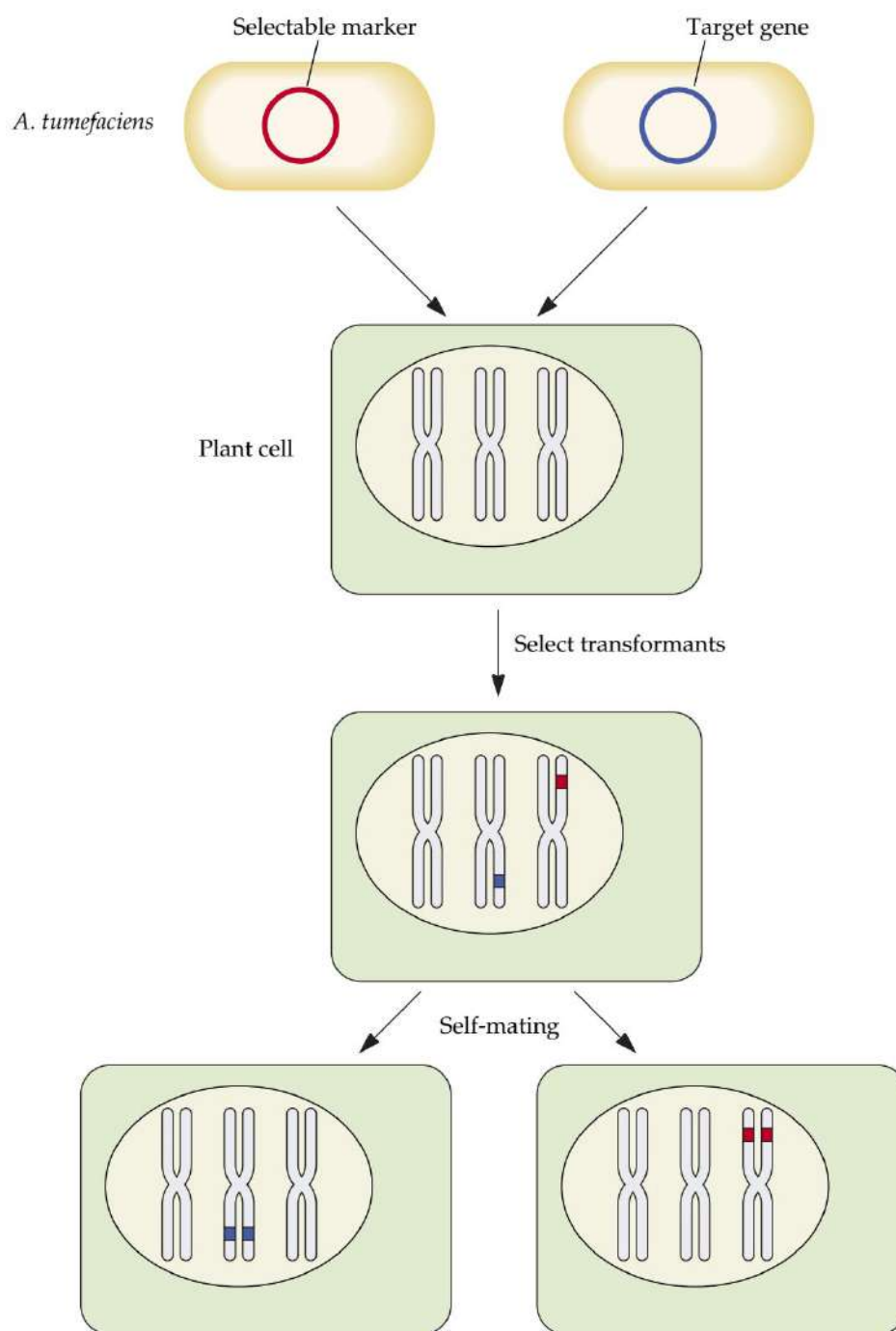


Рис. 3.54 Схематичне зображення котрансфекції рослинної клітини двома окремими ДНК. Одна ДНК містить селективний маркер, а інша – ген-мішень (бажаний цільовий ген). У середньому, більше половини трансформованих рослин мають обидва ці гени, але на різних ділянках хромосоми. Кілька раундів самоспарювання дозволяють перемістити маркерні та цільові гени на різні рослини. Запозичено з [24]

В якості альтернативи котрансфекції, селективний маркерний ген клонують між двома рослинними транспозонами (елементи Ds) і вставляють у Т-ДНК разом із цільовим геном та геном **транспозази**, яка після трансфекції спочатку виріже ДНК між двома елементами Ds, а потім інтегрує її в іншу хромосомний ділянку (рис. 3.55 А).

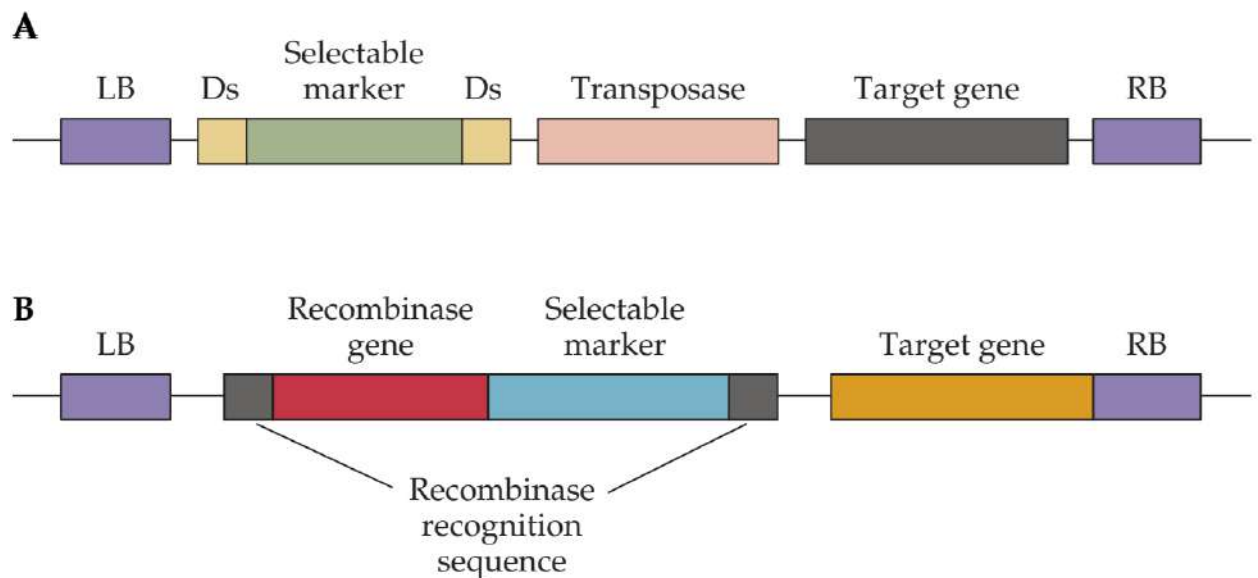


Рис. 75. (А) Схематичне зображення системи видалення гена маркера селекції на основі Т-ДНК. LB, лівий край Т-ДНК; RB, правий край Т-ДНК; послідовності промотора та сайти термінації транскрипції генів не показані. **(Б).** Схематичне зображення конструкції ДНК для напрацювання трансгенних рослин без маркерів селекції. Пояснення в тексті. Запозичено з [24]

Отже, будь-яка послідовність, яка знаходиться між двома Ds елементами, може бути перенесена на нове місце в геномі за умови наявності відповідного ферменту транспозази. Під час вбудовування Т-ДНК у ДНК рослини-господаря у 90 % випадків селективний маркер, що знаходиться між двома Ds елементами, буде переміщений в іншу ділянку хромосомної ДНК. Окрім цього, приблизно в половині випадків нове місце для вирізаного гена маркера селекції буде знаходитися далеко від початкового місця.

Таким чином, на початку експеримента ген маркера селекції може бути використаний для **ідентифікації трансфікованих рослинних клітин**, і згодом його можна буде **видалити шляхом розмноження**.

Будь-яка процедура, яка використовує статеве схрещування для відокремлення селективного маркера від гена інтересу, не може застосовуватися для **деревних рослин** (через тривалий час їх розвитку), для **рослин із вегетативним розмноженням** (коли нові рослини виростають із частин батьківської рослини, а не з насіння) або для **стерильних рослин**.

З огляду на вищезазначене, було запропоновано новий, відносно простий підхід: використовувати **специфічні послідовності ДНК, що фланкують маркер селекції**, і які потім можна застосувати для видалення цих послідовностей із генома (рис. 3.55 В). У такому випадку селективний маркер та фланкуючі послідовності лише тимчасово будуть присутніми в геномі трансгенної рослини.

Наприклад, було використано селективний маркерний ген, злитий із геном **рекомбінази** (з дріжджів *Zygosaccharomyces rouxii*), і **фланкований послідовностями** (з *Z. rouxii*), **які розпізнавалися цією рекомбіназою**. На початку дослідження було виявлено експресію селективного гена. Однак після власної експресії рекомбіназа опосередковувала вирізання ділянок між своїми сайтами розпізнавання, тим самим видаляючи гени селективного маркера й рекомбінази після нарощування культури рослин протягом декількох місяців.

Отже, у цьому випадку трансформовані рослинні клітини відбирають відразу після трансформації, щоб визначити, чи вони містять та експресують цільовий ген, а потім вирощують у культурі, поки не буде вирізаний селективний маркер. Потім трансгенні рослини розвиваються з клітин без гена маркера селекції.

На сьогодні, розроблено декілька подібних систем видалення маркерних генів з ядерної ДНК. Важливим є те, що незалежно від деталей підходів, більше не потрібно методами генної інженерії створювати трансгенні

рослини, які зберігають гени стійкості до антибіотиків або інші небажані селекційні маркери.

Видалення маркерних генів із ДНК хлоропластів. Високий рівень експресії чужорідних генів, а також можливість експресії декількох споріднених генів під контролем того самого промотора призводять до збільшення кількості чужорідних генів, що вводяться в ДНК хлоропласта рослин.

Чужорідні гени, зазвичай, вводяться як частина генетичної конструкції, яка містить бактеріальний ген маркера селекції (наприклад, *aadA*), який надає стійкості до антибіотиків **спектиноміцину** та **стрептоміцину**.

Для видалення маркерного гена його фланкують повторюваними послідовностями ДНК (наприклад, по 174 п.н.). Після росту трансфікованих клітин без селективного тиску зазначений ген буде **вирізаний шляхом гомологічної рекомбінації між прямими повторюваними послідовностями** (рис. 3.56).

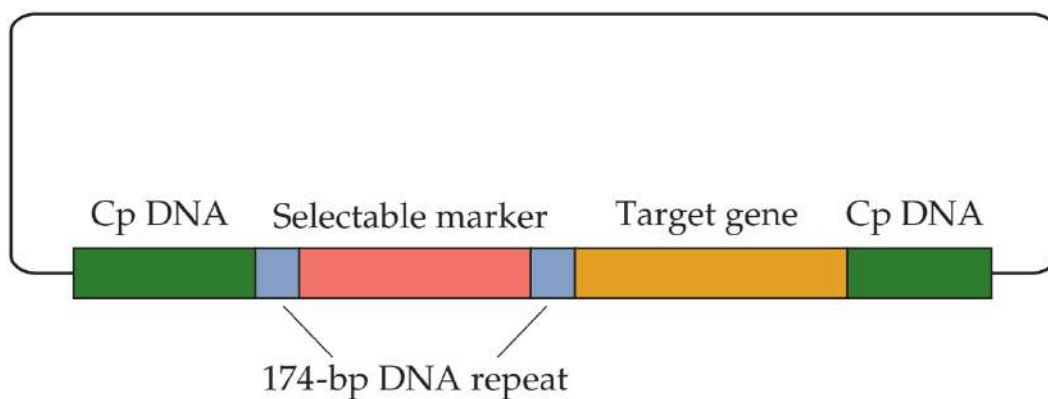


Рис. 3.56. Схематичне зображення системи видалення гена маркера селекції для трансфікованих хлоропластів. Промотори, сайти термінації транскрипції та сайти зв'язування з рибосомою для обох генів не показано. Пояснення в тексті. Запозичено з [24]

Так, після введення в хлоропласти плазмиди із **хлоропластною (Cp) ДНК послідовністю**, остання спрямовує інтеграцію чужорідного гена в

хлоропластний геном шляхом гомологічної рекомбінації (рис. 3.56). Трансформанти відбирають за їхньою стійкістю до спектиноміцину. Потім трансформанти вирощують без антибіотиків, і ген маркера селекції втрачається в результаті гомологічної рекомбінації між повторюваними елементами, довжиною 174 п.н.

Окрім цього, на сьогодні, як було зазначено вище, розробляється **сайт-специфічна рекомбіназна система Flp/FRT** для ефективного видалення маркерів селекції в рослинах.

Альтернативним підходом є **розробка селективних маркерів, які не несуть стійкість до антибіотиків або будь-які інші небажані ознаки**. Одним із можливих маркерів цього типу є **ген шпинату для ферменту бетаїн альдегіддегідрогенази**. Він присутній у хлоропластах обмеженої кількості рослин і перетворює токсичний бетаїновий альдегід на нетоксичний гліцин бетаїн. Крім того, гліцин бетаїн діє як осмопротектор, надаючи в певній мірі солестійкості або посухостійкості рослинам.

Було показано, що, використовуючи стійкість до бетаїнового альдегіду при відборі трансфікованих рослин, ефективність трансфекції була приблизно в 25 разів вищою, ніж при застосуванні спектиноміцину. Таким чином, використання цього підходу має сприяти трансфекції хлоропластів багатьох важливих культур, зокрема злаків, які є природньо резистентними до дії спектиноміцину.

3.8. Синтез коліцинів у біотехнологічних рослинах

Донедавна традиційним способом протидії небажаним бактеріям було застосування різних антибіотиків. Але, як уже було зазначено, поява та розвиток в останні десятиліття **бактеріальної мультирезистентності** значно ускладнює цю задачу. Тому останнім часом розвивається напрямок рослинної та аграрної біотехнології зі створення біотехнологічних рослин, що

продукують **бактеріюцини** (коліцини, сальмоцини) – **антибактеріальні сполуки, які можуть слугувати альтернативою антибіотикам** та підвищувати цінність сільськогосподарських культур.

Бактеріюцини – родина катіонних бактеріальних пептидів, що володіють **антимікробною активністю, однак при цьому не є антибіотиками**. На відміну від антибіотиків, бактеріюцини мають вузькоспецифічну активність і діють лише на бактерії того самого, що й продуцент, або філогенетично спорідненого виду. Більшість бактеріюцинів мають активність, потужнішу в 100-1000 разів порівняно з антимікробними пептидами еукаріотичного походження (табл. 3.6).

Таблиця 3.6.

Антибіотики проти бактеріюцинів: порівняння біологічних властивостей та ринкового потенціалу. Адаптовано з [26, 64]

Антибіотики	Бактеріюцини
Розмір 0,3-0,5 кДа	Розмір 15-80 кДа
Ефективна доза: 50 мг/кг	Ефективна доза: 0,5-5 мг/кг
Можуть використовуватись, коли цільовий патоген невідомий	Можуть бути використаними, лише коли патоген відомий
Широко поширюються через системи органів	Ефективні лише для місцевого застосування
Сформований ринок (60 млрд доларів), що був підірваний появою бактеріальної мультирезистентності	Знаходяться в розробці як альтернатива АБ. Активні проти мультирезистентних бактерій
Значний вплив дешевих генериків на ціноутворення нових препаратів	Можна встановити більш високу ціну як на іноваційні препарати

Відносно рідко випуск нових продуктів, малий обсяг інвестицій компаній у R&D (дослідження та розробку)	Останні дослідження присвячені таким цільовим системам, як шкіра, легені, уrogenітальний тракт та ШКТ

Сучасна класифікація поділяє **бактеріюцини грамполозитивних бактерій** на 4 класи:

- Лантибіотики (містять у своєму складі такі поліциклічні тіоефірні амінокислоти, як лантіонін та 3-метилантіонін: нізин та лактицин тощо);
- Не лантибіотики (сакацин А, лактацин F тощо);
- Клас III. Високомолекулярні термолабільні білки масою > 30 кДа (зооцин А, ентеролізін тощо);
- Клас IV. Характеризуються наявністю ліпідних або вуглеводних частин у своєму складі (плантарицин S, лейконоцин S);

Серед **бактеріюцинів грамнегативних бактерій** також виділяють 4 класи:

- **Коліцини.** Бактеріюцини масою ~ 10 кДа, що продукуються в клітинах *E.coli*. Найбільш популярний клас бактеріюцинів;
- Коліциноподібні бактеріюцини. За своєю структурою та функціями подібні коліцинам, однак продукуються іншими видами бактерій: клебіцини (з *Klebsiella* spp.) та піюцини (з *Pseudomonas aeruginosa*).
- Мікроцини. Бактеріюцини, масою < 10 кДа (мікроцини B17, J25 тощо);
- Бактеріюцини, подібні до фагових хвостів (Phage tail-like bacteriocins, PTLBs). Виникли як результат інсерцій генів фагових хвостів до генома бактерії (R- та F-піюцини).

Механізм дії бактеріюцинів (катіонних білків), у першу чергу, зумовлюється взаємодією з аніонною бактеріальною мембраною, що містить у своєму складі такі молекули, як фосфатидилетаноламін, фосфатидилгліцерол тощо. Бактеріюцини приймають конфігурацію, за якої їх позитивно заряджені групи електростатично взаємодіють із негативно

зарядженою поверхнею бактерій, у той час як гідрофобні поверхні перетинають ліпідний бішар. Після перетину мембрани пептиди полімеризуються, збираючись у комплекси.

Бактеріоцини індують підвищення проникності мембрани бактерії-мішені, формуючи селективні йонні канали, які, вірогідно, викликають розсіювання протонного градієнту, виснаження клітинних запасів АТФ, розщеплення субстратів і як наслідок – клітинну смерть. Наразі відомі бактеріоцини можуть бути використані в якості харчових консервантів: нізин, що продукується в *Streptococcus lactis* застосовується у харчовій промисловості під назвою E234.

Коліцини та їх використання для захисту від патогених штамів *E. coli*. Ентерогеморагічна *E. coli* (ЕНЕС) є одним із головних збудників кишкових інфекцій, викликаючи близько 100000 випадків захворювання, 3000 госпіталізацій та 90 смертей щороку лише в США. Ці хвороби першочергово пов'язані із вживанням зіпсованих тваринних продуктів та овочів.

На сьогодні, використовуються наступні **засоби інактивації бактерій у харчових продуктах**: термічна обробка та застосування органічних кислот. Другий спосіб є досить небажаним, оскільки негативно впливає на якість та смакові властивості їжі. Існують суміші бактеріофагів, які допомагають боротись із серотипом O157:H7, однак вони неефективні проти інших патогенних штамів.

Коліцини – антимікробні пептиди, що продукуються клітинами *E. coli*, чия основна властивість – це інгібування або знищення інших штамів *E. coli*.

Гени коліцину містяться у складі **коліциногенних плазмід**, а також складають частину коліцинових оперонів. Також до цих оперонів входять гени імунних білків та білки лізису: імунні білки захищають коліцин-продукуючі клітини від цитотоксичної активності акумульованого коліцину.

Білок лізису синтезується в результаті прочитання стоп-кодону гена коліцину – явище, коли після проходження стоп-кодону трансляція не зупиняється, а продовжується з нетрансльованих ділянок мРНК. Коли білок

лізису накопичується до критичного рівня, він руйнує коліцин-продукуючу клітину, призводячи до вивільнення коліцину в навколишнє середовище.

Окрім ЕНЕС, іншим поширеним харчовим патогеном є бактерії роду *Salmonella*. Представники *Salmonella* стають причиною близько 1 млн випадків захворювання у США щороку, призводячи до 19000 госпіталізацій та 380 смертей. Коліцини групи Б показують середню активність проти патогенних сальмонел, внаслідок чого постало питання отримання більш високоефективних білків. **Сальмоцини** SalE1a та SalE1b показують широку антимікробну активність проти усіх 99 патогенних штамів *Salmonella* (> 106 активних одиниць/мкг білку).

Синтез коліцинів у біотехнологічних рослинах. На сьогодні, активно вивчається метод білкового синтезу *in vitro* на основі екстракту *E. coli*, також відомого як «безклітинний» білковий синтез (**Cell-Free Protein Synthesis, CFPS**). Це поєднання екстракту клітин *E. coli*, плазмідного вектора або лінійної молекули із геном, що кодує необхідний білок, та субстратів для синтезу (нуклеозидтрифосфати, кофактори, амінокислоти, полімерази, мінеральні солі) в умовах ***in vitro***, фактично у пробірці.

Вихід загального розчинного білка (TSP, Total soluble protein) коліцину, отриманого методом CFPS сягав 240-280 мкг/мл, що десятикратно перевищує середню продукцію коліцину *in vivo*.

Переваги/недоліки:

- можливість повного контролю умов перебігу реакції, однак безперервне постачання компонентів синтезу білків є складним процесом, також це підвищує ризик контамінації;

- проблема забезпечення коректного фолдингу та пост-трансляційних модифікації білків в умовах *in vitro*. Тому для синтезу коліцинів частіше використовують рослини, що накопичують експресований білок у своїх тканинах та вимагають менш вибагливого догляду.

Існує 2 основних способи синтезу бактеріоцинів у рослинах: **стабільна генетична трансфекція та транз'єнтна експресія.**

***Agrobacterium*-опосередкована транзйєтна експресія рекомбйнантних бйлкйв.** Початково вй зусилля дослйдникйв були спрямованй на стабйльну трансформацію рослин з метою отримання стйких трансгенних лйній, якй продукують бйлки з високим фармацевтичним потенцйалом.

Тим не менш, досить швидко став очевидним **ряд обмежень генетичної трансфекції:**

1) ефективнй процедури регенерації рослин йз трансформованих клйтин у калйуснй культурй вдалось розробити лише для обмеженой кйлькостй рослинних видйв;

2) процес отримання гомозиготной трансгенної лйнйй може бути досить довготривалим: наприклад, у випадку томату цей промйжок займає бйльше року;

3) якщо бажаний продукт експресії завдає шкоди рослині, тодй повна регенерація здорових трансгенних органйзмйв стає практично неможливою. Вйрогйдним технйчним рйшенням у таких ситуацйях може бути застосування йндуцибельних промоторйв, утйм це ускладнює та здорожує метод;

4) рйвень вмісту чужорйдних бйлкйв у трансгенних рослинах рйдко коли перевищує 1 % TSP.

Тому дослйдники прийшли до висновку, що для повної реалізації потенцйалу рослинних систем для продукції цйльових бйлкйв необхідно розробити методи для стрймкої експресії: **методи транзйєнтної експресії бйлкйв на основй вйрусних векторйв та *Agrobacterium*-опосередкованого переносу генйв** (табл. 3.7).

Нймецька бйотехнологйчна компанйя «Icon Genetics GmbH» розробила власну технологйю **транзйєнтної експресії** рекомбйнантних бйлкйв у рослинах пйд назвою «**магнйфекція**» – агробактерйальна доставка в рослинну клйтину вйрусних генетичних векторйв: **агробактерії** беруть на себе **функції первинної йнфекції**, а **вйрусний вектор** забезпечує швидке поширення та експресію бйлка на високому рйвнй.

Таблиця 3.7.

Порівняння *Agrobacterium*-опосередкованого переносу генів та стабільної трансфекції. Адаптовано з [13]

Певні характеристики	Транзйєтна експресія – <i>Agrobacterium</i>	Стабильна трансфекция
Вибір організмів-господарів	Середній. Розроблені протоколи для десятків видів	Великий. Існують протоколи для більшості видів вищих рослин
Рівень експресії	Високий. Від 1-2 % до > 50 % TSP	Середній. Зазвичай, до 1 % TSP, у виняткових випадках 10-20 %
Спектр білків для можливого синтезу	Великий. Можлива експресія гетероолігомерних білків, антитіл	Великий, проте для деяких типів білків рівень експресії буде низьким
Тривалість отримання продукту	Дуже швидко. До кількох днів	Довго. Від кількох місяців до кількох років
Обсяг біомаси	Високий. Може вимірюватись у кг	Дуже високий. Може вимірюватись у т
Біобезпека	Висока. Трансгенез не відбувається	Помірна. Необхідні методи для запобігання поширення трансгенів

Одна з найбільш поширених систем **транзйєнтної експресії** базується на **індуцибельних векторах**, які поєднують компоненти рослинних вірусів (35S промотор вірусу мозаїки цвітної капусти) і компоненти **бінарних векторів**.

Як уже було зазначено, існує **2 основних методи доставки *A. tumefaciens*, що несуть вектор**, у рослинні клітини – **агроінфільтрація**:

1) лабораторна інфільтрація через **шприц**;

2) масштабна інфільтрація за допомогою вакуумної камери, також відома як **вакуумна інфільтрація**.

Вакуумна інфільтрація суспензії *Agrobacterium tumefaciens* є швидким, практичним та зручним для масштабування методом продукції чужорідних білків, що дозволяє обійтись без довготривалого процесу створення трансгенних рослин.

Для проведення вакуумної інфільтрації, рослини перевертають догори дном, занурюють наземні частини в суспензію агробактерії та поміщують у герметично закриту камеру. Після цього з камери відкачують усе повітря, утворюючи вакуум, що змушує увесь газ із міжклітинних проміжків листків вийти через продихи. За цим слідує вирівнювання тиску, яке призводить до заміщення газового середовища рослини на агробактеріальну суспензію. Після проведення вакуумної інфільтрації, рослини культивують за температури не вище 30 °C.

Найвищий рівень експресії спостерігається через 2-3 дні після інфільтрації, після чого він поступово знижується. Описаний метод працює винятково добре на *Nicotiana benthamiana* (табак Бентхама), *Mucuna bracteata* (бобова рослина) та відносно слабо на інших рослин, наприклад *A. thaliana* (арабідопсис Таля).

Агроінфільтрація індукцибельного вектора на основі TMV (вірус тютюнової мозаїки, ВТМ) в листки *N. benthamiana* була успішно застосована у лабораторних масштабах для отримання антигенів проти таких збудників як: вірус папіломи людини (HPV), чумна паличка (*Yersinia pestis*), вірус грипу А, вірус натуральної віспи (*Poxvirus variolae*) тощо.

Також шляхом транзійентної експресії були успішно напрацьовані антигени вірусу пташиного (H5N1) та свинячого (H1N1) грипу: агроінфільтровані тютюни продукували вищевказані антигени у кількості 50

мг/кг, що є показником достатньо високої продуктивності. Їх було застосовано для виготовлення вакцин проти грипу, які наразі вже пройшли 2-гу стадію клінічних випробувань.

Агроінфільтрація є дуже перспективним методом для одночасної продукції **кількох рекомбінантних білків**: пухлиноспецифічних рекомбінантних антитіл, глікозильованого рекомбінантного антитіла проти рецептора епідермального фактора росту та моноклональних антитіл проти антигенів збудника сибірки (*Bacillus anthracis*). *N. benthamiana* (табак Бентхама) – на сьогодні, є найбільш розповсюдженим організмом-господарем для накопичення рекомбінантних білків шляхом транз'єнтної експресії.

Синтез коліцинів у рослинах шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої транз'єнтної експресії. Коліцини, синтезовані в рослинах, за своїм складом та структурою ідентичні до природних коліцинів, синтезованих коліциногенними штамми *E. coli* як у середовищах, так і в ШКТ людини. Враховуючи відсутність негативного впливу коліцинів на людський організм, препарати на їх основі можуть бути визнаними як безпечні згідно вимог регуляторної процедури GRAS (Generally recognized as safe – загальноновизнані як безпечні).

Так, було отримано дуже високий рівень експресії коліцинів у рослинах *N. benthamiana*, стандартному організмі-господареві для експресії біологічно активних білків, шпинаті та буряку:

- 20-30 % TSP або 2-3 г/кг свіжої листкової біомаси без оптимізації процесу накопичення;
- коліцини, експресовані окремо або разом з відповідними їм імунними білками, не проявляли токсичної активності проти рослин;
- вартість може бути дуже низькою – близько 1-2 доларів за кг білка.

Для продукції коліцинів шляхом транз'єнтної експресії необхідну конструкцію створюють шляхом вставки гена відповідного коліцину у вірусний вектор на основі TMV або бінарну векторну конструкцію.

Оскільки різні білки мають різний механізм дії, **застосування сумішей коліцинів може здійснювати більш ефективну протидію патогенам.** Суміші коліцину М з іншими білками, особливо із коліцином Е7 демонстрували дуже високу активність проти усіх 7 серотипів *E. coli*, визнаних як головні харчові патогени Управлінням з продовольства і медикаментів США (FDA). Застосування сумішей коліцинів у дозах нижче 10 мг/кг харчового продукту знижувала кількість бактерій від 2 до $> 6 \log$ (чим більший $\log$ показник, тим більший ступінь очищення поверхні від бактерій (від 1 до 7)).

На успішність транзійентної експресії найбільший вплив мають **2 фактори: кількість клітин рослини, у якій відбулась передача векторних конструкцій, а також кількість копій цих конструкцій.**

Встановлено, що кількість введеного генетичного матеріалу переважно залежить від кількості *A. tumefaciens*, що надходить до міжклітинних проміжків внаслідок інфільтрації, та ступеня активності передачі Т-ДНК з Ті плазмід.

На сьогодні, розроблено простий процес **оброблення та очищення рослинної біомаси** із високим вмістом коліцині. У процес входять такі етапи як: гомогенізація рослинних тканин, кислотна екстракція, освітлення та нейтралізація екстрактів, ультрафільтрація та діалізація (розділення речовин із використанням напівпроникних мембран, зокрема методами зворотного осмосу й ультрафільтрації). Отриманий розчин, насичений білками, опціонально піддають ще одному або двом етапам очищення.

Якщо необхідно отримати коліцин високого ступеня чистоти, тоді проводять іоно-обмінну хроматографію для видалення залишкових клітинних білків та рослинних метаболітів, таких як алкалоїди та поліфеноли. У результаті одержують очищений ізолят коліцину зі ступенем чистоти 90 %, що можна використовувати як **харчову добавку або для оброблення готової їжі.**

Нещодавно кілька вищезазначених рослинних рекомбінантних білків бути загальноновизнані як безпечні за вимогами нормативної регуляторної

процедури GRAS в США. Ці харчові протимікробні препарати разом із схваленими біофармацевтичними препаратами та вакцинами представляють собою нові класи продуктів, виготовлених у зелених рослинах-біореакторах.

Підсумки. Таким чином, на сьогодні, за допомогою вищезазначених стратегій і підходів, генна інженерія застосовується для:

- **Подолання рослинами біотичного та абіотичного стресу** (для набуття рослиною стійкості до засухи та солей використовують такі заходи: **гіперпродукція різних осмолітів** (наприклад, трегалози, проліну, гліцину бетаїну та поліамінів); **введення генів рослинних білків стресу** (наприклад, шаперони та білки теплового шоку); **внесення генів білків антиоксидантної ланки** для захисту від реактивних форм кисню та перекисного стресу (наприклад, супероксиддисмутаза); **клонування генів біосинтезу гормонів та різних метаболічних шляхів** (таких, що впливають, наприклад, на клітинний рівень абсцизової кислоти, цитокініну та етилену); **модулювання генів факторів транскрипції**, які змінюють активність як білків «домашнього господарства», так і інших протеїнів різоманітних сигнальних каскадів;
- **Надання стійкості рослинам від комах, вірусів, гербіцидів, бактерій, грибків;**
- **Запобігання передчасного дозрівання та розм'якшення плодів** під час їх транспортування;
- **Моделювання часу цвітіння та виходу зі стану спокою** для розроблення сортів раннього або пізнього цвітіння, адаптованих до конкретних регіонів вирощування;
- **Зміни поживного вмісту рослин** (амінокислот, ліпідів, вітамінів, глютену, мікроелементів);
- **Зміни смаку, аромату та зовнішнього вигляду харчових рослин** (запобіганням знебарвлення плодів після збору врожаю тощо);

- **Оптимізації врожайності рослин** (зміна вмісту лігніну (деревина, поряд із целюлозою є складовою частиною здерев'янілих тканин судинних рослин); збільшення вмісту кисню тощо);
- Створення й вдосконалення різноманітних **дешевих «їстівних вакцин»**;
- Розробка ефективних підходів **трансщеплення** (трансживцювання): щеплення нетрансгенної прищепи на трансгенну підщепу задля надання прищепі певних бажаних якостей (плоди та насіння якої не будуть нести жодної екзогенної ДНК);
- Використання рослин в якості **економічно вигідних біореакторів** (наприклад, отримання у рослинах **бактеріоцинів** (коліцини, сальмоцини); антитіл; полі-бета-гідроксимаєляної кислоти для синтезу пластмас, здатних до біологічного розкладання; тощо).

Контрольні запитання:

1. Чому Ті плазмiда з *A. tumefaciens* широко використовується для розробки векторів для перенесення чужорідних генів у хромосомну ДНК рослин?
2. Чим (1) бінарні та (2) коінтегровані Ті-плазмідні векторні системи відрізняються одна від одної?
3. Що таке репортерні гени і як вони використовуються під час трансфекції клітин рослин?
4. Як трансфекують рослини за допомогою біолістики?
5. Як чужорідна ДНК націлена на інтеграцію в ДНК хлоропласту?
6. За допомогою яких підходів можна створити трансгенну рослину, яка не містить маркерного гена в ядерній ДНК або в її хлоропластній ДНК?
7. Стратегії використання РНК-інтерференції в рослинному геномі.
8. Назвіть сучасні стратегії запобігання вироблення у комах резистентності до Bt токсину та запропонуйте власні.
9. У чому полягає перевага введення чужорідних генів у хлоропласти, а не ядерну ДНК?

10. Що таке ризосекреція? Чому це корисно? Як це можна сконструювати?
11. Як чужорідні білки можуть експресуватися в насінні рослин?
Як можна легко очистити ці білки?
12. Як енансерні послідовності полегшують експресію генів рослин?
13. Яким чином потрібно змінити схему глікозилювання білка ссавців для йлшл продукування в рослинах?
14. Порівняння сучасних методів редагування рослинних геномів з огляду на їх можливі недоліки та переваги.
15. Поясніть загальний принцип функціонування системи CRISPR/Cas. Механізм дії системи CRISPR/Cas. Її застосування в генній інженерії рослин.
16. Біогенез crPHK у системах типу II. Що таке sgPHK?
17. Яким чином відбувається репарація дволанцюгового розриву, спричиненого Cas9?
18. Наведіть шляхи редагування генома за допомогою різних Cas9 системи CRISPR-Cas9. Сучасні модифікації цієї системи.
19. Можливості застосування систем CRISPR-Cas у культурних рослинах для створення противірусного імунітету.
20. Як відбувається синтез коліцинів у біотехнологічних рослинах?
21. Назвіть та охарактеризуйте методи детекції генетичних модифікацій у зразках.
22. Які цільові ознаки генетично модифікованих рослин?
23. Юридичний статус ГМ рослин у світі. Дебати стосовно їх безпеки.
24. Назвіть вражаючі приклади трансгенних рослин.
25. У чому відмінності цисгенезу, трансгенезу та субгенезу?
26. Як олеозини полегшують очищення рекомбінантного рослинного білка?
27. Опишіть принцип дії петле-опосередкованої ізотермічної ампліфікації (LAMP).

Розділ 4. Трансгенні тварини

4.1. Мета, історія, яскраві приклади

При використанні традиційних методів розведення потрібно застосовувати багато поколінь селективних схрещування для генетичного поліпшення худоби та інших домашніх тварин за такими **ознаками, як надої, характеристики вовни, швидкість приросту ваги та частота яйцекладки**. У кожному наступному поколінні як племінне поголів'я використовуються тварини з кращими продуктивними характеристиками. Зрештою, високопродуктивні тварини виводяться як більш менш чисті племінні лінії.

Таке поєднання парування та селекції виявилось винятково успішним, і, на сьогодні, майже всі аспекти біологічної основи тваринництва можна віднести до зазначеного процесу. Але це забирає багато часу та коштів, а введення нових ознак у створену генетичну лінію вимагає нової програми схрещувань багатьох поколінь із суворими процедурами відбору, щоб гарантувати, що нова лінія збереже як свої первинні ознаки, так і нові.

Історичні аспекти:

1974 р. – прогрес у розвитку методів перенесення генів у хромосомну ДНК клітин тварин (трансфекція клітин тварин) призвів до народження **першої у світі трансгенної тварини – ГМ миші з генетичним матеріалом вірусу SV40**.

1989 р. – вперше створено нокаутних мишей (Нобелівська премія 2007).

1990 р. – створено **першого трансгенного бика – Herman the Bull** (мав людський ген, що кодував **лактоферин** (один із компонентів імунної системи організму)).

1996 р. – перше успішне **клонування ссавця з дорослих соматичних клітин – вівця Доллі**.

2003 р. – випуск на ринок **перших комерційних ГМ тварин – «GloFish» – флуоресцентних риб даніо реріо (*Danio rerio*)** у США.

2006 р. – **вперше** отримано **людські антитіла** за допомогою трансгенних мишей **«XenoMouse»**.

2009 р. – Управління з продовольства і медикаментів США (FDA) **схвалило використання схвалило використання першого людського терапевтичного білка, антитромбіну, отриманого з козиного молока.**

У 2014 р. – FDA схвалило **використання рекомбінантного людського білка-інгібітора С1-естерази, виробленого в молочних залозах ГМ кроликів.**

2015 р. – у США зареєстровано та дозволено для **споживання в їжу першу ГМ тварину – лосося «AquAdvantage», а також FDA схвалило використання ГМ курей, які виробляють ліки («Капума») у своїх яйцях.**

2020 р. – FDA схвалило використання ГМ свиней (**«GalSafe»**): їх можна використовувати у виробництві ліків, для забезпечення органів і тканин для трансплантації людині, а також для виробництва м'яса, безпечного для споживання людьми з алергією на м'ясо (**Alpha-gal алергія, яка виникає внаслідок попереднього укусу кліща**).

Таким чином, як зазначено вище, на сьогодні, отримано **генетично модифікованих тварин (ГМТ)** для різних видів ссавців, птахів, земноводних, риб і безхребетних. Концептуально стратегія одержання таких тварин є досить простою. Ген-мішень вводиться в **ядро ембріона на ранній стадії**. Ембріони імплантують у самку-реципієнта, коли успішне завершення ембріонального розвитку неможливе поза самкою, як у випадку із ссавцями. Деякі нащадки, що розвиваються з ембріонів, будуть нести цільовий ген у всіх своїх клітинах. Потім тварин із геном-мішенню, інтегрованим у клітини їхньої зародкової лінії, розводять для створення нових генетичних ліній.

На сьогодні, генетична модифікація тварин, що мають комерційну цінність, відбувається шляхом **введення трансгенів, які кодують різні бажані ознаки** (рис. 4.1). Так, наприклад, трансгенна худоба

використовується для виробництва **фармацевтично важливих білків у їх молочних залозах**. Термін «фармінг» (словозлиття «сільського господарства» (ферми) та «фармацевтики»; «pharming», (англ.)) був придуманий, щоб передати ідею про те, що молоко ГМ тварин із ферми може бути джерелом аутентичних білкових або фармацевтичних препаратів людини.

Молоко – це відновлювана рідина організму, що секретується, яка виробляється в значних кількостях і може збиратися часто без шкоди для тварини. Новий лікарський білок, який продукується молочною залозою й секретується в молоко, не повинен чинити побічних ефектів на нормальні фізіологічні процеси трансгенної тварини і повинен піддаватися посттрансляційним модифікаціям, які, принаймні, близько відповідають таким у людини. Окрім цього, очищення білка з молока, яке містить лише невелику кількість різних білків, відносно просте.



Рис. 4.1. Загальні приклади цільового призначення генетичної модифікації тварин. Пояснення в тексті. Адаптовано з [24, 33, 77]

На доданок, трансгенез також є потужною технікою для **вивчення фундаментальних проблем розвитку тварин, фізіології та молекулярної біології**, а також для створення **моделей тваринних систем для вивчення хвороб людини** (рис. 4.1).

Вражаючі приклади ГМТ. «GloFish» (рис. 4.2) – це запатентований **перший комерційний бренд**, під яким, як зазначено вище, із 2003 р. на території США продаються **генетично модифіковані флуоресціюючі рибки даніо періо** (але офіційним виробником рибок вважається корпорація «Тайконг» у Тайвані). Ця назва утворена двома англійськими словами: glow – «сяючий», «світлення» та fish – «риба».



Рис. 4.2. Загальний вигляд рибок (А) даніо періо дикого типу; (Б) «GloFish». Пояснення в тексті. Запозичено з [41]

Даніо періо – вид невибагливих і популярних акваріумних рибок сімейства коропових. В англomовних країнах ця риба дикого типу відома як **«zebrafish»**, що натякає на характерне смугасте забарвлення, а також за своє незвичайне забарвлення риба отримала прізвисько **«жіноча панчоха»** (рис. 4.2).

Відмінними рисами штучно виведених ГМ особин **«GloFish»** від вихідної форми є:

- трансгенні даніо відрізняються від своєї вихідної форми забарвленням тіла: червоне, зелене або помаранчеве флуоресцентне забарвлення;

- в їх ДНК вбудовані фрагменти ДНК медузи (*Aequorea Victoria*) і червоного коралу (з роду *Discosoma*);
- данію з фрагментом ДНК медузи (ген GFP) мають зелений колір;
- особини данію з фрагментом ДНК корала (ген RFP ДНК) – червоні, а рибки, в генотипі яких присутні обидва фрагмента, – жовті;
- завдяки наявності цих чужорідних білків рибки яскраво світяться в ультрафіолетовому світлі;
- трансгенна форма віддає перевагу більш теплій воді – близько 28 °C;
- відмінності в утриманні, годуванні, розвитку в генетично змінених данію рерію непомічені: трансгенні рибки так само невибагливі в утриманні та миролюбні;
- усі особини «GloFish» із моменту народження мають флуоресцентне забарвлення, яке зберігається все життя й стає яскравішим у міру дорослішання рибки. Таке забарвлення передається малькам при розмноженні трансгенних видів;
- незважаючи на поширення думки про безплідність або стерилізацію генетично модифікованих риб з метою їх не поширення в природних водоймах, від «GloFish» можна отримувати цілком здорове та життєздатне потомство;
- продаж та зберігання цих рибок залишається незаконним у Каліфорнії через постанову, що обмежує розведення, обмін і продаж будь-яких ГМ риб розведення. Проте є чисельні порушення.

Хоча спочатку рибки виводилися не в якості декоративних: первинною метою було полегшити спостереження за внутрішніми органами цих напівпрозорих рибок та створити живі індикатори забруднення (при наявності у воді певних токсичних речовин рибки повинні були змінювати забарвлення), вони стали першими загальнодоступними ГМ домашніми тваринами.

На додаток до червоних флуоресцентних данію-рерію, яких продавали під торговою маркою «Червона зоряна рибка» (англ. Starfire Red), до середини 2006 р. були виведені зелені та помаранчово-жовті флуоресцентні данію, а у

2011 р. – сині та фіолетові. Ці генетичні лінії риб отримали торгівельні назви «Електрично-зелена» (англ. Electric Green), «Сонячно-помаранчева» (англ. Sunburst Orange), «Космічно-синя» (англ. Cosmic Blue) і «Галактично-пурпурова» (англ. Galactic Purple). Усі ці рибки були виведені за допомогою генної інженерії з використанням рекомбінантної ДНК від різних морських коралів.

У 2012 р. з'явився новий різновид флуоресцентних акваріумних рибок (рис. 4.3) під маркою зеленого різновиду англ. «Electric Green» «GloFish», які були виведені тим же методом, що і попередні, але замість даніо-реріо були використані звичайні тернеції (*Gymnocorymbus ternetzi*, вид прісноводних риб родини харацинових). У 2013 році з'явилися тернеції помаранчового та рожевого («Moonrise Pink») забарвлення, а в 2014 до них додалися червоне та синє забарвлення. Створено також форми з вуалевими плавцями.

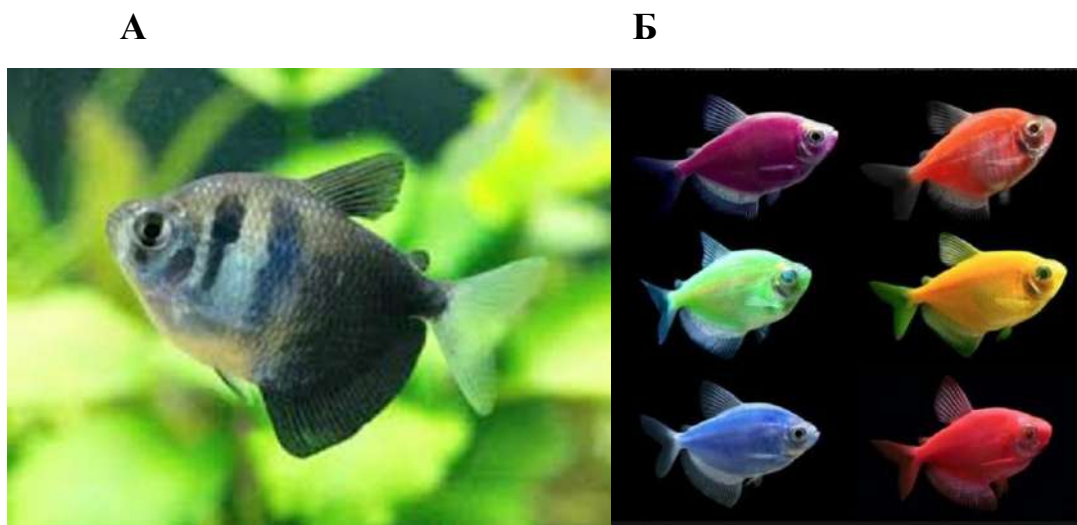


Рис. 4.3. Загальний вигляд рибок: (А) тернеція дикого типу; (Б) різноманітні тернеції «GloFish». Пояснення в тексті. Запозичено з [41]

У 2015 р. були представлені зелені флуоресцентні **барбуси** суматранські або пунтіуси суматранські (*Puntius tetrazona*) – вид прісноводних риб родини Коропових (рис. 4.4). Потім було отримано їх червоний різновид.

На сьогодні, створено «GloFish» і для інших видів риб.

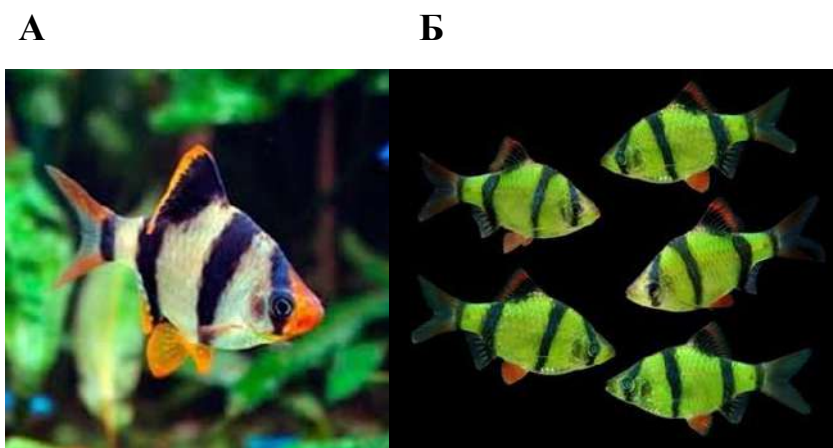


Рис. 4.4. Загальний вигляд рибок: (А) барбус суматранський дикого типу; (Б) «Electric Green» «GloFish». Пояснення в тексті. Запозичено з [41]

Окрім вищезазначених прикладів, можна згадати про худобу, яка виділяла на 25 % менше метану (послаблення парникового ефекту), ніж звичайна корова, за рахунок генно-інженерних маніпуляцій із бактеріями ШКТ. Кози, у ДНК яких було вбудовано ген каркасної нитки павутини, унаслідок чого тварина стала виробляти павутинний білок у своєму молоці. Це «шовкове молоко» потім можна використовувати для виробництва павутинного матеріалу під назвою «Біосталь» («Nexia Biotechnologies», Канада). Створення інших **флуоресцентних тварин** для вивчення патогенезу людських хвороб; та великої рогатої худоби з вимкненим геном міостатину (див. далі підпідрозділ 4.4.6) для збільшення виробництва м'яса (рис. 4.5).

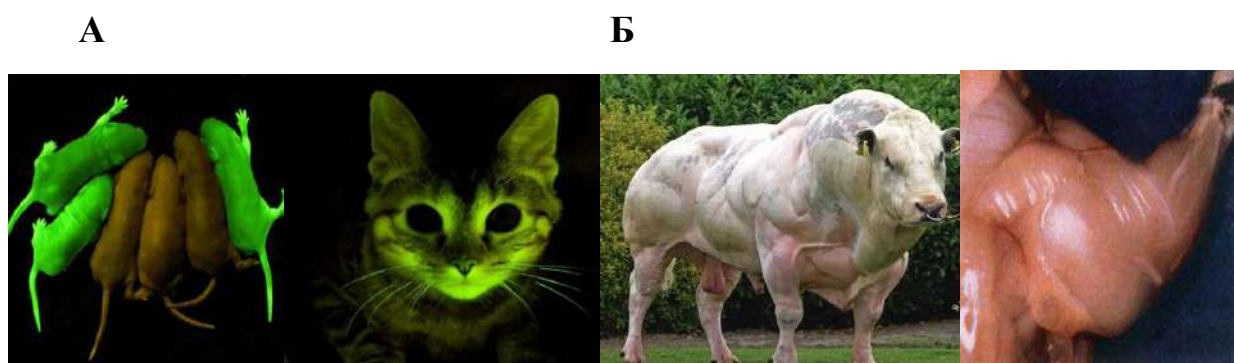


Рис. 4.5. Генетично модифіковані тварини: (А) Флуоресцентні тварини; (Б) Тварини з вимкненим геном міостатину. Пояснення в тексті. Запозичено з [29]

4.2. Трансгенні миші: методологія

Трансгенна технологія була розроблена та вдосконалена саме на лабораторних мишах. Так, із 1980-х років у різні лінії мишей було введено сотні різних генів. Ці дослідження сприяли **розумінню механізмів регуляції генів та розвитку пухлин**; дослідженню імунологічної специфічності, молекулярної генетики розвитку та багатьох інших фундаментальних біологічних процесів. Трансгенні миші також відіграли вагомую роль у вивченні можливості **промислового виробництва одомашненими тваринами терапевтичних препаратів для людини** та у створенні **трансгенних штамів**, які діють як **біомедичні моделі різних генетичних захворювань людини**.

Для трансгенезу ДНК може бути введена мишам різними підходами (1) **методом мікроін'єкції в збільшене ядро чоловічого пронуклеуса заплідненої яйцеклітини**; (2) за допомогою **ретровірусних векторів**, які інфікують клітини ембріона на ранній стадії перед імплантацією в самку; та (3) **шляхом генетичної інженерії ембріональних стовбурових клітин**, які вводять на ранній стадії розвитку ембріона до імплантації в самку.

4.2.1. Метод мікроін'єкції ДНК

Мікроін'єкція ДНК, на сьогодні, є **найкращим методом отримання трансгенних мишей**. Цю процедуру виконують у такий спосіб (рис. 4.6). Донорів яйцеклітин стимулюють до суперовуляції, щоб збільшити кількість запліднених яйцеклітин, які доступні для мікроін'єкції. Самкам мишей роблять початкову ін'єкцію сироватки вагітної кобилки і приблизно через 48 год ін'єкцію хоріонічного гонадотропіну людини. Миша з суперовулюцією виробляє близько 35 яєць замість звичайних 5-10. Самки із суперовулюцією спаровуються із самцями. Потім запліднені яйця вимивають з їх яйцеводів.

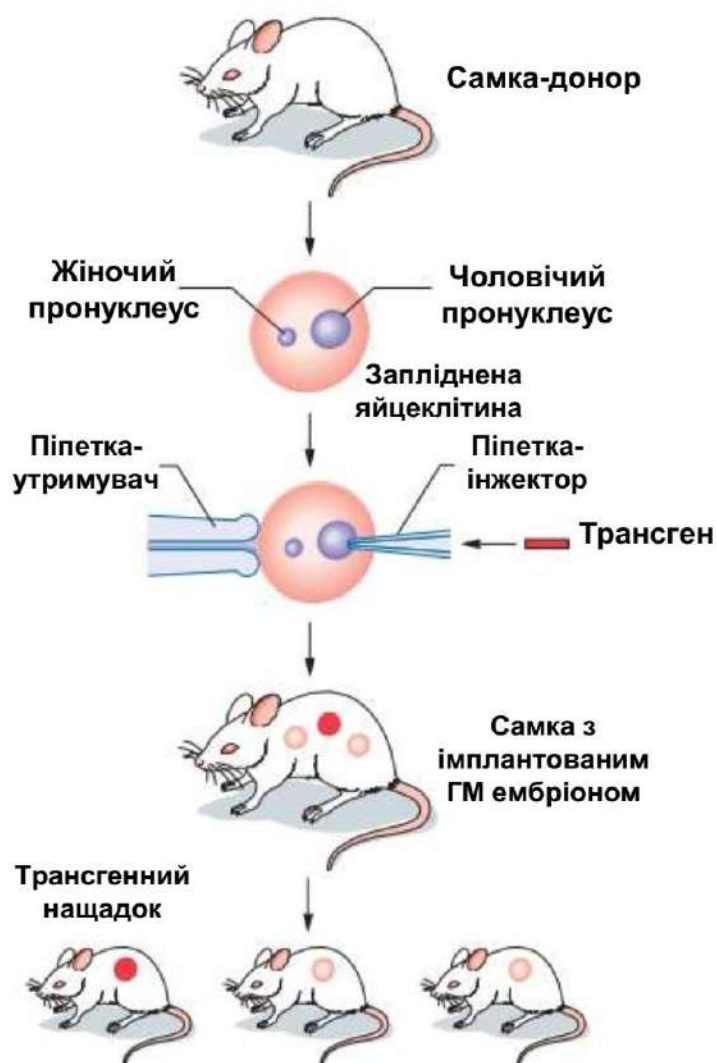


Рис. 4.6. Стадії отримання трансгенних мишей за допомогою методу мікроін'єкції ДНК. Пояснення в тексті. Адаптовано з [24]

Мікроін'єкція ДНК у запліднені яйцеклітини відбувається відразу після їх збору. **Мікроін'єкційна трансгенна конструкція**, як правило, є **геном**, **комплементарною ДНК (кДНК)** або **частиною гена**; зазвичай вона має лінійну форму; і не містить прокаріотичних векторних послідовностей ДНК.

У ссавців після потрапляння сперматозоїда в яйцеклітину як ядро сперматозоїда (чоловічий пронуклеус), так і жіноче ядро є окремими утвореннями. Жіноче ядро завершує свій мейотичний поділ і стає жіночим пронуклеусом, а потім відбувається злиття двох ядер (каріогамія). Перед ядерним злиттям чоловічий пронуклеус, який має тенденцію бути більшим за жіночий, можна визначити за допомогою мікроскопії. Потім заплідненою

яйцеклітиною можна маневрувати: орієнтувати певним чином та утримувати на місці за допомогою мікроманіпуляцій, поки виконується мікроін'єкція ДНК. Деякі з введених молекул ДНК можуть інтегруватися в хромосому.

Після мікроін'єкції від 25 до 40 запліднених яйцеклітин із трансгеном мікрохірургічним шляхом імплантують так званій «прийомній» матері, яку перед цим зробили псевдовагітною шляхом спаровування з вазектомізованим самцем. У мишей копуляція є єдиним відомим способом підготовки матки до імплантації. У цьому випадку, через брак сперми у самця, не відбувається запліднення жодної з яйцеклітин «прийомної» матері. Приблизно через 3 тижні після імплантації «прийомна» мати народжує ГМ дитинчат (рис. 4.6).

Для **ідентифікації ГМ тварин** виділяють ДНК із невеликого шматочка тканини хвоста або вуха, а потім аналізують за допомогою **ПЛР** на наявність трансгена. Трансгенну мишу можна спаровувати з іншою мишею, щоб визначити, чи є трансген у зародковій лінії тварини-засновника. Згодом ГМ нащадків можна схрещувати один з одним для утворення чистих (гомозиготних) трансгенних ліній.

Вищезазначена процедура, хоча на перший погляд і виглядає простою, однак вона **вимагає координації ряду експериментальних кроків, великої кількості яйцеклітин, а також висококваліфікованого персоналу**. Крім цього, у кращому випадку лише 5 % запліднених яйцеклітин із введеною ДНК за допомогою методу мікроін'єкції ДНК зможуть розвинутися в живих трансгенних тварин (рис. 4.7).

Також не всі ГМ дитинчата будуть мати відповідні бажані характеристики. За допомогою цього методу **введена ДНК інтегрується у випадкове місце в геномі**, і часто кілька копій внесеної ДНК вбудовуються в одне місце. У деяких особин кількість копій може бути надмірною, що, у свою чергу, може призвести до **гіперекспресії** та порушення нормальної фізіології тварини.

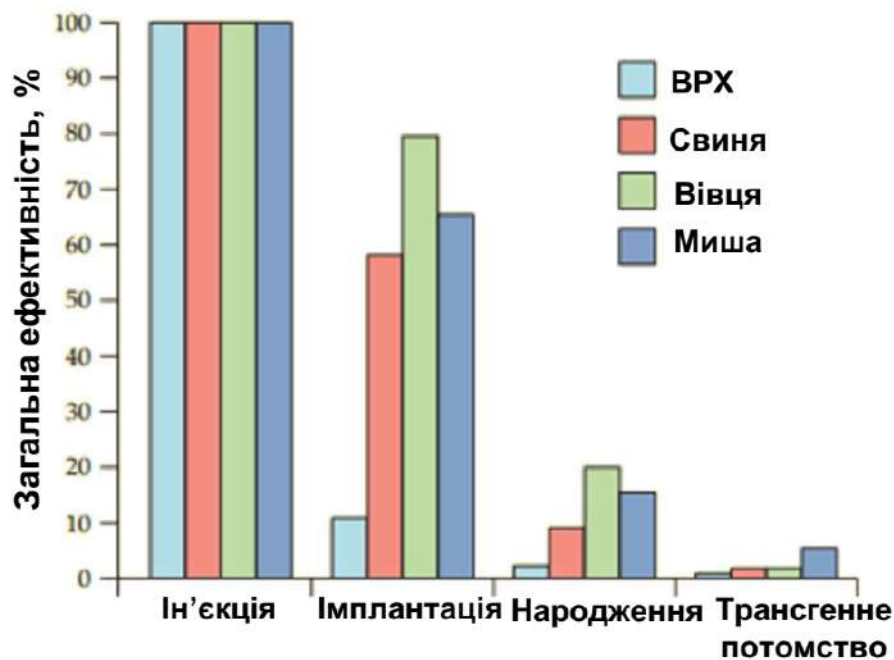


Рис. 4.7. Гістограмми порівняння ефективності проходження стадій отримання трансгенних тварин для різних ссавців за допомогою методу мікроін'єкції ДНК. ВРХ – велика рогата худоба. Пояснення в тексті. Адаптовано з [24]

В інших випадках, трансген може **експресуватися на низькому рівні**, внаслідок як інтеграції в транскрипційно неактивну область генома, так і через вплив негативної регуляції певними послідовностями на відповідній відстані від місця вставки. Для усунення зазначених обмежень були розроблені вектори з високою пропускнуою здатністю, які дозволяють вводити великі послідовності ДНК, які ефективно регулюють транскрипцію або запобігають зниженню експресії трансгена.

Ці вектори також корисні для внесення великих мультигенних послідовностей. Їх отримують, наприклад, із **штучних хромосом дріжджів (YAC)**, які здатні трансфekuвати ДНК-вставки розміром від 100 до 1000 т.п.н. Ряд трансгенних мишей було отримано шляхом мікроін'єкції зі штучними хромосомами, які містили або набір родинних генів, або один великий ген.

Так, було отримано мишей, які синтезували майже повний репертуар людських антитіл для лікування онкологічних захворювань (див. далі підрозділ 4.3 про створення «**КсеноМиші**»).

Отже, незважаючи на загальну неефективність, застосування методу мікроін'єкцій ДНК у чоловічий пронуклеус заплідненої яйцеклітини стало рутинним підходом для створення ліній мишей, що несуть функціональні трансгени, для вивчення процесів розвитку; а також як для моделювання різних захворювань, так і для виробництва терапевтичних агентів для людини.

4.2.2. Вірусні вектори

Вірусні вектори – це поширені інструменти доставки генетичного матеріалу в тваринні клітини. Доставка генів вірусом має назву **трансдукція**. Клітини, що отримали трансген, – **трансдуковані**.

Ретровіруси мають РНК-геноми, які використовуються як шаблон для зворотної транскриптази під час синтезу лінійної дволанцюгової копії ДНК, яку можна вставити в геном інфікованої клітини-господаря.

Деякі вектори, що використовуються для створення трансгенних тварин, використовують здатність ретровірусів доставляти та **інтегрувати трансген у геном** клітини-реципієнта.

Сконструйований ретровірусний вектор, що несе трансген, вводять в ембріони на ранніх стадіях розвитку (як правило, на восьмиклітинній стадії), а потім інфіковані ембріони переносять до самок-реципієнтів для їх подальшого розвитку (рис. 4.8).

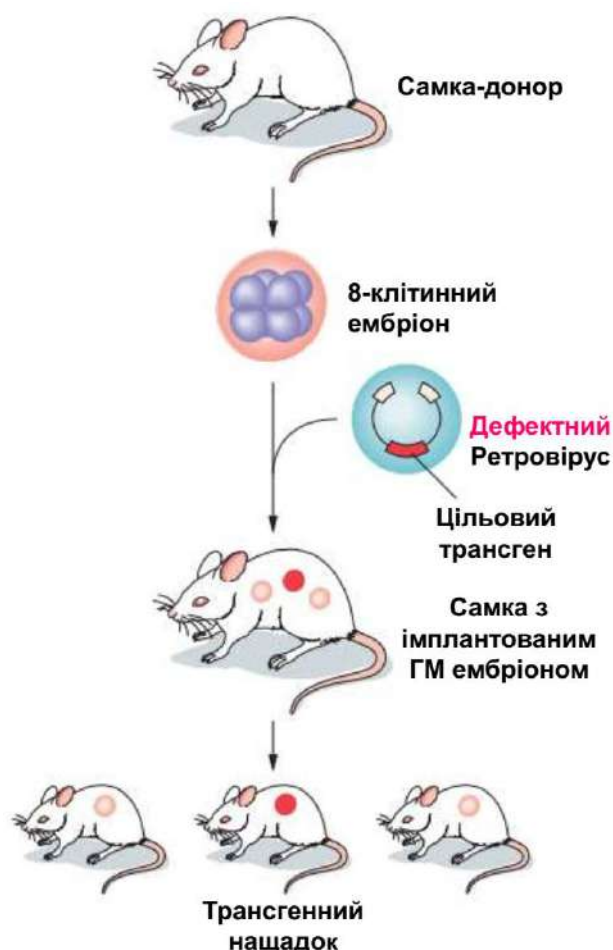


Рис. 4.8. Створення трансгенних мишей за допомогою ретровірусного вектора. Пояснення в тексті. Адаптовано з [24]

Потім проводять спаровування, щоб визначити, які дитинчата мають трансген у клітинах зародкової лінії. Надалі трансгенні лінії можуть бути створені з таких трансгенних тварин-засновників. Цей метод дає високі показники трансгенезу у мишей; часто більше 80 % нащадків містять трансген. Однак **сайт інтеграції в геном хазяїна є випадковим**, і введені трансгени можуть бути неактивними в ембріонах миші.

Система ретровірусного вектора складається з **транспортного вектора (вектора-переносника)**, який несе трансген, та **пакувальної клітинної лінії**, яка забезпечує продукування вірусних білків для виробництва великих кількостей вірусних частинок, які, у свою чергу, використовуються для доставки трансгена в цільові клітини.

Транспортний вектор побудовано з ретровірусного генома, з якого видалено всі вірусні гени, що кодують білки. У ньому зберігаються лише вірусні сигнали, необхідні для інкапсуляції векторної РНК у вірусні частинки та подальшої інтеграції трансгенної ДНК (із відповідними сигналами транскрипції та трансляції) у геном господаря (рис. 4.9).

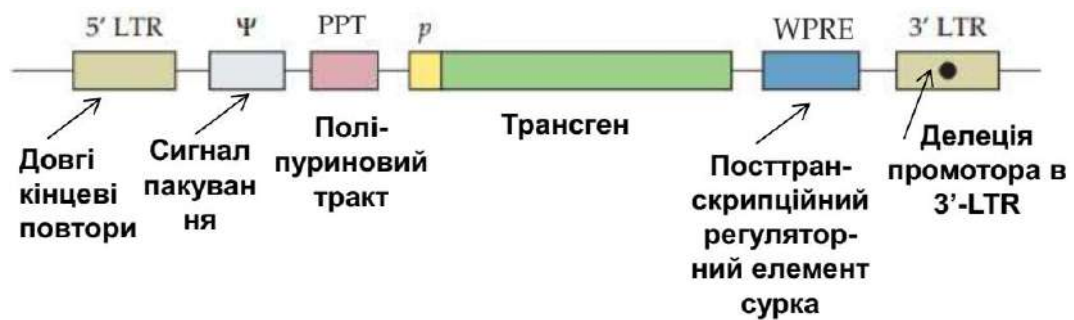


Рис. 4.9. Схема ретровірусного (лентивірусного) вектора для трансфекції тваринних клітин. Регуляторний елемент у межах 3' LTR видалено (позначено чорною крапкою), *p* – промотор. Пояснення в тексті. Адаптовано з [24]

Довгі кінцеві повтори (Long terminal repeat, LTR) на 5'- і 3'-кінцях вектора необхідні для виробництва лентивірусної РНК, а сигнал пакування (Ψ) є обов'язковим для упаковки РНК у вірусні частинки. Після інфікування клітин тварин вірусними частинками відбувається **зворотна транскрипція РНК транспортного вектора**, і трансген інтегрується в геном клітини тварини за допомогою довгих кінцевих повторів (LTR). Послідовність поліпуринового тракту (PPT) і посттранскрипційний регуляторний елемент сурка (WPRE) підсилюють трансдукцію клітин господаря та підвищують експресію трансгена в клітинах тварин. Делеція в 3' LTR запобігає транскрипції суцільної векторної РНК з промотора, що міститься в LTR, після введення в цільові клітини (рис. 4.9). Потрібно зазначити, що ця делеція не впливає на експресію трансгена, оскільки він експресується з власного промотора.

Транспортний вектор вводиться в **пакувальну клітинну лінію**, яка продукує вірусні білки, необхідні для виробництва транспортної векторної РНК, включно з трансгенною послідовністю і капсидами, в які буде упаковуватися векторна РНК для генерування вірусних частинок (рис. 4.10).

Як можна побачити на цьому рисунку, **пакувальна клітинна лінія** містить ретровірусні гени, що кодують ферменти, необхідні для реплікації вірусного генома (*pol*), утворення вірусного капсида та інших структурних білків (*gag*), а також для продукування вірусних поверхневих глікопротеїнів (*env*), які часто заклоновані на окремих плазмідах і функціонують під контролем сильного конститутивного промотора, такого як, наприклад, промотор цитомегаловірусу людини (CMV). Вірусні сегменти не мають послідовності інкапсуляції ($\Delta\psi$), яка потрібна для упаковки ретровірусного генома у вірусний капсид. Пакувальна клітинна лінія синтезує вірусні білки, але за відсутності послідовності інкапсуляції утворюються порожні вірусні капсиди. Пакувальну клітинну лінію трансфекують ретровірусним транспортним вектором, що несе трансген (рис. 4.9).

Векторні РНК, отримані з транспортного вектора, мають сигнал інкапсуляції (ψ^+), тому вони упаковуються у вірусні капсиди. Вивільнені вірусні частинки не здатні до реплікації, оскільки вони не мають гена *pol*.

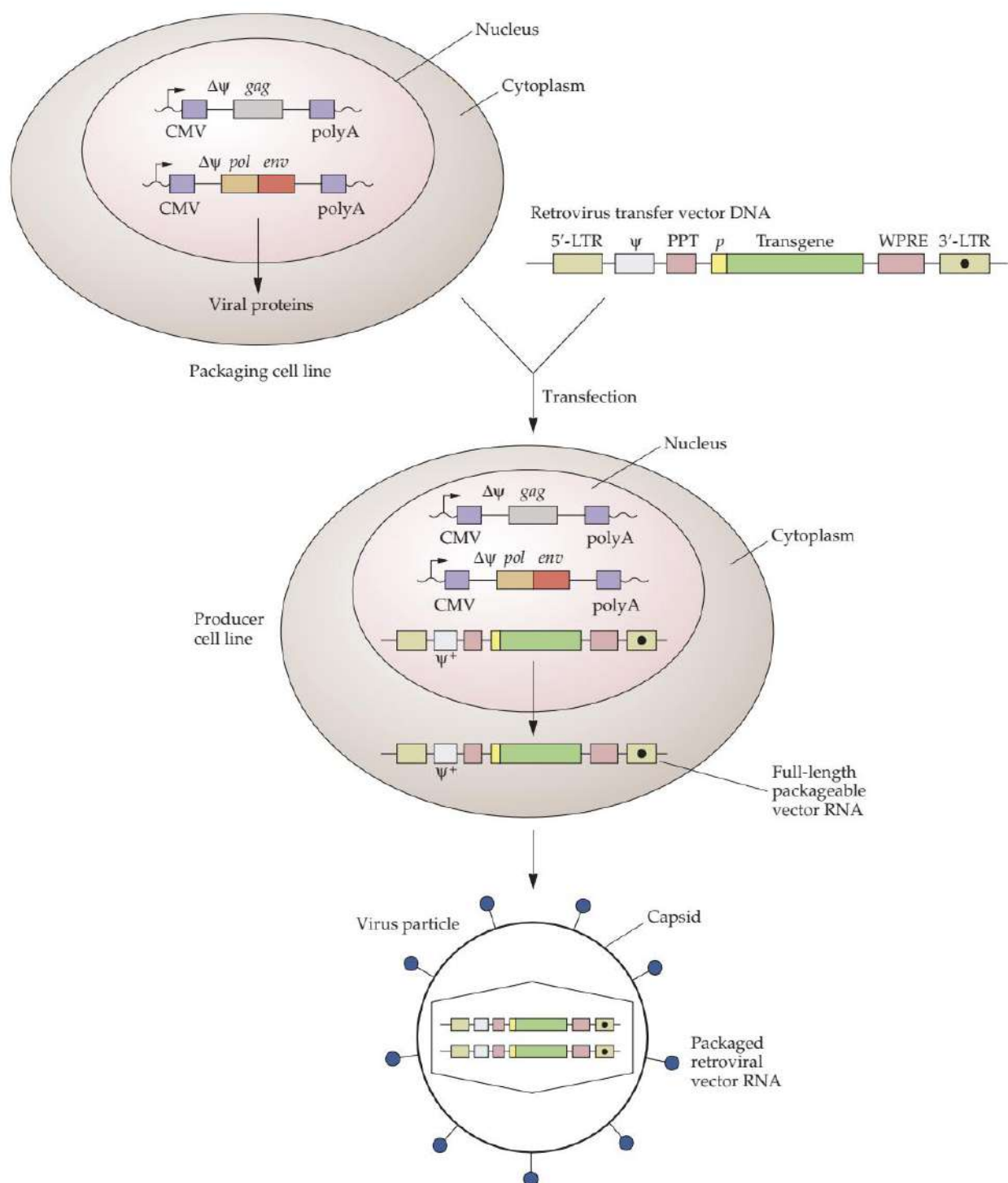


Рис. 4.10. Протудування упакованої векторної ретровірусної РНК.
Пояснення в тексті. Запозичено з [24]

Вектори на основі лентивірусів (тип ретровірусів), успішно використовуються для введення різноманітних трансгенів в ембріональні клітини або ранні ембріони мишей, свиней, великої рогатої худоби та птахів. Їх перевагами є:

- 1) стабільність упродовж тривалого періоду;
- 2) низьку імуно- та канцерогенність;
- 3) вони підходять як для клітин, що діляться, так і для тих, що не діляться;
- 4) за їх допомогою можна переносити відносно великі фрагменти ДНК.

Також було показано, що трансгени, введені за допомогою лентивірусів, можуть експресуватися на достатньо високому рівні в усіх тканинах або тканино-специфічно залежно від обраного промотора. Також лентивіруси часто використовуються як засоби доставки конструкцій для зниження експресії генів у мишей та інших організмів за допомогою **РНК-інтерференції** (див. далі підрозділ **4.2.6.**).

4.2.3. Інженерія ембріональних стовбурових клітин

Клітини з ембріона миші, який розвивається та перебуває на **ранній стадії бластоцисти**, можуть проліферувати в культурі клітин і все ще зберігати здатність диференціюватися на всі інші типи клітин, включно з клітинами статевої лінії, після їх повторного введення в інший ембріон, перебуваючий на стадії бластоцисти. Такі клітини називаються **плюрипотентними ембріональними стовбуровими клітинами**.

У культурі ембріональні стовбурові клітини можна легко піддавати генетичній інженерії, не змінюючи їх плюрипотентності. Наприклад, за допомогою цієї системи **функціональний трансген може бути інтегрований у певному місці** в межах необхідної області генома ембріональних стовбурових клітин – за допомогою **гомологічної рекомбінації**. ГМ клітини можуть бути відібрані, вирощені та використані для створення трансгенних тварин (рис. 4.11).

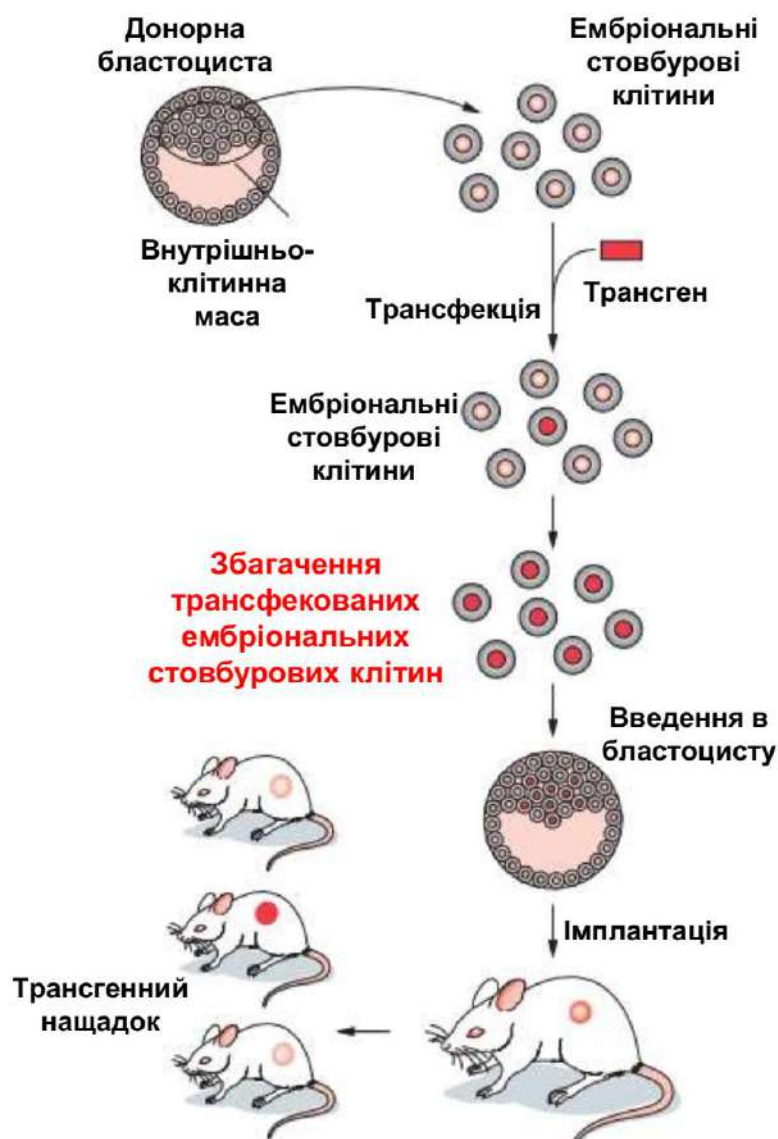


Рис. 4.11. Загальна схема процесу отримання трансгенних організмів, використовуючи метод інженерії ембріональних стовбурових клітин. Пояснення в тексті. Адаптовано з [24]

Отже, за допомогою цього підходу випадковість інтеграції, яка властива методу мікроін'єкцій ДНК та ретровірусним векторним системам, уникається.

Цільовий сайт повинен бути розташований у ділянці геномної ДНК, яка не кодує жодних важливих продуктів, щоб після інтеграції екзогенної ДНК не відбувалося ніякого негативного впливу чи втручання у будь-які клітинні процеси чи процеси розвитку. Більш того, важливо, щоб трансген був інтегрований до тієї частини генома, у якій його експресія не буде ніяким

чином пригнічуватись, як, наприклад, може відбутися при вбудовуванні в гетерохроматин.

Після трансфекції (зазвичай шляхом **електропорації**) культури ембріональних стовбурових клітин вектором із бажаною ДНК, який спеціально розроблений для інтеграції в межах певної визначеної хромосомної ділянки, деякі клітини можуть мати трансгенну ДНК, інтегровану в нецільові (хибні) ділянки, тоді як в інших клітинах інтеграція відбудеться у правильному сайті. На жаль, у більшості ембріональних стовбурових клітин цільова ДНК взагалі не буде інтегрована.

Тому перед введенням в бластоцисту проводиться додатковий етап **збагачення наявної культури клітин на трансгенні ембріональні стовбурові клітини**. Ця процедура називається **позитивно-негативна селекція**. Ця стратегія використовує **позитивний відбір** для клітин, які мають векторну ДНК, інтегровану у будь-якому місці своїх геномів; і **негативний відбір** щодо клітин із послідовністю векторної ДНК, яка інтегрована в хибних ділянках.

Цільовий вектор ДНК для позитивно-негативної процедури відбору (рис. 4.12, А), зазвичай, повинен містити:

1. 2 блоки послідовностей ДНК (HB1 і HB2), гомологічні окремим ділянкам мішені;
2. трансген, який надасть реципієнту нову функцію (TG);
3. послідовність ДНК, яка кодує стійкість до сполуки G-418 (Neo^r);
4. 2 різні гени тимідинкінази (*tk1* та *tk2*) вірусів простого герпесу типів 1 та 2 (HSV-*tk1* та HSV-*tk2*). Розташування цих послідовностей є ключовим моментом для розуміння механізму позитивно-негативної селекції.

Так, між двома блоками ДНК, гомологічними сайту-мішені, знаходяться послідовності ДНК, що кодують як трансген, так і ген стійкості до цитотоксичної сполуки G-418 (ген Neo^r). Поза кожним із гомологічних блоків знаходяться гени HSV-*tk1* та HSV-*tk2*. Якщо інтеграція відбувається в хибному

сайті (тобто не в HB1 та HB2), то один або обидва гени HSV-tk мають високу ймовірність інтеграції разом з іншими послідовностями (рис. 4.12, А).

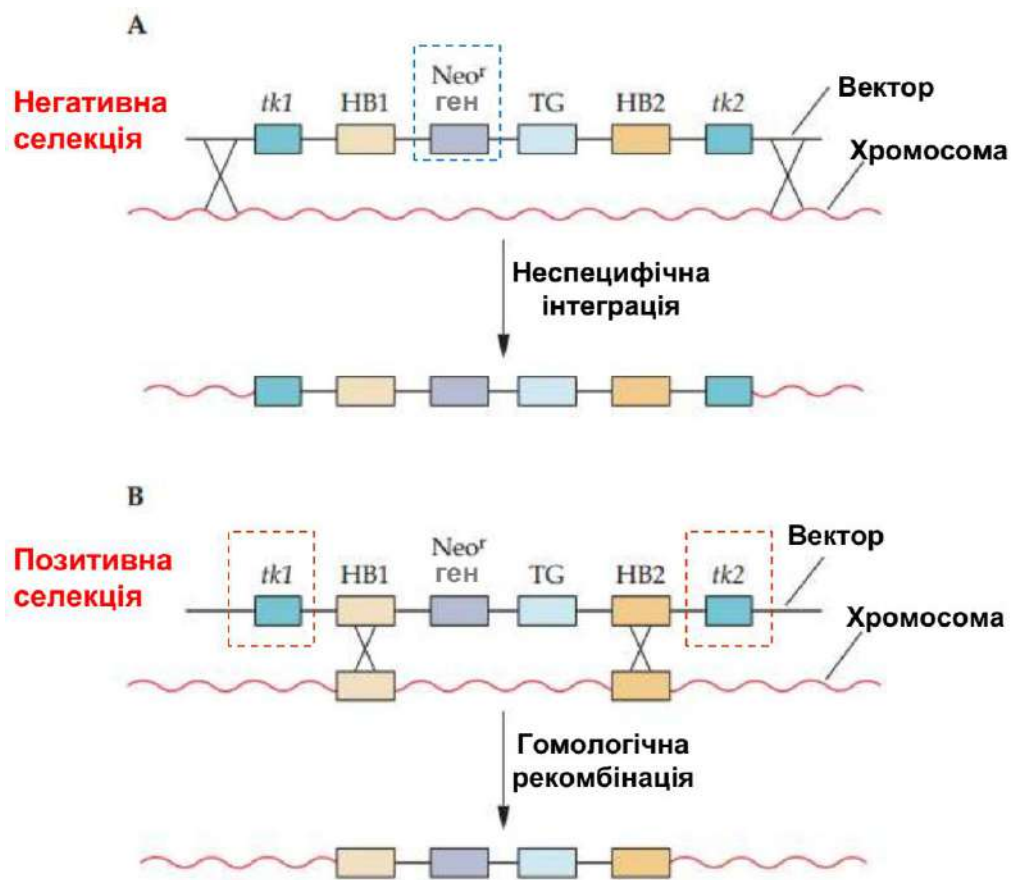


Рис. 4.12. Позитивно-негативна селекція. (А) Результат неспецифічної інтеграції. (В) Результат гомологічної рекомбінації. Пояснення в тексті. Адаптовано з[24]

В якості альтернативи, якщо інтеграції була обумовлена гомологічною рекомбінацією за допомогою подвійного кросинговеру в сайті-мішені, гени HSV-*tk* будуть видалені, і в геном будуть введені тільки трансген і ген *Neor^r* (рис. 4.12, В).

Коли трансфіковані клітини вирощують у присутності G-418, усі клітини, у яких відсутній ген *Neor^r*, гинуть. Отже, зможуть вижити лише клітини з інтегрованою ДНК (тобто ці клітини будуть позитивно відібраними).

Якщо сполуку ганцикловір додати одночасно з G-418, клітини, які експресують тимідинкіназу, будуть знищені, тому що тимідинкіназа перетворює ганцикловір на токсичні сполуки, які вбивають клітини (тобто ці клітини зазнають негативного відбору). Клітини, які, швидше за все, виживуть у цій схемі подвійного відбору, будуть такими, у яких ДНК інтегрована саме в цільовому сайті. Хоча метод позитивно-негативної селекції не є достатньо надійним, він збагачує популяцію ембріональних стовбурових клітин клітинами, котрі несуть трансген у певному місці на хромосомі.

Окрім зазначеної процедури селекції, можна також проводити **пряме тестування на неспецифічну інтеграцію та гомологічну рекомбінацію в трансфікованих клітинах методом ПЛР**. Цільовий ДНК-вектор містить 2 блоки ДНК, гомологічні сайту-мішені, по одному з кожного боку від трансгена та клонованої бактеріальної або синтетичної (унікальної) послідовності ДНК, що відсутня в геномі миші (рис. 4.13).

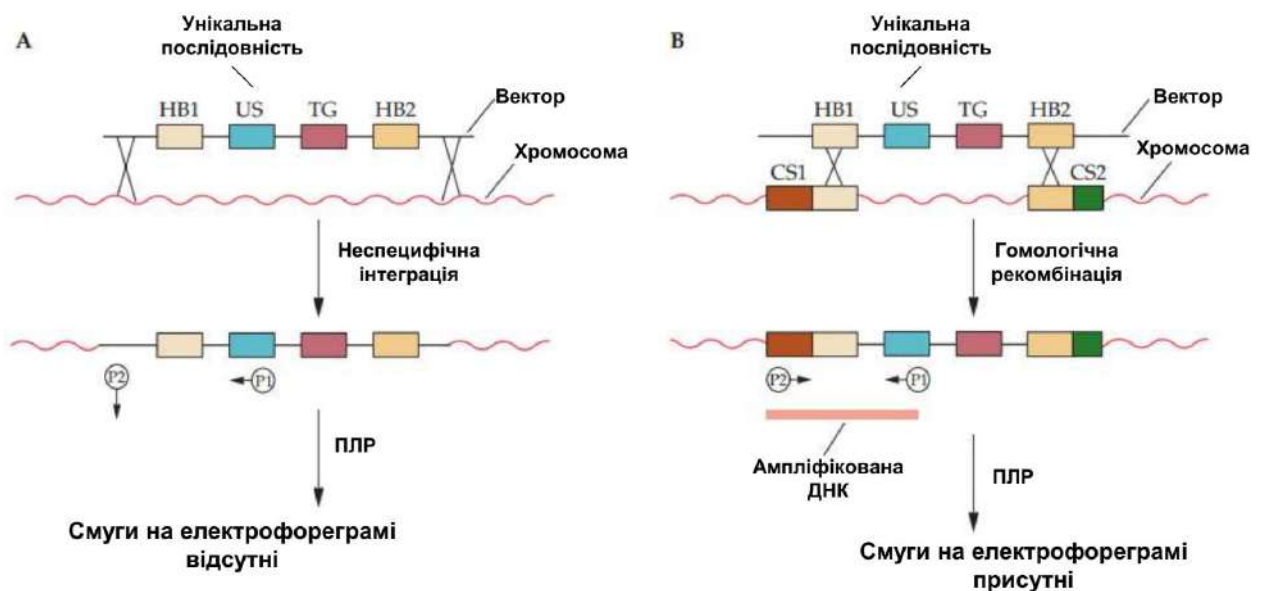


Рис. 4.13. Тестування на неспецифічну інтеграцію (А) та гомологічну рекомбінацію (В) у трансфікованих клітинах методом ПЛР. Пояснення в тексті. Адаптовано з [24]

Після трансфекції ембріональні стовбурові клітини об'єднують, і зразки піддають скринінгу за допомогою ПЛР. Один із праймерів (P1) комплементарний послідовності всередині клонованої бактеріальної або синтетичної (унікальної) послідовності ДНК інтегруючого вектора. Інший праймер (P2) комплементарний послідовності ДНК, що є частиною хромосоми, яка примикає до ділянки одного з гомологічних блоків ДНК. Якщо **інтеграція відбувається у випадковому місці, передбачений продукт ДНК не синтезується** (рис. 4.13 А).

Однак, якщо відбувається **сайт-специфічна інтеграція**, ПЛР ампліфікує фрагмент ДНК відомого розміру (рис. 4.13 В). Таким чином, можна ідентифікувати пул клітин із бажаним геном саме в цільовому місці. Шляхом субкультивування таких клітин можна створити клітинні лінії із сайт-специфічною інтеграцією.

Ембріональні стовбурові клітини, які несуть інтегрований трансген, можна культивувати та вводити в ембріони на стадії бластоцисти, а потім ці ембріони можна імплантувати псевдовагітним прийомним матерям. **Трансгенні лінії** створюються шляхом спарювання потомства, яке несе трансген у своїх зародкових лініях. Потім, якщо потрібно, однопомітних тварин, які несуть трансген у своїх зародкових лініях, схрещують для отримання мишей, гомозиготних за трансгеном.

Трансген не тільки може бути вставлений у певний сайт хромосоми шляхом гомологічної рекомбінації в ембріональних стовбурових клітинах для забезпечення нової функції, але також певний **мишачий ген може стати мішенню для руйнування шляхом введення послідовності ДНК, як правило, гена маркера селекції, у відповідний кодуючий сайт** (рис. 4.14).

Однією з цілей **цілеспрямованого руйнування гена (нокауту)** є дослідження розвитку та фізіологічних наслідків інактивації певного гена. Крім того, трансгенну лінію зі специфічним вимкненим геном можна використовувати як **модельну систему** для вивчення молекулярних механізмів патогенезу різних захворювань людини. Наприклад, інактивація

мишачого гена родопсину шляхом **цілеспрямованого руйнування гена** призводить до руйнування паличкоядерних клітин сітківки у трансгенних мишей, що дуже нагадує **людську хворобу пігментний ретиніт**. Таким чином, прогрес дегенерації сітківки та ефекти потенційних терапевтичних агентів, які або затримують, або блокують розвиток генетично спричиненої ретинопатії, можна досліджувати за допомогою мишей із нокаутом гена родопсину.

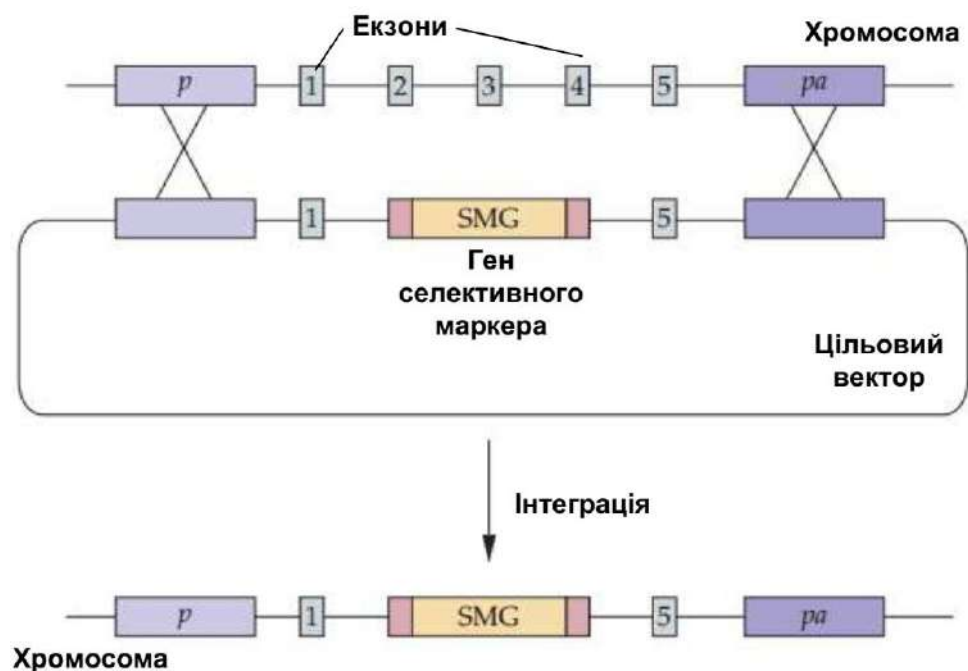


Рис. 4.14. «Вимкнення» гена (нокаут) шляхом цілеспрямованої гомологічної рекомбінації. Цільовий вектор несе ген селективного маркера (SMG) із фланкуючими послідовностями ДНК, гомологічними ділянкам цільового гена. У цьому прикладі цільовий ген має п'ять екзонів (від 1 до 5). Гомологічна рекомбінація (X) руйнує (тобто «вимикає») цільовий ген. *p* – промотор, *pa* – сигнал поліаденілування. Адаптовано з [24]

На сьогодні, сотні різних типів нокаутних мишей були створені в якості тваринних моделей для вивчення різних аномалій людини. Загалом, **нокаутні миші** – це генетично модифіковані миші, в яких один або більше генів

«вимкнені» – або шляхом **фізичного руйнування**, або за рахунок дії сучасних інженерних нуклеаз.

4.2.4. Умовна інактивація генів за допомогою системи рекомбінації *Cre-loxP*

Трансгенні миші, зазвичай, підтримують введений трансген у всіх своїх клітинах. Однак було б корисно мати змогу **вибірково регулювати експресію гена в межах певної соматичної тканини або типу клітини**. Для здійснення цієї мети була адаптована **система рекомбінації *Cre-loxP***, яка походить від генетичних елементів бактеріофага P1 і здатна здійснювати **нокаут генів у конкретній тканині або типі клітин**.

Кільцевий дволанцюговий геном бактеріофага P1 у рідкісних випадках здатен інтегруватися в хромосому *E. coli*. Циркуляризація та інтеграція генома P1 опосередковані **продуктом гена *cre*** (circularization recombination gene (англ.), ген кільцевої рекомбінації) – **рекомбіназою Cre**, яка **специфічно розщеплює та рекомбінує ДНК *loxP*** (**locus of crossing over [x] in P1** (англ.), **локус кросинговеру [x] у P1**) сайтів.

***loxP* сайт** складається з 2 інвертованих повторів, розміром 13 п.н., які відокремлені один від одного спейсерною послідовністю, розміром 8 п.н. (рис. 4.15).



Рис. 4.15. Будова *loxP* сайту. Пояснення в тексті. Запозичено з [24]

Димер Cre зв'язується з кожним *loxP* сайтом (один мономер Cre зв'єднується з кожним інвертованим повтором), а при об'єднанні двох *loxP*

сайтів утворюється тетрамерний Cre комплекс. Cre розщеплює ділянки спейсерів між послідовностями інвертованих повторів, внаслідок чого ланцюги ДНК з'єднуються, утворюючи рекомбінантні молекули ДНК. Спрямованість *loxP* сайту визначається асиметрією спейсерної послідовності, а результат рекомбінації, опосередкованої Cre-рекомбіназою, залежить від відносної орієнтації двох *loxP* сайтів (рис. 4.16).

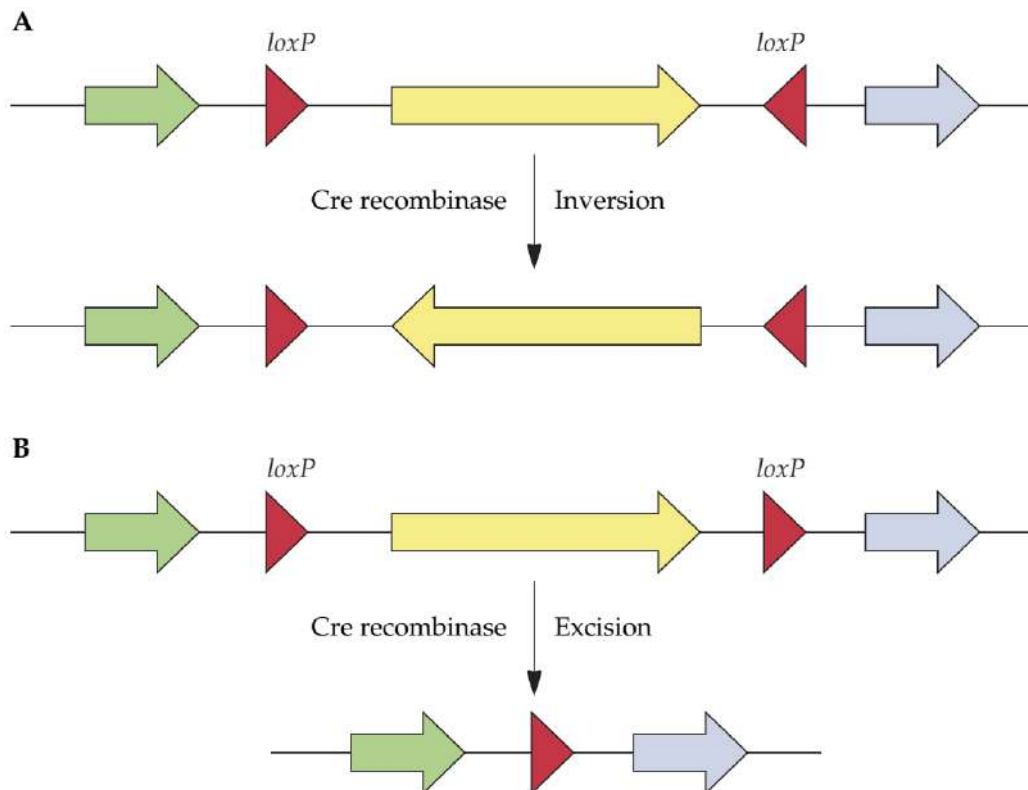


Рис. 4.16. Загальна схема процесу рекомбінації, опосередкованої Cre-рекомбіназою, у залежності від взаємної орієнтації *loxP* сайтів: (A) – протилежна орієнтація; (B) – однакова орієнтація. Пояснення в тексті. Запозичено з [24]

Процес рекомбінації між *loxP* сайтами, що перебувають у **протилежній орієнтації** призводить до **інверсії** послідовності ДНК між двома *loxP* сайтами (рис. 4.16, A). Рекомбінація між *loxP* сайтами, які знаходяться в **однаковій орієнтації** призводить до **делеції** послідовності ДНК між двома *loxP* сайтами (рис. 4.16, B).

Природньо, повторювані елементи бактеріофага P1 перебувають у протилежній орієнтації (рис. 4.16, А). Система рекомбінації Cre-loxP може функціонувати, навіть коли loxP сайти знаходяться далеко один від одного. Так, наприклад, 2 loxP сайти, які є необхідними для циркуляризації генома P1, знаходяться на відстані приблизно 100 т.п.н. один від одного, на кожному кінці лінійного генома. Варто також відмітити, що **специфічність системи Cre-loxP абсолютна, тому що Cre рекомбіназа діє виключно на loxP сайти.**

На основі зазначених особливостей була **розроблена система Cre-loxP** для отримання **клітино-специфічних модифікацій генів у клітинах мишей.**

Загальна стратегія отримання таких модифікацій передбачала наступні кроки (рис. 4.17):

1. ген *cre* був виокремлений, поміщений під контроль специфічного клітинного промотора (p^{cs}) і введений як трансген в лінію мишей. Після цього було проаналізовано ГМ мишей на наявність генної конструкції *cre* та підтверджено тканинну специфічність синтезу Cre.

2. loxP сайти, які перебували в однакових орієнтаціях один відносно одного, клонували по обидві боки екзона, призначеного для видалення. Конструкцію з loxP сайтами вбудовували в певне місце на хромосомі ембріональних стовбурових клітин шляхом гомологічної рекомбінації. Послідовність, фланкована loxP сайтами, може бути цілим геном, призначеним для інактивації, або важливим екзоном, і loxP сайти повинні бути вставлені у фланкуючі ділянки (наприклад, інтрони), щоб вони не порушували експресію гена. Ембріональні стовбурові клітини, що містили loxP сайти, відбирали, культивували й використовували для створення трансгенної лінії мишей. Трансгенну мишу з тканинспецифічним трансгеном *cre* спаровували з ГМ мишею з інтегрованою loxP-фланкованою послідовністю для створення подвійних трансгенних мишей.

3. У специфічних клітинах особини, отриманої після схрещення, синтезувалася рекомбіназа Cre, і дві молекули Cre зв'язувалися з кожним loxP сайтом.

4. Як видно рис. 4.17, *loxP* сайти піддавалися рекомбінації (×), що призводило до вирізання *loxP* сайту та екзону (Екзон 2) на фрагменті ДНК, який зазнавав циркуляризації та врешті-решт деградував; у той час як на цій же хромосомі лишався утворений інактивований ген.

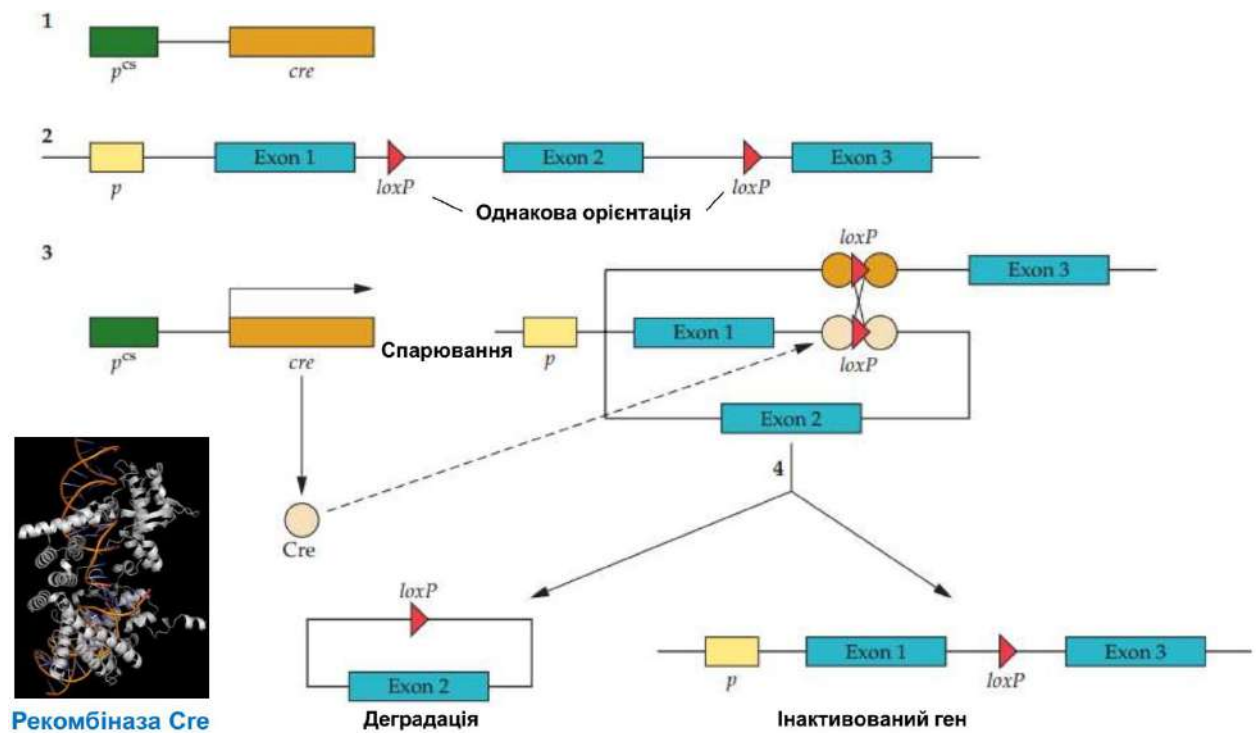


Рис. 4.17. Загальна схема дії рекомбінаційної системи Cre-*loxP* для інактивації гена в певному типі клітин. *p* – відповідний промотор. Пояснення в тексті. Адаптовано з [24]

Таким чином, за допомогою вищезазначеної стратегії можна відстежувати біологічні наслідки втрати активності гена в певній тканині. Система Cre-*loxP* здатна спричиняти нокаут певного обраного гена лише в певних клітинах чи тканинах організму миші, що, без сумніву, сприяє реалізації багатьох різноманітних досліджень стосовно функції окремих генів у певних клітинах/органах, а також для використання мишей у якості модельних систем для дослідження різних патологій та перевірки терапевтичних препаратів тощо.

Окрім цього, така система рекомбінації також може бути використана для **активації трансгена** в певній тканині або на певній стадії розвитку ГМ тварини. Це особливо корисно, коли **продукт, закодований трансгеном, є летальним для ембріона або молоді**. У цьому випадку **послідовність між loxP сайтами запобігає транскрипції такого гена** (рис. 4.18).

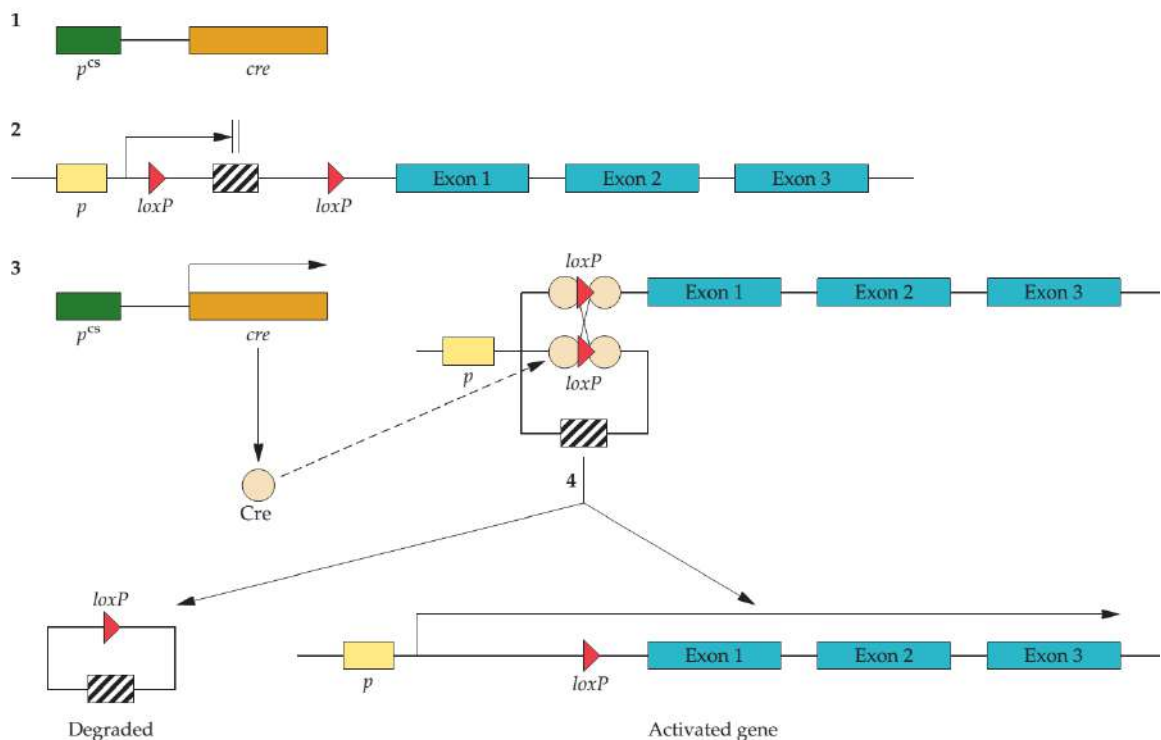


Рис. 4.18. Загальна схема дії рекомбінаційної системи Cre-loxP для активації трансгена в певному типі клітин. *p* – відповідний промотор
Пояснення в тексті. Запозичено з [24]

Як видно на рисунку, послідовність, фланковану loxP сайтами, орієнтованими в одному напрямку, вставляли між промотором і кодуючою послідовністю трансгена таким чином, щоб **спочатку запобігти транскрипції**. Коли Cre експресувався у мишей з цією інтегрованою конструкцією, **послідовність ДНК, яка блокувала транскрипцію, вирізалась, і розпочиналась експресія трансгена** (рис. 4.18).

На доданок, експресію трансгена можна були **модулювати, контролюючи експресію Cre**, наприклад, шляхом додавання індуктора до

питної води мишей, який **активував промотор cre**, або використовуючи промотор, який регулювався в конкретних типах клітин, на певних стадіях розвитку, або при певних фізіологічних умовах.

Технологія *Cre-loxP* широко використовується для вивчення біологічних наслідків інактивації тканино-специфічного гена з метою створення моделей захворювань людини. Наприклад, селективне **видалення гена кінезину II**, який експресується виключно в клітинах фоторецепторів сітківки, призводить до накопичення білків опсину та арестину і, зрештою, до **загибелі клітини**. Цей результат імітує аспекти **спадкового пігментного ретиніту** в людей і використовується для детальних досліджень патофізіологічного впливу на сітківку.

4.2.5. Редагування генома за допомогою системи CRISPR-Cas

Вищезазначений підхід для інсерції або модифікації специфічних генів у геномі миші шляхом гомологічної рекомбінації в культурі ембріональних стовбурових клітинах виявився успішним. У результаті чого було отримано **більше 25000 трансгенних ліній мишей**, включно з **нокаутами** приблизно половини генів, що кодують білок. Однак для отримання трансгенної миші з ізольованих ембріональних стовбурових клітин **потрібно чимало часу (близько одного року), зусиль і витрат** (більше 100000 доларів). Крім того, передача зародковою лінією введених бажаних ознак наступному поколінню не завжди досягається.

Нещодавно стало можливим **редагувати геноми одноклітинних ембріонів миші** безпосередньо за допомогою системи **CRISPR-Cas**. Хоча ця система все ще аналізується та оптимізується для застосування на мишах, на сьогодні, вона успішно використовується для **введення мутацій: інсерцій та делецій, а також для введення трансгенів у цільові ділянки генома миші**.

Щоб зруйнувати ген, у пронуклеус заплідненої яйцеклітини шляхом **мікроін'єкції** вводять як **ендонуклеазу Cas9** (або білок, або мРНК Cas9, яка

транслюється для продукування білка в клітині-господарі), так і **односпрямовуючу РНК (sgРНК)**. sgRNA містить коротку (20 нуклеотидів) послідовність, яка спрямовує Cas9 на розщеплення мишачої ДНК у комплементарній послідовності в гені-мішені, яка безпосередньо примикає до 3 п.н. (послідовність NGG, де N – будь-який нуклеотид) мотиву, суміжного з протоспейсером (PAM).

Кінці дволанцюгового розриву в ДНК миші, утвореного розщепленням Cas9, можуть бути повторно ліговані шляхом **негомологічного з'єднання кінців (NHEJ)**. Як уже було зазначено вище, цей, схильний до помилок процес відновлення, який часто призводить до **інсерцій та/або делецій кількох нуклеотидів (інделів, indels (англ.))**, може порушити рамку зчитування гена, кодуючого білок (рис. 4.19 А). **Великі сегменти генома миші** (до 200 т.п.н.) також були видалені за допомогою **двох sgРНК**, кожна з яких була комплементарна послідовності, що окреслювала ділянку, яку потрібно було вирізати (рис. 4.19 В).

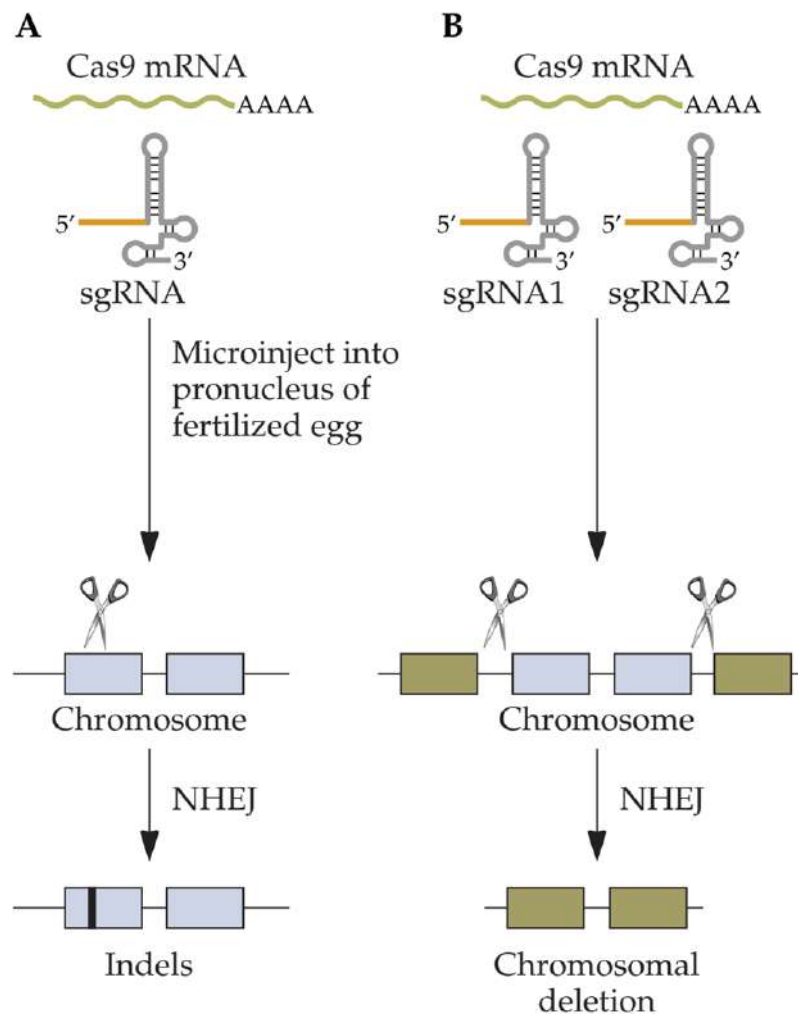


Рис. 4.19. Редагування геномів тварин за допомогою системи CRISPRCas. Пояснення в тексті. NHEJ – негомологічне з'єднання кінців. Запозичено [24]

Як видно на рис. 4.20 С, для створення трансгенних мишей у пронуклеус заплідненої яйцеклітини шляхом **мікроін'єкції** вводили трансген, заклонований у донорській плазміді разом із мРНК Cas9 і sgРНК. Трансген був фланкований послідовностями, гомологічними цільовому сайту, для інтеграції в хромосому миші. Дволанцюговий розрив, утворений Cas9 у цільовому місці, визначеному sgРНК, можна було репарувати шляхом **гомологічної рекомбінації** між фланкуючими послідовностями трансгена та послідовностями на відрізаних кінцях хромосоми, що призводило до інсерції трансгена (рис. 4.20 С).

Цей метод також використовувався для **інсерції** коротких послідовностей, таких як ***loxP* сайти** або певних афінних **тагів** (міток) у геном миші. Для невеликих вставок донорна ДНК, зазвичай, є одноланцюговим олігонуклеотидом, що містить цільову модифікацію, фланковану короткими (50-60 нуклеотидів) послідовностями для гомологічної рекомбінації (рис. 4.20 D).

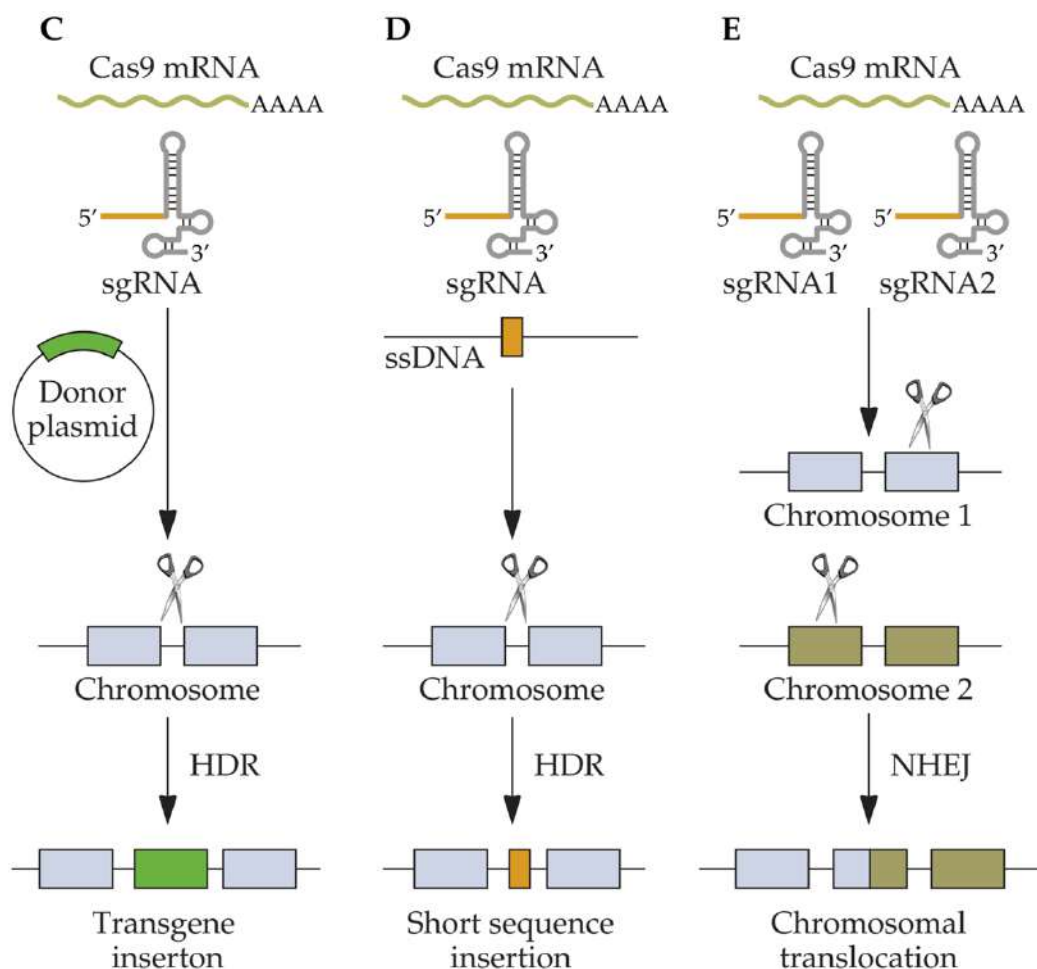


Рис. 4.20. Редагування геномів тварин за допомогою системи CRISPRCas. Продовження. HDR – гомологічна рекомбінація. Пояснення в тексті. Запозичено з [24]

Прикладом практичного застосування технології CRISPR-Cas на мишах є побудова **мишачих моделей ракових пухлин людини**. На сьогодні, геномні дослідження виявили так звану «складність» раку, коли **аберантні клітини** несуть **сотні точкових мутацій, інсерцій, делецій та інверсій**, яких немає в

здорових клітинах, а природа мутацій є різною для різноманітних типів раку. Було б вкрай доцільним створити мишачі моделі, на яких можна було б вивчити внесок цих мутацій і підтвердити участь конкретних ракових генів, використовуючи вищезазначений підхід із гомологічною рекомбінацією донорської ДНК в ембріональних стовбурових клітинах.

Короткі sgRNA, які націлені на багато різних геномних ділянок, можна легко отримати шляхом клонування синтетичних дволанцюгових олігонуклеотидів, що несуть **20-нуклеотидну специфічну послідовність до мішені**, а потім ввести їх у вектор для експресії, який, у свою чергу, кодує залишок послідовності sgРНК (рис. 4.21).

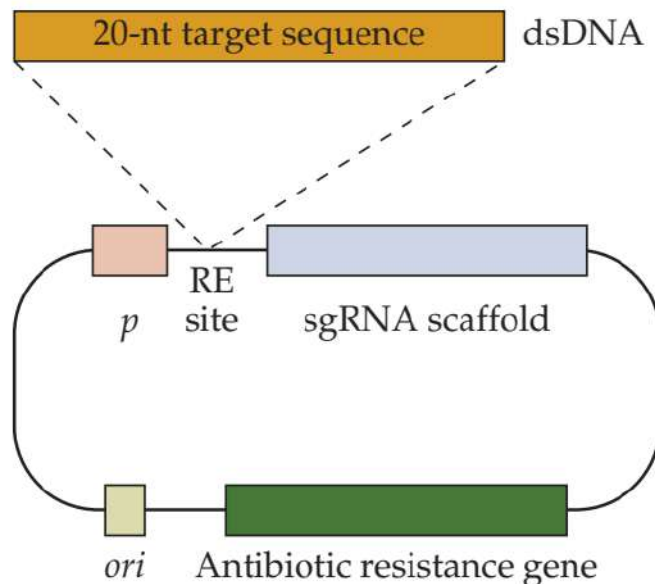


Рис. 4.21. Приклад клонуючого вектора для продукування sgРНК. Дволанцюгова синтетична ДНК (dsDNA), що містить 20-нуклеотидну цільову послідовність, лігують у вектор для клонування, який лінеаризують за допомогою певної рестриктази (RE). Вектор має послідовність, що кодує область sgРНК (scaffold), яка зв'язується з ендонуклеазою Cas9. Повнорозмірна sgРНК може експресуватися із сильного промотора (p), такого як промотор T7, із використанням системи транскрипції *in vitro*, яка полегшує очищення sgРНК для подальшої мікроін'єкції в клітини тварин. Ориджин реплікації (ori) і ген стійкості до антибіотиків також заклоновані для реплікації

та селекції вектора в бактеріальній клітині-хазяїні. *p* – відповідний Запозичено з [24]

Мікроін'єкція sgРНК як комплекс рибонуклеопротейну з Cas9 в одноклітинні ембріони призводить до швидкого генерування багатьох мишачих моделей із різними мутаціями, що викликали канцерогенез. Так, наприклад, за допомогою двох sgРНК, які спрямовували Cas9 до розрізання двох різних хромосом, у мишей були створені хромосомні транслокації, на кшталт виявлених у деяких ракових клітинах (рис. 4.20 Е).

Цей підхід є набагато менш коштовним і трудомістким порівняно з використанням системи *Cre-loxP* для здійснення рекомбінації між двома хромосомами в ембріональних стовбурових клітинах.

Одним з обмежень технології CRISPR-Cas є потенційна здатність до мутагенезу в непередбачених місцях. Розщеплення в «нецільових» сайтах може бути зменшено шляхом забезпечення того, щоб 20-нуклеотидний цільовий сайт sgРНК мав по крайній мірі 3 неспарені основи з будь-якою іншою послідовністю в геномі, або шляхом використання sgРНК із більш короткими (до 17 нуклеотидів) цільовими послідовностями (імовірно, тому, що вони більш чутливі до невідповідностей).

З огляду на вищезазначений недолік системи, на сьогодні, також були сконструйовані ендонуклеази Cas із підвищеною специфічністю до своїх сайтів розщеплення.

4.2.6. Нокдаун генів за допомогою РНК-інтерференції

Як було зазначено вище, на сьогодні, розроблено 2 основні методи зниження експресії генів в клітинах тварин для вивчення біологічних процесів. Можна перервати експресію гена (метод **нокаута**) за допомогою системи CRISPR-Cas або шляхом спрямованого руйнування за допомогою

гомологічної рекомбінації в ембріональних стовбурових клітинах, як було описано вище. Інший метод **знижує** експресію цільового гена (метод **нокдауну**) шляхом **запобігання трансляції мРНК** за допомогою **РНКі** з утворенням **міРНК**.

Для створення трансгенних мишей зі зменшеною експресією певного гена невелику ділянку цільової послідовності клонують у вектор у вигляді інвертованого повтору, розділеного короткою спейсерной ділянкою. Транскрипт РНК, що отримують із цієї послідовності, утворює **малу шпилькову РНК** – **мшРНК** (від 19 до 21 п.н.) завдяки внутрішньо-молекулярним сполученням основ (рис. 4.22).

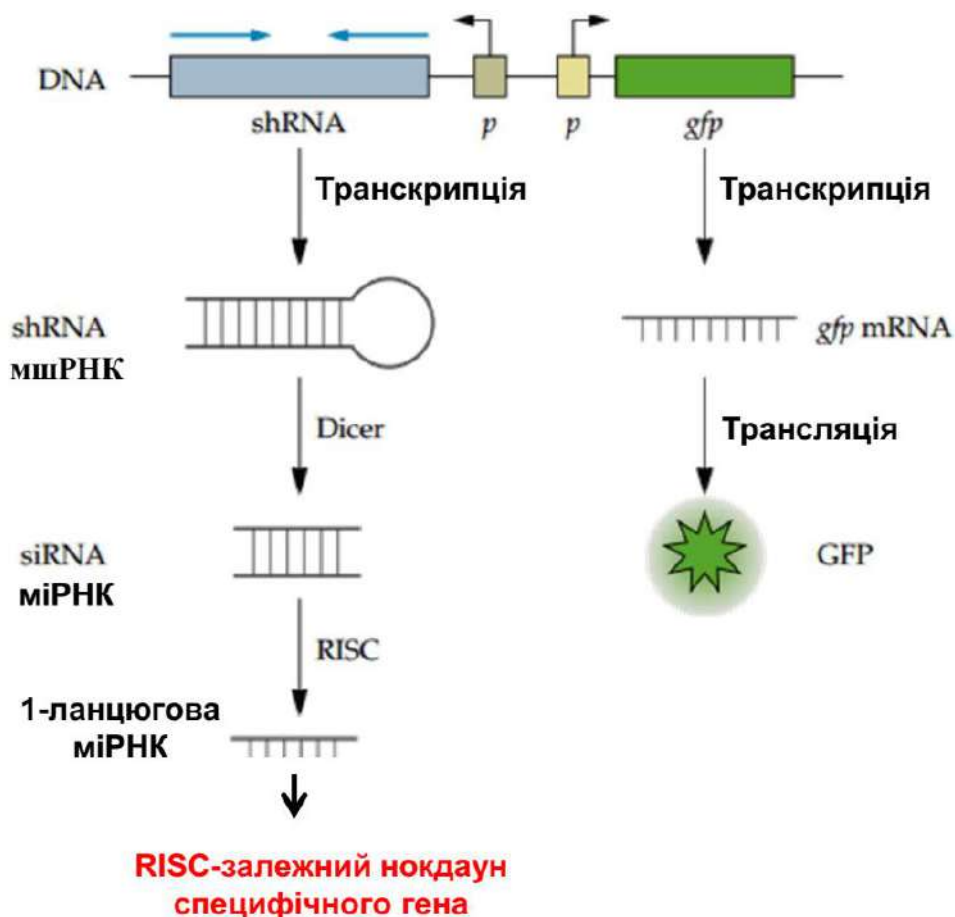


Рис. 4.22. Схема РНК-інтерференції для пригнічення функції генів миші. Трансгенна конструкція, що кодує мшРНК (shRNA) для націлювання на специфічну мРНК для її деградації та маркерний ген (*gfp*) зеленого флуоресцентного білка (кожен під контролем своїх власних промоторів (*p*; напрямок транскрипції вказано чорними стрілками)) вводиться в ембріональні

стовбурові клітини миші шляхом мікроін'єкції ДНК. Трансгенні миші ідентифікують по продукції зеленого флуоресцентного білка (GFP). Завдяки транскрипції трансгена, що кодує короткі інвертовані повтори (сині стрілки), розділені спейсерною послідовністю, з'являється мшРНК. Далі вона під дією білків Dicer (тваринний) і RISC клітини-господаря змінюється на міРНК для зменшення експресії цільового гена. *p* – відповідний промотор. Адаптовано з [24]

Більш короткі послідовності використовуються для того, щоб **уникнути загального зниження трансляції**, яке часто викликається більш довгими послідовностями (вважається, що це відбувається як частина вірусної захисної реакції). Конструкцію вводять в ембріональні стовбурові клітини миші шляхом **мікроін'єкції ДНК** або за допомогою **лентивірусного вектора**. Цей підхід було доволі ефективно застосовано як для отримання **стабільних ліній мишей** із зниженою експресією цільових генів, так і на різних тваринах, включно з **коровами, свинями, козами, жабами й щурами**.

Потрібно зазначити, що у випадках, коли зниження експресії цільового гена може порушити зростання та розвиток тварини, **початок експресії мшРНК можна контролювати**. Для умовного нокдауну у вектор між послідовністю, що кодує мшРНК, і промотором, що контролює експресію мшРНК, вставляється **блокуюча послідовність** (рис. 4.23).

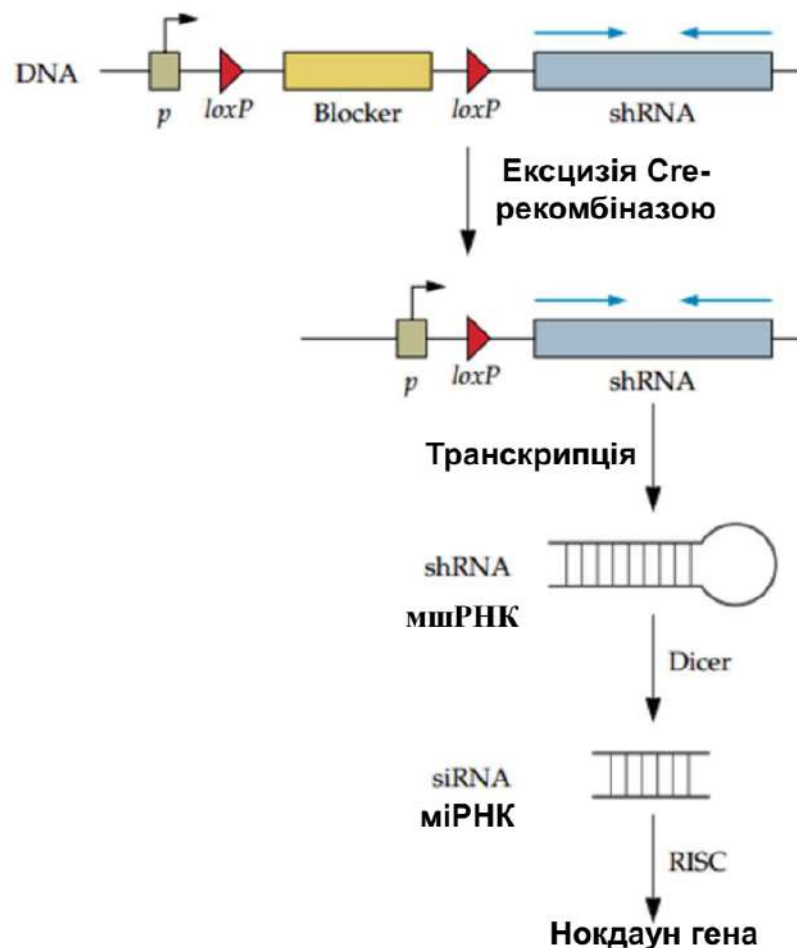


Рис. 4.23. Умовний нокдаун експресії цільового гена за допомогою РНК-інтерференції у миші. *p* – відповідний промотор. Пояснення в тексті. Адаптовано з [24]

Блокуюча послідовність несе сигнал термінації для РНК-полімерази і може також містити маркерний ген, наприклад, *gfp*, також під контролем власного промотора. Блокуюча послідовність фланкована двома *loxP* сайтами в однаковій орієнтації, що спричинює вирізання блокуючої послідовності. Це призводить до відновлення експресії мшРНК і пригнічення експресії цільового гена в геномі миші.

Таким чином, експресія ендегенних генів еукаріотів може бути пригнічена плазмідною експресією мшРНК, які за структурою подібні до мікроРНК, які, як було зазначено, зазвичай, регулюють експресію генів в еукаріотичних клітинах. Малі інтерферуючі РНК (міРНК) та мікроРНК

мають **схожі фізико-хімічні властивості**, але **різні функції та трохи відмінні механізми дії** (табл. 4.1).

Таблиця 4.1.

Порівняння міРНК і мікроРНК для нокдауну генів. Адаптовано з [24]

Параметр	міРНК	мікроРНК
Форма до Dicer-залежного процесингу	2-ланцюгова РНК довжиною від 30 до 100 нуклеотидів	Пре-міРНК довжиною 70-100 нуклеотидів із розсіяними місметчами та шпильками
Структура	21-23 нуклеотидний дуплекс РНК із двома нуклеотидами, що виступають на 3'-кінці	19-25 нуклеотидний дуплекс РНК із двома нуклеотидами, що виступають на 3'-кінці
Комплементарність до цільової мРНК	Повністю комплементарні до цільових мРНК (рис. 4.24)	Часткова комплементарність, переважно – до 3'-НТД мРНК (рис. 4.24)
мРНК-мішень	Одна	Множинні мішені (може сягати сотні)
Механізм регуляції експресії генів	Розщеплення мРНК за допомогою нуклеаз	Репресія трансляції, деградація мРНК, рідше – розщеплення мРНК за допомогою нуклеаз
Клінічне застосування	Терапевтичний агент	Мішень фармацевтичних препаратів, терапевтичний агент, діагностичний інструмент / маркер детекції

Найбільш ефективною системою доставки міРНК/мікроРНК у клітини зарекомендували себе **вірусні вектори** (лентивірусні вектори тощо). Проте, на сьогодні, через ряд їх недоліків все більшої популярності **набувають інші**

системи доставки: на основі полімерів, ліпідів, нанотрубок тощо. Але, не зважаючи на їх безпечність, нижчу вартість тощо, поки що вони менш ефективні *in vivo*.

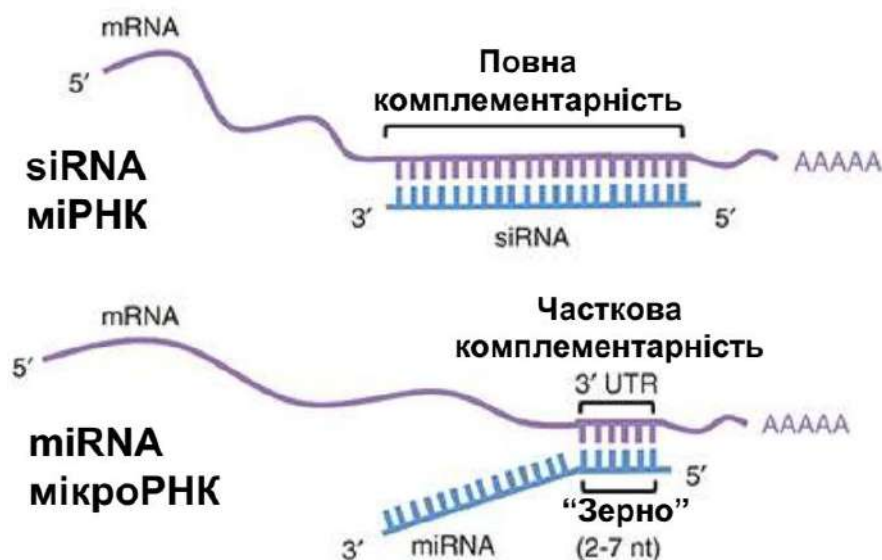


Рис. 4.24. Загальна схема механізму взаємодії міРНК і мікроРНК із мРНК. Пояснення в тексті. Адаптовано з [9, 24]

4.3. Трансгенні миші: застосування

Миші є найчастіше використовуваними тваринами-моделями для вивчення хвороб людини. Вони генетично (99 % спільних генів) та фізіологічно схожі на людей і, як наслідок, **схильні до багатьох таких самих генетичних захворювань**. Більш того, як було описано вище, миші успішно піддаються генетичним маніпуляціям і можуть бути генно модифікованими для точного моделювання початку та розвитку хвороби людини, а також дослідження зв'язків між хворобою й конкретними генами.

На сьогодні, були розроблені **моделі трансгенних мишей для багатьох генетичних захворювань людини**, включно з хворобою Альцгеймера, хворобою Хантінгтона, артритом, м'язовою дистрофією, гіпертензією, нейродегенеративними розладами, ендокринологічною дисфункцією,

ішемічною хворобою, онкогенезом тощо. Трансгенні миші також широко використовуються для **розробки та тестування потенційних терапевтичних агентів** для різних патологічних станів.

«**КсеноМиша**». Як зазначено вище, було отримано мишей, які синтезували майже повний репертуар людських антитіл для лікування онкологічних захворювань. Дослідники сконструювали «**КсенуМишу**» («**XenoMouse**», (англ.)), в якій (1) механізм виробництва власних мишачих антитіл був інактивованим; і (2) **усі локуси імуноглобулінів людини** (як L-, так і H-ланцюги) були **інтегрованими в хромосому миші** (рис. 4.25).

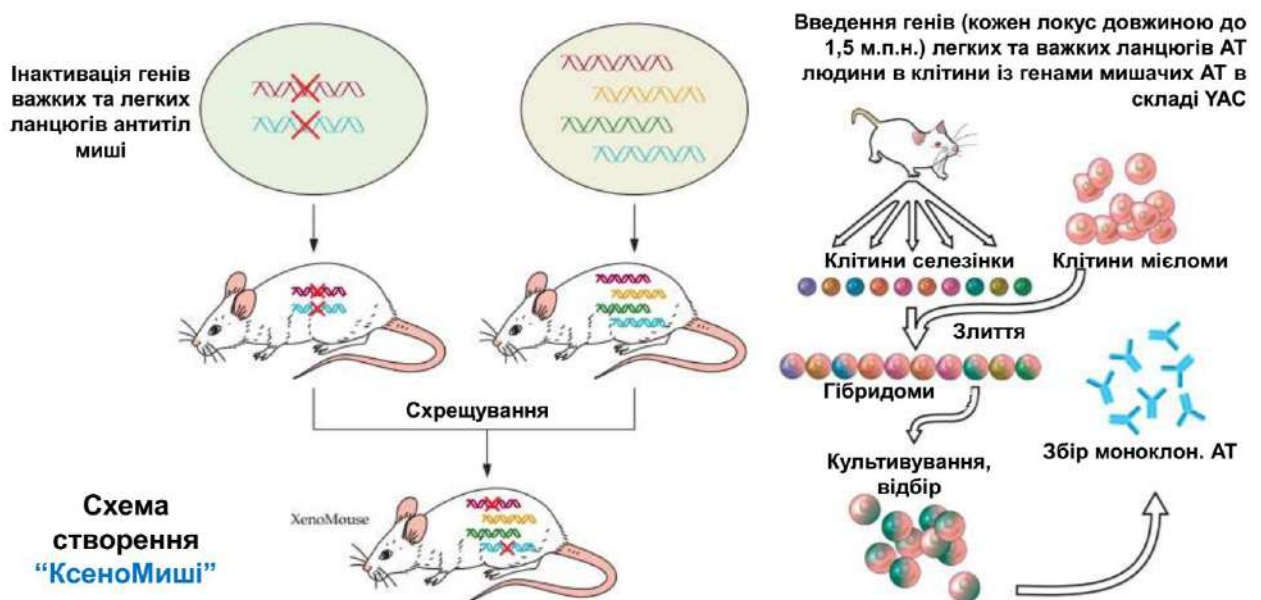


Рис. 4.25. Загальна схема створення «КсеноМиші». АТ – антитіла; м.п.н. – мільйони пар нуклеотидів. Пояснення в тексті. Адаптовано з [24]

Гени H-ланцюга людини та гени κ і λ L ланцюга людини (де κ і λ є різними класами генів L-ланцюга) були клоновані в YAC. Після цього YAC із генами імуноглобулінів людини вводили в ембріональні стовбурові клітини миші шляхом злиття з ними **сфероластів** (клітини, з яких була видалена клітинна стінка) **дріжджів**, що містили YAC.

Завдяки цій процедурі було отримано велику кількість ембріональних стовбурових клітин, в яких усі введені гени імуноглобулінів людини стабільно

інтегровалися в хромосомну ДНК. Ці трансфіковані клітини були використані для створення мишей, що містили локуси генів імуноглобулінів людини, а також і миші. Схрещування двох мишачих ліній, одна з яких несла гени імуноглобулінів миші та людини, а інша – лише видалені гени мишачих імуноглобулінів, призвела до створення **мишачого штама (названого «КсеноМиша»)**, який експресував лише імуноглобуліни людини. Внаслідок цього з'явилась можливість генерування повністю людських імуноглобулінів після **імунізації «КсеноМиші» певним антигеном**.

На сьогодні, деякі з таких імуноглобулінів уже схвалені для використання людиною, причому багато інших на різних стадіях клінічних випробувань. Наприклад, **«Панітумумаб» («Panitumumab» (англ.), «Вектибикс»,** раніше відомий як ABX-EGF; був розроблений компанією «Abenix Inc.»; схвалений для використання у 2006 р.; виробляється компанією «Amgen» (США)) – це **протипухлинний препарат**, людські моноклональні антитіла IgG2, специфічні для рецептора епідермального фактора росту, відомого у людині як рецептор епідермального фактора росту EGFR, ErbB-1 та HER1.

«Панітумумаб» був розроблений саме за допомогою «КсеноМиші». Після вищезазначених процедур специфічний клон В-лімфоцитів, який виробляв антитіла проти EGFR, був відібраний і закріплений в **клітинах яєчника китайського хом'яка (Chinese hamster ovary – CHO)**. На сьогодні, ці клітини використовуються для повномасштабного виробництва на **100 % людських антитіл** для лікування рефрактерного EGFR-експресуючого метастатичного колоректального раку у пацієнтів із не мутуючим («диким») KRAS (англ. KRAS proto-oncogene, протоонкоген, ГТФаза).

Нокаутні миші. Нокаутні миші – це потужний інструмент для дослідження функцій та фенотипових проявів генів. Мишачі моделі дозволяють моделювати різноманітні патологічні стани. У той час як нокаут передбачає руйнування («вимкнення») гена, на противагу йому, **нокін (knock-in)** призводить до зміни **амінокислотної послідовності закодowanego білка**

внаслідок нуклеотидної заміни або інсерції певної послідовності, що була відсутньою в локусі (рис. 4.26).

Лінії нокаутних мишей прийнято називати по відповідному гену (наприклад, p53-нокаутні миші, p53^{-/-}) або по **фенотиповим особливостям** (наприклад, лінія «Мафусаїл» (довша тривалість життя тварин), лінія «Frantic» (несамовитий (англ.)) – миші з тривожними розладами (рис. 4.26).

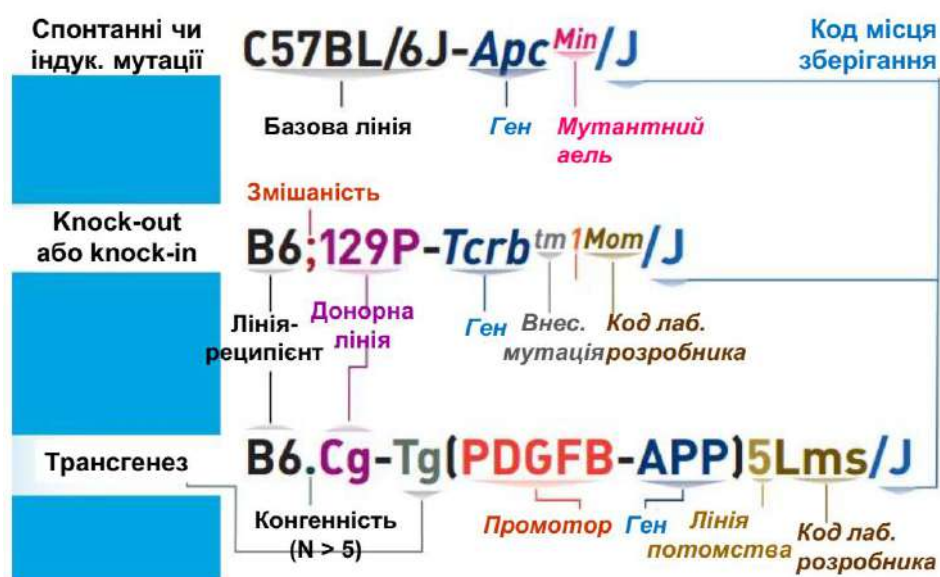


Рис. 4.26. Загальний приклад опису ліній нокаутних мишей. Термін **конгенність** означає генетичну ідентичність тварин двох ліній, за винятком відмінності по одному локусу. Конгенна лінія – інбредна лінія мишей, яка містить невелику генетичну ділянку (в ідеалі, один ген) з іншої лінії, але в іншому є ідентичною вихідній інбредній лінії. Адаптовано з [77]

Іншим прикладом трансгенних мишей є так звана «**Могутня миша**». Її було створено, щоб допомогти вченим зрозуміти, **як в космосі людина втрачає м'язові й кісткові тканини** і як саме відбувається цей процес. Миші, нокаутні за геном *Mstn*, що кодує **міостатин** (також відомий як фактор росту та диференціювання 8, білок, який пригнічує ріст та диференціювання м'язової тканини), демонстрували різке зростання м'язів.

Було показано, що «Могутні миші» дійсно лишилися відносно могутніми під час перебування в умовах мікрогравітації, тоді як звичайні контрольні миші втрачали значну м'язову масу та щільність кісток.

Таким чином, отримані дані можуть бути корисними у пошуку можливих терапевтичних стратегій для відновлення космонавтів після їх перебування в умовах невагомості (без сили тяжіння) і повернення на Землю.

Умовний контроль клітинної смерті. Здатність викликати загибель клітин у різний час та за певних умов у специфічному органі живого організму є корисним способом як для вивчення патологій органів, спричинених загибеллю клітин, так і для дослідження процесу відновлення тканин та органів після різного ступеня втрати клітин. З цією метою було створено нокаутних мишей, які експресували **рецептор, необхідний бактеріальному токсину для спричинення загибелі клітин** (рис. 4.27 А).

Дифтерійний токсин продукується бактеріальним збудником *Corynebacterium diphtheriae*. Він з'єднується з гепарин-зв'язувальним рецептором епідермального фактора росту, і токсин-рецепторний комплекс потрапляє в клітину, де токсин **інактивує фактор елонгації 2 (EF2)**. Оскільки для синтезу білка потрібні функціональні молекули EF2, за відсутності його синтезу настає **загибель клітин** (рис. 4.27 В).

Клітини мишей, зазвичай, не сприйнятливі до дифтерійного токсину, оскільки вони не мають рецептора, який розпізнає цей бактеріальний білок. Тому було створено **трансгенних мишей для експресії людського або мавп'ячого гепарин-зв'язувального рецептора епідермального фактора росту** (інша назва – рецептор дифтерійного токсину) під **контролем клітинно-специфічного промотора**.

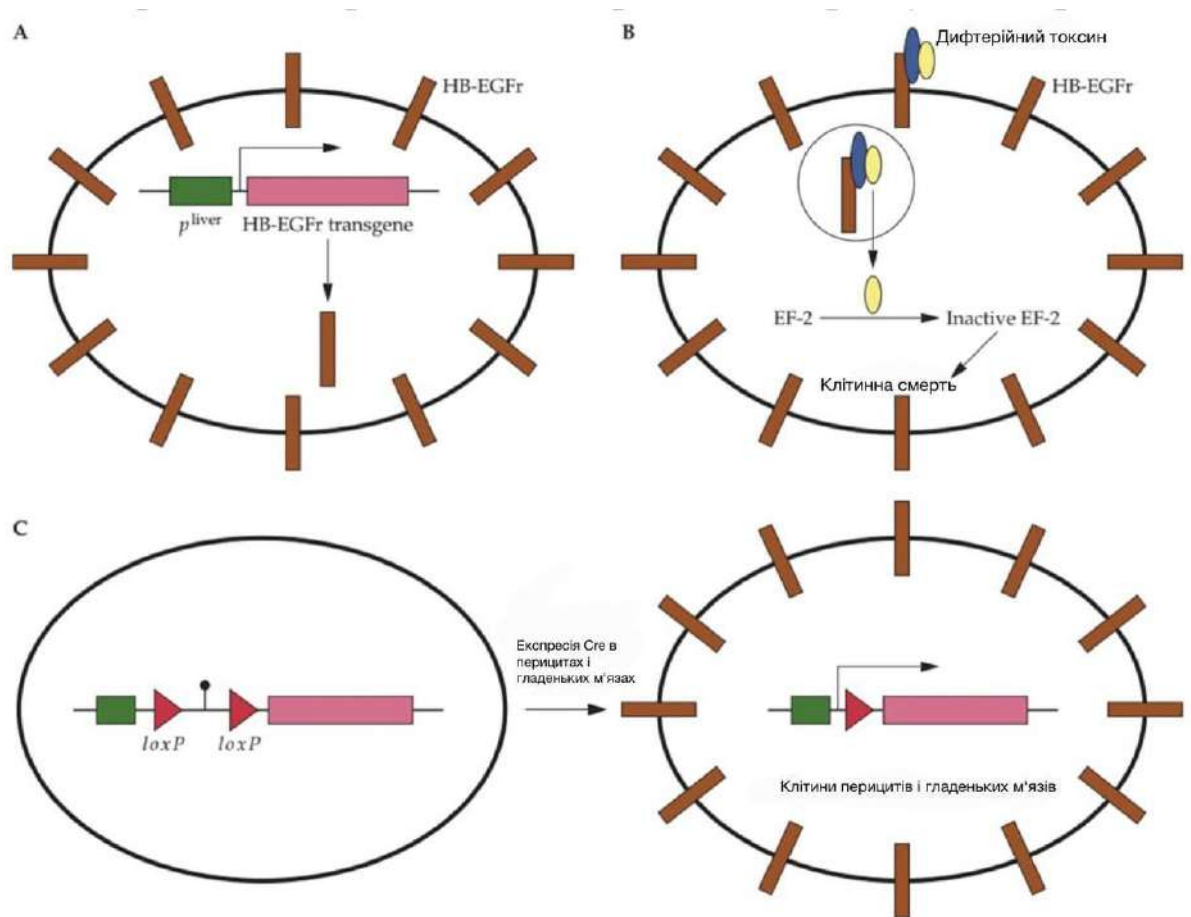


Рис. 4.27. Загальна схема індукції загибелі специфічних клітин. (А) Локалізовані в клітинній мембрані гепарин-зв'язувальні рецептори епідермального фактора росту – HBEGFr – (коричневі прямокутники) синтезуються з кДНК трансгенного HBEGFr під контролем специфічного для клітини промотора (p^{CS}). **(В)** Дифтерійний токсин (жовтий і синій овали) зв'язується з HBEGFr і потрапляє в клітину. Субодиниця дифтерійного токсину (жовтий овал) вивільняється з ендосоми та інактивує EF2. Клітинна загибель настає після припинення синтезу білка. **(С)** HBEGFr продукується лише в специфічних клітинах після експресії Cre-рекомбінази з клітинного промотора. Cre опосередковує рекомбінацію між *loxP* сайтами, що призводить до вирізання послідовності термінації транскрипції (чорне коло), яка, в іншому випадку, блокує експресію HBEGFr. Клітини, що продукують HBEGFr, є сприйнятливими до дифтерійного токсину. Адаптовано з [24]

За допомогою цього підходу в ГМ мишей були вибірково знищені **перипцити** (клітини, що оточують кровоносні капіляри) судин сітківки, щоб

дослідити вплив таких порушень на зорову функцію. Також втрата перицитів пов'язана з порушенням функції сітківки у хворих на **цукровий діабет I та II типу**. Для індукування порушень перицитів мишей генно модифікували таким чином, щоб вони могли **умовно експресувати рецептор дифтерійного токсину**.

Спочатку експресії рецептора запобігала **блокуюча послідовність, розташована вище за *loxP***, яка містила послідовність **термінації транскрипції** (рис. 4.27 С). Блокуюча послідовність була вирізана після індукції синтезу **Cre-рекомбінази** з промотора важкого ланцюга міозину гладеньких м'язів, що призвело до виробництва рецептора дифтерійного токсину саме в перицитах і гладком'язових клітинах. Потім трансгенним мишам вводили дифтерійний токсин, і через п'ять днів було підтверджено **загибель клітин** перицитів і гладком'язових клітин судин в артеріях сітківки. Втрата цих клітин пов'язана з особливостями **ранніх стадій діабетичної ретинопатії**, включно з мікроаневризмами тощо.

Таким чином, вищезазначені нокаутні миші забезпечують зручну модель для вивчення наслідків специфічної втрати клітин при складних захворюваннях, таких як діабет. Ефекти селективного видалення різних типів клітин можна вивчити на мишах, помістивши ген рецептора дифтерійного токсину під прямий або непрямий (як у прикладі, представленому тут) контроль різних клітин-специфічних промоторів.

4.4. Трансгенна худоба

На сьогодні, є **декілька основних цілей** для виробництва трансгенної худоби. По-перше, хоча миші виявилися досить корисними в біомедичних дослідженнях як моделі людських хвороб і для тестування потенційних засобів для лікування різних патологічних станів; загальна анатомія, тривалість життя та деякі аспекти фізіології мишей відрізняються від

людських. З іншого боку, худоба, особливо свині, виявилися більш інформативними та вірогідними тваринами для моделювання захворювань, вивчення регуляції генів і розвитку імунної системи.

По-друге, багато свіських тварин здатні продукувати велику кількість молока, і тому можуть використовуватися для виробництва та секреції великої кількості рекомбінантних білків та інших молекул, що мають фармацевтичне значення. По-третє, генна інженерія може бути використана для швидкого й специфічного покращення таких характеристик худоби, як швидкість росту, стійкість до патогенів, якість молока, а також покращення харчових якостей м'ясної продукції.

Методи, що використовуються для створення трансгенної худоби, концептуально аналогічні тим, що використовуються для трансгенних мишей. Неодмінні етапи модифікованого протоколу мікроін'єкції ДНК для трансгенезу миші (рис. 4.28) включають:

- (1) збирання ооцитів (яйцеклітин), наприклад, від тварин, убитих на бійнях;
- (2) дозрівання ооцитів *in vitro*;
- (3) запліднення спермою *in vitro*;
- (4) центрифугування запліднених яєць для концентрування жовтка, який у звичайних яйцях не дозволяє легко побачити чоловічі пронуклеуси під мікроскопом;
- (5) мікроін'єкція ДНК, що вводиться, у чоловічі пронуклеуси;
- (6) розвиток ембріонів *in vitro*; (7) нехірургічна імплантація одного ембріона однієї прийомної матері-реципієнту під час природної тічки (еструс);
- (8) скринінг ДНК потомства на наявність трансгена.

Хоча мікроін'єкція ДНК у чоловічі пронуклеуси протягом багатьох років була основним методом трансгенезу худоби, вона є **трудомісткою та неефективною**. Низька ймовірність інтеграції після мікроін'єкції ДНК призводить до **низької ефективності трансгенезу** (рис. 4.7).



Рис. 4.28. Основні етапи в розвитку трансгенної худоби. Пояснення в тексті. Адаптовано з [24]

Крім того, інтеграція трансгенів відбувається на **випадкових ділянках**, що часто негативно впливає на експресію трансгена; а встановлення бажаної трансгенної лінії вимагає ряду поколінь.

За таких причин, на сьогодні, трансгенна худоба створюється **шляхом перенесення ядра з генетично зміненої соматичної клітини в ооцит**.

4.4.1. Клонування худоби шляхом перенесення ядра

Вівця на ім'я Доллі (самиця; порода Finnish Dorset) народилася 5 липня 1996 року і мала трьох матерів: одна надала яйцеклітину, інша – ДНК, а третя виносила клонований ембріон до його народження. Доллі була клонована шляхом перенесення ядра з клітини молочної залози (вимені) дорослої вівці в яйцеклітину вівці, попередньо позбавлену ядра. Це було першою демонстрацією плюрипотентності (тотипотентності (здатність 1 клітини багатоклітинного організму дати початок цілому новому організму шляхом поділу)) ядра диференційованої дорослої клітини. Після клонування Доллі ядра соматичних клітин використовувалися для клонування різних тварин, зокрема, великої рогатої худоби, кіз, овець і свиней, а також інших ссавців, амфібій, риб і комах.

Для перенесення ядра **ембріональні, фетальні або дорослі донорські клітини** з різних типів клітин (наприклад, епітелію молочної залози, яєчників, фібробластів і лімфоцитів) виділяють, **культивують і генетично модифікують** із використанням методів, описаних вище (рис. 4.29).

Хоча це не завжди можливо відтворити з дорослими клітинами, краще проводити тривале культивування, оскільки в експериментаторів є додатковий час для проведення послідовних генетичних змін, таких як інактивація обох алелів локусу або створення множинних змін генів.

Після встановлення клітинної лінії із специфічною генетичною модифікацією окремі донорські клітини зливаються з без'ядерним ооцитом за допомогою впливу короткочасного електричного імпульсу. Так, було застосовано 2 імпульси по 2,5 кВ/см протягом 10 мкс для злиття клітин фібробластів дорослої великої рогатої худоби з ооцитами, позбавленими ядра. Такі імпульси одночасно **індукують як злиття клітин, так і активацію ооцитів.**

Кожну зливу клітину **культивують** (або вирощують у перев'язаних яйцеводах (маточних трубах)) до **стадії бластоцисти**, перш ніж переносити в

матку псевдовагітної самки. При народженні потрібно провести аналіз генотипу для підтвердження наявності внесеного трансгена.

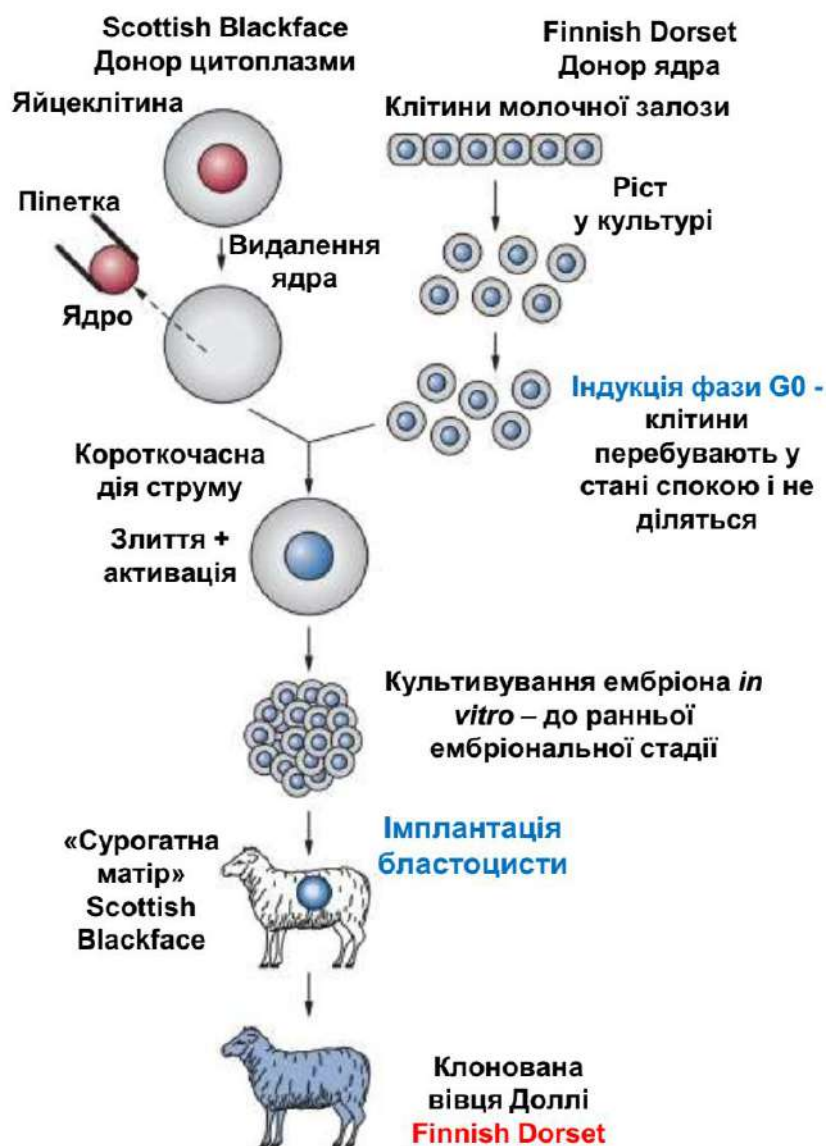


Рис. 4.29. Схема клонування вівці Доллі худоби шляхом перенесення ядра. Ядро яйцеклітини з вівці породи Scottish Blackface (чорноголова вівця) видалили піпеткою (пунктирна стрілка). Клітини епітелію молочної залози дорослої вівці (порода Finnish Dorset) вирощували в культурі, і фаза G₀ індукувалась шляхом інгібування росту клітин. Клітина у фазі G₀ та яйцеклітина без ядра зливалися, і яйцеклітина без ядра вирощувалась у культурі до ранньої ембріональної стадії, перш ніж її імплантували прийомній матері (порода Scottish Blackface), де розвиток тривав до відповідного терміну та народження Доллі (Finnish Dorset). Адаптовано з [24]

Незважаючи на вищезазначені успіхи, при перенесенні ядра соматичних клітин відбувається **значна втрата особин до і після народження, а деякі з клонованих тварин демонструють аномалії**. Така аномалія, як **збільшення ваги при народженні**, більшою мірою поширена в клонованих телят та ягнят, ніж в інших ГМ тварин.

Однією з причин цього є нездатність генома донора соматичної клітини пройти **епігенетичне перепрограмування; патерн метилювання ДНК і модифікації гістонів вихідної донорської клітини неналежним чином зберігається в клітинах тварини-реципієнта**. Оскільки епігенетичний стан ДНК контролює експресію генів, це може серйозно порушити клітинну функцію. Однак упродовж років досліджень було виявлено, що деякі тварини, отримані таким способом (наприклад, ті ж самі вівці), були **здоровими (без будь-яких дефектів)**, нормально розвивалися, були здатними до розмноження, а їх **тривалість життя не відрізнялась від такої у звичайних тварин**.

На сьогодні, клонування шляхом перенесення ядра є кращим методом для створення трансгенної худоби, адже основними **перевагами зазначеного методу клонування худоби на противагу методу мікроін'єкції ДНК є:**

- усі народжені тварини є трансгенними;
- можливість сайт-специфічних змін;
- можливість швидкого створення одностатевих груп тварин;
- гарна виживаність трансгенних тварин.

4.4.2. Трансгенна худоба як продуцент терапевтичних білків

Молочні залози трансгенних тварин є привабливими **біореакторами** для виробництва людських терапевтичних білків, таких як гормони, фактори росту та ферменти. Трансген, що кодує цільовий білок, поміщають під **контроль специфічного промотора молочної залози** та вводять його в одноклітинні

ембріони шляхом **мікроін'єкції ДНК** або в культивовані **соматичні клітини** **перед перенесенням їх ядра в ооцити, позбавлені ядер.**

Велика кількість рекомбінантних білків, що виробляються молочними залозами трансгенних тварин, як правило, відповідно **глікозильовані**, мають біологічну активність, ідентичну активності людських джерел, і їх можна легко очистити з молока. На 2016 р. понад 100 різних людських білків продукуються в **молоці ГМ овець, кіз, свиней та кроликів** (табл. 4.2).

Основною **перевагою** виробництва фармацевтичного білка в молочних залозах є те, що **молоко можна легко збирати у великих кількостях**. Це сприяє **зниженню витрат** на виробництво рекомбінантного білка приблизно до однієї десятої вартості виробництва в культивованих клітинах ссавців. Молочні корови щорічно дають приблизно 10000 л молока. Якщо на л молока виробляється 1 г рекомбінантного білка, і його можна очистити з 50 % ефективністю, **вихід від 20 трансгенних корів складатиме приблизно 100 кг на рік!** Це річна глобальна потреба людини в білку С, який використовується для профілактики утворення тромбів.

Однієї трансгенної корови було б більш ніж достатньо для виробництва річного світового запасу фактора ІХ (компонента тромбопластину плазми), який використовується хворими на **гемофілію** для полегшення згортання крові.

Таблиця 4.2.

Приклад рекомбінантних терапевтичних білків, що експресуються в молочних залозах трансгенних тварин, проходять клінічні випробування або були схвалені для використання. Адаптовано з [24]

Білок	Трансгенна тварина	Застосування
Антитромбін	Коза	Запобігає надмірному згортанню крові
C1-естеразний інгібітор	Кролик	Послаблює дисфункцію трансплантованих органів
Альфа-фетопротейн	Коза	Аутоімунні захворювання
Бутирилхолінестераза	Коза	При отруєнні фосфоорганічними речовинами; хвороба Альцгеймера
Лактоферин	Корова	Біологічно активні добавки для запобігання інфекційних захворювань
Гормон росту	Корова	Карликовість
Фактор VIIa	Кролик	Гемофілія
Фактор IX	Свиня	Гемофілія
Фібриноген	Кролик, корова	Герметик для тканин
Альфа-1 Антитрипсин	Коза	Спадкова недостатність антитрипсину
Анти-CD20 моноклональне антитіло	Коза	Імунотерапія раку
Анти-CD137 моноклональне антитіло	Коза	Імунотерапія раку

Поверхневий білок малярійних мерозоїтів	Коза	Вакцина для профілактики малярії
<i>Rotavirus</i> капсидний білок VP2/VP6	Кролик	Вакцина для профілактики вірусного гастроентериту

Хоча кількість молока, яке виробляється або вівцею, або козою, менше ніж вироблене коровою, лактація в овець та кіз (вони можуть продукувати молоко швидше, ніж корови) дає сотні літрів молока на рік (табл. 4.3).

Таблиця 4.3.

Приклад розрахованого виходу рекомбінантного білка від тварин, які використовувалися для експресії трансгенів у молочних залозах.

Адаптовано з [24]

Організм	Щорічне вироблення молока (л)	Планова кількість рекомбінантного білка на одну самицю (кг/рік)
Кролик	5	0,02
Свиня	300	1,5
Вівця	500	2,5
Коза	900	4
Корова	10000	60

У 2009 році Управління з продовольства і медикаментів США (FDA) схвалило використання **людського білка антитромбіну**, отриманого з козячого молока (табл. 4.2), для осіб із спадковим дефіцитом синтезу цього білка, а також для пацієнтів під час операцій.

Антитромбін є інгібітором протеаз, який діє як **фактор антикоагуляції**, пригнічуючи активність тромбіну та інших коагуляційних протеаз, і, таким чином, запобігає надмірному утворенню тромбів. Він також має протизапальну активність. Приблизно 1 з 5000 людей не може виробляти цей білок природним шляхом, що наражає їх на ризик серцевого нападу та інсульту.

Хоча **антитромбін** можна отримувати з плазми донорської крові, такий **об'єм** є недостатнім для задоволення потреб усіх потенційних пацієнтів. Крім цього, **очищення донорської крові** є коштовнішою **процедурою** порівняно з екстракцією рекомбінантних білків із молока, на доданок до **більш високого потенційного ризику** зараження саме **людськими патогенами**.

Для продукування антитромбіну в кіз, **кДНК людського антитромбіну** з'єднували з **промотором гена β -казеїну кози** (рис. 4.30), і таку конструкцію вводили в ембріони шляхом **мікроін'єкції ДНК**.



Рис. 4.30. Конструкція для експресії антитромбіну людини в козячому молоці. Повнорозмірну кДНК антитромбіну людини клонували між екзоном 2 (EX2) та екзоном 7 (EX7) гена β -казеїну кози. Послідовності промотора (p), сайта термінації транскрипції (t) та екзонів 1, 8 і 9 (EX1, EX8, EX9) гена β -казеїну зберігаються. Адаптовано з [24]

Важливо, що рекомбінантний антитромбін, який секретувався в молоко трансгенних кіз, був за **структурою** подібним до білка людини, за винятком деяких відмінностей в олігосахаридах у трьох з 4 сайтів N-глікозилювання. Було показано, що ці **відмінності не впливали на активність інгібування тромбіну**. Також було виявлено, що в трансгенному козячому молоці можна було отримати **від 2 до 10 г антитромбіну людини на л молока**. У той час як у культурах клітин отримували лише 0,2-1 г цього білка на л культурального середовища. Було підраховано, що **75 трансгенних кіз зможуть забезпечити щорічний світовий попит на антитромбін!**

На сьогодні, різні людські терапевтичні білки, вироблені трансгенними козами, проходять **клінічні випробування**, включно з іншими інгібіторами протеаз крові (антитрипсин, альфа-фетопротейн), вакцини, моноклональні антитіла для імунотерапії раку тощо (табл. 4.2).

Інші ссавці також розглядаються для комерційного виробництва фармацевтичних білків у молоці. Так, у 2014 р. FDA схвалило використання **рекомбінантного людського білка-інгібітора С1-естерази, виробленого в молочних залозах трансгенних кроликів**, для осіб, які страждають від гострих нападів **спадкового ангіоневротичного набряку**. Кролики виробляють **високий рівень білків у своєму молоці**, їх легко доглядати та **утримувати** через їхні невеликі розміри, **вони швидко розмножуються** та не є переносниками серйозних інфекційних захворювань людям.

Виходячи з вищезазначеного, з економічної, суспільної та етичної точок зору використання тварин як біореакторів для виробництва терапевтичних білків є прийнятним.

4.4.3. Продукування донорських органів

Тварини є потенційним джерелом органів для трансплантації людям. Трансплантація органів **людини**: серця, печінки та нирок **іншій людині (алотрансплантація або алотрансплантат)** ефективна на 75–95 % протягом першого року, і, в середньому, пацієнти після трансплантації живуть від 10 до 15 років. Однак у всьому світі **попит на донорські органи значно перевищує наявну пропозицію**. У США, наприклад, у 2015 р. було потрібно понад 122000 трансплантацій органів, але було виконано лише близько 31000.

Зважаючи на це, **трансплантація тварин людині (ксенотрансплантація)** була запропонована як спосіб подолати цю невідповідність. **Свині** вважаються найбільш вірогідним джерелом органів для ксенотрансплантації. І оскільки вони вирощуються для споживання в якості їжі, використання їх як **донорів органів може бути соціально та**

етично прийнятним для певних верств населення (виключення: мусульмани, вегетаріанці, вегани).

Основною перешкодою для трансплантації органів між зазначеними видами є надгостре **відторгнення органу тварини**. Таке відторгнення відбувається, коли вже існуючі антитіла господаря (наприклад, людини) зв'язуються з **вуглеводним епітопом галактози- α -1,3-галактози (α -Gal)** на поверхні клітин трансплантованого органу. Зв'язані антитіла викликають запальну реакцію (каскад комплементу), яка руйнує клітини, вкриті антитілами, і призводить до втрати трансплантованого органу протягом кількох годин. У природних умовах білки на поверхні клітин, що вистилають кровоносні судини, захищають клітини від запальної реакції. Ці білки, що інгібують комплемент, є **видоспецифічними**. Тому було запропоновано наступне: якщо тварина-донор несе **1 або більше генів білка, який інгібує комплемент людини**, трансплантований орган може бути захищений від початкової запальної реакції.

Було створено трансгенних свиней (рис. 4.31) із різними **інгібіторами людського комплементу**. Надгострого відторгнення не відбулося після трансплантації нирок трансгенних свиней примату-хазяїну, і рівень виживання становив від 20 до 90 днів залежно від експресії інгібітора комплементу людини. Рівень виживаності також залежав від рівня імуносупресивних препаратів, які вводилися.

Крім цього, було виявлено, що виживаність значно покращилася під час трансплантації серця та нирок приматам, отриманим від ГМ свиней, у яких **антигенний епітоп α -Gal не синтезувався внаслідок видалення гена, кодуєчого α -1,3-галактозилтрансферазу**. Коли зазначені генетичні модифікації були об'єднані у трансгенних свиней, які експресували білки, що регулюють згортання крові людини (наприклад, тромбомодулін), для зниження імуноактивованого утворення тромбів, виживаність павіана із трансплантованим серцем, зросла від кількох місяців до більш ніж одного року (рис. 4.31).



Рис. 4.31. Генно модифікована свиня для продукування ксенотрансплантантів. Пояснення в тексті. Адаптовано з [69]

На доданок до вищезазначених недоліків та можливих ускладнень, необхідно також розглядати ймовірність того, що **латентні патогени свиней**, такі як **ендогенний ретровірус свиней (PERV)**, можуть активуватися після ксенотрансплантації та викликати **інфекції у людей**. Було виявлено, що PERV мав здатність реплікуватися в деяких довготривалих лініях клітин людини, але не в новостворених культурах клітин або в клітинах людини *in vivo*. Хоча немає доказів того, що PERV викликає несприятливі симптоми у людей, можна запобігти активації PERV за допомогою **РНК-інтерференції**.

Отже, на сьогодні, необхідно детально проаналізувати та нівелювати всі ймовірні ускладнення, а також продемонструвати тривале виживання приматів-реципієнтів, яким трансплантували життєзабезпечувальний орган, перш ніж розпочати використовувати ксенотрансплантати (зокрема, **вирощені в свині індивідуальні органи лише для певного пацієнта** (рис. 4.32)) для клінічних випробувань на людях.

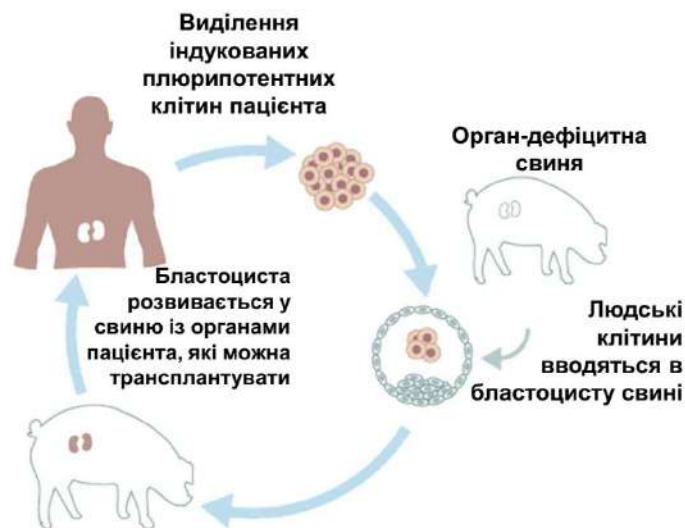


Рис. 4.32. Загальна схема використання свині для отримання органів пацієнта для подальшої індивідуальної трансплантації. Пояснення в тексті.
Адаптовано з [69]

На доданок, на сьогодні, **свині – найсучасніші ГМТ, схвалені FDA**. Так, у грудні 2021 р., як було вже зазначено, FDA схвалило використання ГМ свиней («GalSafe», рис. 4.33): їх можна використовувати у виробництві ліків, для забезпечення органів і тканин для трансплантації людини, а також для виробництва м'яса, безпечного для споживання людьми з алергією на м'ясо.



Рис. 4.33. Свиня «GalSafe». Запозичено з [33]

Alpha-gal алергія – або **алергія на м'ясо ссавців** – це тип алергії на м'ясо, що характеризується відстроченим появою симптомів (3-8 год) після вживання м'яса ссавців і внаслідок попереднього укусу кліща. Вперше про неї було повідомлено у 2002 році.

Цей тип алергії (перша відома харчова алергія, пов'язана з вуглеводами, а не білками) – це реакція на **чужерідний вуглевод** галактозу- α -1,3-галактозу (**α -Gal**), у результаті якої організм перевантажується антитілами до імуноглобуліну E (IgE) при контакті з ним. Anti-gal – це природне антитіло людини, яке специфічно взаємодіє з Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R (альфа-галактозильний епітоп). Молекула α -Gal зустрічається в усіх ссавців, за винятком катаринів (маври Старого Світу).

Внаслідок **укусів певних кліщів**, таких як *Amblyomma americanum* у США та *Ixodes holocyclus* в Австралії, цей вуглевод може передаватися жертві, що, у свою чергу, призводить до розвитку зазначеної сповільненої алергічної реакції на споживання м'ясних продуктів ссавців (**«червоне м'ясо»**): яловичину, свинину, баранину, оленину, кролятину та субпродукти. Інші продукти ссавців, що містять α -Gal, крім м'яса, такі як молоко та желатин, також можуть викликати алергічну реакцію. Деякі пацієнти настільки гіперчутливі до α -Gal, що алергія може викликати перехресну реакцію з желатином ссавців і навіть деякими молочними продуктами. На сьогодні, немає розробленого та схваленого протокола лікування від цієї алергії, окрім уникання споживання вищезазначених продуктів.

За допомогою сучасних методів редагування геномів у цю лінію свиней було введено **рекомбінантну ДНК, щоб зруйнувати ген, зв'язаний із виробництвом α -Gal**. Так, було використано так звану **навмисну зміну генома (intentional genomic alteration, IGA)**, також відому як **«редагуванням геному» («genome editing»)**.

«GalSafe» свині були розроблені компанією під назвою «Revivacor», вони є **першими генетично зміненими тваринами, яких FDA схвалило як для споживання людиною, так і для медичного використання**. Наприклад, ці

тварини потенційно можуть бути використані як продуцент препарату **гепарину**, що розріджує кров. Будь-які сторони, які бажають використовувати свиней «GalSafe» для нових ліків, трансплантатів або імплантатів у людей, повинні будуть отримати додатковий дозвіл FDA.

Крім того, «тканини та органи від свиней «GalSafe» можуть потенційно вирішити проблему імунного відторгнення у пацієнтів, які отримують **ксенотрансплантати**, оскільки вважається, що саме α -Gal є причиною відторгнення у пацієнтів.

У рамках свого огляду FDA оцінило як безпеку підходів **IGA** для тварин і людей, які вживають їх м'ясо, так і намір розробника продукту просувати на ринок «GalSafe». Також FDA проаналізувало потенційний вплив таких ГМ свиней на навколишнє середовище в США, і визначило, що він аналогічний впливу від звичайних свиней. Однак умови, в яких будуть утримуватися свині «GalSafe», набагато суворіші, ніж умови утримання свиней на звичайних фермах.

4.4.4. Створення резистентних до хвороб тварин

На сьогодні, **інфекційні хвороби домашніх тварин** контролюються вакцинацією, медикаментами, фізичною ізоляцією та ретельним контролем. На практиці витрати на профілактику захворювань можуть досягати до 20 % від загальної вартості виробництва.

Створення трансгенних тварин із **спадковою стійкістю до бактеріальних, вірусних та паразитарних захворювань** призведе до зменшення вживання відповідних ліків тваринами, до зростання їх продуктивності, а також забезпечить отримання безпечніших продуктів харчування, що, у свою чергу, збільшить економічний зиск.

Один підхід для створення стійких до інфекційних захворювань трансгенних тварин передбачає **введення гена антитіла, яке зв'язується з**

патогенспецифічним антигеном. Обґрунтування цієї стратегії полягає в тому, щоб забезпечити **успадкований механізм біологічного захисту** для ГМ тварини, який **усуває необхідність імунізації шляхом вакцинації.** Хоча тварина, зазвичай, має інтактну гуморальну імунну систему, експресія моноклонального антитіла проти специфічного патогену забезпечить негайний захист без попереднього контакту з патогеном. Якщо трансген, що кодує моноклональне антитіло, сконструювати таким чином, щоб він **секретувався в молоко, молодняк ГМ молочних тварин набуде пасивного імунітету проти патогену.**

Інший підхід полягає у **видаленні білків хазяїна, які роблять тварину сприйнятливою до конкретного інфекційного захворювання.** Пріонні захворювання викликаються аномальними формами нормальних білків мозку (рис. 4.34).

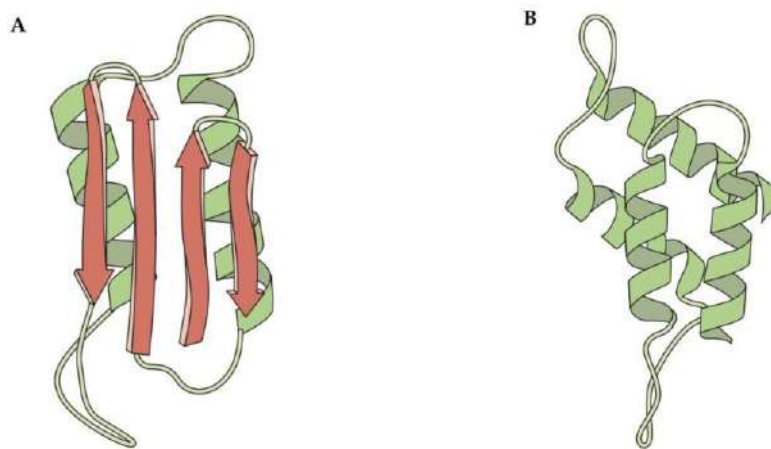


Рис. 4.34. Білки-пріони є аберантними формами (А) нормального білка головного мозку Prp^C (В). Пояснення в тексті. Запозичено з [24]

Пріони є інфекційними в тому сенсі, що після їх виникнення в клітині, аберантні білки спонукають нормальні білки мозку неправильно укладатися. Неправильно згорнуті білки агрегують і порушують роботу мозку.

Пріонною хворобою, особливо проблематичною для виробництва яловичини, є **губчаста енцефалопатія великої рогатої худоби (BSE).** Вона спричинена мутантною формою білка, відомого як **пріонний білок BSE**

(Prp^{BSE}), щоб відрізнити його від нормального білка або Prp^C, глікопротеїна, знайденого на поверхні нейронів центральної нервової системи, де він відіграє роль у захисті від стресу. **Скрепі** (англ. scrapie) – це подібне пріонне захворювання, яке зустрічається в **овець**.

Коров'яча енцефалопатія, яку часто називають **коров'ячим сказом** через невропатологічні симптоми у корів, завдала величезних економічних збитків молочним фермерам та тваринникам і є причиною ряду спірних питань у торгівлі худобою між країнами. Лікування від цієї хвороби не існує, вона є заразною, тому при виявленні захворювання багатьох тварин необхідно утилізувати, як правило, шляхом спалювання.

Крім того, є певні докази того, що пріони можуть передаватися людям через споживання заражених пріонами м'ясних продуктів, викликаючи **іншу форму енцефалопатії або хворобу Крейтцфельда-Якоба** (у людей такі пріонні білки називають Prp^{CJD}). Ця підступна хвороба може протікати безсимптомно протягом дуже тривалого періоду часу, але з часом можуть проявитися **психічні розлади**.

Таким чином, було б полегшенням як для фермерів, так і, власне, для споживачів продуктів тваринного походження, якби **худобу можна було б захистити від пріонної білкової інфекції**.

Для цього було запропоновано **шляхом генної інженерії припинити продукування нормальної версії білка Prp^C**. Цей підхід спочатку був протестований на мишах, а потім на **великій рогатій худобі**, у яких **обидва алелі гена, що кодує Prp^C, були зруйновані шляхом інсерції гена стійкості до антибіотика в кодуєчу послідовність**.

Потім генетично модифікованих тварин оцінювали за багатьма морфологічними та фізіологічними ознаками, зокрема, за наявністю **показників, які використовуються для діагностики губчастої енцефалопатії**, включно з психічним статусом, сенсорними та моторними функціями, імунною функцією та морфологією тканини головного мозку (мозкова тканина інфікованих тварин заповнюється отворами, які надають

мозку характерного **губчастого вигляду**). У всіх аспектах трансгенні корови виявилися здоровими та залишалися нормальними протягом всього періоду дослідження.

Для **перевірки ефективності цієї стратегії** гомогенати мозкової тканини великої рогатої худоби як дикого типу, так і з нокаутних особин Prp^{C} окремо інкубували з гомогенатами головного мозку великої рогатої худоби, інфікованої BSE, яка мала аномальну версію пріонного білка Prp^{BSE} (рис. 4.35).

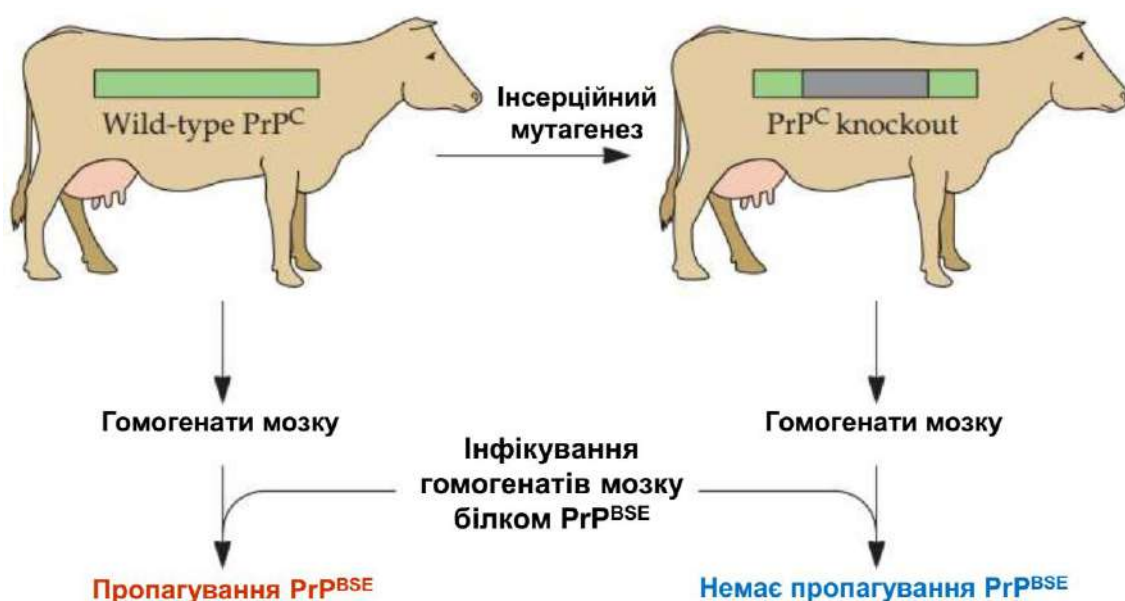


Рис. 4.35. Загальна схема створення трансгенних корів, резистентних до губчастої енцефалопатії великої рогатої худоби (BSE). Пояснення в тексті. Адаптовано з [24]

Пропагування Prp^{BSE} не було виявлено в гомогенатах тварин, нокаutowаних за Prp^{C} , тоді як прояви цієї хвороби було знайдено в гомогенатах дикого типу.

Отже, отримані результати показали, що втрата функції Prp^{C} не викликає BSE, і нормальний Prp^{C} необхідний для поширення аберантної форми пріонного білка, у той час, як **ГМ велика рогата худоба з нокаутом Prp^{C} здатна проявляти резистентність до інфекції BSE.** На сьогодні, проводяться подальші дослідження, щоб визначити, чи буде так само стійкою велика рогата худоба з нокаутом Prp^{C} до зараження Prp^{BSE} *in vivo*.

Бактерія *Staphylococcus aureus* (золотистий стафілокок) відповідає за 25 % випадків зараження молочних залоз (**мастит**) у корів: Ця інфекція є заразною, часто рецидивує після припинення лікування антибіотиками та легко поширюється по всьому стаду. **Надої молока від заражених корів значно знижуються.** На сьогодні, спалахи маститу, викликаного *S. aureus*, не піддаються ефективному контролю, при цьому щорічні витрати в США становлять близько 2 мільярдів доларів.

Staphylococcus simulans виробляє **лізостафін**, пептидоглікангідролазу, яка специфічно атакує клітинну стінку *S. aureus*. Однак, коли культивовані еукаріотичні клітини спочатку трансфекували бактеріальним геном лізостафіну, утворювався лише неактивний лізостафін, оскільки 2 залишки аспарагіну були **глікозильованими**. Цей недолік вдалося подолати шляхом використання **спрямованого мутагенезу** для заміни кодонів цих двох аспарагінів кодонами глутаміну (рис. 4.36).

Було виявлено, що **модифікований лізостафін** був **не глікозильований** після синтезу в еукаріотичних клітинах, а також **діяв проти *S. aureus***. Ефективність цього підходу вперше було перевірено на ГМ мишах, які синтезували модифікований ген лізостафіну під контролем промотора гена овечого β -лактоглобуліну (білковий продукт якого секретується в **молоко**).

Завдяки успішному захисту трансгенних мишей від інфекційного впливу *S. aureus*, цей підхід було **адаптовано для створення корів**, продукуючих трансген лізостафіну. Змінений ген лізостафіну **під контролем промотора овечого β -лактоглобуліну вводили в коров'ячі фібробластів, ядра з яких потім переносили в ооцити, попередньо позбавлені ядер**. Після цього, отримані бластоцисти були імплантовані в матку корів. Народжені телята були використані для створення трансгенних ліній.

Згодом було показано, що після дев'яти інфузій *S. aureus* у молочні залози корів із високим вмістом лізостафіну **розвиток інфекції не спостерігався**. У той же час більше 70 % нетрансгенних тварин були інфіковані. Навіть низькі рівні експресії лізостафіну забезпечували значний рівень захисту від збудника.

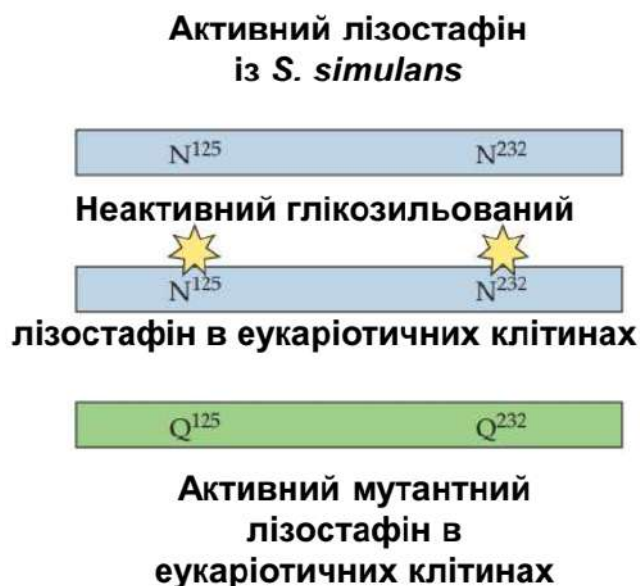


Рис. 4.36. Загальна схема створення активного мутантного лізостафіну в клітинах клітин. У клітинах тварин, трансфікованих кодуючою послідовністю лізостафіну з *S. simulans*, лізостафін глікозильований (жовті зірочки); N¹²⁵ і N²³² – амінокислотні положення залишків аспарагіну; Q¹²⁵ і Q²³² – амінокислотні положення залишків глутаміну. Пояснення в тексті. Адаптовано з [24]

Незважаючи на те, що ці результати є перспективними для вирішення зазначеної важливої проблеми м'ясної та молочної промисловості, **питання безпеки молока, яке містить лізостафін, такі як здатність змінювати нормальну кишкову мікрофлору споживачів та селекціонувати стійкі до лізостафіну штами патогенного *S. aureus*, ще потрібно вирішити.**

4.4.5. Покращення якості молока

Коров'яче молоко складається з наступних компонентів: води (87,7 %), лактози (4,9 %), жирів (3,4 %), білків (3,3 %), мінеральних речовин (0,7 %). Серед білків понад 80 % припадає на казеїни.

Однією з цілей трансгенезу молочних тварин є **підвищення корисних властивостей молока для людей і молочних тварин.** Наприклад, надмірна

експресія білків, що беруть участь у виробництві поживних речовин молока, може покращити зростання, здоров'я та виживання молодих тварин. Специфічні компоненти молока також можуть бути змінені, щоб принести користь споживачам.

Так, у 1997 р. у Рослінському інституті (Roslin Institute, інститут у м. Росліні поблизу Единбурга, Шотландія, Великобританія) було створено **першу трансгенну корову на ім'я Розі**. Ця ГМ корова виробляла молоко, **збагачене людським білком альфа-лактальбуміном** (2,4 грама на літр). За поживністю таке молоко являло собою **більш збалансований продукт для людських немовлят**, ніж натуральне коров'яче молоко.

Антибактеріальний та імуномодуючий білок **лізоцим** природним чином виробляється у великих кількостях у **людському грудному молоці**, але в **молоці жуйних тварин, таких як корови та кози, його значно менше**. Лізоцим розщеплює глікозидні зв'язки у пептидоглікані, що призводить до розриву клітинних стінок бактерій. Присутність лізоциму в жіночому грудному молоці сприяє зниженню шлунково-кишкових інфекцій у дітей, які перебувають на грудному вигодовуванні, та сприяє збільшенню кількості корисних бактерій, таких як *Lactobacillus* та *Bifidobacteria*. Споживання цього білка у тваринному молоці, що є основним джерелом їжі для багатьох дітей молодшого віку, може допомогти **знижити високий рівень захворюваності на бактеріальні захворювання**, що супроводжуються діареєю, у дітей (від них щороку помирає понад 1 мільйон дітей) та у молодняка тварин.

Експресія гена, що кодує лізоцим людини, відбувалася з **промотора α -казеїну в молочних залозах трансгенних кіз** та призводила до отримання молока, рівень лізоциму в якому становив 68 % порівняно з людським молоком. **Поросята**, яких годували пастеризованим молоком трансгенних кіз, **швидше одужували від інфекції**, спричиненої *E. coli*, ніж поросята, яких годували молоком нетрансгенних кіз.

Подальші клінічні випробування необхідні для перевірки безпеки та ефективності збагаченого лізоцимом трансгенного козячого молока в якості засібу профілактики діарейних захворювань дітей.

Багатьом людям з **алергією на коров'яче молоко було б корисно не вживати β -лактоглобулін** – один із білків плазми (сироватки) коров'ячого молока та молока інших тварин (за винятком грудного молока людини), **основний алерген молока.**

Було запропоновано підхід на основі **нуклеази із цинковими пальцями (ZFNs)** для продукування коровами молока без цього білка. Розроблені нуклеази із цинковими пальцями містили ДНК-зв'язуючий домен, який націлював ендонуклеазний домен на специфічну послідовність для її розщеплення. Ендонуклеаза робила дволанцюговий розрив у ДНК-мішені, який можна було репарувати шляхом **негомологічного з'єднання кінців (NHEJ)**. Це, у свою чергу, часто призводило до **інсерції та/або делеції нуклеотидів, які порушують рамку зчитування послідовності, що кодує білок.**

Щоб порушити продукцію β -лактоглобуліну, у клітини фібробластів бичачого плода вводили мРНК, що кодувала нуклеазу із цинковими пальцями, призначену для **зв'язування та розрізання послідовності гена β -лактоглобуліну** (рис. 4.37).

ПЛР-аналіз показав, що 80 % мутантних клітин фібробластів мали невеликі (< 20 п.н.) делеції або інсерції в послідовності-мішені. Трансгенних корів отримували шляхом перенесення ядра із використанням ядер фібробластів, які, як було підтверджено, мали мутації в обох алелях гена β -лактоглобуліну. Із 8 клонованих тварин, що народилися, вижило лише одне теля. Ця тварина мала дві делеції: 9 і 15 п.н. в алелях β -лактоглобуліну, які не порушили рамку зчитування, але забезпечили синтез укороченого білка.

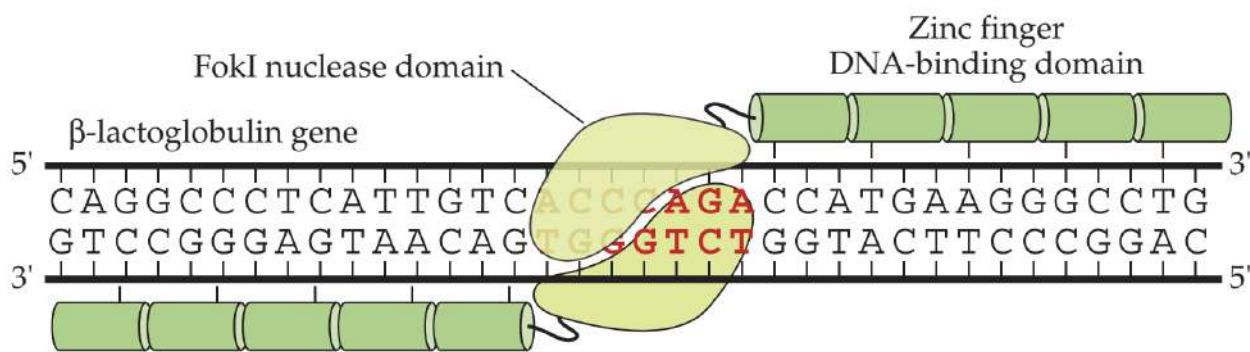


Рис. 4.37. Загальна схема дії нуклеази із цинковими пальцями для руйнування гена β -лактоглобуліну великої рогатої худоби. ДНК-зв'язуючий домен зв'язується зі специфічною послідовністю нуклеотидів у гені β -лактоглобуліну та позиціонує домен нуклеази FokI для розщеплення цільового сайту (позначено червоним). Репарація розрізаної ДНК за допомогою негомологічного з'єднання кінців вносить у ген мутацію зі зсувом рамки зчитування. Запозичено з [24]

Таким чином, ці попередні результати демонструють цілеспрямоване руйнування гена, який кодує білок коров'ячого молока, за допомогою нуклеази для редагування генома; проте ще необхідно **достеменно вивчити, чи будуть толерантними до такого модифікованого молока особи з алергією на β -лактоглобулін.**

4.4.6. Покращення продуктивності тварин

Підвищення сухої долі білків або зниження частки жирів у м'ясі – часто є більш складною задачею, ніж вищеописаний трансгенез, застосований при зміні складу та якості молока, внаслідок **полігенності** ознак. Спочатку дослідники прагнули збільшити масу тіла худоби, вводячи **гени, що кодують гормони росту або інсуліноподібний фактор росту**. Хоча тварини мали підвищену здатність перетворювати корм у масу тіла, їм заважали труднощі з контролем експресії трансгенів. До того ж, було виявлено, що надмірне

виробництво гормону росту **негативно впливало на здоров'я тварин**, призводячи до виразки шлунка, дисфункції нирок, кульгавості, запалення оболонки серця, нерухомості суглобів і сприйнятливості до пневмонії тощо.

Для подолання цієї проблеми використовувались **індуцибельні промотори, такі як промотор металотіонеїну**, який може активуватися цинком, що вводять в їжу тваринам. Однак виявлений рівень експресії був занизьким, оскільки трансген було введено в гетерохроматин.

Деякі породи великої рогатої худоби, такі як **бельгійська блакитна («Belgian Blue»)**, мають більш потужну й сухорляву м'язову масу (рис. 4.38), ніж інші породи, через природну мутацію гена, що кодує **міостатин** – фактор росту, який, зазвичай, пригнічує ріст скелетних м'язів. **Мутації в обох копіях гена міостатину (MSTN) призводять до виробництва скороченого, а отже, нефункціонального білка міостатину.**



Рис. 4.38. Бик породи бельгійська блакитна (Belgian Blue). Пояснення в тексті. Запозичено з [24]

Отже, було запропоновано, що за допомогою підходів генної інженерії стане можливим **інактивувати цей ген в інших породах великої рогатої худоби для збільшення виробництва м'яса.** Більше того, вчені намагалися

ввести таку модифікацію лише **самцям** задля збереження лактаційного процесу **самиць** без будь-якого впливу та змін.

Уперше доцільність цього підходу була продемонстровано на **мишах**. Послідовність ДНК, яка кодувала **інактиватор міостатину**, було спрямовано на **Y-хромосому**, забезпечуючи експресію інактиватора лише самцями. **Інактиватор міостатину** складається з **N-кінцевого пропептидного домена** (латентно асоційований пептид; **LAP**) білка міостатину. Після протеолітичного розщеплення N-кінцевий пропептид може утримувати C-кінцеву частину білка (димер), яка є біологічно активним компонентом, у неактивному стані (рис. 4.39). Це блокує активність міостатину, яка, зазвичай, призводила б до пригнічення росту м'язів.

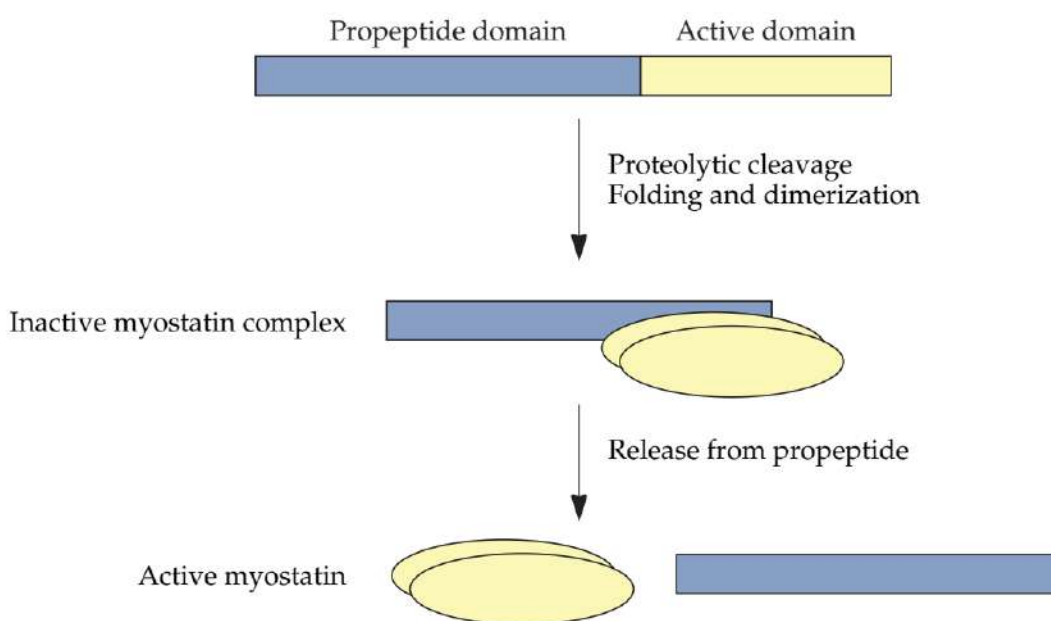


Рис. 4.39. Структура активного та неактивного міостатину. Інактиватор міостатину складається з N-кінцевого пропептидного домена (propeptide domain) білка міостатину. Пояснення в тексті. Запозичено з [24]

Була розроблено двоетапну стратегію для введення гена, що кодує інактиватор міостатину, в **Y-хромосому ембріональних стовбурових клітин миші**. На **першому етапі касету**, що містила позитивний (ген стійкості до неоміцину *Neo*) та негативний (*HSV-tk*, чутливість до ганцикловіру)

селективні маркери, фланковані *loxP* сайтом дикого типу та мутантним *loxP**сайтом (із двома нуклеотидними змінами) було введено в Y-хромосому шляхом **гомологічної рекомбінації** між неважливою послідовністю в Y хромосомі (Y) і гомологічною послідовністю, клонованою у вектор (рис. 4.40).

Позитивний селективний маркер (*neo*) надавав стійкості до антибіотика G-416 (Geneticin; генетицин), а негативний селективний маркер (*tk*) забезпечував чутливість до ганцикловіру. Трансфіковані клітини були відібрані на основі їх стійкості до цього антибіотика. Сайт інтеграції в Y-хромосомі перевіряли за допомогою ПЛР із специфічними праймерами.

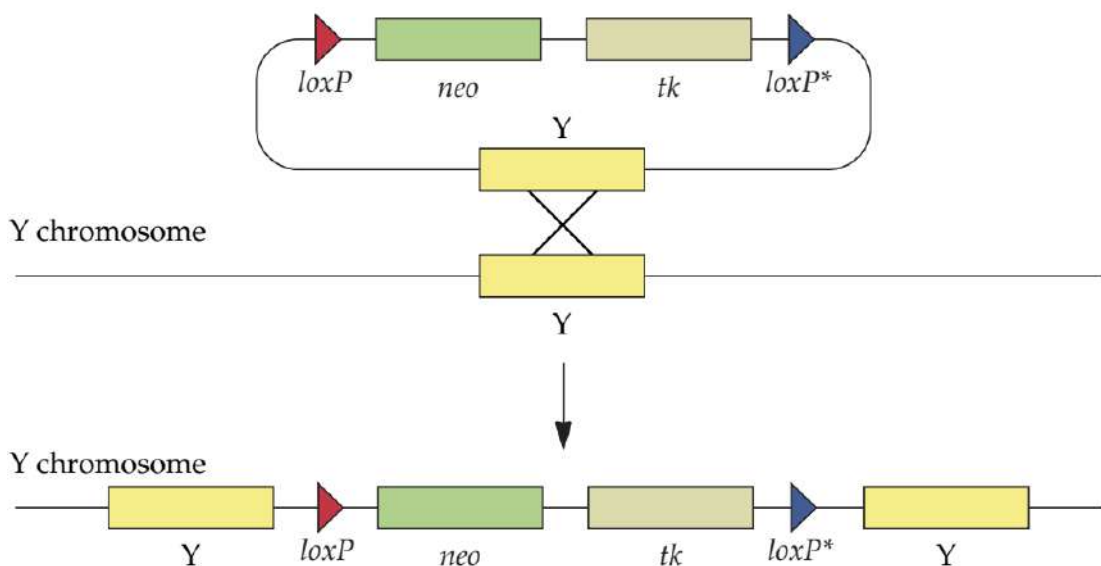


Рис. 4.40. Стратегія створення трансгенних мишей зі збільшеною м'язовою масою. Перший етап. *loxP* сайт дикого типу (червона стрілка); мутантний *loxP** сайт із двома нуклеотидними змінами (синя стрілка); Y – неважлива послідовність на Y-хромосомі. Пояснення в тексті. Запозичено з [24]

На другому етапі ген, що кодував інактиватор міостатину, під контролем сильного промотора та енхансера із скелетних м'язів щурів, і також фланкований тими ж гетерологічними ділянками *loxP*, був клонований у плазмиду та введений шляхом **електропорації** в трансфіковані

ембріональні стовбурові клітини, які вже мали введену касету з маркером селекції (рис. 4.41).

Другу плазмиду, яка кодувала **Cre-рекомбіназу**, також було введено в трансфіковані клітини. Активність Cre-рекомбінази призводила до **рекомбінації між гомологічними loxP сайтами та інтеграції гена інактиватора міостатину в Y-хромосому**. Сайт інтеграції в Y-хромосомі так само перевіряли за допомогою ПЛР із специфічними праймерами. Трансфіковані ембріональні стовбурові клітини, що містили ген інгібітора міостатину, культивували, вводили в бластоцисти, а потім імплантували псевдовагітним прийомним матерям.

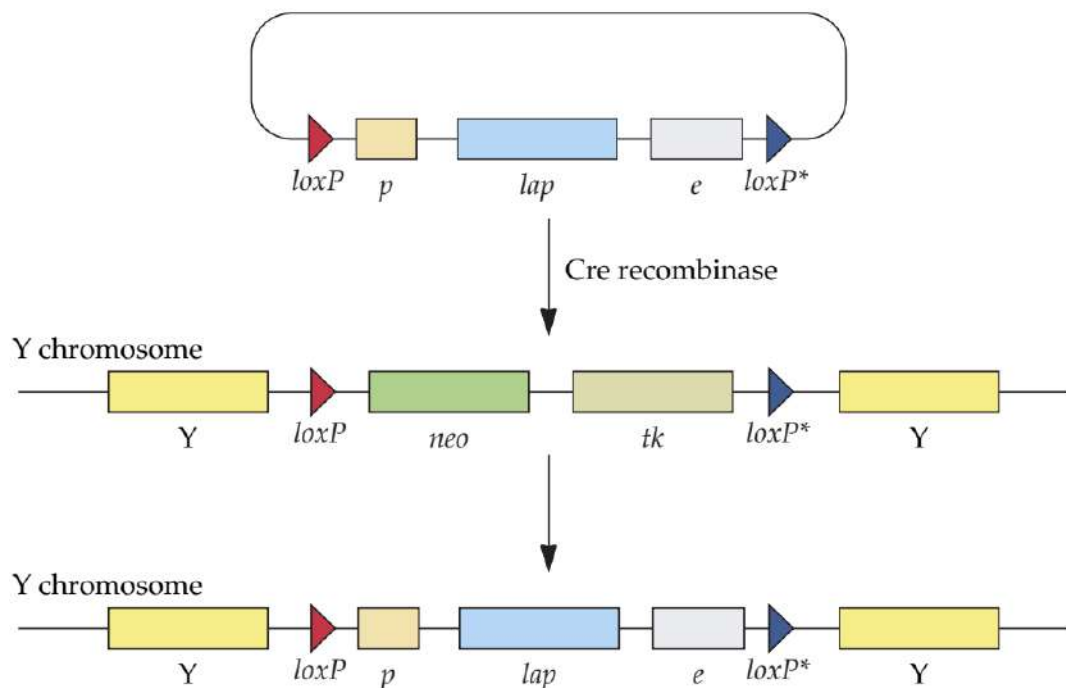


Рис. 4.41. Стратегія створення трансгенних мишей зі збільшеною м'язовою масою. Другий етап. Інактиватор міостатину (LAP); промотор скелетних м'язів щурів (*p*); енхансер (*e*); Cre recombinase – Cre рекомбіназа. Пояснення в тексті. Запозичено з [24]

Було отримано **одну трансгенну мишу-засновника чоловічої статі**, яку потім спаровували з не трансгенними самками. Як і очікувалось, для гена, інтегрованого в Y хромосому, усі нащадки чоловічої статі несли трансгенний

інгібітор міостатину, тоді як **жодна жіноча особина з потомства не була ГМ**. У трансгенних самців інгібітор міостатину експресувався в скелетних м'язах, а не в серцевій або печінковій тканині. М'язова маса була більшою на 5-20 % у трансгенних самців порівняно з нетрансгенними контрольними самцями мишей.

В іншому підході, щоб інактивувати міостатин і збільшити вихід м'яса у великої рогатої худоби, ген *MSTN* було зруйновано за допомогою нуклеаз, які редагують геном. Так, було застосовано **ефекторну нуклеазу, подібну до транскрипційних активаторів (TALEN)**.

Як було зазначено вище, **TALEN** – це сконструйована нуклеаза, подібна до **нуклеаз із цинковими пальцями (ZFNs)**, адже вона складається з неспецифічного домена нуклеази FokI, злитого з ДНК-зв'язуючим доменом, який спрямовує нуклеазу до цільової послідовності.

У TALEN нуклеазі ДНК-зв'язуючий домен складається із **серії з 34 амінокислотних модулів, кожен з яких розпізнає і зв'язується з одним конкретним нуклеотидом**, порівняно з трьома нуклеотидами для модуля нуклеаз із цинковими пальцями. Специфічні для певної послідовності TALENs синтезують шляхом об'єднання кодуючих послідовностей для таких модулів і нуклеазного домена в експресуючому векторі. Нуклеаза генерує **дволанцюгові розриви** в ДНК-мішені, які можуть бути репарованими у **процесі негомологічного з'єднання кінців (NHEJ)**, що, як правило, призводить до **місенс-мутацій**, які порушують функцію гена.

Для інактивування гена *MSTN* великої рогатої худоби, було сконструйовано нуклеазу TALEN для розрізання саме в тій ділянці цього гена (рис. 4.42), **делеції в якій викликали більш потужну й сухорляву м'язову масу в бельгійській блакитній породі**.

мРНК TALEN, вводили безпосередньо в **запліднені ооцити корів та овець** для виробництва нуклеази, націленої на *MSTN*. Через 7 днів ембріони аналізували на наявність бажаних мутацій, перш ніж їх імплантували псевдовагітним прийомним матерям для подальшого розвитку.

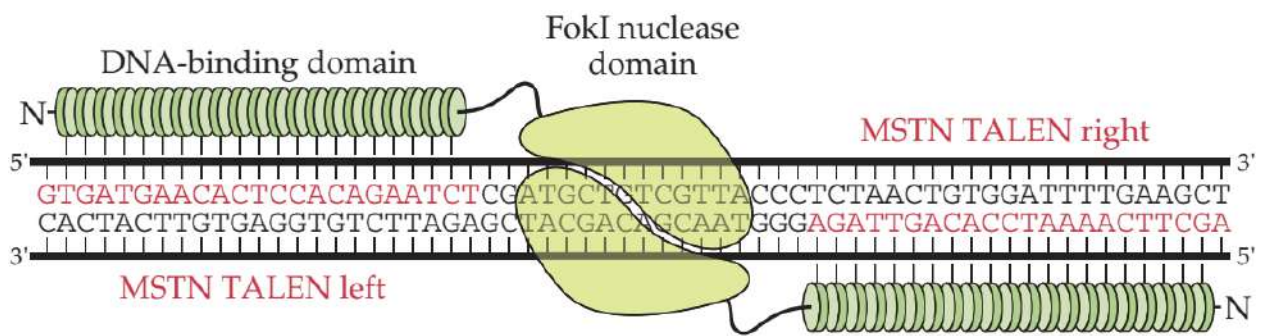


Рис. 4.42. Загальна схема створення ефекторної нуклеази, подібної до транскрипційних активаторів (TALEN), для введення мутацій у ген міостатину – *MSTN* – великої рогатої худоби. Пояснення в тексті. Запозичено з [24]

Від 20 пересаджених бичачих ембріонів було отримано лише 2 живонароджених телят; однак лише один із нащадків мав модифіковані алелі *MSTN*. У бика, що виріс, було виявлено 3 різні алелі (2 з делеціями 1-го та 3-х п.н. і алель дикого типу), що вказує на те, що нуклеаза TALEN була активною більш ніж в одному клітинному поділі. Незважаючи на отриманий **мозаїцизм**, **бик** демонстрував посилений розвиток мускулатури. З 26 пересаджених овечих ембріонів вижили лише 9 нащадків. Тільки **одне ягня** мало єдиний ГМ алель *MSTN* (інший алель був дикого типу), і, що цікаво, це була та сама делеція 3-х п.н., що й у вищезазначеного бика. На сьогодні, й надалі вивчається, чи цієї єдиної делеції в кодоні гена *MSTN* буде достатньо для зміни функції міостатину.

Ген міостатину овець також був успішно відредагований за допомогою системи **CRISPR-Cas9**. мРНК **Cas9** і **sgРНК**, націлені на послідовність, сусідню з **PAM**, в екзоні 1 гена *MSTN* (рис. 4.43 А), були доставлені шляхом **мікроін'єкції в цитоплазму одноклітинних ембріонів овець *in vitro***. Після розрізання послідовності за допомогою Cas9 відновлення ДНК відбувалось шляхом **негомологічного з'єднання кінців (NHEJ)**. Ця трансфекційна подія не спричинила жодних негативних наслідків для раннього розвитку ембріонів.

З 53 бластоцист, імплантованих матерям-реципієнтам для подальшого розвитку, народилося 22 тварини, хоча троє ягнят померли протягом першого дня після пологів. Секвенування послідовності екзона 1 *MSTN* із шкірі та м'язів виживших ягнят, показало, що 10 тварин містили мутації в одному або обох алелях. Більшість мутацій були невеликими (до 27 п.н.) делеціями та/або інсерціями, які порушували рамку зчитування екзона 1. Однак 3 з них були делеціями, довжиною 6 п.н., всередині рамки зчитування (рис. 4.43 В). У 9 тварин передчасний стоп-кодон було введено в рамку зчитування принаймні одного алеля.

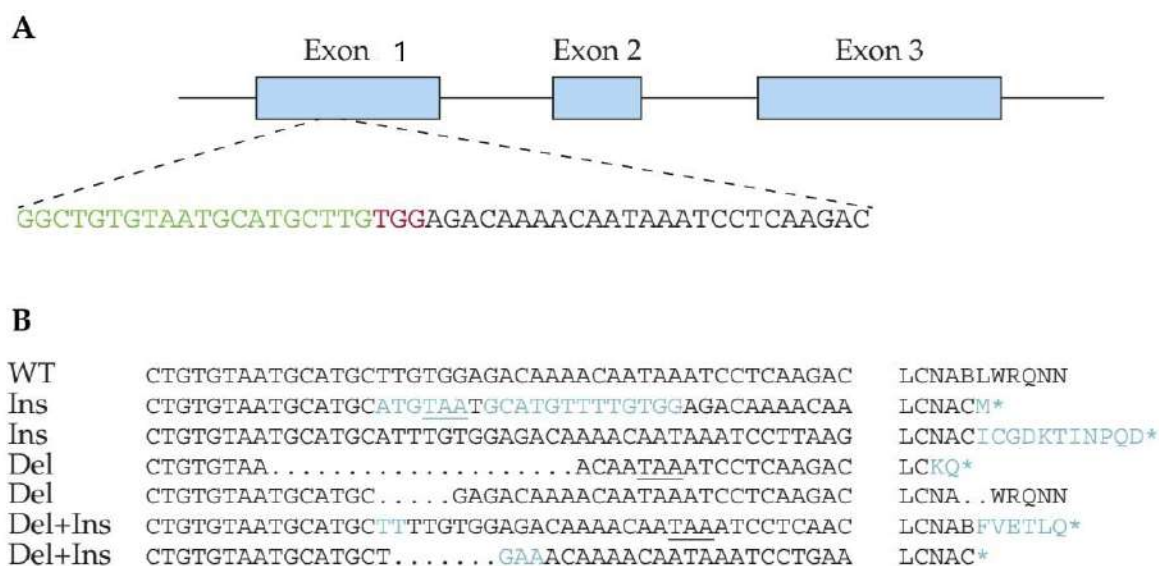


Рис. 4.43. Порушення гена *MSTN* овець за допомогою системи CRISPR-Cas9. (A) Склад sgРНК. Цільова послідовність екзона 1 гена *MSTN* (зелена); поруч послідовність РАМ (червона). (B) Деякі мутації, введені в екзон 1, після розщеплення за допомогою Cas9. Інсерції виділено синім кольором, делеції представлені крапками, а введені стоп-кодони підкреслені. Вплив на послідовність, що транлюється, показано введеними амінокислотами, виділеними синім кольором, і передчасним припиненням трансляції, зазначеним зірочкою. Пояснення в тексті. Запозичено з [24]

У жодного з ягнят не було виявлено мозаїчності, а **побічні (нецільові) мутації** було виявлено лише у 2 тварин. Тварини з біалельними

мутаціями не експресували міостатин у м'язових волокнах і у віці від двох місяців були на **20-30 % важчими** за ягнят дикого типу. Тварини з лише одним мутантним алелем виробляли міостатин на рівні, подібному до тварин дикого типу, і не виявляли підвищеної маси тіла.

На доданок, у 2017 р. було проведено дослідження, в якому було показано, що **система CRISPR/Cas9n забезпечила телят стійкістю до туберкульозу**. Так, у певні ділянки генома вбудували ген *NRAMP1*, що **забезпечує природну стійкість до туберкульозу**, за допомогою цієї системи, ніказа якої здатна робити лише **одноланцюгові розриви ДНК**. При такому підході репарація зі вставкою заданого гена відбувається шляхом **гомологічної рекомбінації**, яка значно **краще захищена від помилок, ніж негомологічне з'єднання кінців**. Подальші експерименти по зараженню отриманих ГМ телят збудником коров'ячого туберкульозу (*Mycobacterium bovis*) показали, що **введений ген забезпечував більш інтенсивну імунну відповідь і пригнічував ріст мікобактерій** у порівнянні зі звичайними тваринами, тобто підвищував їх природну стійкість до інфекції.

Таким чином, ці дослідження демонструють доцільність використання системи CRISPR-Cas9 та її модифікацій для ефективного впровадження покращених продуктивних ознак у тваринництві.

4.5. Трансгенні птахи

Створення трансгенних птахів шляхом **мікроін'єкції ДНК у запліднені яйцеклітини** є **вкрай неефективним підходом** внаслідок певних **унікальних особливостей репродукції та розвитку птахів**. Наприклад, під час запліднення у птахів в яйцеклітину проникає **кілька сперматозоїдів (поліспермія)**, а не 1, як, зазвичай, буває у ссавців. Як результат, **неможливо визначити чоловічий пронуклеус, який буде зливатися з жіночим пронуклеусом**. Крім того, **ДНК, введена в цитоплазму заплідненої**

яйцеклітини, **не інтегрується в геномну ДНК**. І навіть якби мікроін'єкція ядерної ДНК була можливою, методику було б важко реалізувати, оскільки **яйцеклітина після запліднення стає оповитою жорсткою мембраною, оточеною великою кількістю альбуміну та укладеною у внутрішню та зовнішню оболонки**.

Незважаючи на ці недоліки, трансген можна ввести в **область (гермінальний (зародковий) диск) на жовтку**, яка містить жіночий і чоловічий пронуклеуси. **Зародковий диск** присутній до формування яєчної шкаралупи. Після введення ДНК у зародковий диск, кожне **яйце культивують *in vitro***, а після формування ембріона, його поміщають у сурогатне яйце для подальшого вилуплення пташеняти. **Незважаючи на технічні труднощі, цим методом все ж було досягнуто виведення деяких трансгенних ліній курей**.

Для трансгенезу використовуються **плюрипотентні клітини**, які можна постійно **підтримувати в культурі** та генетично модифікувати за допомогою вищезазначених стандартних методів. Це клітини **бластодерми** й **примордіальні гермінальні клітини** (мають обмежений ріст *in vitro*), а також курячі ембріональні стовбурові клітини на **стадії Х** (стадія ембріона в щойно відкладеному яйці), які можуть виживати протягом 21 дня в культурі клітин.

Зазначені клітини спочатку **видаляються у курчат-донорів**, трансфекуються трансгеном, імплантуються в субгермінальний простір ембріонів-реципієнтів із свіжовідкладених яєць (рис. 4.44).

Після вилуплення деякі нащадки мають **суміш клітин**. Організм, який складається з генетично різних популяцій клітин двох або більше особин, називається **химерою** (це не **мозаїк**, в якому різні популяції клітин виникають з однієї зиготи). У деяких курячих химер клітини, що походять від трансфікованих клітин, стають частиною тканини зародкової лінії та утворюють зародкові клітини. Потім із цих химер можна отримати **трансгенні лінії шляхом декількох циклів схрещування**.

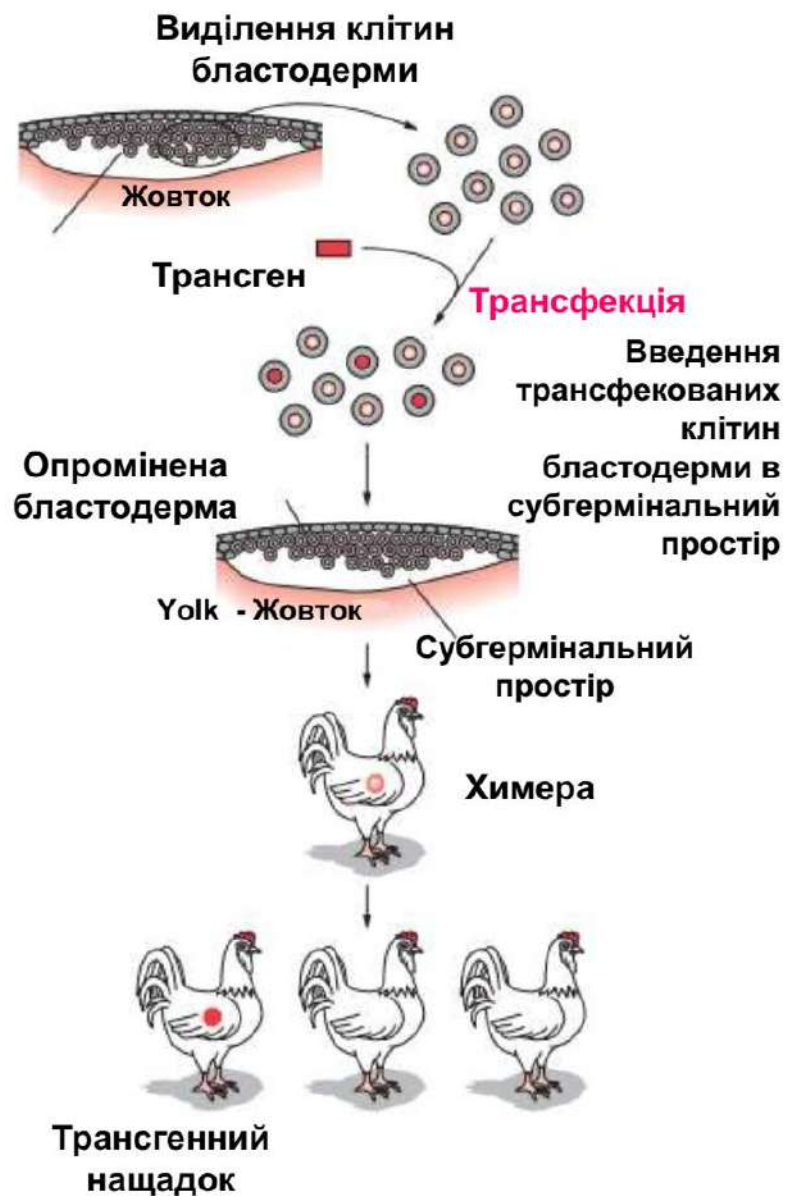


Рис. 4.44. Загальна схема створення трансгенних курей шляхом трансфекції ізолюваних клітин бластодерми. Пояснення в тексті. Адаптовано з [24]

Загалом клітини реципієнта значно перевищують кількість клітин із трансгеном. Однак **частка трансфікованих клітин може бути збільшена для підвищення ймовірності отримання химер зародкової лінії**. Так, одна стратегія передбачає **гамма-опромінення ембріонів-реципієнтів дозою від 540 до 660 рад за 1 год до введення трансфікованих клітин**. Радіаційний вплив **руйнує деякі, але не всі клітини бластодерми**, тим самим збільшуючи кінцеве співвідношення донорських та резидентних клітин у химерної курки.

Незважаючи на свою **неефективність**, на сьогодні, ця процедура часто **використовується** для отримання **трансгенних курчат**.

Отже, у птахівництві підходи генної інженерії застосовують для набуття птахами **стійкості до вірусних, бактеріальних та кокцидіальних захворювань**; для **збільшення ефективності перетворення корму**; для **зменшення рівня холестерину в яйцях**; та для **поліпшення якості м'яса**. Окрім цього, було запропоновано, що **яйця з високим вмістом білка можуть бути використані як джерело фармацевтичних білків**. За аналогією з молочною залозою худоби, експресія трансгена в клітинах репродуктивного тракту курки, яка в нормі секретує велику кількість **овальбуміну**, може призвести до накопичення **трансгенного білка, який буде поміщений у яєчну шкаралупу**.

Овальбумін становить понад 50 % протеїна яєчного білка, тому експресія бажаного трансгена під контролем **промотора овальбуміну** та відповідних регуляторних елементів може давати високі рівні рекомбінантного білка. Так, було отримано до 1 г рекомбінантного білка на яйце, і з огляду на те, що одна курка несе понад 300 яєць на рік, продуктивність цих тварин-біореакторів може бути значною. Рекомбінантний білок може бути **екстрагований із стерильних упаковок для яєць**.

Використовуючи вищезазначені підходи, на сьогодні, було створено **трансгенних курей, які синтезують** моноклональні антитіла, гормон росту, інсулін, людський сироватковий альбумін, α -інтерферон. А також препарат для внутрішньовенної інфузії **«Kanuma»** (себеліпаза альфа; продається компанією «Alexion Pharmaceuticals»), який є **рекомбінантною формою ферменту лізосомальної кислотної ліпази** і використовується для лікування дефіциту лізосомальної кислотної ліпази (рідкісного, хронічного, прогресуючого спадкового захворювання).

Окрім цього, розробляються **кури, які несуть яйця з miR24**. МікроРНК-24 (miR-24) широко вивчена при різних видах раку людини, отже, такі

трансгенні яйця можуть бути потенційними терапевтичними агентами при певних **онкологічних захворюваннях**.

Отже, **нормативне затвердження** терапевтичних білків, що виробляються в яйцях, може бути більш простим, оскільки з 2015 р. ГМ курячі яйця вже використовуються для виробництва ліків людям.

Одним із важливих застосувань трансгенезу курей є **запобігання поширенню вірусу пташиного грипу**. Вірус пташиного грипу переважно вражає диких птахів, але він дуже заразний і може вражати **домашніх птахів**, наприклад, курей, від яких він може передаватися людям. Віруси грипу мають РНК-геном, який потребує РНК-залежної РНК-полімерази для своєї реплікації та синтезу вірусних білків. РНК-полімераза зв'язується зі специфічною послідовністю, виявленою на кожній з восьми молекул РНК, що складають вірусний геном, і каталізує синтез РНК.

Було висловлене припущення, що якби **трансгенні кури експресували невелику молекулу РНК, яка діяла б як приманка, зв'язуючи РНК-полімеразу та пригнічуючи її активність**, можна було б **попередити синтез нових віріонів**, які можуть поширюватися на інших тварин.

Для цього курячим ембріонам шляхом **мікроін'єкції ДНК** ввели **лентивірусний вектор** із трансгеном, який кодував **маленьку РНК** (яка мала інгібувати РНК-залежну РНК-полімеразу, необхідну для виробництва нових віріонів) і сайт зв'язування РНК-полімерази під промотором курки. Самця, який мав трансген у своїх репродуктивних клітинах, схрестили з нетрансгенними курками для отримання гетерозиготного трансгенного потомства, яке було схрещено для отримання **гомозиготних трансгенних курчат**. Усі **нетрансгенні кури**, які були безпосередньо заражені вірусом пташиного грипу, **загинули від інфекції** протягом 6 днів після інфікування (рис. 4.45 А).

Усі трансгенні та нетрансгенні птахи, які утримувалися разом із інфікованими нетрансгенними курчатами, але не були безпосередньо щеплені вірусом, також **заразились цією інфекцією**. Навпаки, 4 з десяти

безпосередньо інфікованих трансгенних курей вижили протягом 7 днів, а двоє були здоровими до кінця десяти денного дослідження. Важливо, що жоден із неінокульованих (без щеплення) птахів, яких утримували разом з інфікованими трансгенними курчатами, не загинув від грипу, і жоден не був позитивним на вірусний антиген (рис. 4.45 В).

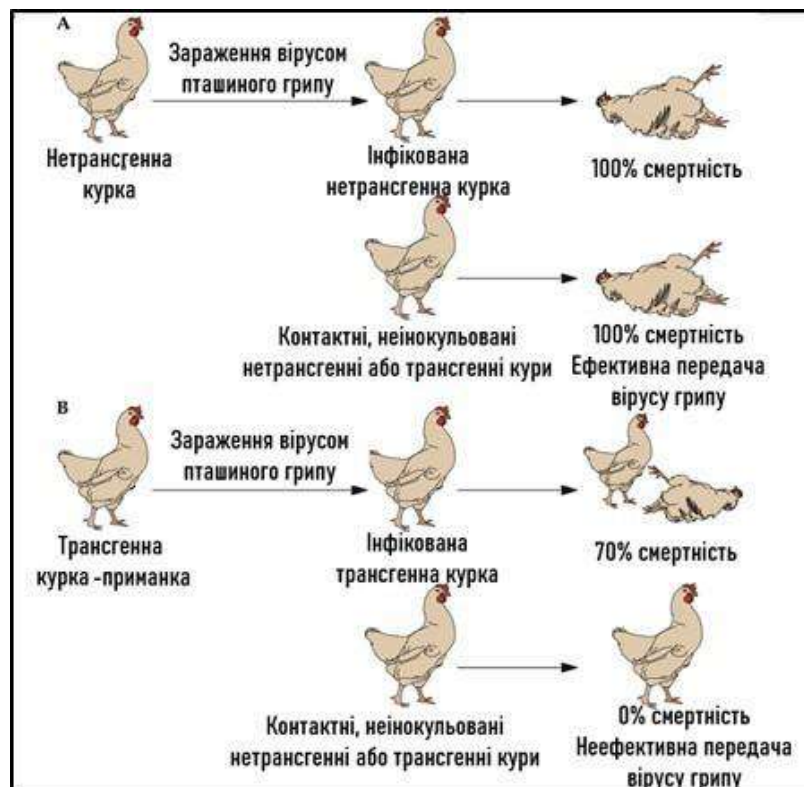


Рис. 4.45. Смертність нетрансгенних та трансгенних курей-приманок після зараження вірусом пташиного грипу. Пояснення в тексті. Адаптовано з [24]

Високий рівень вірусної РНК був присутній у 100 % букальних і 90 % клоакальних зразків від нетрансгенних курей, що вказує на розповсюдження вірусу, порівняно з 50 % буккальних і 20 % клоакальних зразків від трансгенних птахів.

Ці результати підтверджують **неефективну передачу вірусу від трансгенних курей**. Саме **генетична стійкість до грипу** є набагато кращою, ніж імунізація вакцинами, які необхідно вводити досить часто через **високий**

рівень мутаційного процесу вірусу грипу. Більше того, щоб подолати інгібуючий ефект створеної РНК-приманки (введена маленька РНК) та розмножитися в трансгенних курчатах, вірус грипу повинен мутувати як у гені РНК-полімерази, так і в сайтах її зв'язування на всіх восьми хромосомах, що є надзвичайно рідкісною можливістю.

4.6. Трансгенна риба

Через поступове виснаження природних запасів риби виробництво цього світового продовольчого ресурсу все більше залежить від **аквакультури**. У цьому контексті **підвищена швидкість зростання, стійкість до стресу навколишнього середовища та резистентність до хвороб** є деякими з особливостей, які можуть бути створені за допомогою підходів генної інженерії. Донедавна трансгени вводили шляхом **мікроін'єкції або електропорації ДНК в запліднену ікру** ряду видів риб, включно з коропом, сомом, форелью, лососем, арктичним гольцем і тиляпією.

Пронуклеуси риби не видно під мікроскопом після запліднення; тому лінеаризована трансгенна ДНК вноситься шляхом мікроін'єкції в цитоплазму запліднених яйцеклітин, або ембріонів, які досягли 4-клітинної стадії розвитку. На відміну від ембріогенезу ссавців, розвиток ікринок риб відбувається в **зовнішньому середовищі**, отже, не було необхідності в процедурі імплантації.

Розвиток трансгенних риб відбувається в **резервуарах з регульованою температурою**. Рівень виживаності ембріонів риб після мікроін'єкції ДНК є досить високим (від 35 до 80 %), у той час як **ефективність створення трансгенних риб від 10 до 70 %**. Наявність введеного трансгена оцінюють за допомогою ПЛР, використовуючи ДНК, наприклад, з ядерних еритроцитів риб. Далі риб-засновників спаровують для встановлення **чистих племінних трансгенних ліній**.

На сьогодні, розробляються методи, такі як **модифікація сперматогоніальних стовбурових клітин** та **трансплантація**, які здатні зробити революцію в отриманні трансгенних риб. Сперматогенез – це безперервний і динамічний процес розвитку, в якому **одна диплоїдна сперматогоніальна стовбурова клітина (SSC)** проліферує та диференціюється з утворенням зрілого сперматозоїда. Отже, культуру зародкових клітин можна модифікувати за допомогою, наприклад, системи **CRISPR/Cas** для подальшої **передачі зародкової лінії** шляхом трансплантації клітин, перенесення ядер та/або виробництва сперматозоїдів *in vitro* для штучного запліднення (рис. 4.46).

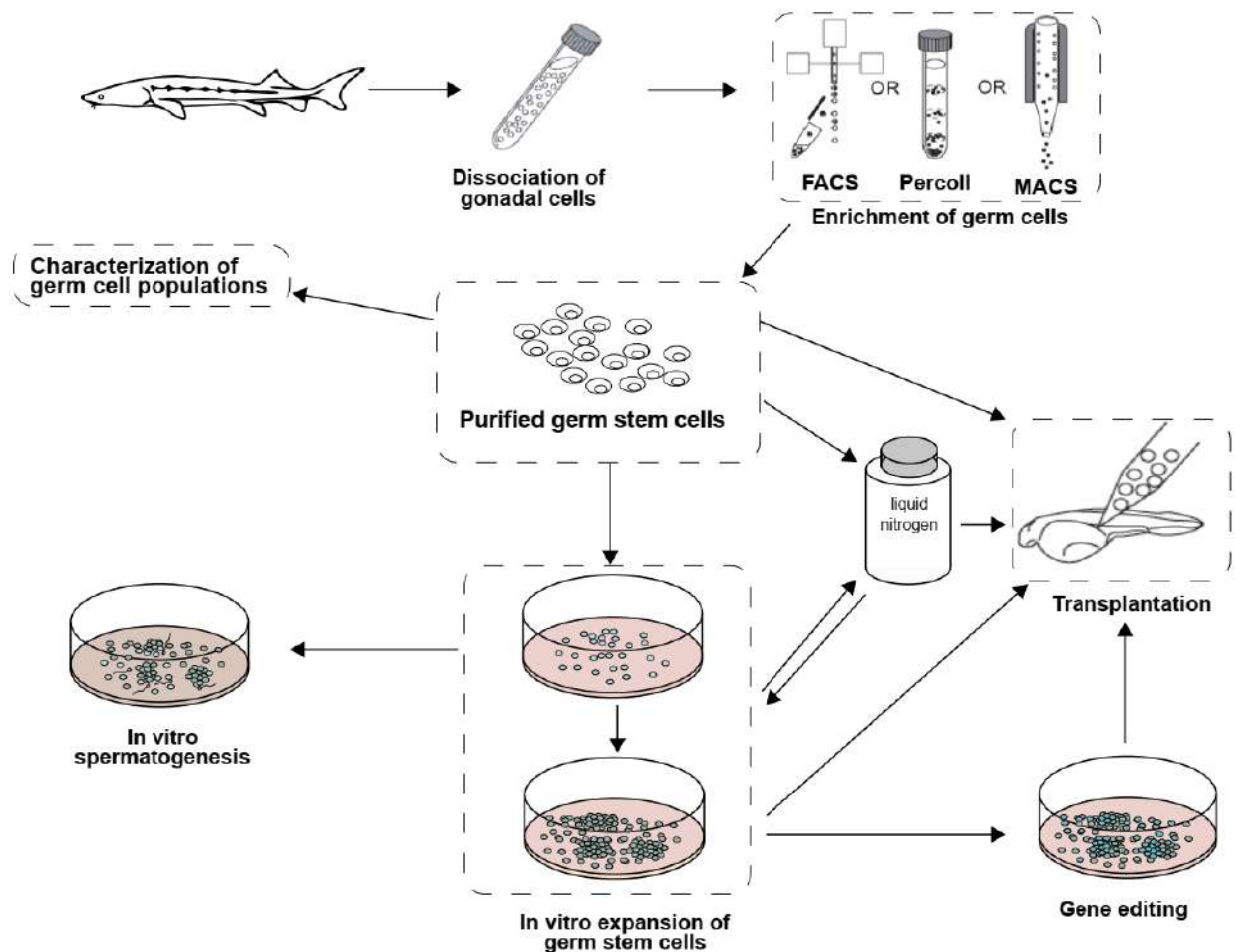


Рис. 4.46. Потенційні галузі застосування виділених та культивованих зародкових клітин. Сім'яники видаляють із тіла риби і дисоціюють, отримуючи суспензію клітин, яку можна сортувати за допомогою сортування клітин, що активується флуоресценцією, або центрифугування в

градієнті густини; наприклад, у розчині Перколла або за допомогою магнітно-активованого сортування клітин. Очищена суспензія зародкових клітин може бути охарактеризована щодо молекулярних характеристик та морфології. Очищені клітини можна ін'єкувати реципієнту для отримання химери зародкової лінії або ампліфікувати в культурі *in vitro*. Культивовані клітини можуть бути використані для редагування генів або піддані кріоконсервації. FACS – сортування клітин, що активується флуоресценцією; MACS – магнітно-активоване сортування клітин. Запозично з [91]

У 2015 році Управління з продовольства і медикаментів США (FDA) схвалила **першу генетично модифіковану тварину для споживання людиною – трансгенний атлантичний лосось (сьомга, *Salmo salar*)– «AquAdvantage», який посилено продукує гормон росту для підвищення швидкості росту (рис. 4.47).**



Рис. 4.47. Трансгенний лосось – «AquAdvantage» в порівнянні з нетрансгенним. Пояснення в тексті. Запозичено з [29]

Для створення «AquAdvantage» було використано **кДНК гормону росту чавичі** (риба роду тихоокеанських лососів, «королівський лосось», Chinook salmon (англ.)). Експресія цього трансгена контролюється **промотором** (рис. 4.48) і **сигналами термінації транскрипції-поліаденілювання з гена антифризного білка (AFP) американської бельдюги** (ocean pout (англ.)).

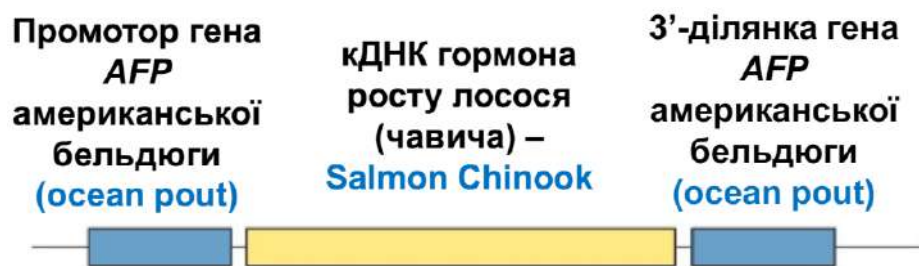


Рис. 4.48. Універсальна конструкція «Все з риби» («All-fish») для посилення росту риби. Пояснення в тексті. Адаптовано з [24]

Таку конструкцію «**Все з риби**» («All-fish») було розроблено (рис. 4.48), щоб усунути занепокоєння щодо можливої біологічної несумісності, яка може виникнути в результаті використання гена гормона росту з нерибних джерел. Систему експресії саме з американської бельдюги було обрано для підвищення транскрипції гормона росту в холодних водах.

Було показано, що молодий ГМ лосось росте швидше, ніж нетрансгенний, досягаючи відповідного розміру за половину часу та використовуючи на 25 % менше корму, що знижує собівартість продукції. Аквакультура з цією трансгенною рибою підтримується в обмежених, наземних об'єктах, щоб запобігти втечі в дику природу. Біологічне стримування розмноження модифікованих лососей досягається шляхом вирощування лише триплоїдних самиць, які не можуть розмножуватися з особинами природних популяцій диплоїдних риб у разі випадкового потрапляння «AquAdvantage» в ареал особин дикого типу.

На додаток до покращення ознак, які сприяють вирощуванню риби для їжі, трансгенез можна використовувати для створення систем моніторингу забруднення водних систем. Така біосенсорна система передбачає використання, наприклад, трансгенної риби медаки (японська оризія, або японська медака, (*Oryzias latipes*) – вид прісноводних риб), для експресії червоного або зеленого флуоресцентного білка під контролем промоторів, що реагують на забруднювачі.

На сьогодні, медака також набуває визнання як модельний організм для вивчення біологічних процесів завдяки своєму невеликому розміру (можна

використовувати невеликі акваріуми), швидкому розвитку, а також **прозорому тілу, що полегшує візуалізацію внутрішніх тканин** та експресію репортерних генів, таких як **флуоресцентні білки**. Трансгенні медаки були розроблені як **біосенсиори** для **виявлення естрогенних сполук** у водному середовищі.

Естрогени є статевими стероїдними гормонами, які стимулюють розвиток і підтримку жіночої репродуктивної системи та вторинних статевих ознак, а також регулюють деякі репродуктивні функції у чоловіків. Синтетичні похідні природних естрогенів використовуються в більшості оральних контрацептивів, як терапія постменопаузних розладів у жінок, для лікування безпліддя та ендометріозу, а також для **створення популяцій риб, що складаються тільки з самок, для біологічної ізоляції в аквакультурі**.

Широкий спектр **промислових хімікатів**, таких як бісфенол А та поліхлоровані бісфеніли (PCBs), які використовуються у виробництві фармацевтичних препаратів, пластмас, фарб, миючих засобів та інсектицидів, також мають **екстрогенну активність і впливають на тварин**.

Отже, велика кількість естрогенних хімічних речовин змивається у водні екосистеми з **побутовими, сільськогосподарськими та промисловими стічними водами**, що може токсично впливати на водні організми. Дійсно, одне дослідження показало, що високий рівень естрогену у стічних водах причетний до фемінізації диких самців риб, що, у свою чергу, може призвести до **масштабного скорочення популяцій риб**.

Щоб розробити трансгенну медаку для моніторингу рівнів природних і синтетичних естрогенів у воді, було створено **конструкцію з клонованим чутливим до естрогену промотором з гена вітелогеніну медаки (p^{vit})**, а також **геном (gfp)**, кодуєчим зелений флуоресцентний білок (рис. 4.49). Потім конструкцію ввели шляхом **мікроін'єкції в цитоплазму запліднених яйцеклітин цієї риби**.

Вітелогеніни, зазвичай, синтезуються у жінок у відповідь на ендогенні естрогени, такі як 17β -естрадіол, а у чоловіків – у відповідь на синтетичні

естрогени. Вплив на трансгенну медаку 17β -естрадіолу та інших природних та синтетичних естрогенних сполук **активує промотор вітелогеніну та синтез зеленого флуоресцентного білка**. Це дозволяє **швидко візуалізувати випромінювання зеленої флуоресценції** при нормальному освітленні у живих риб без додаткових реагентів.

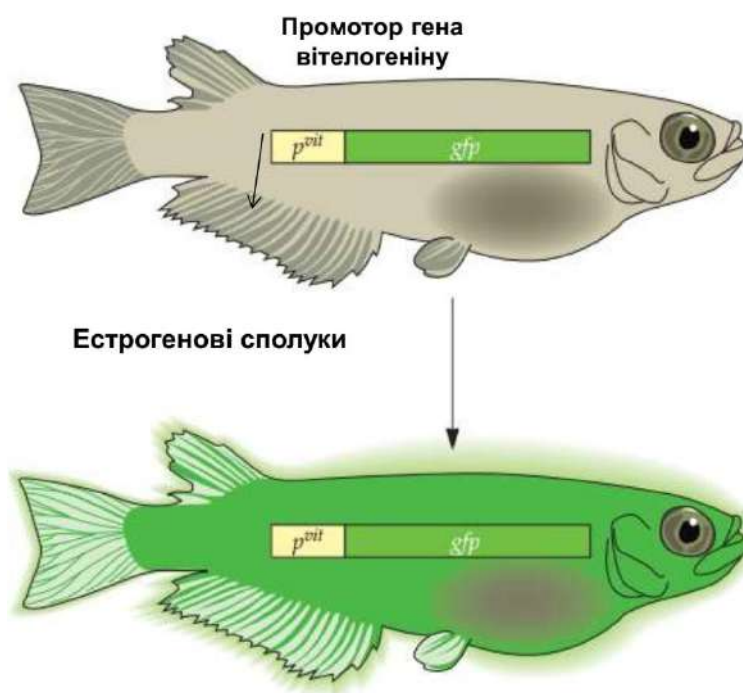


Рис. 4.49. Трансгенна риба-медака як біосенсор забруднення навколишнього середовища. Пояснення в тексті. Адаптовано з [24]

На доданок, зазначену систему можна **модифікувати** за рахунок введення **додаткових промоторів, що реагують на інші токсини** з навколишнього середовища, такі як **важкі метали** тощо, які також будуть індукувати експресію червоних і зелених флуоресцентних білків, **навіть в однієї й тієї ж риби**. Кожен колір вказуватиме на наявність різних забруднюючих речовин.

Підсумки:

Таким чином, на сьогодні, за допомогою вищезазначених стратегій і підходів, генна інженерія застосовується для:

- Створення **трансгенних мишей** (зокрема, нокаутних), які є інформативними **моделями** для дослідження **багатьох захворювань людини**. А також можуть бути використаними як системи для тестування потенційних **методів лікування** людини та тварин. Окрім цього, ГМ миші можуть бути використаними і для **виробництва рекомбінантних терапевтичних білків**;
- На сьогодні, в якості **моделей** для дослідження **патологічних станів людини** можуть бути використані й інші тварини: **свині** (є гарною мішенню, оскільки вони мають подібні розмір тіла, анатомічні особливості, фізіологію, патофізіологічну реакцію та дієту), **примати** (першою метою їх дослідження є хвороба Паркінсона та хворобу Хантінгтона) тощо.
- За допомогою генетичних маніпуляцій можна **покращити поголів'я худоби**: збільшити темпи росту та м'язеву масу; підвищити стійкість до різних захворювань; а також **оптимізувати поживний вміст молока та м'ясних продуктів**. Основним застосуванням трансгенної худоби є її використання в якості **біореактора** для **виробництва білкових фармацевтичних препаратів у молоці**;
- **Трансгенез птахів**, особливо **курей**, можна використовувати для покращення бажаних ознак особин відповідної лінії. Крім того, ГМ курки **секретують розроблені фармацевтичні препарати безпосередньо в свої яйця**;
- Генна інженерія **риб** спрямована, у першу чергу, на **покращення темпів росту та надання стійкості до хвороб**. Крім того, трансгенні риби розглядаються як **біосенсори забруднювачів навколишнього середовища**;
- Розробка та використання **ГМ-комах** як для дослідницьких цілей, так і для генетичної **боротьби із комахами-переносниками хвороб** (створення комарів, стійких до малярії тощо) і **комахами-шкідниками**. Однак, на сьогодні, лишаються невирішеними численні питання на кшталт: «Чи виграють фермери від модифікації комах, щоб зменшити кількість шкідників? Які

питання безпеки та етики пов'язані з випуском генетично модифікованих комах? Як слід регулювати цю нову технологію?»;

- Генна інженерія **амфібій** застосовується для **вивчення ембріонального розвитку** й функціонального значення окремих генів; для **скринінгу** потенційного **впливу шкідливих хімічних речовин**; для дослідження **регенераційної здатності тканин**;
- **Тутовий шовкопряд**, личинкова стадія *Bombyx mori*, є економічно важливою комахою в шовківництві. Вчені розробляють стратегії **підвищення якості та кількості шовку**. Існує також потенціал використання машинерії виробництва шовку для продукування інших цінних білків. Білки, що експресуються тутовими шовкопрядами: людський сироватковий альбумін, α -ланцюг людського колагену, мишаче моноклональне антитіло, N-гліканаза тощо. Були створені шовкопряди, які виробляють **павутинний шовк**, міцніший, але надзвичайно важкий для збирання шовк, і навіть нові види шовку.
- Було розроблено системи для створення й **інших трансгенних організмів**, а саме: **плоскі черви, нематоди, гідри, равлики, gekони, черепахи, раки, устриці, креветки, молюски, губки** тощо для вивчення **хвороб**, еволюції імунітету, експресії генів та окремих процесів розвитку, а також для виявлення забруднювачів навколишнього середовища.

Контрольні запитання:

1. Як створюють трансгенних мишей?
2. Назвіть переваги та недоліки трьох основних підходів для створення трансгенних мишей.
3. Що таке позитивно-негативна селекція? Опишіть її принцип.
4. Що таке нокаутні миші? Як і для чого вони створені?
5. У чому різниця між поняттями: нокін, нокаут, нокдаун?
6. Опишіть, як система рекомбінації CreloxP використовується для регуляції експресії трансгена.

7. Які нуклеази для редагування геному використовуються в трансгенезі тварин?
8. Опишіть, як система CRISPR-Cas використовується для введення трансгену в геном тварини.
9. Опишіть, як система CRISPR-Cas застосовується для руйнування гена в геномі тварини.
10. Обговоріть деякі обмеження системи CRISPR-Cas для модифікації геномів тварин.
11. Опишіть застосування нокаутних мишей. Як створюють назви ліній таких тварин?
12. Як саме та для чого було створено «КсеноМишу»?
13. Як можна викликати загибель специфічних клітин на прикладі трансгенних мишей?
14. Що таке клонування худоби шляхом перенесення ядра? Які переваги та недоліки цього методу отримання трансгенних тварин?
15. Опишіть стратегію використання молочної залози худоби в якості біореактору для виробництва комерційної продукції.
16. Обговоріть, як можна використати трансгенез для покращення трансплантації органів. Зазначте сучасні здобутки генної інженерії в цій галузі.
17. Опишіть стратегію створення трансгенних тварин, захищених від інфекційних захворювань.
18. Як трансгенез худоби може призвести до покращення виробництва молока чи м'яса?
19. Які підходи розроблено для отримання трансгенних курей?
20. Запропонуйте, як саме трансгенез може покращити рибу аквакультуру.
21. Для чого було створено свиней «GalSafe»?
22. Навіщо було розроблено конструкцію «All-fish»?
23. Використання риб як біосенсорів забруднення навколишнього середовища. Опишіть генно-інженерні підходи.

Розділ 5. Медична біотехнологія

5.1. Імунологічна діагностика

Молекулярна діагностика пов'язана з виявленням **специфічних білків, послідовностей НК** або **малих молекул** у людей, тварин, рослин, мікроорганізмів, у води та ґрунті. Наявність конкретної молекули в організмі може бути **симптомом інфекційного** чи **генетичного захворювання**, може допомогти як виявити **особу** чи її **рідство** з іншими особами чи популяціями, так і встановити присутність особи на місці злочину; або може вказати на наявність мікроорганізмів або трансгенів, наприклад, у харчових зразках.

Діагностичний тест повинен мати **високу специфічність** для молекули-мішені (тобто вкрай мало хибнопозитивних результатів), мати **високу чутливість** для виявлення низьких рівнів мішені (тобто вкрай мало хибнонегативних результатів), а також бути досить **швидким і недорогим** для рутинних та, в ідеалі, високо продуктивних аналізів.

Головною метою діагностичного тестування є **виявлення молекулярних біомаркерів захворювання якомога раніше**, перш ніж хвороба починає значно прогресувати, що, відповідно, буде обмежувати ефективність лікування. Клінічно-діагностичні тести також використовуються для **прогнозування сприйнятливості до захворювання** або **відповіді на лікування**, для визначення **прогнозу** захворювання (прогресу та результату) та контролю **ефективності** лікування.

Біомаркер захворювання – це специфічна молекула, яка, як було передбачено, має бути виявленою або виявлена на більш високому або менш високому рівнях у тканині хворого порівняно з тканиною відносно здорової людини. Це може бути **білок**, конкретна послідовність **ДНК** або **РНК**, або невеликий **метаболіт**, який **якісно** або **кількісно** аналізується в **рідинах** організму, таких як кров, сеча, мокрота, гній із рани; або в **тканині**, отриманій

шляхом біопсії. Зразки, які містять малу кількість молекули-мішені, наприклад, **невеликі зразки після голкової біопсії** або **зразки крові** вимагають певної **ампліфікації мішені** для точного виявлення та кількісного визначення. Комплексна неоднорідність клінічних зразків також може представляти складність для молекулярної діагностики. Хоча було виявлено багато різноманітних біомаркерів для виявлення як моногенних розладів, таких як муковісцидоз тощо, так складних мультигенних захворювань, таких як хвороба Альцгеймера тощо, на жаль, на сьогодні, клінічно значущі біомаркери для більшості захворювань людини ще чітко не визначені.

При проведенні лабораторних досліджень часто виникає необхідність визначити наявність або кількісний вміст ряду біологічних компонентів (**гормонів, ферментів, нейропептидів, продуктів імунної системи, антигенів** (відповідь імунної організму хазяїна на дію збудника) тощо). Це завдання може бути вирішено з використанням **методів імунного аналізу**, заснованих на специфічному зв'язуванні **антитіла з антигеном**, при якому до одного з компонентів хімічно приєднана мітка. Оскільки антитіла з високою специфічністю зв'язуються з антигенами, а детекція комплексів антиген-антитіло є доволі простою, отже, відпала необхідність у розробці індивідуальних методів для кожного типу молекул.

Зазначені методи дають можливість ідентифікувати досліджувані сполуки в низьких і **дуже низьких концентраціях (до 5 пкг/мл)**. Залежно від типу використовуваної мітки та способу детекції сигналу імунний аналіз позначається як **імуноферментний (ІФА, ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay (англ.))**, **радіоімунний (RIA)**, **імунофлуоресцентний** тощо.

Найбільш поширеним на сьогодні є ІФА, який використовує в якості мітки фермент. При детекції в результаті реакції з відповідним хромогенним субстратом утворюється забарвлений продукт, **кількість якого можна визначити спектрофотометрично.** Використання ІФА в лабораторній

практиці значно розширилося з появою можливості імобілізації антигену й антитіла на **твердих носіях** із збереженням їх активності до зв'язування.

За стадіями проведення розрізняють **прямий (Direct ELISA)** і **непрямий (Indirect ELISA)** варіанти аналізу (рис. 5.1). У разі **прямого ІФА** використовують антитіла до антигену, який виявляють, з'єднані зі специфічною міткою (кон'югат із біотином або з **репортерним ферментом**, таким як лужна фосфатаза, пероксидаза хрому, β -галактозидаза або уреаза (детекція на рівні пМ)) задля взаємодії з певним субстратом ферментативної реакції.

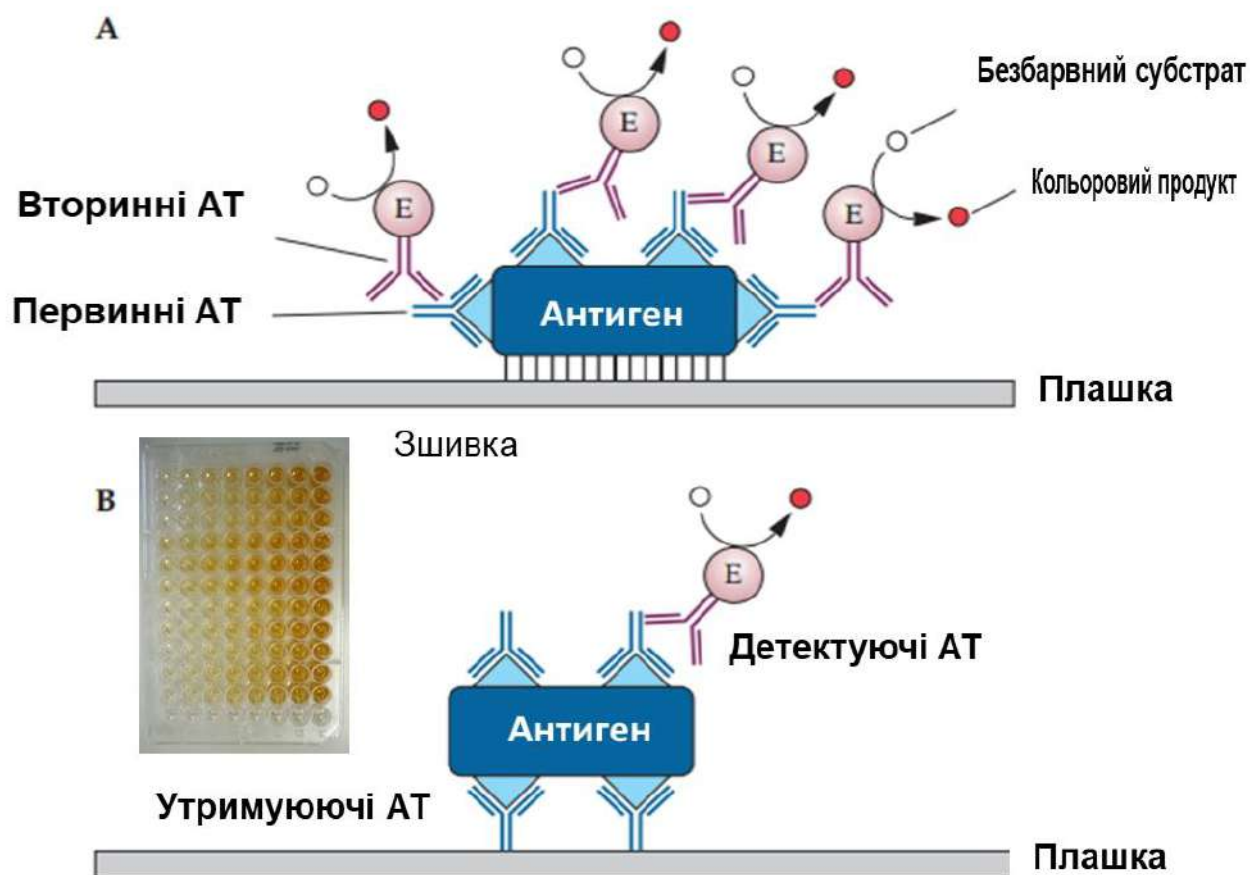


Рис. 5.1. Узагальнена схема методу ІФА: (А) непрямий ІФА; (В) прямий «сендвіч»-ІФА. АТ – антитіла. Пояснення в тексті

У **непрямому** аналізі **2 етапи** (рис. 5.1 А). При проведенні першого етапу використовують немічені антитіла до аналізуємих антигенів, а на другому

етапі додають **антивидові мічені антитіла**. Найчастіше для першого етапу використовуються мишачі, а для другого – козячі антитіла. Вторинні антитіла ампліфікують сигнал.

ІФА «сендвіч»-метод (рис. 5.1 В) є основою для багатьох діагностичних тестів (для моніторингу прогресування та рецидивів пухлин; діагностування аутоімунних захворювань тощо), зокрема домашні тести на вагітність. Так, в одному тесті на вагітність білок хоріонічного гонадотропіну (ХГЧ), що виробляється під час вагітності плацентою, яка розвивається, можна виявити в сечі.

Як зображено на рисунку 5.2: (1) сеча наноситься на один кінець мембрани; (2) сеча проходить крізь мембрану за рахунок капілярної дії, і молекули ХГЧ (hCG) у сечі вагітної жінки зв'язуються з моноклональними антитілами (MAb) анти-ХГЧ (antiHCG); (3) Молекули ХГЧ, зв'язані з моноклональними антитілами, згодом переносяться з потоком сечі та захоплюються іммобілізованими анти-ХГЧ поліклональними антитілами (PAb). Моноклональні антитіла (MAbs) кон'юговані з ферментом, який реагує з молекулами барвника (D), утворюють кольоровий продукт (червону зірку), що свідчить про позитивний результат тесту; (4) контрольна зона на мембрані містить іммобілізовані анти-IgG антитіла (antiIgG), які зв'язуються з вищезазначеними моноклональними антитілами (MAb) незалежно від наявності чи відсутності ХГЧ, і виробляють кольоровий продукт (жовта зірка), що вказує на те, що тестові реагенти функціонують коректно.

Користуючись таким тестом, потрібно пам'ятати, що **його терміни важливі для точності постановки методу**, оскільки білок ХГЧ виробляється лише після імплантації ембріона в стінку матки, що відбувається через 6-12 днів після запліднення, після чого рівень білка продовжує зростати протягом перших 20 тижнів вагітності. **Помилково негативні результати** можуть мати місце, якщо тест проводиться на занадто ранніх термінах вагітності.

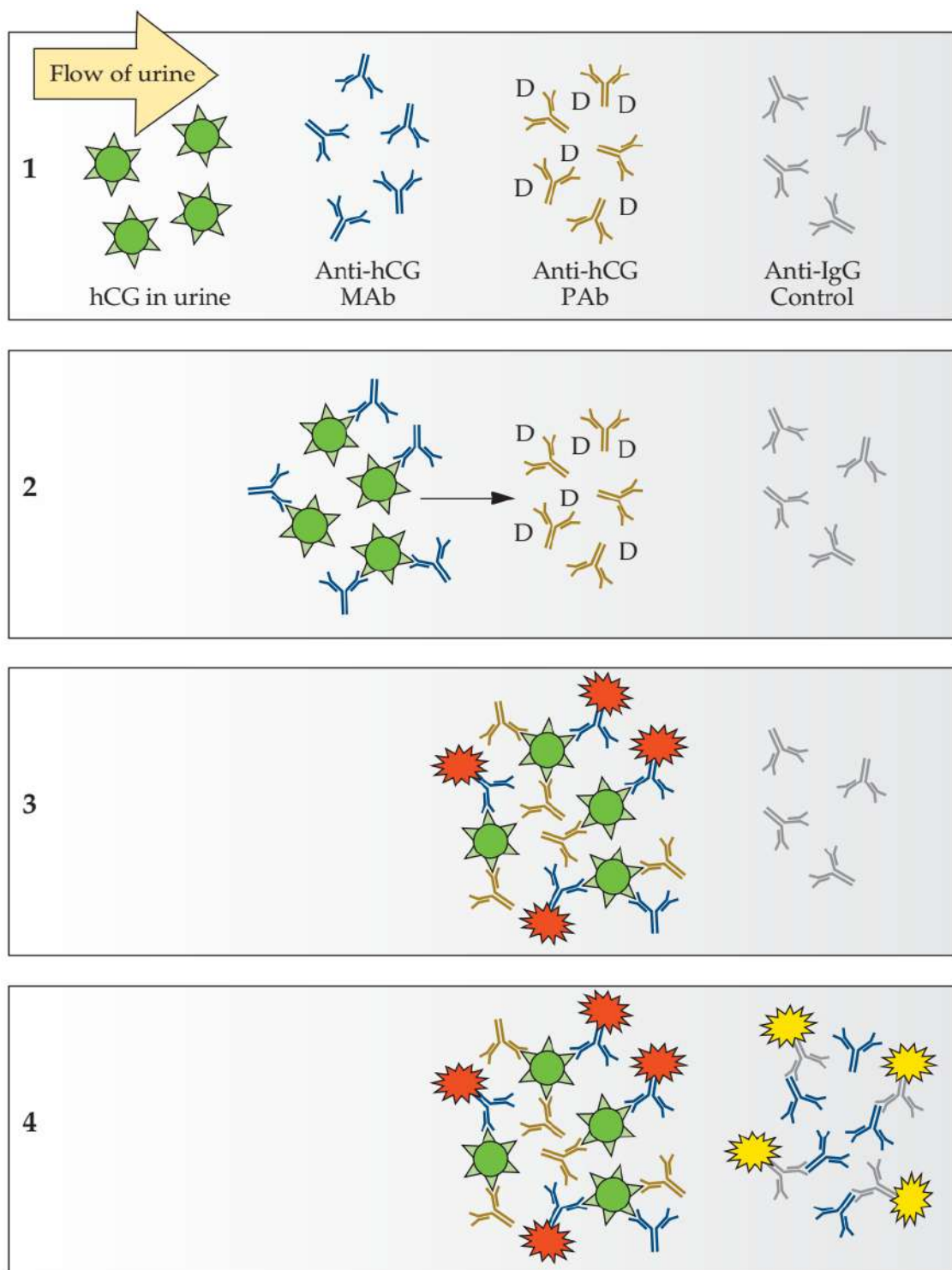


Рис. 5.2. Загальна схема теста на вагітність за допомогою ІФА «сендвіч»-метода. 1-4 – стадії методу. Пояснення в тексті. Запозичено з [24]

За типом хімічної взаємодії на першій фазі аналізу, при зв'язуванні компонента, який визначається, методи імунного аналізу можна розділити на **конкурентні** та **неконкурентні**. У разі використання **неконкурентного** способу в системі присутні тільки аналізований компонент і специфічні

антитіла з відповідними центрами зв'язування. При **конкурентному** варіанті ІФА, наприклад, у системі є **мічений ферментом антиген** (рис. 5.3), який **конкурує** за сайти зв'язування мобілізованих первинних антитіл з **антигеном зразка (неміченим)**.

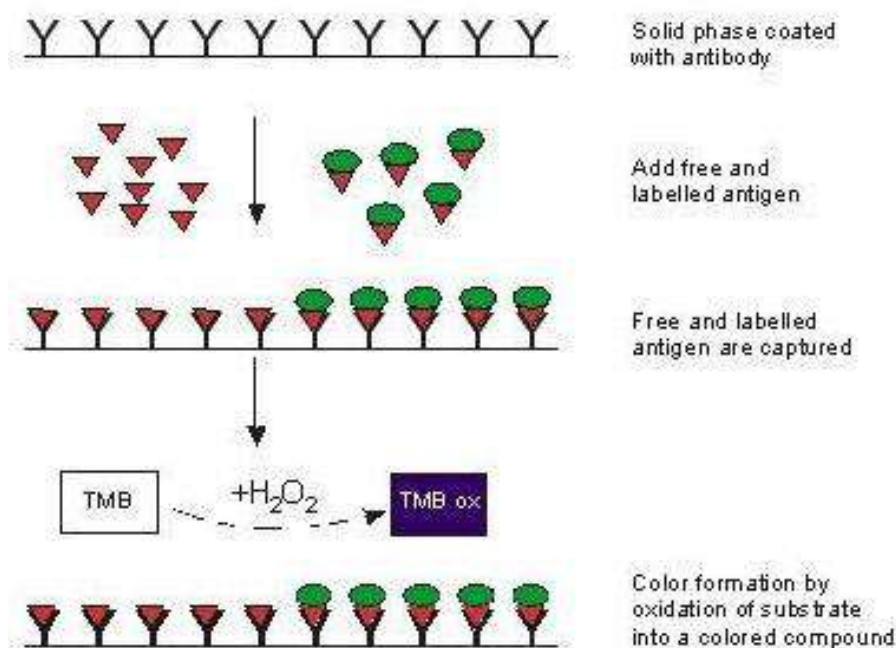


Рис. 5.3. Загальна схема конкурентного варіанта ІФА. Пояснення в тексті. ТМВ – розчин субстрату з тетраметилбензидином; ТМВ ох – окислений тетраметилбензидин. Запозичено з [37]

Отже, **чим більше** буде аналізуємого **антигену в зразку**, тим менше міченого антигену зберігається в лунці і тим **слабший сигнал**. Тому такий ІФА буде мати назву – **конкурентний (інгібуючий) ІФА (Competition/inhibition ELISA, також відомий як blocking ELISA)**.

Антитіла можуть бути **полі- та моноклональними**. Для отримання антитіл до специфічного антигена, очищений розчин цього антигена вводять **тварині** (наприклад, кролик). Потім із цієї антисироватки виділяють суміш антитіл, окремі антитіла якої зв'язуються з різними епітопами (рис. 5.4) введеного антигена – це **поліклональні антитіла**.

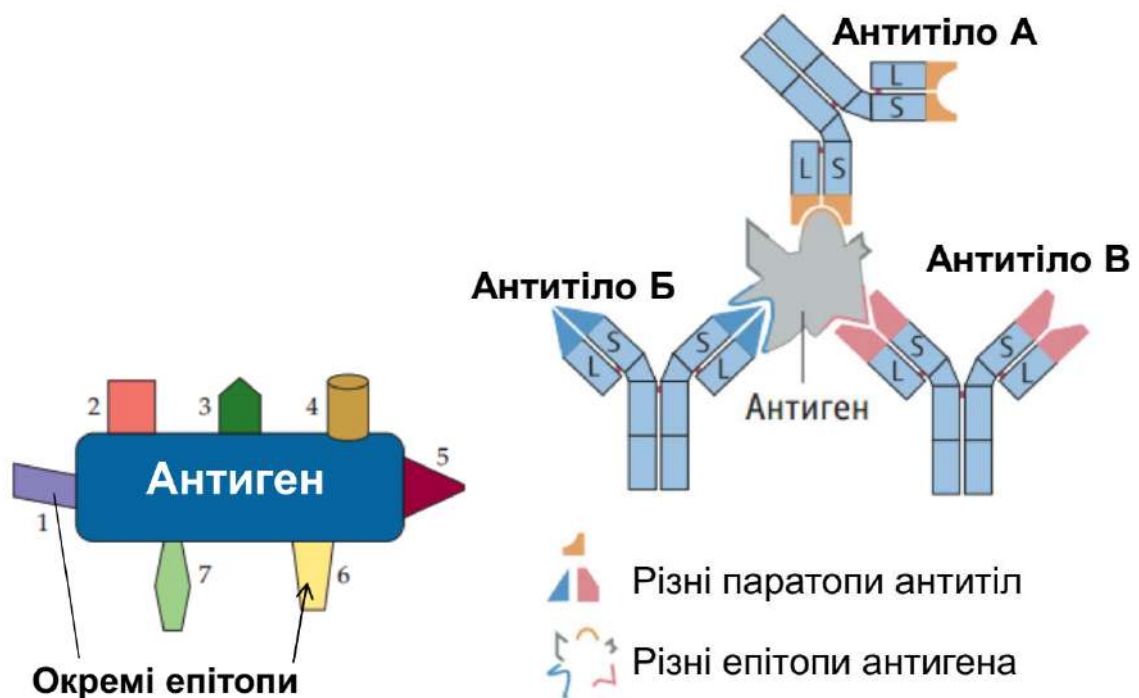


Рис. 5.4. Взаємодія різних епітопів антигена з різними паратопами антитіл. Пояснення в тексті. Адаптовано з [24]

Недоліки поліклональних антитіл:

- 1) Нерівна кількість окремих антитіл у поліклональній суміші;
- 2) Неможливість розрізнити близькі мішені, що відмінні лише 1 епітопом.

Уникнути цих недоліків можна при використанні **моноклональних** антитіл, які **специфічні до одного конкретного епітопу**. Таким чином, розвитку ІФА сприяло створення **моноклональних антитіл**, які **продукуються гібридомою**, отриманої в результаті злиття імунокомпетентної **клітини В-лімфоцита** та **клітини мієломи мишей** (рис. 5.5). Такі клітини зберігають здатність до продукування моноклональних антитіл і росту впродовж багатьох років.

Моноклональні антитіла несуть тільки **одну хімічно однорідну популяцію антитіл**, комплементарну специфічній детермінанті антигену, що дозволяє здійснювати тонку диференціацію білків.

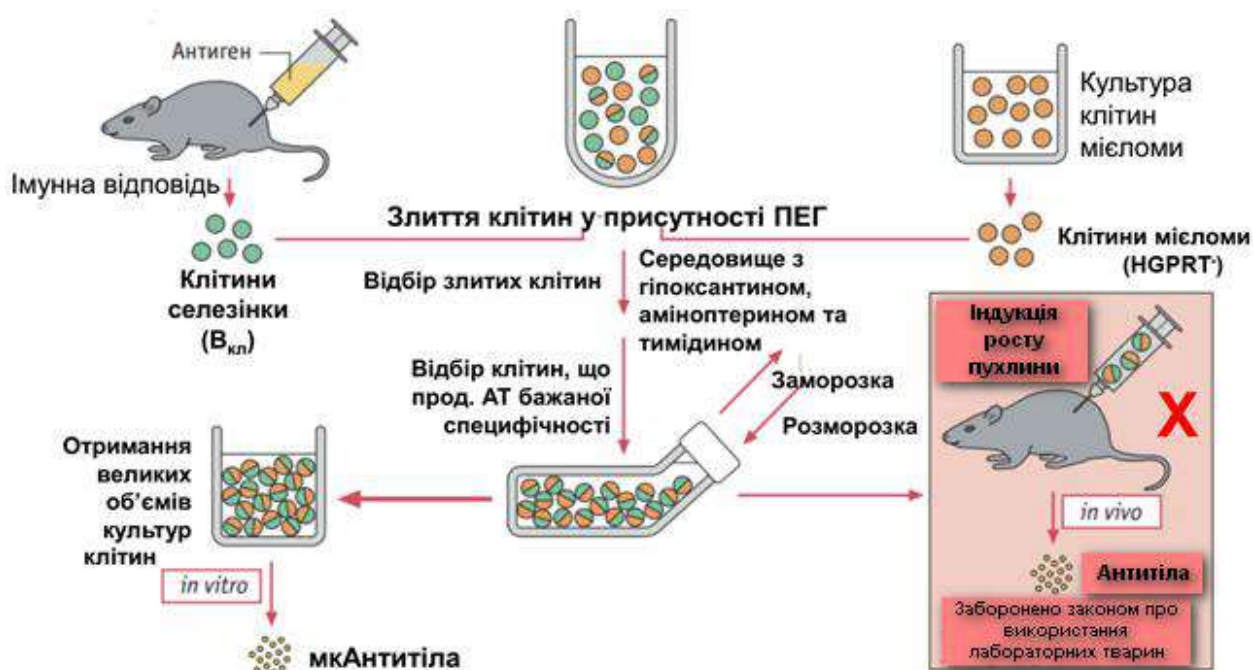


Рис. 5.5. Загальна схема створення моноклональних антитіл.
мкАнтитіла – моноклональні антитіла; $B_{кл}$ – В-лімфоцит (В-клітина); АТ – антитіла; ПЕГ – поліетиленгліколь. Пояснення в тексті. Адаптовано з [77]

На сьогодні, удосконалення імуноферментного аналізу йде як у бік підвищення чистоти антигенів та антитіл, так і в бік розробки **автоматизованих** систем постановки реакцій та їх інструментального аналізу. Також розробляються підходи для створення конформаційно-специфічних антитіл для виявлення, наприклад, агрегованих білків β , якф свідчать про хворобу Альцгеймера тощо.

Білкові набори (мікрочипи) для виявлення полігенних хвороб. ІФА, зазвичай, виявляє **1 цільовий білок**. Проте для деяких діагностичних цілей може бути більш інформативним виявлення та вимірювання **кількох цільових білків в одному зразку**. Аналіз **протеома**, головним чином, використовується в дослідженнях для ідентифікації та кількісної оцінки білкових змін у клітинах або тканинах за різних умов, наприклад, у тканинах хворих порівняно з тканиною відносно здорової людини, і корисний для діагностики **полігенних захворювань**, таких як рак молочної залози, хвороба Альцгеймера, діабет I типу та серцево-судинні захворювання.

Білкові **мікрочипи** – це мультиплексні імуноаналізи, які можуть виявити кілька біомаркерів в одному клінічному зразку. Біомаркери можуть бути певними детермінантами білків у складних клінічних зразках, таких як біопсія пухлинної тканини. На сьогодні, комерційно доступні білкові мікрочипи найчастіше використовуються для виявлення антитіл у сироватці крові пацієнтів, які страждають на алергію, аутоімунні або інфекції захворювання.

Наприклад, як показано на рисунку 5.6: очищені алергени наносять на тверду підложку і додають сироватку хворого на алергію пацієнта. Специфічний IgE, присутній у сироватці крові, буде зв'язуватися з певним імобілізованим алергеном і буде детектуватися за допомогою людських анти-IgE антитіл, кон'югованих із флуоресцентним барвником. Так само будуть виявлені й декілька різних IgE у зразку.

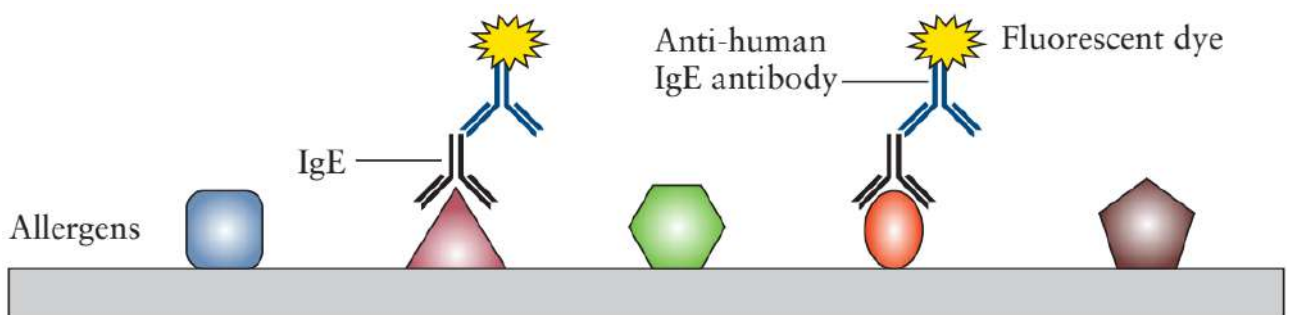


Рис. 5.6. Загальний принцип мікрочипа для діагностики алергенів.
Пояснення в тексті. Запозичено з [24]

На доданок, варто згадати про молекулярну діагностику «**ImmunoCAP**» на основі методики «**UniCAP**» (на базі автоматизованого імунологічного аналізатора «**ImmunoCAP250**», «**Phadia AB**») задля серологічної діагностики й диференціювання механізму алергічної реакції (IgE-опосередкований або не IgE-опосередкований). Ця діагностика здійснюється за допомогою *in vitro* тесту на виявлення імуноглобулінів класу E, специфічних для конкретних алергенів: не тільки мажорних алергенів, але й **паналергенів** (перехресно-реагуючих (мінорних) алергенів), що, як наслідок, багаторазово підвищує точність алергологічної діагностики. Зазначена методика використовує

імунофлуоресцентний метод детектування, а також спеціально розроблену матрицю на основі спіненого матеріалу для взаємодії антиген-антитело, що забезпечує можливість виявлення занадто низьких концентрацій IgE-антитіл та інших показників у надто малій кількості крові пацієнта. Точність визначення рівня антитіл таким чином складає 0,01кЕ/л (кЕ – кілоодиниця).

5.2. Біофлуоресцентні та біolumінесцентні системи детекції

5.2.1. Флуоресцентні білки

Білки, які природним чином флуоресціюють або люмінесціюють, або такі, флуоресценцію яких легко індукувати, можуть використовуватися в якості біологічних **репортерів** за допомогою різних підходів. Наприклад, гени, що кодують ці білки-біорепо́ртери, можна використовувати для інженерії клітин, щоб виробляти вимірюваний сигнал у відповідь на конкретний хімічний або фізичний агент в їхньому середовищі.

В одній із версій цієї системи ген флуоресцентного або люмінесцентного білка може бути поміщений під контроль **промотора, який реагує на певні сигнали навколишнього середовища**, так що при активації промотора генерується **флуоресцентний** або люмінесцентний сигнал (рис. 5.7).

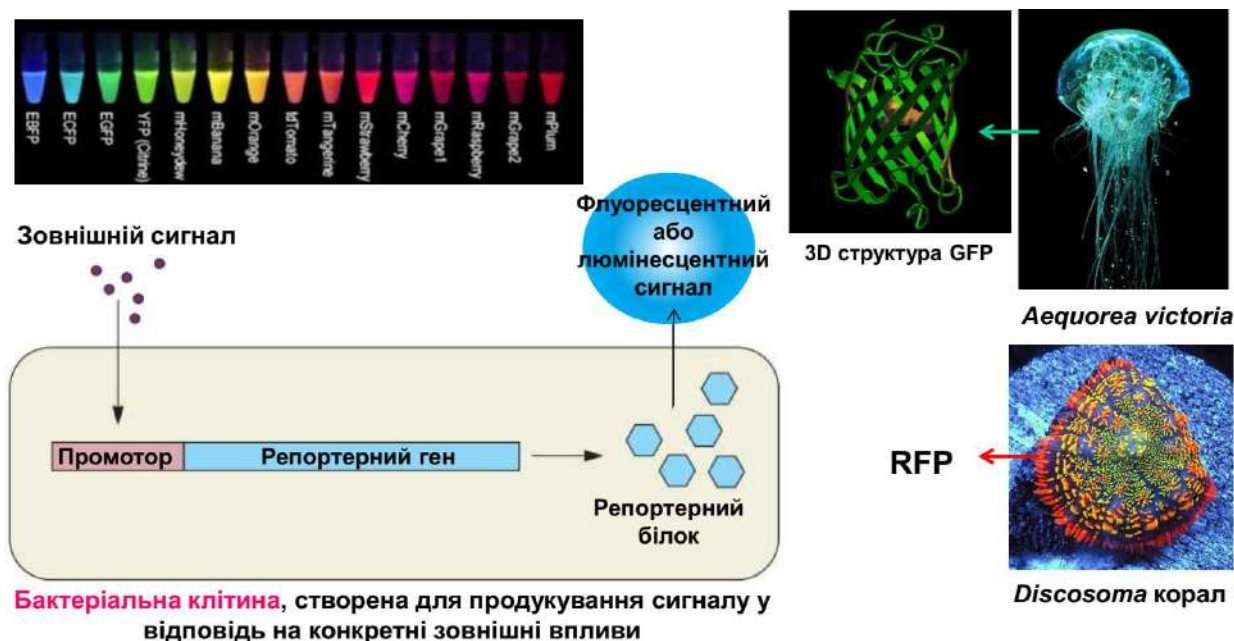


Рис. 5.7. Загальна схема використання біофлуоресцентних та біолюмінесцентних систем детекції сигналу. GFP – зелений флуоресцентний білок; RFP – червоний флуоресцентний білок. Пояснення в тексті. Адаптовано з [24]

Зелений флуоресцентний білок – GFP. Цей фотопротеїн зеленого кольору – це флуоресцентний білок довжиною 238 амінокислот, виділений із медузи *Aequorea victoria*, який флуоресціює зеленим кольором при дії синього світла (380-500 нм) чи ультрафіолету: 100 до 400 нм (рис. 5.7). Хоча багато флуоресцентних барвників є фототоксичними, введення зеленого флуоресцентного білка в клітини дозволяє **спостерігати за неушкодженими живими клітинами в режимі реального часу**. Використання цієї молекули-репортера революціонізувало **флуоресцентну мікроскопію**. Серед багатьох його застосувань дослідники використовували зелений флуоресцентний білок для **моніторингу пухлинних клітин** у протоколах генної терапії, для оцінювання реакцій певних типів клітин на різні терапевтичні препарати та методи лікування, для моніторингу білок-білкових взаємодій при терапії.

Червоний флуоресцентний білок – RFP. Після відкриття та подальшого успішного використання зеленого флуоресцентного білка вчені почали шукати як у природі, так і шляхом **спрямованого мутагенезу**, інші кольорові

флуоресцентні білки. Наявність кількох кольорових флуоресцентних білків дозволило **б одночасно контролювати кілька біологічних процесів**. Для практичного використання цих білків важливо, щоб вони були як максимально стабільними, так і якомога яскравішими.

Однією з **проблем** багатьох природних кольорових флуоресцентних білків є те, що вони часто мають тенденцію утворювати **гомодимери або гомотетрамери**. Такі мультимерні структури можуть негативно впливати на субклітинну локалізацію білків, що потенційно може призвести до **внутрішньоклітинної агрегації** та інших артефактів.

Одна група дослідників виділила ген червоного флуоресцентного білка з коралів *Discosoma* (рис. 5.7) і за допомогою множинних випадкових мутацій генерувала мутантну форму, яка існувала виключно як **мономер**. З кожним ітеративним циклом випадкового мутагенезу відбирали білки, які давали червону флуоресценцію, яка була одночасно яскравою та стабільною. Для виробництва мономерного червоного флуоресцентного білка потрібно було ввести 33 мутації. Незважаючи на цей успіх, мономерний червоний флуоресцентний білок мав кілька **недоліків** у порівнянні з нативною тетрамерною формою білка, включно зі **зниженою яскравістю** та **зменшеною фотостабільністю**.

Для вирішення деяких вищезазначених проблем із мономерним червоним флуоресцентним білком, а також для **розширення репертуару доступних флуоресцентних білків** були проведені додаткові раунди мутагенезу. Спочатку до гена червоного флуоресцентного білка додали ДНК, що кодує 7 амінокислот із N кінця зеленого флуоресцентного білка (рис. 5.8).

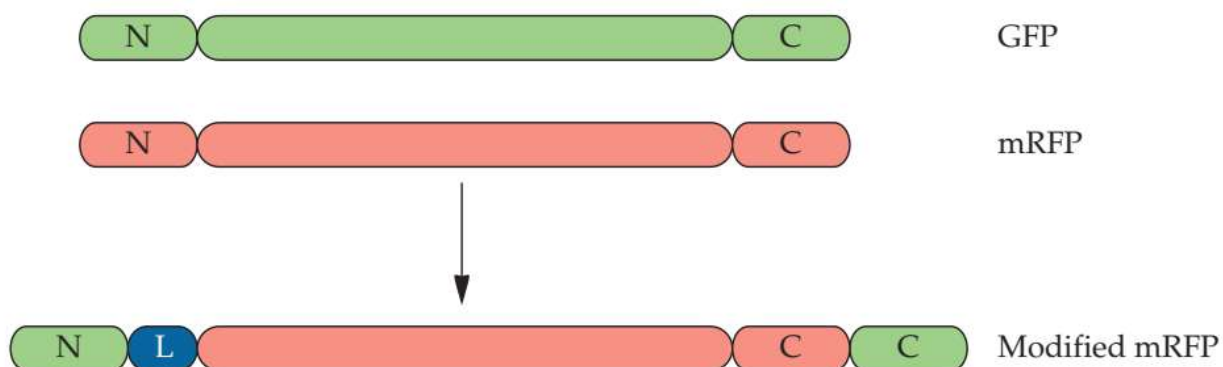


Рис. 5.8. Побудова модифікованого мономерного червоного флуоресцентного білка (модифікований mRFP). Области гена, що кодують N і C кінці зеленого флуоресцентного білка (GFP), були сплайсовані на ген mRFP після видалення частини гена mRFP, що кодує N кінець, і додавання олігонуклеотиду, який кодує короткий лінкер-пептид (L). Запозичено з [24]

Потім до гена червоного флуоресцентного білка додали ДНК для 6 амінокислот із кінця зеленого флуоресцентного білка. Потім ця конструкція стала відправною точкою для кількох додаткових раундів випадкового мутагенезу та спрямованої еволюції. Зрештою було утворено 7 різних мономерних флуоресцентних білків (рис. 5.9).

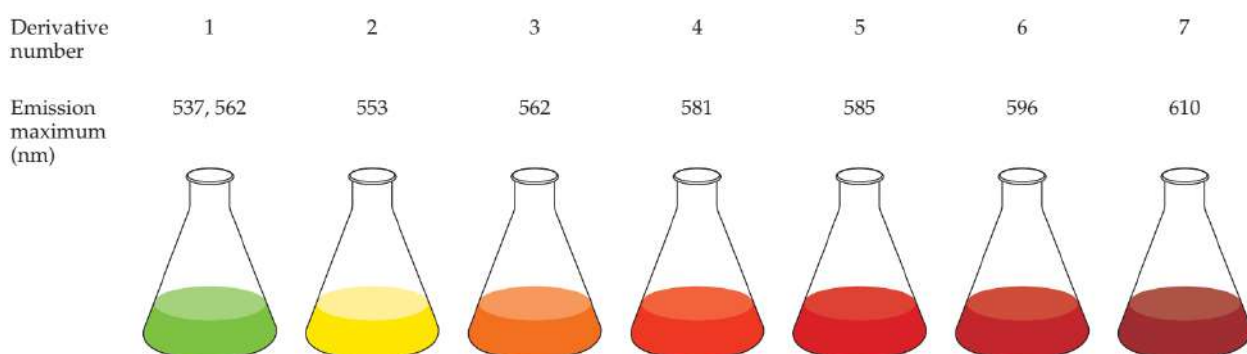


Рис. 5.9. Різнокольорові мономерні флуоресцентні білки, отримані з мономерного червоного флуоресцентного білка. Кольори були названі, від похідної 1 до сьомої: медова роса, банан, апельсин, помідор, мандарин, полуниця та вишня відповідно. Emission maximum (nm) – максимальна довжина хвилі випромінювання в нм. Запозичено з [24]

Проте, було виявлено, що жодний із них не мав найкращих якостей кольорового флуоресцентного білка. Деякі з них були яскравіші за інші, деякі більш фотостабільні, а інші більш чутливі до зміни рН.

Таким чином, було виявлено, що різні флуоресцентні білки можуть використовуватися для різних застосувань. Більше того, використовуючи 2-3 із цих білків, можна помітити кілька різних клітинних компонентів або типів клітин одночасно, тим самим збільшуючи корисність цього підходу.

На сьогоднішній день, отримано різноманітні нові форми флуоресцентних білків за допомогою відповідних раундів мутагенезу (рис. 5.10).

Protein	Reference	Excitation, nm	Emission, nm	Brightness, % of eGFP	Protein	Reference	Excitation, nm	Emission, nm	Brightness, % of eGFP
Sirius	Tomosugi et al., Nat. Methods, 2009	355	424	12	YPet	Nguyen et al., Nat. Biotechnol., 2005, 23, 355	517	530	238
eBFP2	Ai et al., Biochemistry, 2007, 46, 5904	383	445	60	mKO	Karasawa, S., et al., Biochem J, 2004, 381, 307-312 www.mblintl.com	548	559	92
Azurite	Mena et al., Nat. Biotechnol., 2006, 24, 1569	383	448	43	mOrange	Shaner et al., Nat. Biotechnol., 2004, 22, 1524	548	562	146
TagBFP	Subach et al., Chem. Biol. 2008, 15, 1116-1124. www.evrogen.com	400	456	99	mKOk	Tsutsui H, et al., Nat. Methods 2008, 5, 683-685	551	563	190
mTurquoise	Goedhart et al., Nat. Methods, 2010, 7, 137-139	434	474	75	dTomato (dimer)	Shaner et al., Nat. Biotechnol., 2004, 22, 1524	554	581	142
Cerulean	Rizzo et al., Nat. Biotechnol., 2004, 22, 445	433	475	79	TagRFP	Merzlyak et al., Nat. Methods, 2007, 4, 555 www.evrogen.com	555	584	146
eCFP	www.clontech.com	439	476	39	mStrawberry	Shaner et al., Nat. Biotechnol., 2004, 22, 1524	574	596	78
CyPet	Nguyen et al., Nat. Biotechnol., 2005, 23, 355	433	477	53	LSS-mKate2	Piatkevich et al., PNAS, 2010, in press.	460	605	16
mTFP1 (dimer)	Ai et al., Biochem. J., 2006, 400, 531	462	492	158	mCherry	Shaner et al., Nat. Biotechnol., 2004, 22, 1524	587	610	47
TagGFP2	www.evrogen.com	482	505	100	mKeima	Kogure et al., Nat. Biotechnol., 2006, 24, 577	440	620	12
eGFP	www.clontech.com	484	507	100	mKate2	Shcherbo et al., Nat. Methods, 2007, 4, 741 www.evrogen.com	588	635	74
Emerald	Cubitt et al., Methods Cell. Biol., 1999, 58, 19	487	509	116	E2-Crimson (tetramer)	Strack et al., Biochemistry, 2009, 48, 8279	611	646	86
Superfolder GFP	Pedelacq et al., Nat. Biotechnol., 2006, 24, 79-88	485	510	160	eqFP650 (dimer)	Shcherbo et al., Nat. Methods, 2010	592	650	46
T-Sapphire	Zapata-Hommer et al., BMC Biotechnol., 2003, 3, 5	399	511	78	mNeptune	Lin et al., Chem. Biol., 2009, 16, 1169	600	650	40
eYFP	www.clontech.com	514	527	151	TagRFP657	Morozova et al., Biophys J, 2010, 99, L13-L15	611	657	10
Venus	Nagai et al., Nat. Biotechnol., 2002, 20, 87	515	528	156	eqFP670 (dimer)	Shcherbo et al., Nat. Methods, 2010	605	670	12
mCitrine	Griesbeck et al., J. Biol. Chem., 2001, 276, 29188	516	529	174					

Рис. 5.10. Властивості найбільш вживаних флуоресцентних білків, які отримують шляхом мутагенезу. Excitation, nm – довжина хвилі збудження у нм; Emission, nm – довжина хвилі випромінювання в нм; Brightness, % of eGFP (enhanced GFP) – яскравість як відсоток яскравості посиленого зеленого флуоресцентного білка. Запозичено з [44]

5.2.2. Люциферазна система детекції

Люцифераза – це ензим, що каталізує реакцію, спряжену з **утворенням світла** (490 нм / 550-575 нм). Не потребує опромінення. Походить із різних таксонів: **бактерії, водорості, гриби, медузи, комахи, молюски** тощо (рис. 5.11).

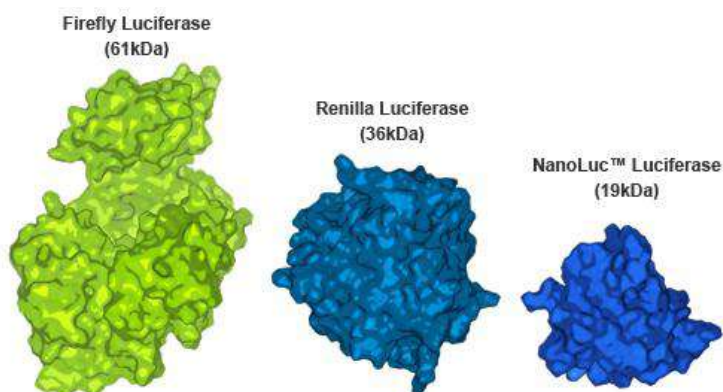


Рис. 5.11. Люциферази світлячка (*Photinus pyralis*, Firefly (англ.), коралового поліпа (*Renilla reniformis*), рекомбінантна люцифераза – «NanoLuc™». kDa – кілодальтон. Запозичено з [27]

Білки системи кодуються у **бактерій** генами *luxCDABE*, у **комах** – генами *luc*. Як правило, використовується в спряженні з еукаріотичними клітинами.

У деяких підходах усі 5 генів *lux* використовуються як засіб контролю присутності різних **сполук у навколишньому середовищі**, таких як **органічні сполуки**: фенол, саліцилат, бензол, трихлоретилен, аміак, ксилол, толуол та етилбензен; або **метали**: кобальт, мідь, залізо, свинець, ртуть, нікель та цинк. Коли використовуються всі **5 генів**, світлоутворююча система **не вимагає додавання будь-яких інших сполук**. Отже, після додавання зразка, що містить забруднювач, до бактеріальних клітин, які несуть *luxCDABE*, упродовж певного часу: від кількох хв до не більше ніж кількох год генерується біolumінесцентний сигнал, який можна визначити **кількісно**.

Хімічна реакція, що каталізується люциферазою є **двостадійною**:

- 1) **Люциферин** + АТФ → люциферил-аденілат + ФФ_н
- 2) Люциферил-аденілат + O₂ → оксилюциферин + АМФ + **світло**

Нещодавно було розроблено люциферазу «**NanoLuc™**» (рис. 5.11). Це невеликий (19 кДа), високостійкий, незалежний від АТФ біоломінесцентний білок, який являє собою надзвичайно **надійну, чутливу та багатофункціональну систему**, наприклад, для скринінгу терапевтичних антитіл із високою пропускнуою здатністю. При застосуванні «**NanoLuc™**» використовують новий субстрат, **фуримазин**, за рахунок чого генерується яскравіше світіння.

На рис. 5.12 наведено приклад одного з люциферазних репортерних векторів – **pTL-Luc**.

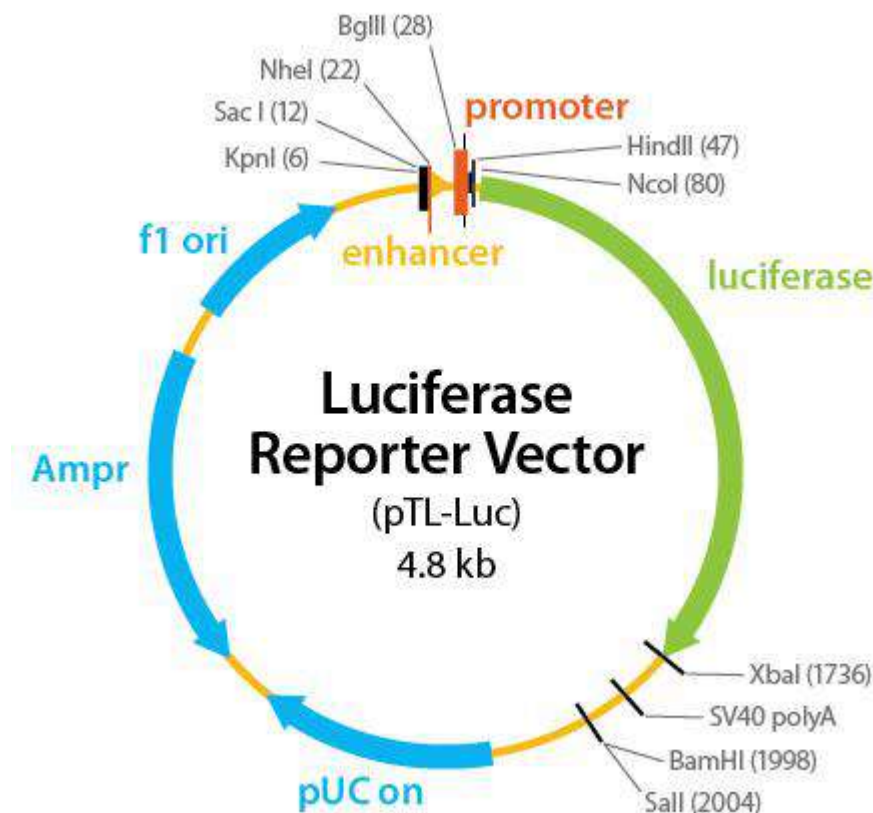


Рис. 5.12. Приклад люциферазного репортерного вектора – pTL-Luc.
Пояснення в тексті. Запозичено з [28]

Як можна побачити на рисунку, зеленим кольором на ньому позначено заклонований ген люциферази. У своїй основі вектор також містить ген стійкості до ампіциліну, ориджин реплікації та *f1* ориджин для утворення одноланцюгової ДНК.

За допомогою такого вектора-репортера можна контролювати та навіть **кількісно** визначати зв'язувальну активність факторів транскрипції. Кожен такий вектор перед мінімальним *TA* промотором містить численні копії цис-діючого елемента зв'язування ДНК (енхансера) з промотора тімідинкінази вірусу простого герпеса, які розпізнаються певним фактором транскрипції. Зв'язування на цій ділянці призводить до експресії люциферази світлячка (ген *luc*) і, відповідно, – потужної біоломінесцентної реакції. Світло, що випромінюється в результаті хімічної реакції, можна **кількісно виміряти за допомогою люмінометра або сцинтиляційного лічильника**. Кількість світла прямо пропорційна кількості синтезованого ферменту і, отже, зв'язувальній активності цільового фактора транскрипції.

Окрім цього, як уже було зазначено вище, бактеріальні клітини, які несуть *luxCDABE* гени, можуть бути використаними в якості **мікробних біосенсорів**. Бактерії, які є **конститутивно біоломінесцентними** (тобто, на відміну від ситуації, згаданої вище, біоломінесценція не повинна бути індукована) є гарними кандидатами на **детектори забруднюючих речовин**.

У присутності забруднювачів **біоломінесценція зменшується**, що чітко вказує на наявність забруднюючих речовин. Природно біоломінесцентні бактерії, такі як морські бактерії *Vibrio fischeri*, потребують сольових умов та певного діапазону рН, і тому вони не є інформативними для тестування наземних ґрунтових вод. Однак структурні гени *luxCDABE* можуть бути вбудовані у випадкові ділянки хромосомної ДНК ґрунтової бактерії, такої як *Pseudomonas fluorescens*. Ці гени не містять транскрипційного промотора, тому після вставки в хромосомну ДНК *P. fluorescens* єдиними люмінесцентними колоніями (візуалізованими в темній кімнаті) є ті, в яких

гени *lux* вставлено нижче за конститутивним промотором *P. fluorescens* (без руйнування будь-яких важливих бактеріальних генів).

Клітини, які найбільше люмінесцирують і мають швидкість росту, подібну до швидкості росту штаму дикого типу, відбирають для тестування з різними забруднювачами навколишнього середовища. Для скринінгу зразків води на наявність різних забруднюючих речовин (як металів, так і органічних сполук) суспензію біоломінесцентного *P. fluorescens* змішують із досліджуваним розчином, і після 15-хвилинної інкубації вимірюють люмінесценцію суспензії в люмінометрі (рис. 5.13).

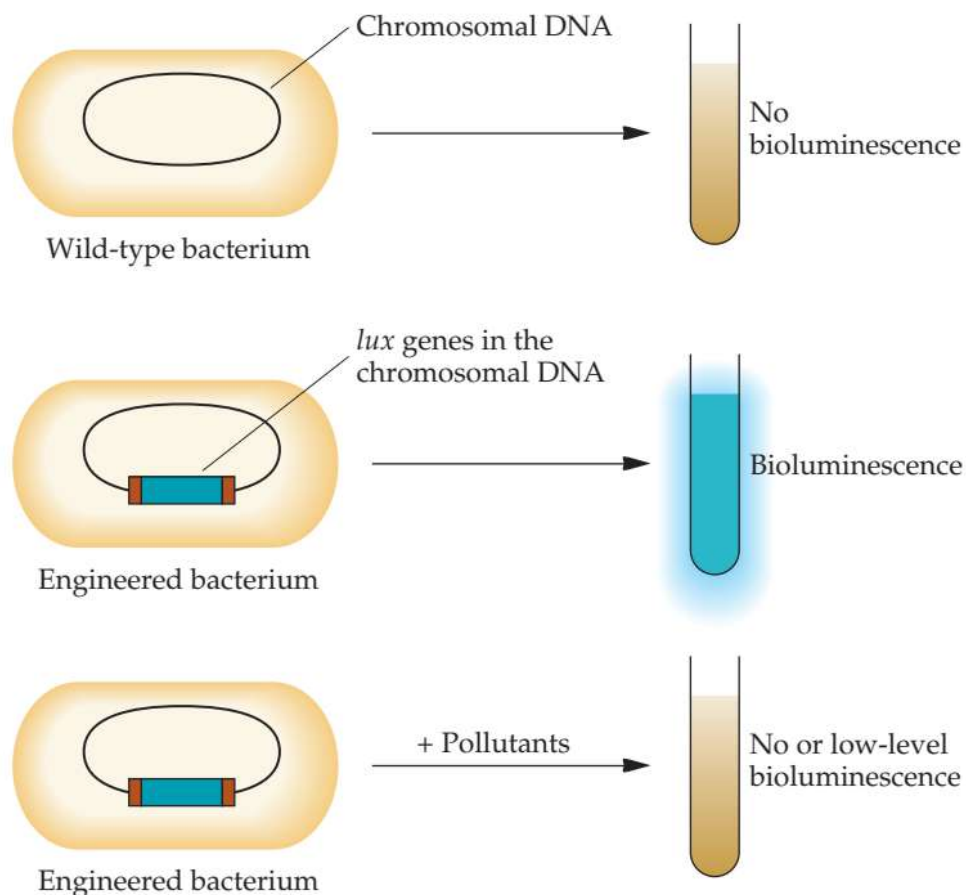


Рис. 5.13. Визначення наявності забруднювачів із генетично модифікованим біоломінесцентним *P. fluorescens*. Пояснення в тексті. Запозичено з [24]

Коли досліджуваний зразок містить **низький** та **середній** рівень певних забруднювачів, **люмінесценція клітин пригнічується**, імовірно, тому, що

забруднювач безпосередньо впливає на бактеріальний метаболізм. Оскільки ця процедура є швидкою, простою та недорогою, вона є **інформативним скринінговим підходом** для оцінювання наявності забруднення на певній ділянці. Після отримання позитивного результату за допомогою бактеріального біосенсора більш детальну інформацію про забруднювачі можна визначити іншими методами.

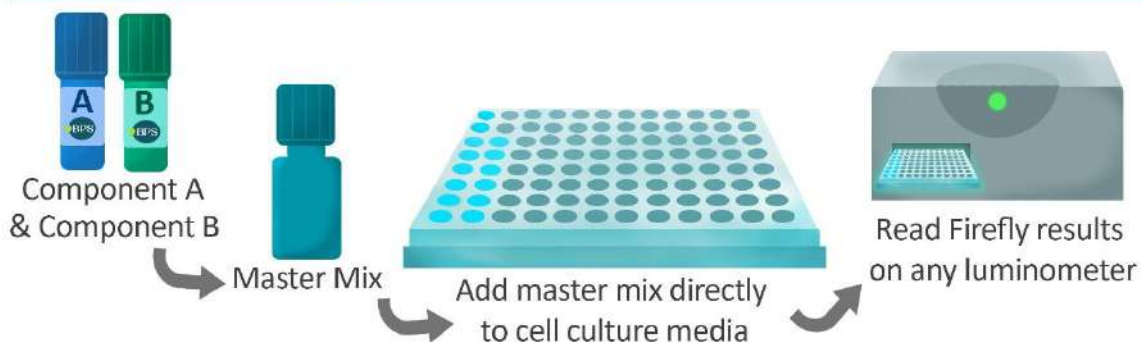
Окрім оцінювання рівнів забруднювачів, на сьогодні створено різноманітні **люциферазні репортерні набори для неінвазивного маркування генів у живих організмах** (адже D-люциферин може добре проникати всередину клітин і тканини, і він є дуже стійким), зокрема, в режимі **реального часу («Real-Time Luciferase Reporter Assay»)**; для аналізу **рівня експресії генів** та життєздатності клітин; для оцінювання кількості АТФ або внутрішнього кальцію в клітинах; аналізу структур промоторів; для вивчення клітинних сигнальних шляхів та різних видів РНК.

Наприклад, **подвійний люциферазний репортерний аналіз («Dual-Luciferase Reporter assay»)** використовує репортер внутрішнього контролю для підвищення експериментальної точності та мінімізації внутрішньої експериментальної мінливості у різних експериментах (аналіз життєздатності трансфікованих клітин, ефективності трансфекції тощо). У більшості експериментів на культурі клітин ссавців **люцифераза світлячків (Firefly)** використовується як **експериментальний репортер**, а люцифераза з **коралового поліпа *Renilla*** використовується як **внутрішній контроль**.

Так, **люциферазний реагент Firefly** спочатку додається до клітин безпосередньо в середовищі. Цей реагент лізує клітини та містить субстрат люциферази світлячка для генерування люмінесценції цією люциферазою. Далі в ту ж саму лунку додають **реагент люциферази коралового поліпа** (рис. 5.14).

Dual Luciferase (Firefly-Renilla) Assay System

Firefly Luciferase Signal



Renilla Luciferase Signal

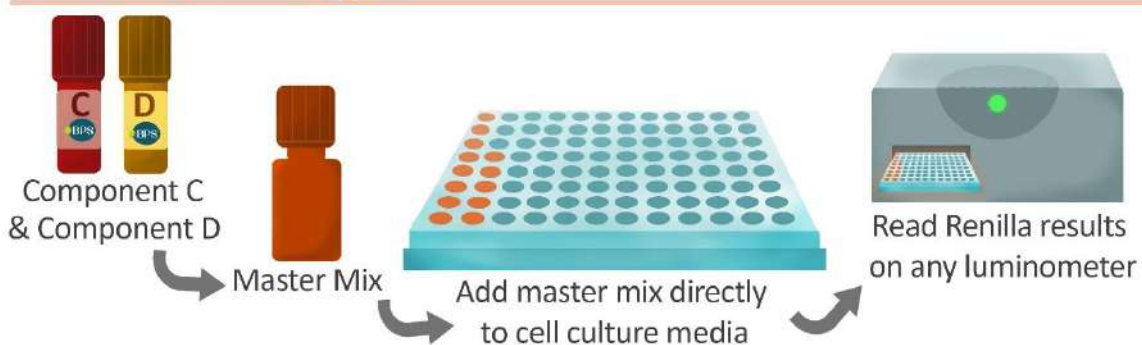


Рис. 5.14. Подвійна люциферазна репортерна система аналізу.
Пояснення в тексті. Запозичено з [26]

Він гасить люмінесценцію люцифери світлячка та надає субстрат (целентеразин – люциферин риб тощо) для люцифери коралового поліпа для генерування люмінесценції, але тепер уже люциферазою коралового поліпа (рис. 5.15).

Вищезазначений підхід є корисним при скринінгу високопродуктивних біоактивних сполук за рахунок надзвичайно **високої чутливості (від 10 до 1000 разів більша ніж у GFP)**.

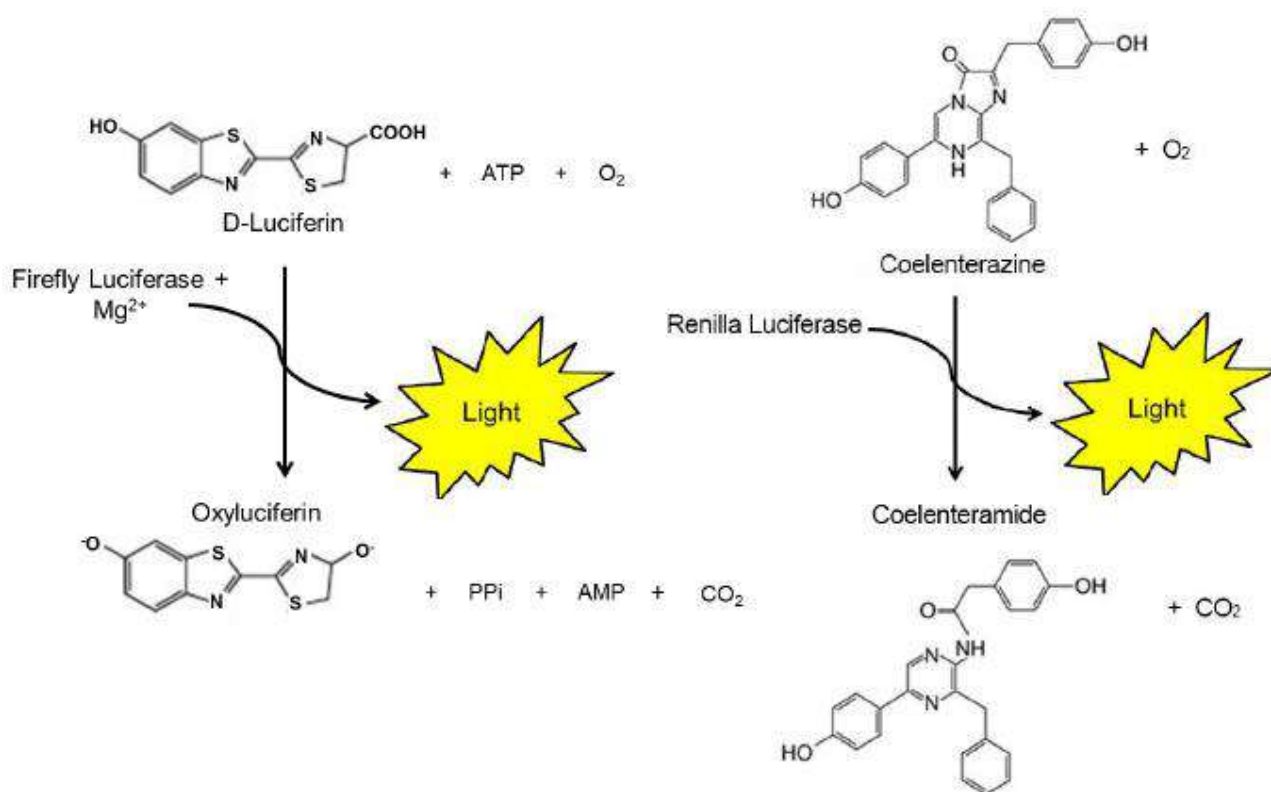


Рис. 5.15. Схема хімічних реакцій, що каталізуються різними люциферазами в подвійній люциферазній репортерній системі аналізу. Пояснення в тексті. Запозичено з [26]

Різнокольоровий люциферазний репортерний аналіз («Multicolored Luciferase Reporter assay») є одноетапним методом одночасного виявлення багатьох компонентів суміші за рахунок генерування різних кольорів модифікованими люциферазами, використовуючи лише один субстрат: D-люциферин світлячка. Люциферази («CBG_{luc}», «CBR_{luc}», «EL_{luc}», «SLR», «SLG» та «SLO») різних видів **жуків** були створені за допомогою внесення **точкових мутацій у ген *luc***.

На рисунку 5.16 показано принцип вищезазначеного підходу. Так, 3 репортерні плазмідні вектори містять послідовність цільового промотора (Промотор 1) та послідовність гена люциферази залізничного хробака (*Rhagophthalmus ohbai*), яка випромінює зелене світло ($\lambda_{\text{max}} = 550 \text{ nm}$); послідовності іншого цільового промотора (Промотор 2) та послідовність гена люциферази, що випромінює помаранчеве світло (отримано внаслідок

точкової мутації попередньої люцифери, $\lambda_{\text{max}} = 580 \text{ nm}$); послідовність конститутивного промотора (Контрольний промотор) та послідовність гена люцифери жука фріксотрікса (*Phrixothrix hirtus*), яка випромінює червоне світло ($\lambda_{\text{max}} = 630 \text{ nm}$). Після трансфекції трьох плазмід у клітини-мішені промоторні області регулюють **транз'єнтну експресію** генів люцифери в живих клітинах.

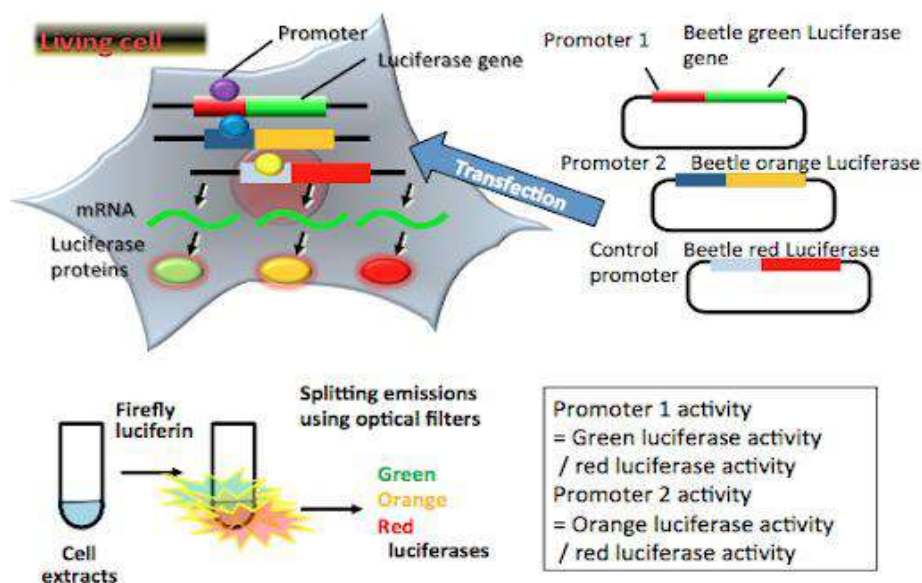


Рис. 5.16. Схема різнокольорового люциферазного репортерного аналізу. Пояснення в тексті. Запозичено з [63]

Вищезазначені люцифери каталізують реакцію з люциферином світлячка, виробляючи **зелене, помаранчеве та червоне** світло. Люцифери жуків випромінюють різні кольори під час реакції з D-люциферином світлячків, і кожне випромінювання може бути розділене оптичним фільтром.

Далі кількість синтезованих білків люцифери в лізаті клітин можна оцінити за інтенсивністю світла. У цьому випадку дві цільові промоторні активності (зелена люцифераза для Промотора 1 та помаранчева люцифераза для Промотора 2) нормалізуються активністю Контрольного промотора (червона люцифераза).

Отже, зазначена система є економічно вигідною, адже зменшує як кількість необхідного зразка, так і час проходження реакції, а також полегшує інтерпретацію даних.

5.3. ДНК- і РНК-діагностичні підходи

5.3.1. Гібридизація нуклеїнових кислот

Нуклеотидна послідовність, що відповідає за специфічний біологічний прояв є цільовою ознакою, що може бути використана як **діагностична** детермінанта.

Гібридизація (відпал) – це процес комплементарного спарювання ланцюгів НК за рахунок утворення водневих зв'язків. Діагностичний тест, що включає гібридизацію ДНК, використовує **ДНК-зонд для виявлення комплементарної цільової послідовності ДНК.**

Будь-яка діагностична система, що базується на гібридизації має **3 ключових елементи:**

- ДНК-зонд;
- ДНК-матриця;
- Система детекції.

Як показано на рисунку 5.17, 1) на початку аналізу рестрикти геномної ДНК, обробленої певною **рестриктазою (ендонуклеазою рестрикції)**, та відповідні мічені маркери ДНК певної довжини розділяють за розміром за допомогою **гель-електорофорезу в агарозному гелі**; 2) після електрофорезу відбувається капілярне чи електроперенесення розділених фрагментів з агарозного геля на мембрану (нітроцелюлозну); 3) далі проводиться гібридизація рестриктів ДНК із зондом (проба, мічена певним чином), комплементарним до послідовності рестриктів; 4) після кроків відмивання від

послідовностей зонда, що не зв'язалися з рестриктами, та інкубування системи упродовж певного проміжку часу та за певних умов (м'яких чи жорстких) відбувається детектування сигналу відповідно до характеристик використаної мітки та встановлення розміру виявлених фрагментів на основі розміру використаних ДНК-маркерів певної довжини (5).

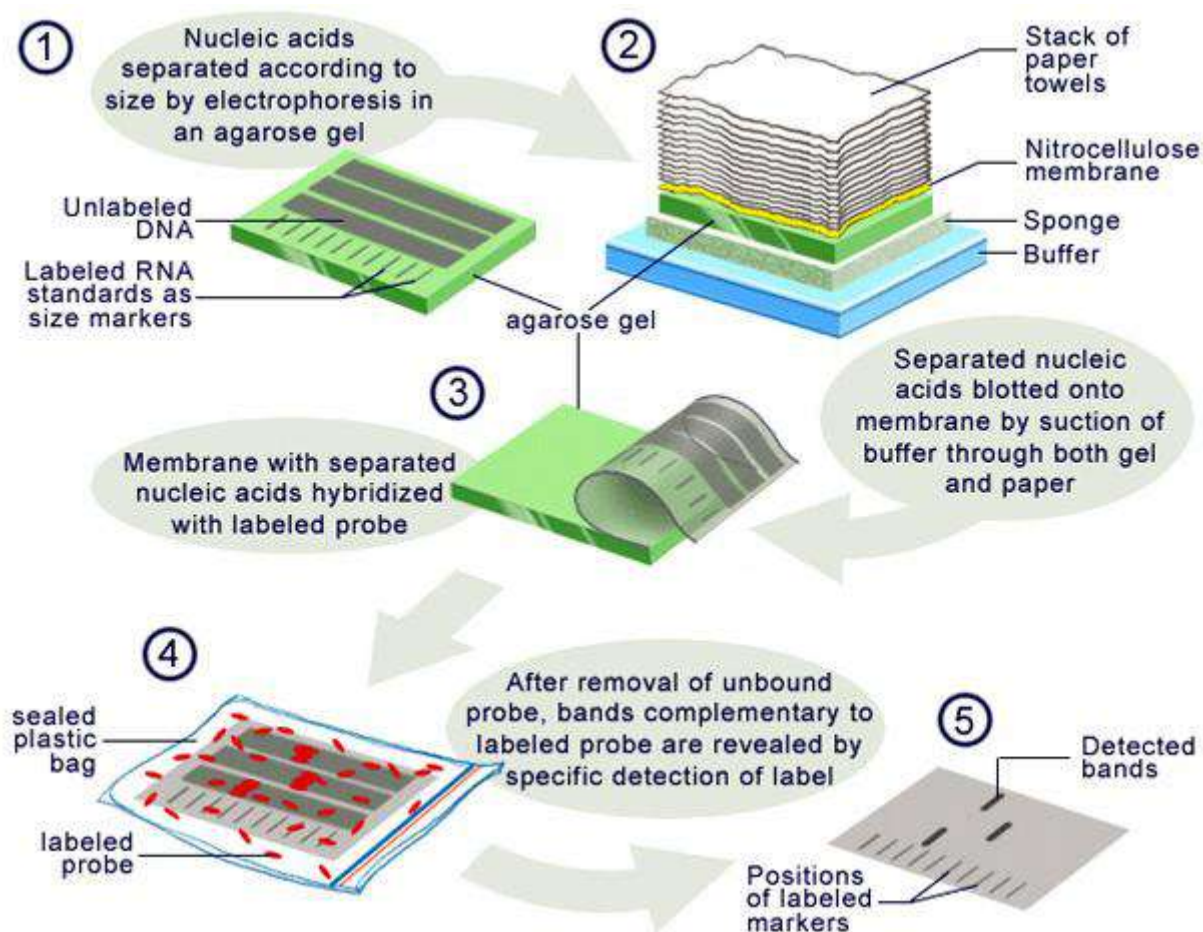


Рис. 5.17. Загальна схема Саузерн-блотингу. Пояснення в тексті.
Запозичено з [37]

Зонди для гібридизації. Зонд має бути **специфічним** виключно до цільової послідовності. Розрізняють видо-, штамo-, геноспецифічні зонди. Використовують як ДНК-, так і РНК-зонди. Довжина коротка (< 50 п.н.) або довга (> 100 п.н.). Отримують зонди численними методами: **хімічний синтез**, **клонування інтактних генів у плазмідах**, **виділення фрагментів генів**

тощо. Так, на рисунку 5.18 наведено схему виділення ДНК патогена та його плазмідне клонування в клітині-хазяїні *E. coli*.

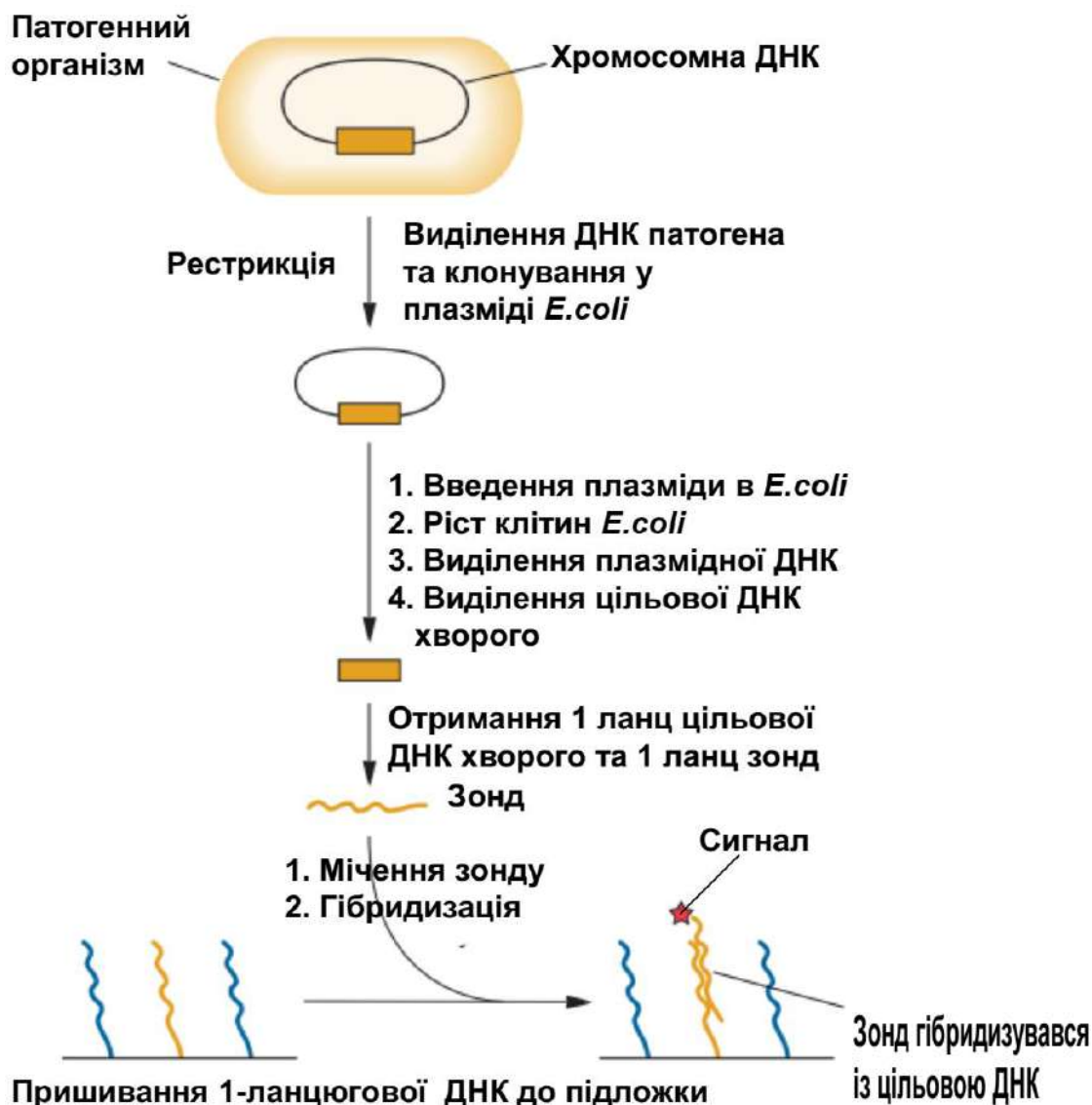


Рис. 5.18. Загальна схема отримання зонда шляхом клонування.

Пояснення в тексті. Адаптовано з [24]

На сьогодні, успішно створено та застосовано зонди для ідентифікації ДНК у зразках крові, сечі, фекалій, змивів із горла тощо. У випадках дуже малої кількості ДНК методом вибору постає ПЛР (див. далі підрозділ 5.3.2).

Нерадіоактивна детекція при гібридизації. Результати гібридизації ДНК часто визначали за допомогою радіоактивномічених (P^{32}) зондів та

методу **авторадіографії**. Через **недоліки** такого підходу (небезпека, великі затрати часу тощо), все більш популярними є нерадіоактивні системи детекції, що базуються на використанні **хромогенних** або **люмінісцентних** субстратів (див. вище). Найчастіше застосовують флуоресцентні барвники та **мітки** з непрямою детекцією, наприклад, **біотинільовані зонди** (рис. 5.19) або **дігексигенін (DIG)**.

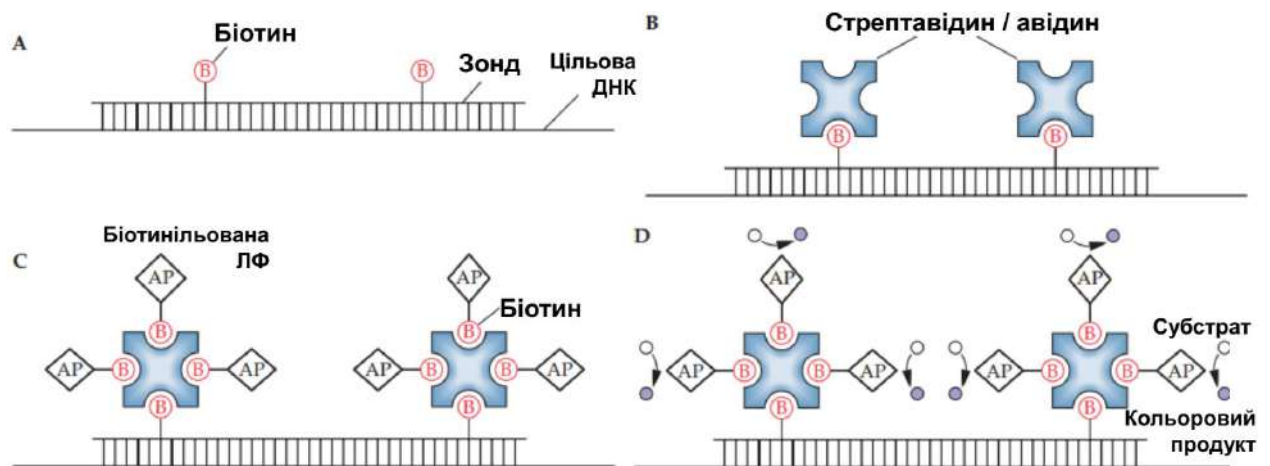


Рис. 5.19. Схема хемілюмінісцентної детекції цільової ДНК за допомогою біотин-стрептавідинової системи. AP (alkaline phosphatase) – лужна фосфатаза. Пояснення в тексті

Гібридизація НК як **прямий метод діагностики** може бути використаною для **ідентифікації носіїв спадкових захворювань, пренатальної діагностики вроджених патологій, планування сім'ї тощо.**

Муковісцидоз – вроджене генетичне моногенне захворювання (аутосомно-рецесивне), пов'язане з однією з 1900 відомих мутацій у гені **CFTR** (the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene), які призводять до дефектів транспорту хлорид-іонів та порушень функціонування дихальної, травної та репродуктивної систем.

Найбільш поширеною мутацією є делеція трьох нуклеотидів у **10-му екзоні гена CFTR**, котра спричинює втрату амінокислоти **фенілаланіну** (кодон 508 – $\Delta F508$). Більше 90 % пацієнтів з муковісцидозом є носіями

принаймні одного аллеля $\Delta F508$, і майже 50 % пацієнтів з муковісцидозом є особами, гомозиготними по $\Delta F508$.

На рисунку 5.20 представлено схему детекції муковісцидозу методом алель-специфічної гібридизації з одним зондом. Так, на початку геномна ДНК або кДНК пацієнта ампліфікується за допомогою ПЛР і після перенесення на мембрану гібридується (окремо) з міченими певним чином олігонуклеотидними зондами, які здатні виявити мутантний ген (зазвичай $\Delta F508$) або ген дикого типу.

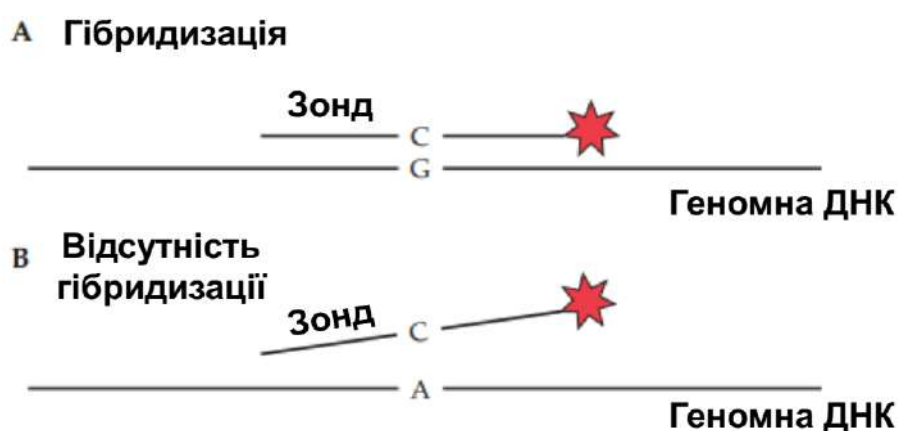


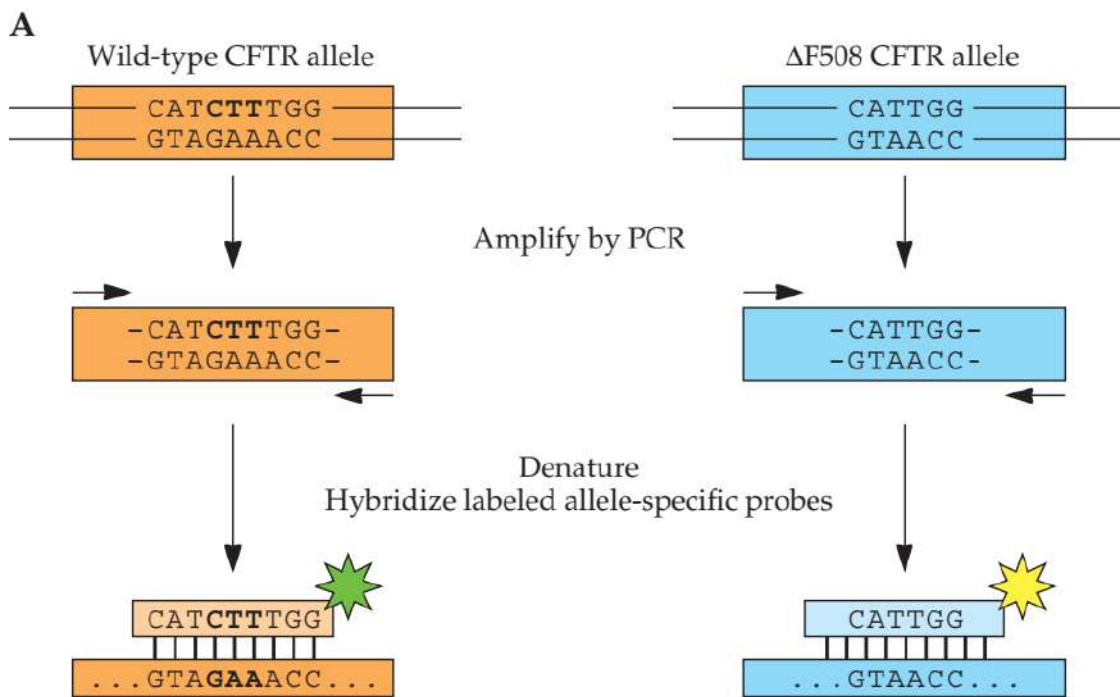
Рис. 5.20. Спрощена схема детекції муковісцидозу методом алель-специфічної гібридизації ДНК із зондом до гена дикого типу. Пояснення в тексті. Адаптовано [24]

Як можна побачити на рисунку, мічений олігонуклеотидний зонд гібридується з повністю комплементарною геномною ДНК (А), але за таких самих умов цей зонд не здатний з'єднуватися з послідовністю ДНК, в якій одна з основ в середині була змінена внаслідок мутаційного процесу (В). У цьому випадку зонд був розроблений для гібридизації з геном дикого типу.

На рисунку 5.21 (А) показано більш сучасну схему детекції муковісцидозу методом алель-специфічної одночасної гібридизації ДНК із різними зондами: до гена дикого типу та до гена з певними мутаціями. Як можна побачити на цьому рисунку, схема експерименту не відрізняється від вищезазначеної, але лише з тією різницею, що використано 2 зонди, які

специфічно гібридизувалися з алелями дикого типу або мутантними алелями (зазвичай, $\Delta F508$).

Таким чином, після детектування флуоресценції, випромінюваної флуорофорами зондів, можна зробити висновок про стан обстежуваної людини: здорові особи є гомозиготними за алелем дикого типу, тоді як уражені хворобою мають 2 мутантні алелі (рис. 5.21 В). **Носії муковісцидозу гетерозиготні по алелях *CFTR* (отже, виявлено флуоресценцію двох флуорофорів – двох кольорів).**



B

Source of blood sample	Hybridization test results	
Normal individual	★	★
Cystic fibrosis carrier	★	★
Cystic fibrosis-affected individual	★	★

Рис. 5.21. Схема детекції муковісцидозу методом алель-специфічної гібридизації ДНК із різними зондами: до гена дикого типу та до гена з певною мутацією. Показано лише частину послідовності гена *CFTR* та зондів. Пояснення в тексті. Запозичено з [24]

Аналіз лігування олігонуклеотидів (the oligonucleotide ligation assay (OLA)) – це ефективний підхід до ідентифікації однонуклеотидних поліморфізмів (single-nucleotide polymorphism – **SNP**), які можуть бути асоційованими з певними генетичними захворюваннями людини. Раніше мав назву – **метод ПЛР/OLA**, адже як тоді, так і зараз він поєднує **ПЛР** із **лігуванням олігонуклеотидів**.

На рисунку 5.22 надано **схему початкового варіанту методу**. Припустимо, що в нормальному гені, у певному сайті (скажімо, нуклеотид номер 106) розташована пара нуклеотидів – АТ; тоді як у мутантному варіанті гена, у цьому самому місці, буде інша пара нуклеотидів – GC. Якщо послідовності нуклеотидів нормального гена з обох сторін положення 106 відомі, це дозволяє синтезувати та використати для гібридизації дві короткі (20-нуклеотидні) олігонуклеотидні послідовності, які розташовані поряд і комплементарні одному з двох ланцюгів ДНК. Суттєвою особливістю цієї пари олігонуклеотидів є те, що один із них (зонд X) має останньою основою на 3'-кінці нуклеотид, який є комплементарним нуклеотиду в положенні 106 не мутантної послідовності.

Інший олігонуклеотид (зонд Y) починається на своєму 5'-кінці з нуклеотиду, який безпосередньо комплементарний нуклеотиду поруч із положенням 106. Коли ці 2 зонда гібридизуються з ДНК-мішенню, що містить нормальну послідовність (яку попередньо ампліфікували за допомогою ПЛР), нуклеотид на 3'-кінці зонда X з'єднується з ДНК-мішенню, а зонд Y гібридизується таким чином, що його 5'-кінець знаходиться поруч із 3'-кінцем зонда X. Додавання **ДНК-лігази** до реакції ковалентно з'єднує зонд X із зондом Y.

Навпаки, коли ці 2 зонди гібридизуються з **мутантною** ДНК, в якій нуклеотид у положенні 106 змінений, нуклеотид на 3'-кінці зонда X утворює так званий **місметч** і не здатний до гібридизації з нуклеотидом 106 у послідовності ДНК-мішені; проте зонд Y може гібридизуватися. У цьому випадку ДНК-лігаза не може приєднати зонд X до зонда Y через

неузгодженість нуклеотидів. Так само можна синтезувати зонди, які будуть з'єднуватися лише у випадку наявності мутантного нуклеотиду у положенні 106.

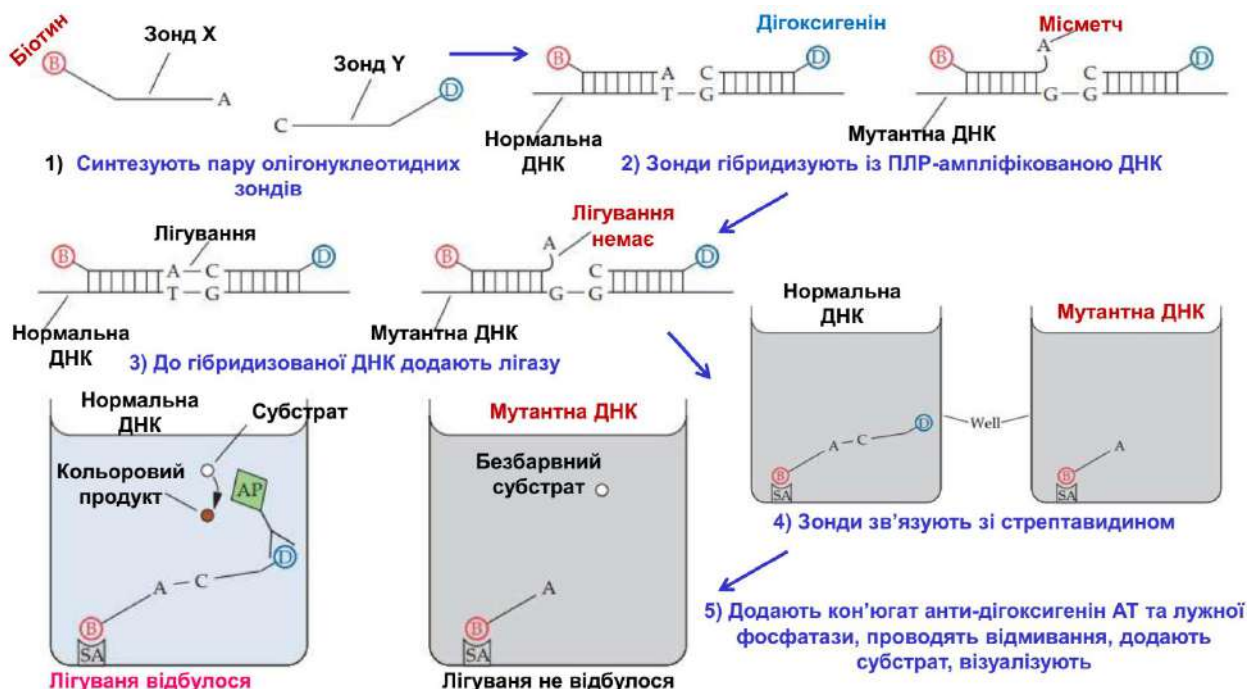


Рис. 5.22. Загальна схема методу PCR/OLA. АТ – антитіла; В – біотин; D – дігексигенін; SA – стрептавідин; AP (alkaline phosphatase) – лужна фосфатаза; А, С, Т, G – аденін, цитозин, тимін, гуанін відповідно. Пояснення в тексті. Адаптовано з [24]

Щоб визначити, чи відбулося лігування між двома зазначеними зондами, зонд X мічений на 5'-кінці **біотином**, а зонд Y мічений на 3'-кінці **дігексигеніном** (рис. 5.22). Низькомолекулярна сполука дігексигенін використовують в якості індикатору зв'язування антитіл. Після проведення стадій гібридизації та лігування ДНК денатурують для вивільнення сполучених зондів X-Y, і всю суміш переносять у невелику пластикову лунку, покриту стрептавідином. Після промивання в лунці лишається лише біотинільований зонд. Далі додають кон'югат антитіл: **анти-дігексигенін** та лужна **фосфатаза**, проводять відмивання, додають безбарвний хромогенний субстрат і візуалізують.

Поява **кольору** в лунці вказує на те, що анти-дігексигенін антитіла зв'язалися з дігексигеніном і що мічений дігексигеніном зонд був з'єднаний лігазою з біотинільованим зондом. Якщо ж **колір не з'являється**, це свідчить про те, що лігування не відбувалося. Таким чином, загалом, система ПЛР/OLA є **швидкою, чутливою та високоспецифічною**; може проходити в автоматичному режимі.

На сьогодні, розроблено модифікований метод – **аналіз лігування олігонуклеотидів**, який **одразу використовує зонди, що відповідають різним SNP і мічені різноманітними флуоресцентними молекулами** (рис. 5.23). Це дозволяє **розрізняти** гомозиготний дикий типів, гомозиготних мутантів та гетерозиготних особин.

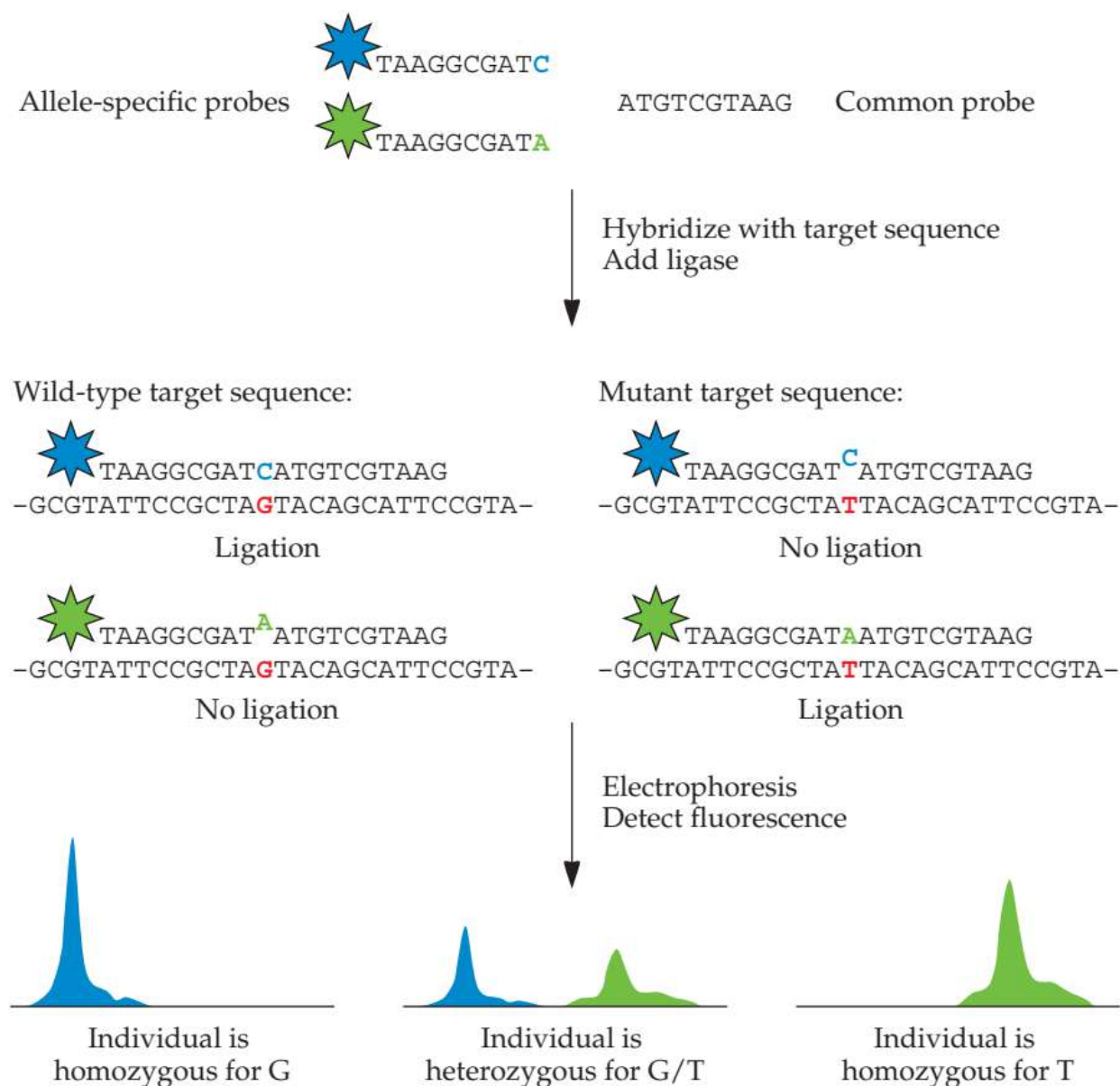


Рис. 5.23. Схема аналізу лігування олігонуклеотидів. А, С, Т, G – аденін, цитозин, тимін, гуанін відповідно. Лігування аллель-специфічних і загального зондів відбувається тільки тоді, коли аллель-специфічний зонд повністю комплементарний цільовій послідовності. Довші ліговані зонди можна відокремити від більш коротких нелігованих зондів за допомогою гелелектрофорезу. Запозичено з [24]

Padlock-зонди (Padlock probes). Діагностичні тести для виявлення SNP, які використовують Padlock-зонди (за своєю структурою схожі на навісні замки), дуже схожі на ті, які використовують OLA зонди, за винятком того, що перший використовує лише **1 зонд**, а не 2, як це використовується в процедурі

OLA. Padlock-зонд – це **олігонуклеотид**, комплементарний цільовій послідовності на 5'- і 3'-кінцях, але не в середній її частині (рис. 5.24).

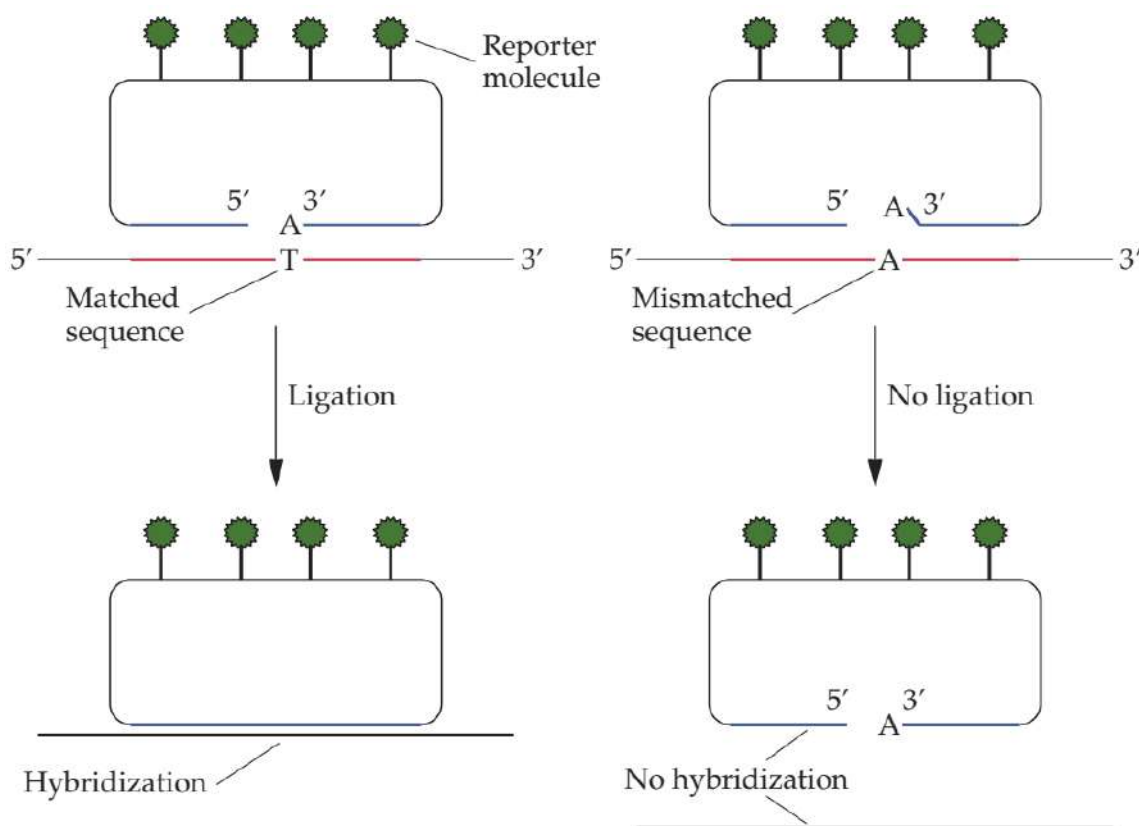


Рис. 5.24. Загальна схема функціонування Padlock-зонда. Пояснення в тексті. Запозичено з [24]

Коли Padlock-зонд гібридизується із цільовою послідовністю, 5'- і 3'-кінці зонда наближаються один до одного. Якщо кінці зонда точно комплементарні цільовій послідовності, після гібридизації дволанцюгову ДНК можна з'єднати разом за допомогою **ДНК-лігази**. Якщо є невідповідність між мішенню та зондом, **лігування не відбувається**.

Вимога щодо ідеального зв'язування обох кінців зонда з цільовою послідовністю для лігування забезпечує **високу специфічність** виявлення SNP. Після реакції лігування гібрид зонд-мішень можна виявити за активністю **репортерної молекули**, приєднаної до середньої (лінкерної) частини зонда. Padlock-зонди, зазвичай, мають послідовності довжиною приблизно від 15 до 20 нуклеотидів на кожному кінці, які комплементарні цільовій послідовності, і

середню ділянку з приблизно 50 нуклеотидів, яка не зв'язується із цільовою послідовністю.

ДНК-фінгерпінтинг (геномна дактилоскопія, ДНК-профілювання) – це метод аналізу гіперваріабельних тандемних повторів або **мінісателітів** (VNTR – variable number of tandem repeats – кількість тандемних повторів, яка може бути різною).

На сьогодні, ДНК-фінгерпінтинг використовується більшою мірою в **криміналістиці** при проведенні судово-медичних експертиз задля **ідентифікації особи** та для встановлення **батьківства**. Так, на рисунку 5.25 наведено приклад ДНК-профілювання за допомогою мінісателітів.

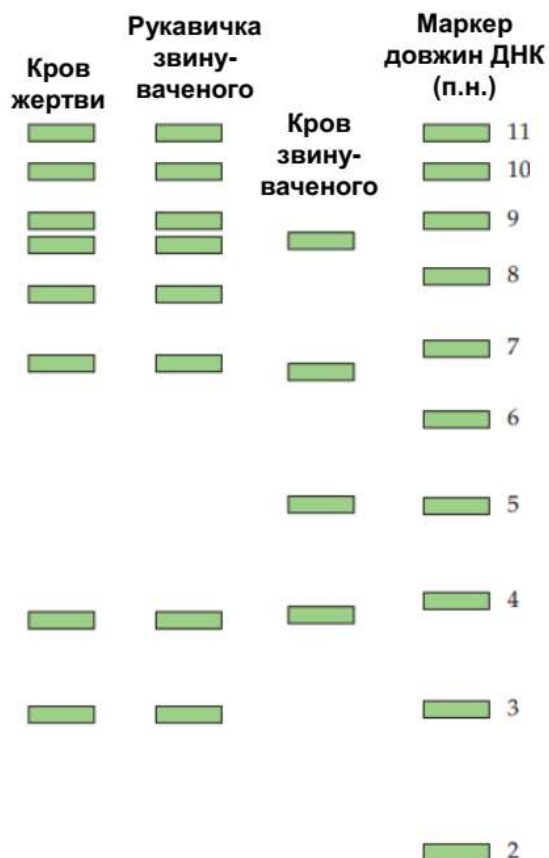


Рис. 5.25. Узагальнений приклад ДНК-фінгерпринтного аналізу на основі мінісателітів у криміналістиці. Розміри молекул ДНК у смугах визначаються шляхом порівняння положень смуг маркера довжин ДНК (п.н.). Пояснення в тексті

Як видно з рисунка, різні дактиловідбитки (із крові жертви, рукавички звинуваченого тощо) містять **різну кількість смуг**. Якщо б рукавичка звинуваченого, дійсно, належала звинуваченому, то всі смуги цих двох ДНК-фінгерпринтів були б однаковими, але, як видно з рис. 5.25, для зазначених геномних відбитків характерні багаточисельні виключення.

Кількість ДНК, отримана з крові, сперми, волосся, шкіри або інших тканин, знайдених на місці злочину, як правило, дуже мала, тому для виявлення мікросателітної ДНК потрібна саме **ПЛР**. Сучасний метод ДНК-профілювання заснований на методі **ПЛР** і використовує **короткі тандемні повтори** (КТП, англ. **STR** (short tandem repeat), інші їх назви: **мікросателіти** або **SSR** (simple sequence repeat)). У такому методі аналізуються ділянки з високим рівнем поліморфізму, що мають короткі повторювані послідовності ДНК (найбільш поширеним є 4 базових повтори, однак зустрічаються й інші довжини повтору, у тому числі 3 і 5 п.н.). Крім того, розробляються комплекти інструментальних засобів, які дозволяють аналізувати також й одиночний нуклеотидний поліморфізм.

У США в 1994 р. ФБР запровадило об'єднану базу даних ДНК «**Combined DNA Index System**» («**CODIS**») для судово-медичної ідентифікації в кримінальних справах, а із січня 2017 р. стандартизовало набір із **20 тандемних повторів** (замість 13 використовуваних раніше) для ДНК-профілювання. Оскільки різні люди мають різну кількість повторюваних ланок, ці ділянки ДНК можуть використовуватися для встановлення відмінностей між індивідуумами.

До ділянок генома, що містять КТП, підбирають **специфічні олігонуклеотидні праймери з флуоресцентними мітками**, потім за допомогою **ПЛР** ампліфікують відповідні фрагменти ДНК. Далі ці фрагменти ДНК аналізуються за допомогою гель-електрофорезу в поліакриламідному гелі або за допомогою **генетичного аналізатора, який є повністю автоматизованим капілярним приладом**, здатним одночасно аналізувати декілька зразків.

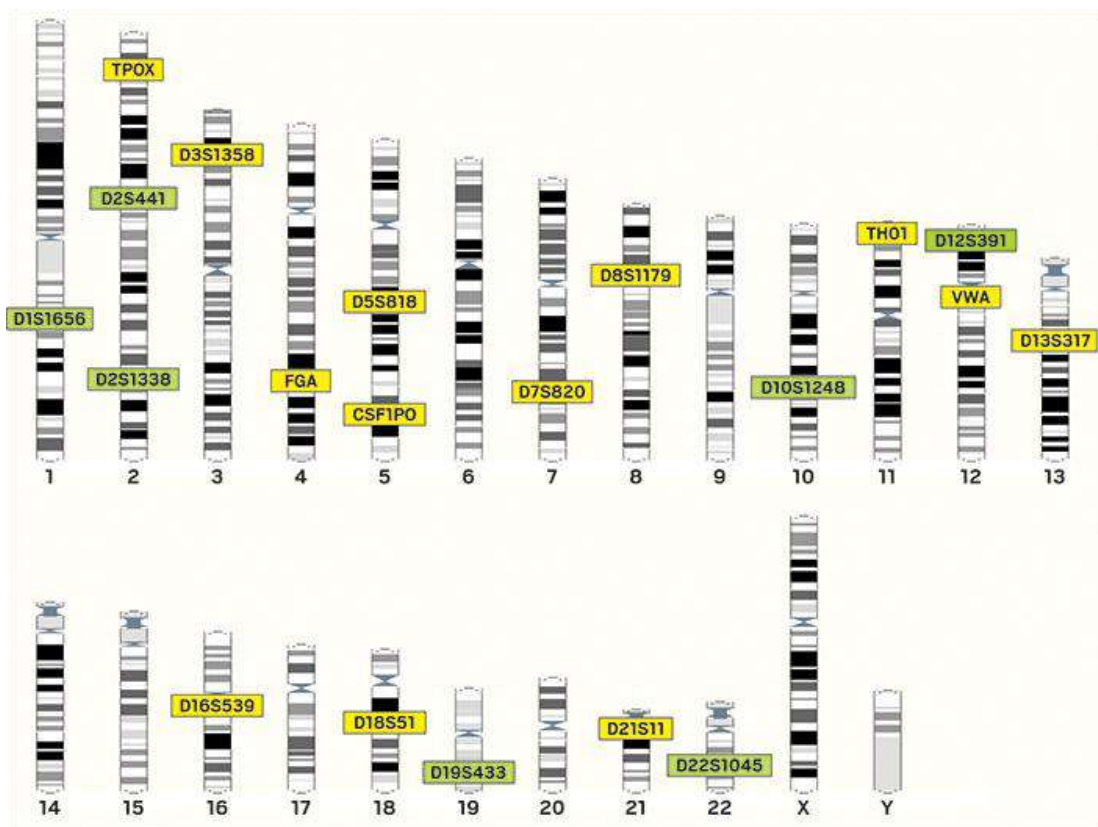


Рис. 5.26. Узагальнений приклад ДНК-фінгерпринтного аналізу на основі мінісателітів у криміналістиці. Локуси STR, які використовуються в базі даних CODIS, розкидані по геному людини. Початкові 13 виділено жовтим, а 7, доданих, виділені зеленим. Пояснення в тексті. Запозичено з [8]

Отже, методи, засновані на гібридизації НК, мають широке використання у медичній біотехнології та молекулярній діагностиці захворювань різного генезу.

5.3.2. Методи на основі ПЛР

Багато діагностичних тестів НК базуються на ПЛР. **Переваги** тестів на основі ПЛР:

- (1) **специфічність**, яка дозволяє виявити конкретну послідовність нуклеотидів у складних зразках;
- (2) **чутливість**, яка дозволяє виявити мішені з низьким вмістом;

- (3) можливість ампліфікувати **значну кількість цільової послідовності** для додаткових аналізів, таких як гібридизація або секвенування;
- (4) **швидкий** аналіз (зазвичай, реакція проходить протягом 1-2 год або навіть менше години);
- (5) **мультиплексування**, яке дозволяє ідентифікувати кілька мішеней в одному зразку;
- (6) низька вартість.

Звичайна ПЛР широко використовується в діагностичних лабораторіях для виявлення послідовностей НК; також можна **кількісно** визначити цільову послідовність, наприклад, послідовність патогена, у зразку за допомогою **кількісної ПЛР у реальному часі (qPCR, Real-time PCR)**.

Для детекції **результатів класичної ПЛР** (після проходження реакції) існують різні підходи: **гель-електрофорез** (у тому числі, при використанні флуоресцентно мічених праймерів можна застосувати **капілярний форез** із автоматичним детектуванням результатів генетичним аналізатором (рис. 5.27).

У **гібридизаційно-ферментному аналізі ((ГіФа), по «кінцевій точці»)** детекція проводиться шляхом **гібридизації з ДНК-зондом, комплементарним ДНК інфекційного збудника**, що має бути виявленим. Гібридизація із зондом ідентифікується за допомогою **флуоресцентного методу**, а інтенсивність забарвлення залежить від вірусного навантаження й реєструється на **фотометрі** при певній довжині хвилі. **Чутливість** ПЛР із детекцією методом ГіФа досягає **97 %**, а **специфічність** складає **100 %**, проте цей підхід **не є кількісним**, як при застосуванні ПЛР у реальному часі.

Інший метод ПЛР із детекцією по «кінцевій точці» – **«FLASH»** (Fluorescent Amplification-based Specific Hybridization) дозволяє враховувати результати ПЛР не відкриваючи пробірки, **безпосередньо після проведення ПЛР**, що виключає можливість забруднення ПЛР-лабораторії амплікона. ПЛР в модифікації FLASH **виключає стадії аналізу продуктів ПЛР методом електрофорезу та гель-документації** результатів електрофорезу, що

дозволяє скоротити час повного ПЛР-аналізу до 2-3 год і знизити вартість комплекту обладнання для ПЛР-лабораторії. Реєстрація флуоресценції (зонди подібні до TaqMan) відбувається на **детекторі** флуоресценції, який реєструє флуоресцентне світіння реакційної суміші в пробірках безпосередньо після проведення ПЛР.

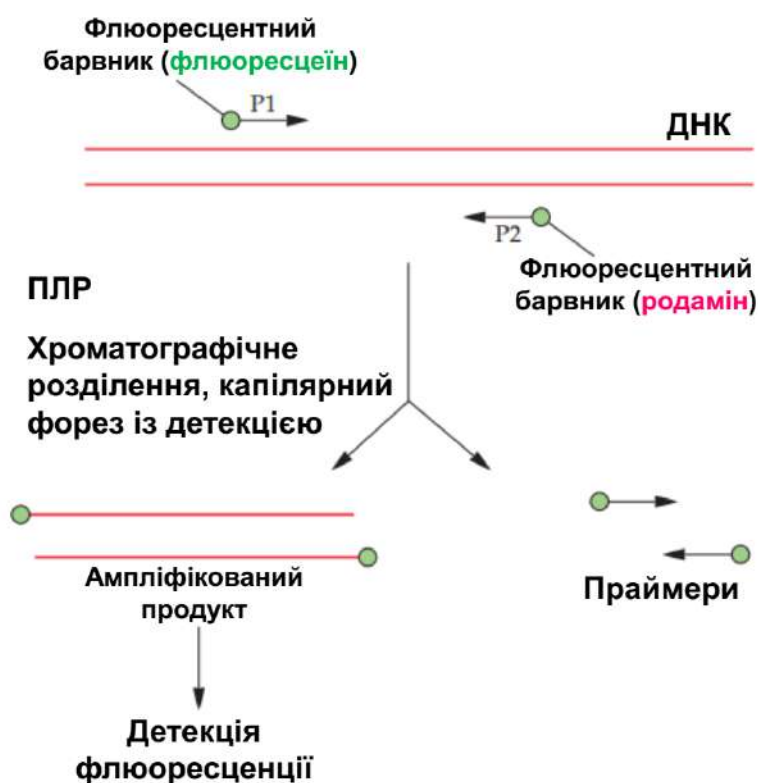


Рис. 5.27. Схема автоматичної детекції ПЛР-продуктів за допомогою мічених праймерів. Пояснення в тексті. Адаптовано з [24]

За допомогою вищезазначених методів можна аналізувати більшість ПЛР-продуктів, але абсолютно точні результати одержують тільки при **секвенуванні** (високонадійний метод доказу специфічності, але застосовується, в основному, для визначення точкових мутацій генів (див. далі)).

Алель-специфічна ПЛР. Зазначений різновид ПЛР застосовується для скринінгу відомих **SNP**. Для цього використовують різні праймери для виявлення **алелів**, які розрізняються одним нуклеотидом, наприклад, алелі здорової особи та пацієнта з певним генетичним захворюванням. У такій ПЛР

системі **перший праймер** точно комплементарний нормальній послідовності ДНК, а **другий** праймер буде відпалюватися на варіантній послідовності, що містить асоційований із захворюванням SNP. Зазвичай, праймери підібрано таким чином, що поліморфний нуклеотид розміщено на 3'-кінці прямого праймера, оскільки більшість термостабільних полімераз для ПЛР, ефективно не подовжують 3'-місметчі. **Третій** зворотний праймер є комплементарним до протилежного ланцюга і є спільним для всіх реакцій.

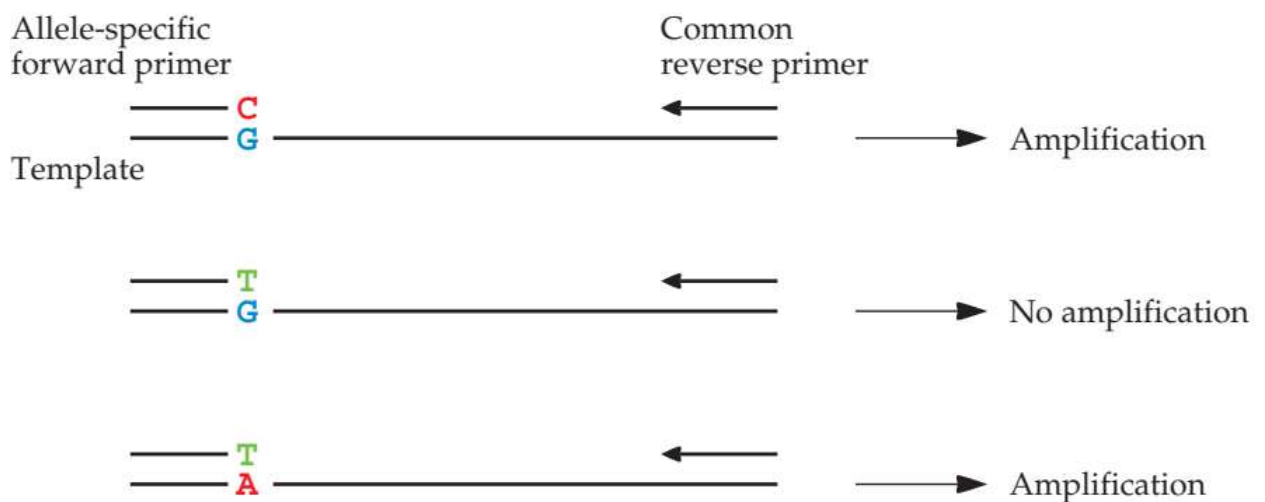


Рис. 5.28. Загальна схема алель-специфічної ПЛР. Пояснення в тексті.

Запозичено з [24]

Кожна реакція містить лише 1 із алель-специфічних прямих праймерів і загальний зворотний праймер разом із зразком ДНК пацієнта, термостабільною ДНК-полімеразою та всіма чотирма дезоксирибонуклеотидами. ПЛР-ампліфікація відбувається лише за наявності прямого праймера, який точно комплементарний цільовій послідовності у зразку пацієнта; невідповідності між праймером і матричною ДНК перешкоджають відпалу праймера і, отже, подовженню праймера під час синтезу ДНК. **Перевага** цього методу порівняно з алель-специфічною гібридизацією, описаною вище, полягає в тому, що стадії ампліфікації та діагностики поєднуються.

Сучасний варіант алель-специфічної ПЛР відомий як так званий «конкурентний олігопраймінг», при якому два SNP-специфічні прямі праймери використовують в одній реакції (рис. 5.29). Для розрізнення продуктів ПЛР кожен праймер мітиться відповідним **флуоресцентним барвником**.

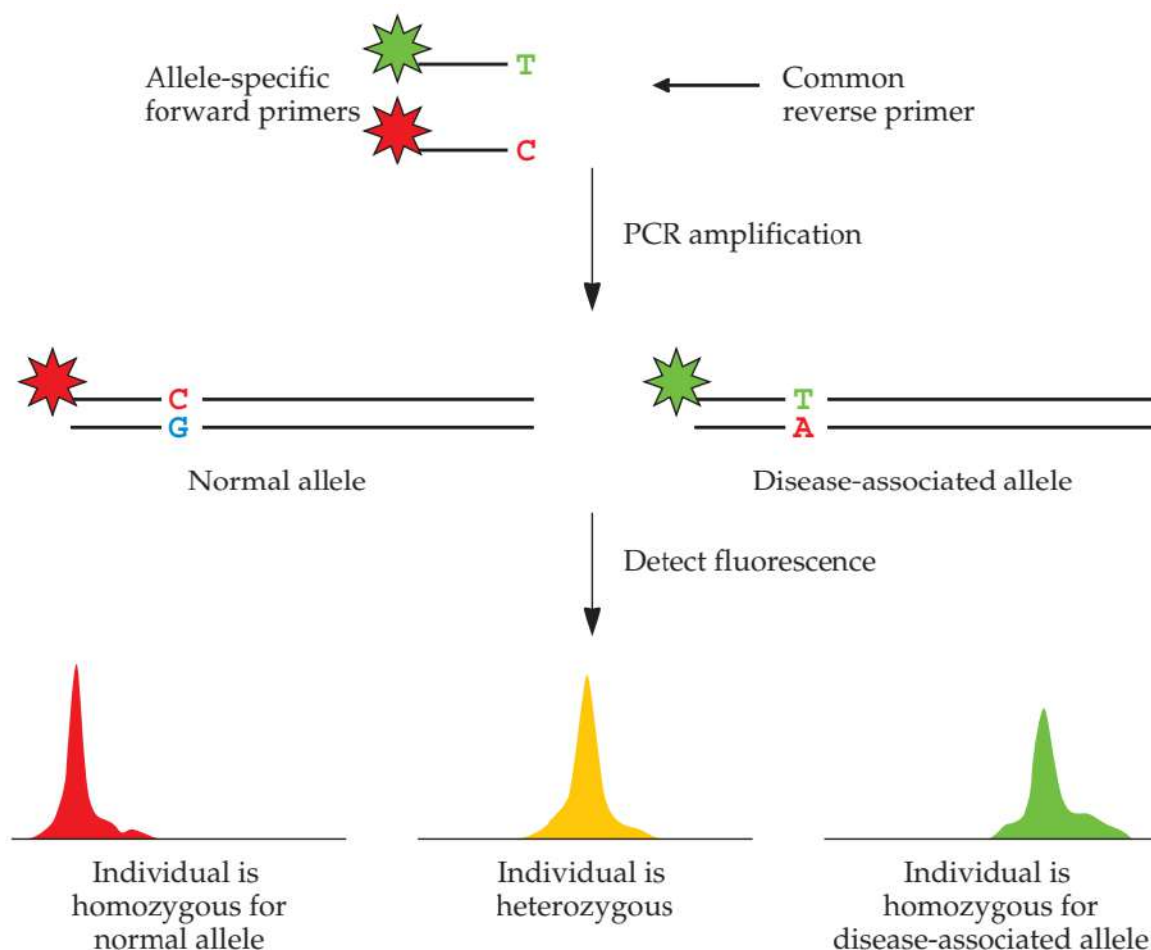


Рис. 5.29. Алель-специфічна ПЛР («конкурентний олігопраймінг») для детектування однонуклеотидного поліморфізму. Пояснення в тексті. Запозичено з [24]

Як показано на рисунку 5.29, 2 алель-специфічних прямих праймера, які різняться нуклеотидом на 3'-кінці, додають в одну реакцію разом із зворотнім праймером, що відпалюється з послідовністю, котра є спільною для двох альтернативних алелів. ПЦР проходить лише тоді, коли праймер ідеально комплементарний ДНК-мішені. Для того, щоб розрізнити продукти

ПЛР, які відповідають нормальному алелю та мутантному алелю, пов'язаному з певним захворюванням, **кожний прямий праймер мітять різноманітними флуоресцентними барвниками**. У наведеному тут прикладі продукти ПЛР від осіб, які гомозиготні за **нормальним** алелем, флуоресціюють **червоним**, у той час, як ПЛР-продукти від осіб, які гомозиготні за асоційованим із цим захворюванням алелем, флуоресціюють **зеленим**. ПЛР-продукти від осіб, які є гетерозиготами за зазначеним алелем, генерують флуоресценцію **жовтого** кольору (рис. 5.29).

ПЛР у реальному часі або кількісна ПЛР. Більшість діагностичних тестів НК на етіологічні агенти **інфекційних захворювань** ґрунтуються на ПЛР. ПЛР дозволяє **уникнути необхідності вирощувати патогени**, що вимагає багато часу для вірусів і бактерій, які повільно ростуть або є надто вибагливими. Цей метод не тільки дозволяє ідентифікувати вірусний, бактеріальний або грибовий патоген, але також може виявити специфічні характеристики цього патогену, наприклад, **наявність генів стійкості до антибіотиків**, які можна використовувати для визначення найкращого **курсу лікування**. Успішний ПЛР-аналіз для виявлення мікробів у зразках, отриманих від людини, повинен дозволяти розрізняти цільовий штам серед величезної кількості коменсальних видів, які існують у шлунково-кишковому, сечостатевому, травному та респіраторному трактах людини та на шкірі.

ПЛР в реальному часі має всі **переваги** ПЛР-аналізу і, крім того, дозволяє **кількісно** визначити патоген, що викликає інфекцію. У ПЛР в реальному часі продукт дволанцюгової ДНК зв'язується з **флуоресцентною молекулою**, і **флуоресценція вимірюється після кожного циклу ампліфікації** в реальному часі для визначення кількості певного патогена. Пост-ПЛР детекція результатів є непотрібною, тому час на ідентифікацію збудника менший, ніж при звичайній ПЛР.

Отже, кількісна ПЛР у режимі реального часу застосовується для **моніторингу мікроорганізмів**, що викликають низку **інфекційних захворювань**. Наприклад, цей метод використовували для кількісного

оцінювання **рівня забруднення *Salmonella enterica* зразків харчових продуктів**. У цьому випадку зразки їжі промивали водою або сольовим розчином, далі рідину фільтрували, щоб забезпечити збір бактеріальних клітин. Бактеріальні клітини видаляли з фільтруючої мембрани, лізували та проводили ПЛР у реальному часі. У цьому випадку вся процедура зайняла лише приблизно 3 год і змогла виявити та визначити кількісно навіть 700 клітин *S. enterica* на 100 мл рідини. Окрім цього, за допомогою, **TaqMan проб (див. рис. 3.15)** у назальних мазках пацієнтів було виявлено *S. aureus*, резистентний до лікування метициліном.

«Проби з інвертованим кінцевим повтором («молекулярні маячки (маяки)», molecular beacons). Цей підхід є варіантом попереднього методу (у цьому випадку використовується ДНК-полімераза, яка не має 5'→3' екзонуклеазної активності). Тому під час ампліфікації зонд лише зміщується, але не руйнується. На відміну від TaqMan проб репортер і гасник відмежовуються один від одного не шляхом гідролізу, а за допомогою лінеаризації зонда, що призводить до флуоресценції репортера. Проба має короткий (5-8 нуклеотидів) інвертований кінцевий повтор. Флуорофор і гасник розташовані на кінцях олігонуклеотиду. У розчині проби при температурі нижче 55-60 °C утворюють структуру типу стебло-петля з дуже низьким рівнем флуоресценції (за рахунок **контактного гасіння**). При гібридизації з ампліконом проба «розвертається», що призводить до суттєвого зростання рівня флуоресценції (рис. 5.30).

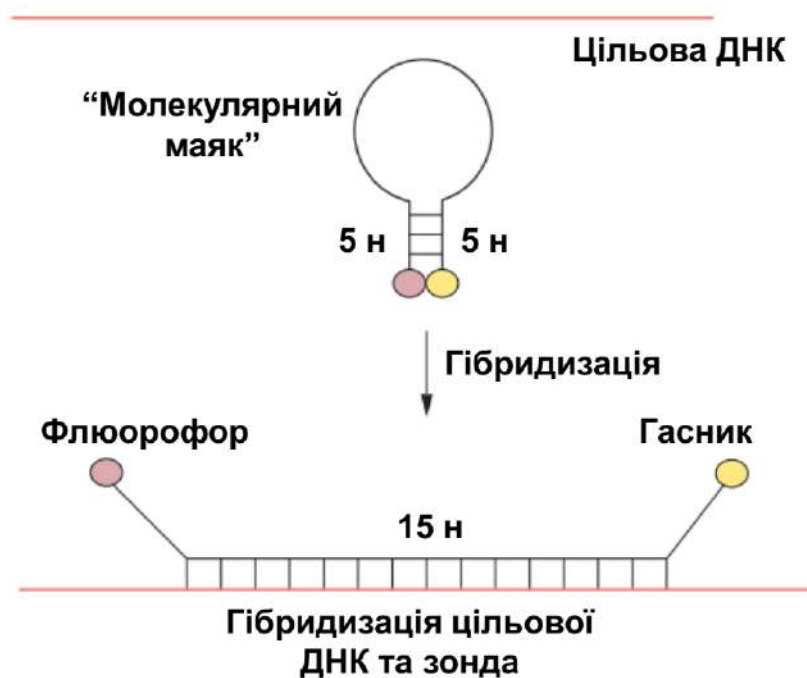


Рис. 5.30. Схема детекції продуктів ПЛР у реальному часі за допомогою «молекулярних маячків». 5 н, 15 н – 5 і 15 нуклеотидів відповідно. Пояснення в тексті. Адаптовано з [37]

«Молекулярні маячки» мають широке використання для детекції специфічних послідовностей ДНК методом ПЛР у реальному часі. Зокрема, **комбінація** «молекулярних маячків», кожен з яких комплементарний до своєї мішені та має свій колір (рис. 5.31), дозволяє визначати **одночасно декілька послідовностей**.

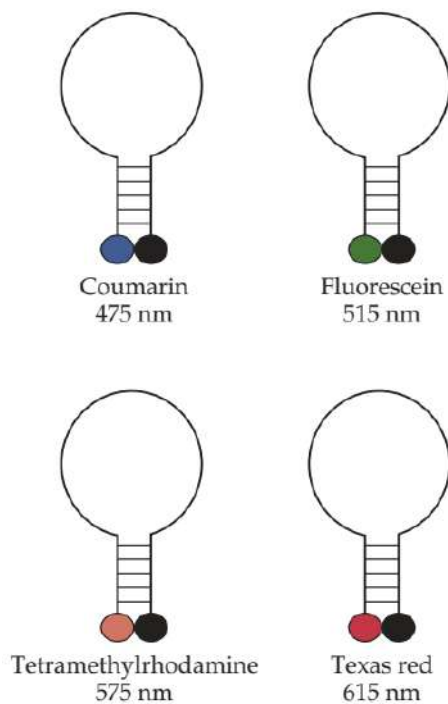


Рис. 5.31. Зонди «молекулярні маячки» із різними флуорофорами. Під кожним зондом зазначено назву флуорофора та довжину хвилі його максимального випромінювання. Кожен флуорофор представлений (ліворуч) кольором його флуоресценції. Запозичено з [24]

Наприклад, так можна **генотипувати особу/особину, ГМО**: до кожного з алелів підбирається свій зонд, а після гібридизації генотип визначається візуально. Отже, комбінація барвників дозволяє визначати генотип (рис. 5.32): поява **зеленої** флуоресценції свідчить про **гомозиготу (дикий тип)**; утворення **червоної** флуоресценції говорить про **гомозиготний мутантний генотип**; у той час як **комбінування зеленого та червоного** флуоресцентного випромінювання засвідчує **гетерозиготність** особи, яка є носієм певного захворювання.

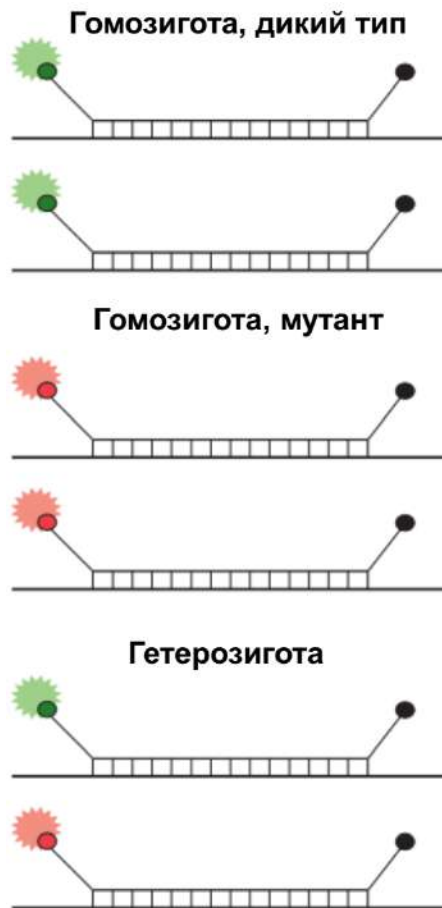


Рис. 5.32. Схема виявлення різних генотипів під час ПЛР у реальному часі за допомогою «молекулярних маячків». Пояснення в тексті.
Адаптовано з [24]

І на доданок, **цифрова полімеразна ланцюгова реакція** (цифрова ПЛР, digital PCR, dPCR) є біотехнологічним удосконаленням звичайних методів ПЛР, які можна використовувати для **прямого кількісного визначення** та клональної ампліфікації ланцюгів НК, зокрема ДНК, кДНК або РНК. **Ключова відмінність** між dPCR і традиційною ПЛР полягає в методі вимірювання кількості НК, причому перший є **більш точним методом**, ніж ПЛР, хоча також більш схильний до помилок у руках недосвідчених користувачів.

«Цифрове» вимірювання **кількісно** та **дискретно** вимірює певну змінну, тоді як «аналогове» вимірювання екстраполює певні вимірювання на основі вимірюваних моделей. Замість проведення однієї реакції на лунку, dPCR

передбачає поділ розчину ПЛР на десятки тисяч крапель, розміром у нл, де в кожній із них відбувається **окрема реакція ПЛР**. Робоча суміш для dPCR складається з матричної ДНК (або РНК), зондів-гасників флуоресценції (наприклад, TaqMan), праймерів та основної суміші для ПЛР, яка містить відповідний буферний розчин, ДНК-полімеразу, дезоксирибонуклеотидтрифосфати, $MgCl_2$ в оптимальних концентраціях. Кілька різних методів можуть бути використані для розподілу зразків, включно з мікропланшетами, капілярами, масляною емульсією (**ddPCR – Droplet Digital PCR (цифрова краплинна ПЛР)**) та мікроматрицями мініатюрних камер із поверхнями, що зв'язують НК. Поділ зразка НК дозволяє більш надійно та чутливо оцінити кількість молекул-мішеней, припускаючи, що така популяція відповідає розподілу Пуассона (рис. 5.33).

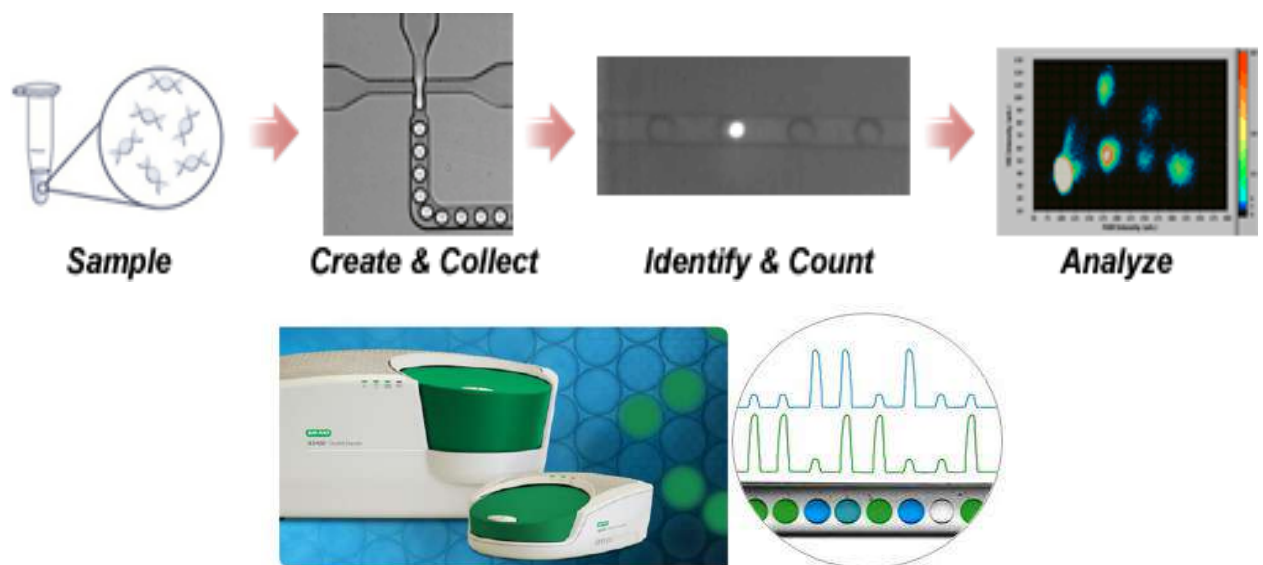


Рис. 5.33. Загальна схема роботи цифрової ПЛР та приклад основних приладів для її постановки. Пояснення в тексті. Запозичено з [37]

Після кількох циклів ПЛР-ампліфікації зразки перевіряються на флуоресценцію і отримані результати надаються у вигляді бінарного зчитування «0» (відсутній сигнал) або «1» (сигнал присутній). Реєструється загальна частка флуоресціюючих крапель та аналізуються отримані дані (рис. 5.33). На відміну від ПЛР у реальному часі абсолютна кількісна оцінка за

допомогою dPCR не потребує стандартної кривої. Також dPCR має більшу толерантність до інгібіторів ПЛР.

Було продемонстровано, що цей метод може бути корисним для вивчення варіацій у генних послідовностях: таких як **зміни кількості копій (CNV)** і **точкові мутації** (зокрема, рідкісні, пов'язані з певними **патологічними станами**); а також забезпечує **абсолютну** та відтворювану **кількісну оцінку** цільових НК із роздільною здатністю однієї молекули.

5.3.3. ДНК- і РНК-мікрочипи

У той час як гібридизаційні зонди та ПЛР широко використовуються для виявлення мутацій в окремих генах, аналіз **мікроматриць – ДНК-мікрочипів (microarray)** – дозволяє одночасно виявляти мутації в декількох локусах, пов'язаних зі складними генетичними захворюваннями.

Методи детекції НК із використанням **мікрочипів** також засновані на **гібридизації** (рис. 5.34).

У цих методах на твердій основі (підкладці) закріплюють **велику кількість специфічних олігонуклеотидних зондів** (цілий геном, окрема хромосома, вибрані геномні області або вибрані кодуючі області з одного або декількох різних організмів). Усю НК, що міститься в зразку, мітять і гібридизують із зондами чипа. Після відмивання компонентів, які не зв'язалися, реєструють результати реакції. Як показано на рисунку 5.34, на початку аналізу (А) мРНК виділяють із двох зразків (зразок 1 – **рефересний** (наприклад, відносно здорова людина) та зразок 2 – **тестовий** (пацієнт)), і під час **зворотної транскрипції (ЗТ-ПЛР)** ланцюги кДНК мітять **флуоресцентними барвниками Cy3 та Cy5** відповідно.

Зразки кДНК змішують і гібридизують із впорядкованою мікроматрицею або генних послідовностей, або геноспецифічних олігонуклеотидів. Після реакції гібридизації кожен комірок чипа сканують на наявність сигналу від

обох вищезазначених флуоресцентних барвників, сигнал кожного з яких реєструють окремо. Комірки, які генерують лише **зелене** або **червоне** випромінювання, являють собою гени, що транскрибуються лише в зразку 1 або 2 відповідно. Флуоресценція **жовтого** кольору вказує на гени, активні в обох зразках; у той час як відсутність емісії (**чорний** колір) свідчить про гени, які не транскрибуються в жодному із зразків (В).

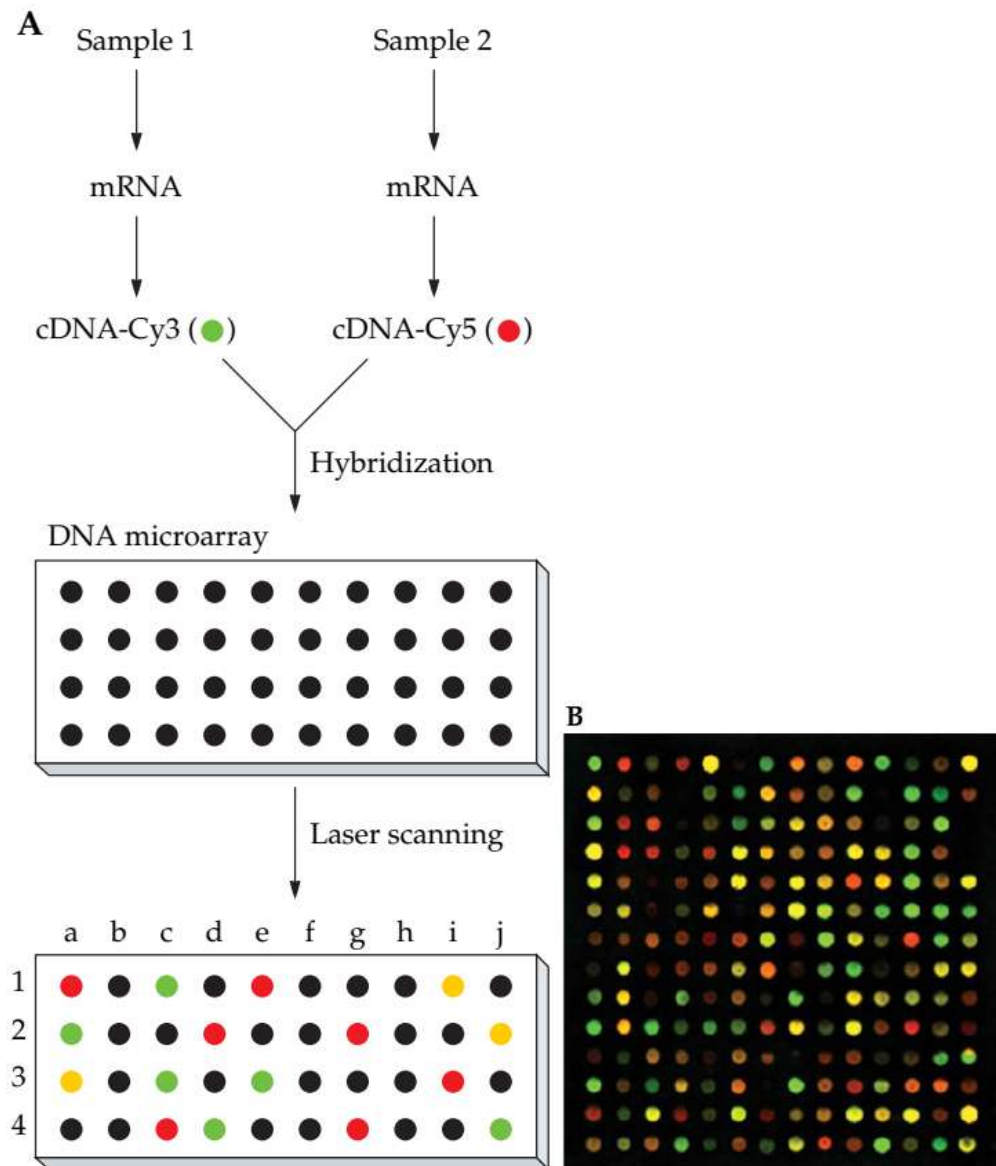


Рис. 5.34. Профілювання експресії генів за допомогою ДНК-мікрочипа. (А) Загальна схема метода. (В) Флуоресцентне зображення ДНК-мікрочипа, гібридизованого з кДНК, міченою Cy3 та Cy5. Пояснення в тексті. Запозичено з [24]

На сьогодні, були розроблені мікрочипи (так звані **SNP-чипи**) для одночасного скринінгу більш ніж 900000 SNP у геномі людини. «**Mammaprint**», мікрочип для виявлення раку молочної залози, і «**AmpliChip CYP450**», мікроматриця для прогнозування реакції на певні ліки, були першими діагностичними мікрочипами, схваленими FDA.

Останнім часом компанії пропонують геномні тести на основі мікрочипів безпосередньо споживачам, щоб визначити походження та спрогнозувати ризик конкретних захворювань, наприклад, мікроматриці з послідовностями **мікро-РНК**, які можуть бути використаними в якості **ранніх провісників хронічного лімфолейкозу** (наприклад, **miR-29** та інші) тощо.

Отже, на сьогодні, за допомогою цього підхода можна виявляти множинні алелі, наприклад, для **оптимізації дозування лікарського засобу та прогнозування несприятливих наслідків дії препарату**; можна визначати **епігенетичні маркери**, пов'язані з певними видами **раку**; на основі SNP проводити визначення предків та виявляти випадки незаконної торгівлі тваринами або їх частинами; а також визначати **рівень мРНК генів**, експресія яких змінюється при певних **патологічних станах (транскриптоміка)**.

Це **якісний, напівкількісний аналіз**, який потербує відповідних підходів для калібрування даних флуоресценції, отриманих як під час використання повторів аналізу, так і на різних ДНК- і РНК-чипах; а також певних методів аналізу, в яких вихідні дані випромінювання флуоресценції кожного гена перетворюються на співвідношення, яке зазвичай виражається як кратна зміна.

Первинні дані часто організовані в **кластери генів, патерни експресії** яких подібні за різних умов або протягом певного періоду часу (рис. 5.35).

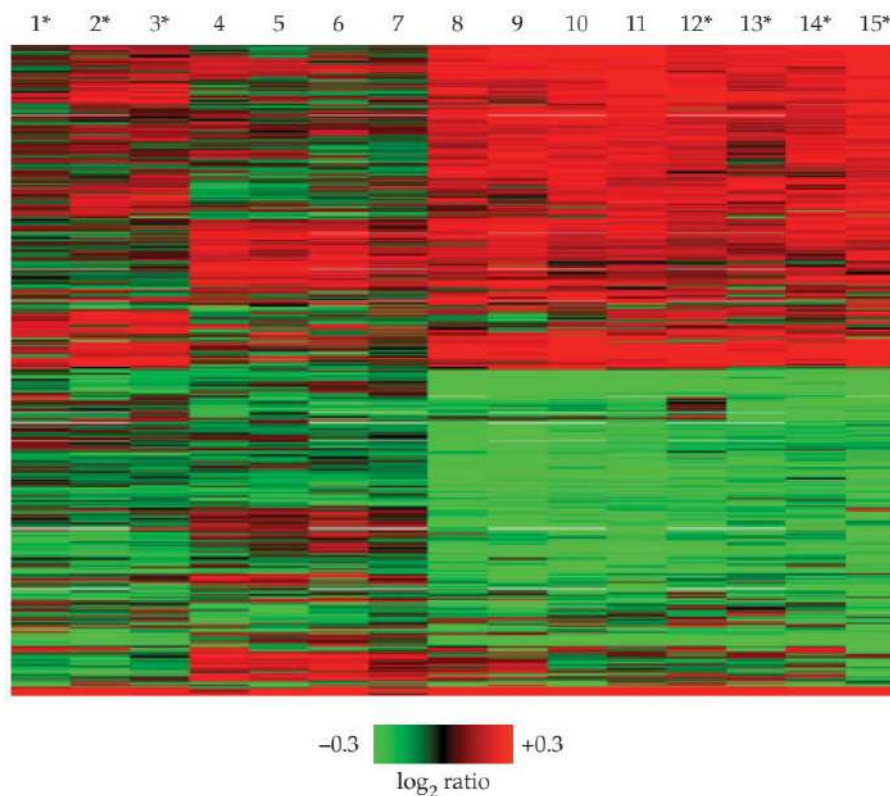


Рис. 5.35. Профіль експресії генів у тканині печінки за умов цирозу, викликаного різними чинниками. Стовбчики з 1 по 7 і з 8 по 15 – експресія генів у зразках печінки пацієнтів із цирозом печінки, спричиненим етанолом і вірусом гепатиту, відповідно. Зірочки позначають пацієнтів із тяжким перебігом захворювання. Пояснення в тексті. Запозичено [24]

Це полегшує прогнозування транскрипційної активності певних генів, які можуть функціонувати разом у відповідному патологічному шляху. На рис. 5.35 показано, що визначені за допомогою ДНК-мікрочипа профілі експресії 2965 генів у відносно здорової особи відрізнялися від відповідних профілей пацієнтів із цирозом печінки. Зокрема патерни експресії в пацієнтів із цирозом, спричиненим етанолом, є відмінними від профілей у хворих із цирозом, індукованим вірусом гепатиту С.

Транскриптоміка (профілювання експресії генів) спрямована на вимірювання рівнів транскрипції генів на основі цілого генома за певних умов. **Транскрипцію** можна оцінити як функцію певних медичних станів, як наслідок мутацій, у відповідь на природні або токсичні агенти, у різних

клітинах або тканинах, чи в різний час під час біологічних процесів, таких як поділ клітин або розвиток організму. Часто метою досліджень експресії генів є ідентифікація генів, які підвищують або знижують регуляцію у відповідь на зміну певного стану. **Двома основними експериментальними підходами до вимірювання рівнів транскриптів РНК на основі цілого генома є вищезазначений аналіз мікрочипів ДНК і високопродуктивне секвенування РНК наступного покоління (next-generation RNA sequencing).**

5.3.4. Методи секвенування ДНК

Секвенування – це найбільш потужний метод ДНК-діагностики. **Метод Сенгера (секвенування з обривом ланцюга, що зростає)** – традиційний підхід **першого** покоління методів секвенування ДНК (рис. 5.36), який було використано в **проекті «Геном людини»**.



Рис. 5.36. Загальний огляд методів секвенування трьох поколінь за допомогою різних платформ. Пояснення в тексті

На сьогодні, цей метод є автоматизованим. Довжина прочитання за один «прогон» – 900 п.н. Час прогону – 40 хв. До 96 реакцій паралельно. Метод Сенгера є найбільш точним, але дорогим способом секвенування з невеликою продуктивністю. Так, проект «Геном людини» зайняв приблизно 13 років і коштував близько 3 мільярдів доларів.

Однак, розроблені при реалізації проекту технічні рішення, привели до стрімкого розвитку технологій секвенування наступних поколінь (**другого й третього**) та загалом **високоефективного секвенування (High-Throuput Sequencing, HTS)** або **NGS (next-generation sequencing, секвенування нового покоління)**.

Технології NGS мають високу продуктивність, швидкість, високу точність та дозволяють вирішувати різноманітні завдання (повногеномне секвенування, секвенування геномів і транскриптомів *de novo*, ресеквенування з пошуком заданої мутації, метагеномне дослідження тощо). Велике значення для NGS відіграє **біоінформатика**, тому що оброблення отриманих даних та збирання нуклеотидних послідовностей вимагає високопродуктивного програмного забезпечення.

Варто зазначити, що під високоефективними методами деякі дослідники об'єднують методики як другого, так і третього поколінь. Серед основних відмінностей між другим і третім поколінням методів є відсутність етапу ампліфікації бібліотеки або окремого фрагменту ДНК в останньому. Це суттєво змінює процес секвенування, адже засновано на визначенні первинної структури одиничних молекул і характеризується відсутністю стадії ампліфікації фрагментів ДНК. Вказана особливість дозволила значно прискорити, спростити та здешевити оброблення геномних даних. Найбільш продуктивні методи, забезпечують читання мільярдів нуклеотидів у день. Саме через це HTS зараз є основним методом дослідження повних геномів, а крім того грає помітну роль у розробці програм персоналізованої медицини для людей. Отже, **NGS** наближує **еру персоналізованої медицини**.

Персоналізована медицина – підхід, який розділяє пацієнтів на окремі групи, виходячи з їх індивідуальних особливостей; і вибір методу лікування базується саме на передбаченій індивідуальній реакції пацієнтів.

У 2001 році – уперше було опубліковано вираз «Геном за 1000 доларів» – межа, досягнення якої позначить початок ери персоналізованої геноміки. Компанія «Illumina» – абсолютний лідер у секторі NGS-сиквенаторів – у 2014 році презентувала серію найпродуктивніших у світі сиквенаторів «HiSeq X», які були здатні сиквенувати 6 людських геномів за 11 днів і подолали бар'єр вартості секвенування генома людини в 1000 доларів (рис. 5.37).

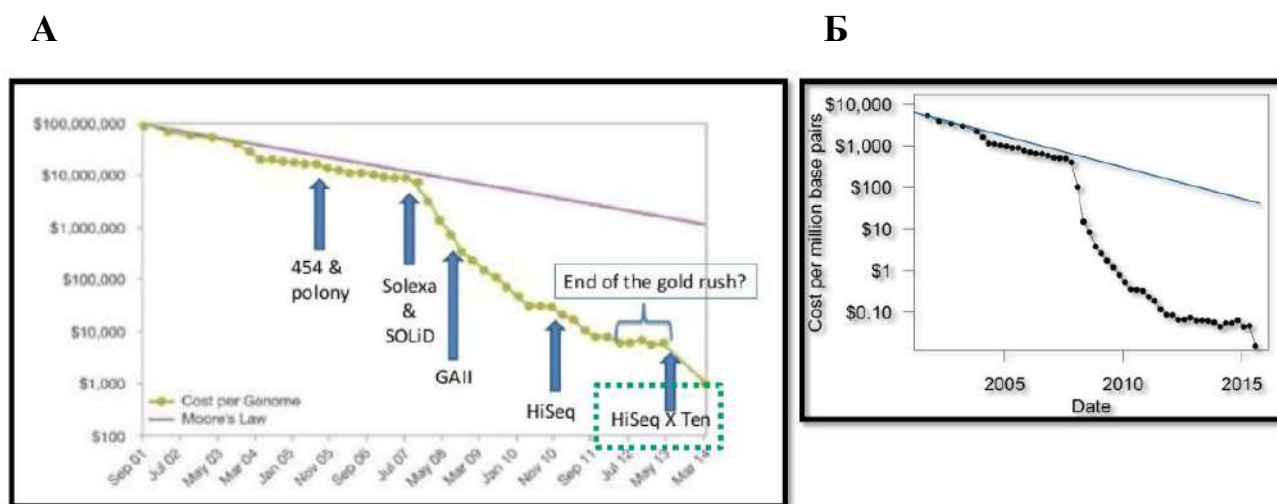


Рис. 5.37. Графіки залежності вартості високоефективного секвенування від (А) різних платформ і (Б) років. Пояснення в тексті. Запозичено з [39]

Метод зворотніх термінуючих нуклеотидів (секвенування на молекулярних кластерах; секвенування шляхом синтезу з оборотним термінуванням (Sequencing Using Reversible Chain Terminators; Sequencing by synthesis; Метод Illumina/Solexa, «Illumina» («Solexa») sequencing, США). Це найбільш поширена з існуючих технологій NGS другого покоління (на сьогодні, біля 80 % ринку). У цьому методі застосовується принцип реєстрації утворення фосфодіефірного зв'язку, але

не за продуктами реакції, а за безпосереднім **сигналом від основи у складі приєднаного нуклеотиду** (рис. 5.38).

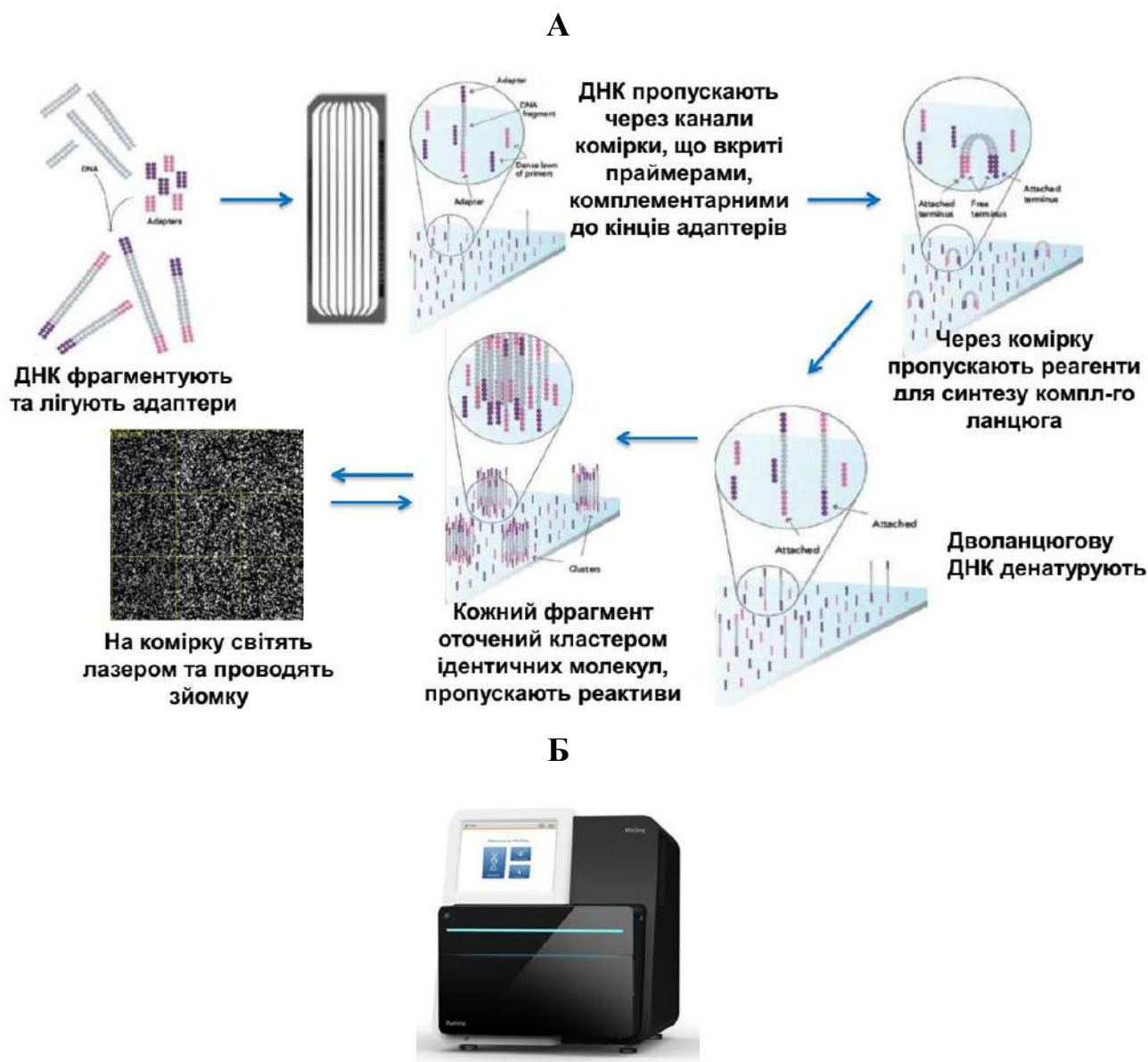


Рис. 5.38. Схеми секвенування (А) шляхом синтезу з оборотним термінуванням (платформа «Illumina»). Секвенатор «Illumina MiniSeq» (Б). Пояснення в тексті. Адаптовано з [39]

У цьому підході має бути забезпечене приєднання лише одного нуклеотиду за цикл за рахунок використання 3'-блокованих трифосфатів, а також мітка основи повинна відносно легко від'єднуватися. Під час роботи додаються 4 термінуючі флуоресцентно-мічені нуклеотиди, на яких синтез

зупиняється завдяки блокованим 3'-фосфатам. Детекція відбувається завдяки зчитуванню флуоресцентного сигналу спеціальною фотоматрицею.

Переваги платформи «Illumina»: висока точність при невеликій довжині прочитання, універсальність, продуктивність (600 Гб за одне прочитання); доступність програм для обробки та аналізу результатів; найнижча вартість секвенування (в перерахунку на один нуклеотид і 1 Гб).

Недоліки платформи «Illumina»: висока вартість реактивів; ускладнення із секвенуванням повторів (їх важко як правильно зібрати, так і потім аналізувати внаслідок наявності численних помилок); короткі прочитання (ріди) – reads – (на сьогодні, уже до 250 нуклеотидів); помилки у GC-збагачених ділянках; загалом, середня частота помилок при прочитанні становить 0,5 %, тобто одна помилка на 200 нуклеотидів.

Є, звісно, ще довгі прочитання – **long reads seq** – від платформи «**Nanopore**» чи «**PacBio**», але для повногеномних проєктів вони використовуються разом з короткими від «Illumina». Це відбувається тому, що в перших рівні помилок – error rates – значно вищі, але довгі прочитання дуже сильно покращують і полегшують збірку. Саме тому використовують, як правило, **гібридний підхід (hybrid approach)**, але це є актуальним для збірок геномів *de novo*, що для більшості комерційних компаній (наприклад, «**Veritas Genetics**») для повногеномного секвенування не є актуальним.

Однак, незважаючи на наявність технологій із високою пропускнуою здатністю, вважається, що **дидезоксинуклеотидний метод** до сих пір залишається «**золотим стандартом**» визначення нуклеотидної послідовності ДНК і широко використовується як у науково-дослідних роботах, так і в діагностиці. Проте, потрібно зважати на наступний нюанс: точність самої реакції не відрізняється від такої в «Illumina», однак оскільки **ріди** цієї платформи є **коротшими**, то **ймовірність помилок при збірці зростає**. Але цей недолік можна успішно подолати за допомогою **збільшення глибини секвенування (sequencing depth)** та комбінування з довгими рідками.

Під глибиною секвенування спрощено розуміють – у скільки разів вихідні дані більші за очікуваний розмір генома. Наприклад, якщо у людини геном 3 Гб, а отриманих даних після секвенування 90 Гб, то можна говорити про глибину секвенування у 30X (і це не є зовсім тотожним покриттю, яке можна побачити тільки після картування рідів при збірці). Найнижчий допустимий показник точності (ассурасу) для «Illumina» Q30 = 99,9 %, тобто 1 помилка на 1 т.п.н., якщо геном 3 млрд п.н. (Гб), то помилок може бути 3 мільйони. Також в «Illumina» можуть бути рідки Q40, Q50 і навіть Q80, це означатиме 99,99 % 99,999 % і 99,999999 % показник точності, що, у свою чергу, зменшує кількість помилок порівняно з Q30 у 10, 100 та 100000 разів відповідно.

Так, за допомогою цієї платформи можна проводити **неінвазивну діагностику захворювань плода по фетальній ДНК у материнському кровотоці**. Уже в перший місяць вагітності в крові жінки починають циркулювати фетальні ДНК. А до 10-го тижня концентрація цих макромолекул досягає такого рівня, що їх можна виділити для генетичного аналізу – і виявити найпоширеніші **хромосомні аномалії** за допомогою секвенування нового покоління.

Потірно зазначити, що **бар'єр вартості секвенування генома людини продовжує знижуватися**. Так, у 2016 році «Veritas Genetics» почала надавати послуги з повногеномного секвенування цілих геномів, включно з оформленням звітної документації, за 999 доларів. У 2017 році «BGI» проводило секвенування нового покоління за 600 доларів. У 2019 року «Veritas Genetics» скоротив вартість NGS до 599 доларів. На сьогодні, у США є багато провайдерів, які пропонують повногеномне секвенування від 999 до 399 доларів.

На сьогодні, секвенування стає ще набагато дешевше, а ринок NGS характеризується надзвичайною конкуренцією. Так, основний лідер ринку «Illumina», представив серію приладів «NovaSeq X», що дасть змогу знизити вартість секвенування геному людини до 200 доларів, а результати можна буде отримати вдвічі швидше.

У той же час нові компанії також намагаються розробити платформи та підходи, які коштуватимуть ще дешевше. Так, на початку 2023 р. стартап-компанія «Ultima Genomics» (США) заявила, що її прилад зможе секвенувати геном всього за 100 доларів.

З огляду на те, що вартість тестування одного гена в діагностиці спадкових захворювань може коливатися в широких межах: від 100 до декількох тисяч доларів, можна зробити висновок, що **секвенування цілого генома коштує менше ніж тестування певного окремого гена вищезазначеними підходами і є інформативним та економічно вигідним** знаряддям при діагностуванні спадкових і неспадкових патологічних станів.

5.4. Основи генної терапії

Генна терапія дає надію на подолання генетичних захворювань. Із розвитком технології рекомбінантної ДНК велика кількість ензимів та структурних білків стали доступними для **терапевтичного використання**. Існують різні варіанти компенсації функції дефіцитних генів, наприклад, **замісна ензиматична терапія** (доставка ферментів через кровотік). Більш перспективна альтернатива – **генна терапія** – полягає у **введенні нормальних генів у соматичні чи статеві клітини** з порушеннями в геномі з метою корекції генетичних захворювань.

Генна терапія соматичних клітин реалізується одним із двох способів: ***in vivo*** або ***ex vivo*** (рис. 5.39). Як показано на рисунку, для генної терапії ***in vivo*** терапевтичний ген **вводиться в цільову тканину пацієнта** за допомогою **вірусних векторів, ліпосом, полімерів, пептидів**. Генна терапія ***ex vivo*** передбачає **збирання та культивування стовбурових клітин ураженої особи**, введення терапевтичного гена в ці культивовані клітини (за допомогою **вірусних векторів, ліпосом, полімерів, а також шляхом електропорації**), вирощування клітин із терапевтичним геном (**gene editing**), а потім пересадку

цих клітин назад пацієнту. Найбільшою перешкодою для розробки терапевтичних засобів на основі нуклеїнової кислоти є **труднощі з доставкою цих агентів** до їх цільової(их) тканини(н).

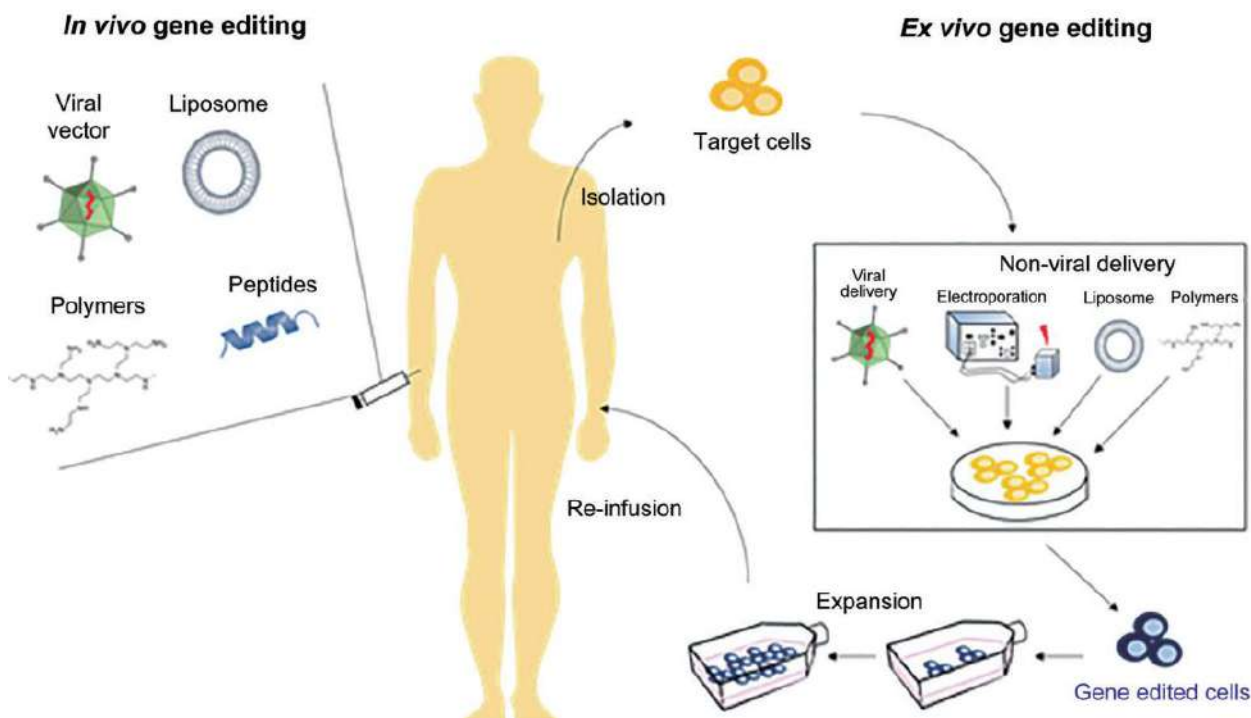


Рис. 5.39. Загальна схема підходів генної терапії: *in vivo* або *ex vivo*, застосовних як до редагування генів, так і до перенесення генів. Пояснення в тексті. Запозичено з [76]

У 1990 році було проведено **перше клінічне випробування** методу генної терапії у США – спроба терапії важкого комбінованого імунodefіциту (також алімфоцитоз, синдром Глянцмана-Рінікера, синдром важкого комбінованого імунodefіциту та тимічна алімфоплазія; **SCID** – Severe combined immunodeficiency).

У 2000 році – успішне лікування вродженої краснушної інфекції у двох новонароджених.

У лютому 2020 року в США обстеження трьох пацієнтів, хворих на рак, показало **безпечність використання CRISPR** технологій для редагування генома.

Генна терапія не завжди є безпечною. У 1999 році було проведено невдалу генну терапію орнітин-транскарбамілази (ОТК)-дефіциту у 18-річного хлопця: смерть через масовану імунну відповідь внаслідок використання **аденовірусу** як вектору доставки гена.

Вимоги до випробувань суттєво зросли після ряду невдалих випадків. **Основна проблема** – розробка **високоєфективної, тканино/клітиноспецифічної та неімуногенної системи** доставки.

Для доставки терапевтичних генів були розроблені **численні вірусні системи**. Перевагою вірусних векторів є їх здатність як до проникнення в певну клітину, захищаючи терапевтичну ДНК від деградації, так і до спрямовування її до клітинного ядра.

Частіше всього використовують **вектори** на основі (рис. 5.40):

- Ретровірусів;
- Аденовірусів;
- Адено-асоційовані вірусів;
- Вірусів на основі HSV (вірус простого герпесу).



Рис. 5.40. Віруси, які найчастіше використовуються в якості векторів у генній терапії. Пояснення в тексті. Адаптовано з [24]

Доставка генів вірусом має назву **трансдукція**. Клітини, що отримали трансген, – **трансдуковані**.

Ключовими вимогами до вірусних векторів є:

- 1) Безпечність та низька токсичність (чи буде впливати на вже набутий імунітет господаря, спричинюючи небажану потужну імунну відповідь);
- 2) Генетична стабільність;
- 3) Клітинна специфічність;
- 4) Розмір, і, відповідно, максимальний розмір вставки;
- 5) Здатність інфікувати клітини, що діляться або не поділяються;
- 6) Здатність інтегруватися в геном реципієнта, зокрема, в певне місце;
- 7) Наявність селективного маркера.

Дефіцит аденозиндезамінази (дефіцит АДА) – це метаболічний розлад, що викликає імунodefіцит (другий за поширеністю тип важкого комбінованого імунodefіциту). Такий стан викликано мутаціями гена *ADA*. На його частку припадає приблизно 10-15 % усіх випадків аутосомно-рецесивних форм важкого комбінованого імунodefіциту (**SCID**) серед не-інбредних груп населення.

На рисунку 5.41 представлено загальну схему використання **ретровірусного вектора (*ex vivo*)** задля лікування важкого комбінованого імунodefіциту: злиття плазмід, яка несе клонований людський ген *ADA* із дефектним ретровірусом; інфікування отриманою конструкцією Т-клітин пацієнта з SCID; вирощування культури клітин з активним трансдуковним геном *ADA*; введення ГМ клітин пацієнту.

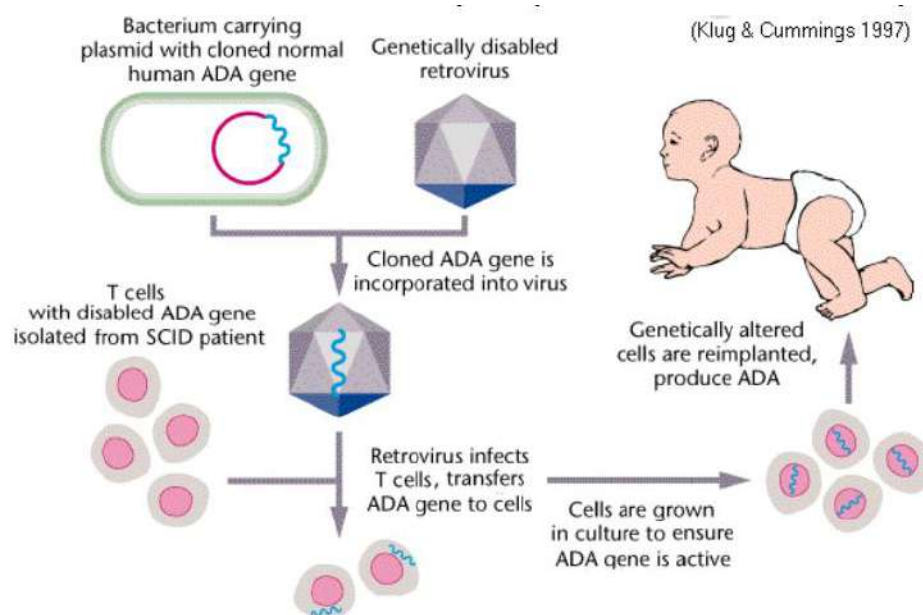


Рис. 5.41. Загальна схема використання ретровірусного вектора для лікування важкого комбінованого імунodefіциту. Пояснення в тексті. Запозичено з [18]

«Фракція аутологічних клітин, збагачена CD34+, яка містить клітини CD34+, трансдуковані ретровірусним вектором, що кодує послідовність кДНК ADA людини» – це звичайна назва терапії, що з 2017 року продається під торговою маркою «**Strimvelis**» («Orchard Therapeutics», Нідерланди) і являє собою ліки, які використовуються для лікування важкого комбінованого імунodefіциту через дефіцит аденозіндезамінази (ADA-SCID) для пацієнтів, у яких немає відповідного донора стовбурових клітин, що відповідає людському лейкоцитарному антигену (HLA). Також це лікування є **першою аутологічною генною терапією *ex vivo***, схваленою Європейським агентством із лікарських засобів (European Medicines Agency, EMA).

Ця терапія є **індивідуальною** для кожного пацієнта. Спочатку гемопоетичні стовбурові клітини вилучають з організму людини і очищають, так що залишаються тільки клітини, які експресують CD34. Ці клітини культивують із цитокінами та факторами росту, потім проводять **трансдукцію гаммаретровірусом**, який містить ген аденозіндезамінази людини (що спочатку був клонований у бактеріальному векторі – плазміді), і потім вводять

цій самій людині. Зазначені клітини приживаються в кістковому мозку людини, реплікуються і створюють клітини, які дозрівають і створюють нормально функціонуючий білок аденозіндезамінази, лікуючи порушення.

У 2021 році ціна на лікування цим препаратом становила 594000 євро, що **вдвічі перевищує річну вартість ін'єкцій замісної ферментативної терапії**. Замісна ферментативна терапія АДА вимагає щотижневих ін'єкцій і коштує близько 4,25 млн доларів США для одного пацієнта старше десяти років.

Незважаючи на доведений терапевтичний ефект, найпоширенішим побічним ефектом є пірексія (лихоманка), гемолітична анемія (низька кількість еритроцитів через їх занадто швидке руйнування), апластична анемія (низька кількість клітин крові через пошкодження кісткового мозку), гепатит, тромбоцитопенія (низька кількість тромбоцитів у крові) та синдром Гійєна-Барре (пошкодження нервів, що може спричинити біль, оніміння, м'язову слабкість та утруднення при ходьбі), а також лейкемія.

Вивчення антиретровірусних (ВІЛ) препаратів на основі інтерферуючих РНК у псевдовірус-клітинної системі. Було показано успішне застосування розробленої псевдолентівірус-клітинної системи для оцінки ефективності антиретровірусних сполук на основі інтерферуючих РНК (РНКі), спрямованих проти консервативних сайтів-мішеней у послідовності генів білка вірусного капсида (*gag*), зворотної транскриптази та полімерази (*pol*).

Псевдолентівіруси – це лентівірусний капсид з усіма ферментами ВІЛ, але без деяких регуляторних і додаткових білків вірусу; біліпідна оболонка псевдовіруса може включати гомологічні або гетерологічні (псевдотипуючі) вірусні поверхневі білки злиття: поверхневі білки вірусів везикулярного стоматиту, грипу, Ебола, сказу, гепатиту С тощо.

Псевдовірусні частки фізіологічно майже не відрізняються від істинного вірусу ВІЛ-1 і відтворюють реплікаційний цикл вірусу у всіх стадіях, аж до інтеграції провірусу, але **без утворення потомства в заражених клітинах**. Звідси їх друга назва – **віруси одного циклу інфекції** (single cycle infection

virus): ймовірність виникнення в експериментах із ними реплікаційно компетентного вірусу дуже мала, у зв'язку з чим **безпека** їх використання для вивчення антивірусних препаратів набагато **вища**, а вартість робіт нижче, ніж при використанні інфекційних ізолятів ВІЛ-1.

Було показано *in vitro* залежність ефективності інгібування утворення псевдовірусних частинок у культурі клітин-продуцентів за допомогою анти-ВІЛ **shРНК** від кількості одонуклеотидних невідповідностей у сайті-мішені між послідовностями shРНК і лентівірусним геномом. Так, тільки shРНК з не більше ніж однією нуклеотидною заміною володіли високою ефективністю інгібування (60-90 %). Така псевдолентівірус-клітинна система вважається ідеальною для **безпечного скрінінга антиретровірусних інтерферуючих РНК**.

CRISPR/Cas9. На сьогодні, на основі аналізу літературних даних можна стверджувати, що кількість успішних експериментів по застосуванню цієї системи та її модифікацій зростає з кожним місяцем. Лінії клітин, модифікованих за допомогою CRISPR-Cas, можуть використовуватися як **моделі різних захворювань людини**. Окрім цього, як приклад можна привести роботи з **лікування** найрізноманітніших захворювань людини: **вірусних** (у тому числі ВІЛ-інфекції та герпесвірусних інфекцій); **алергії** та імунологічних захворювань (у тому числі аутоімунних), **онкологічних, нейродегенеративних, серцево-судинних** захворювань та навіть ревматизму, а також **спадкових** розладів – таких, як синдром Дауна, серповидно-клітинна анемія, пігментний ретиніт, β -таласемія тощо.

У березні 2020 року була проведена операція по введенню дози ліків «AGN-151587», також відомих як «**EDIT-101**» (зроблені на основі технології **CRISPR/Cas9**). Вона була спрямована на лікування хвороби – **амавроз Лебера** (Leber Congenital Amaurosis type 10 (**LCA10**)). Препарат вводився через субретинальну ін'єкцію в досліджуване око (рис. 5.42).

LCA10 викликається мутацією розташованого на 12-й хромосомі гена центросомного білка 290 (*CEP290*), який необхідний для розвитку та належної

функції клітин **фоторецепторів** (рис. 5.42). Глобальна захворюваність оцінюється в межах від двох до трьох на 100000 новонароджених у всьому світі. За оцінками «Editas» (клінічна біотехнологічна компанія, яка розробляє методи лікування, засновані на технології редагування генів CRISPR-Cas9; знаходиться в Кембриджі, штат Массачусетс) у США та Європі є від 2000 до 5000 пацієнтів із цим захворюванням.

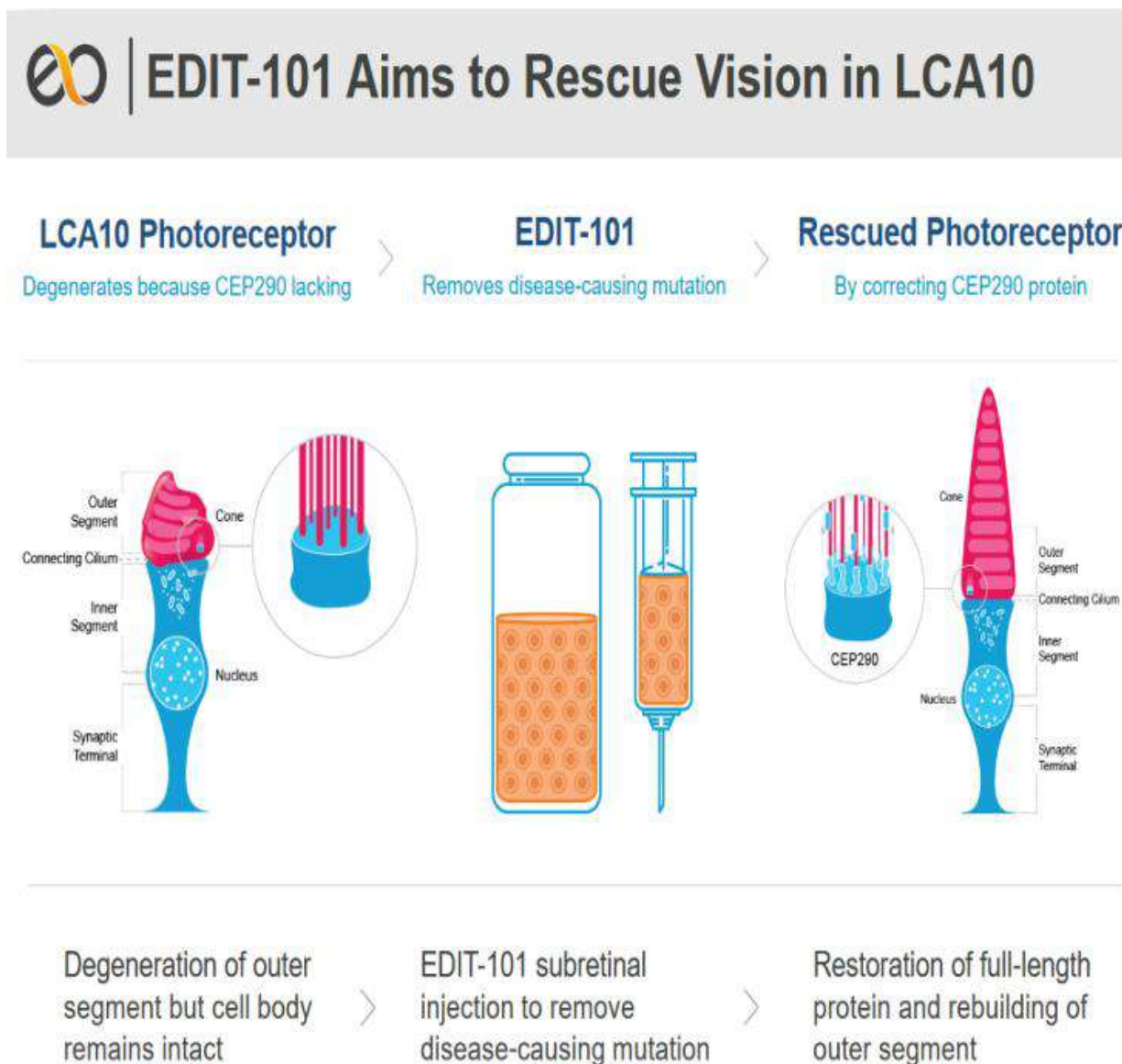


Рис. 5.42. Загальна схема лікування хвороби амавроз Лебера (Leber Congenital Amaurosis type 10 (LCA10)) за допомогою ліків «EDIT-101». Пояснення в тексті. Запозичено з [38]

«AGN-151587» («EDIT-101») полегшує редагування, опосередковане введенням адено-асоційованого вектора AAV5 для доставки ДНК, що кодує **SaCas9**), розробленого «Editas» (рис. 5.43).

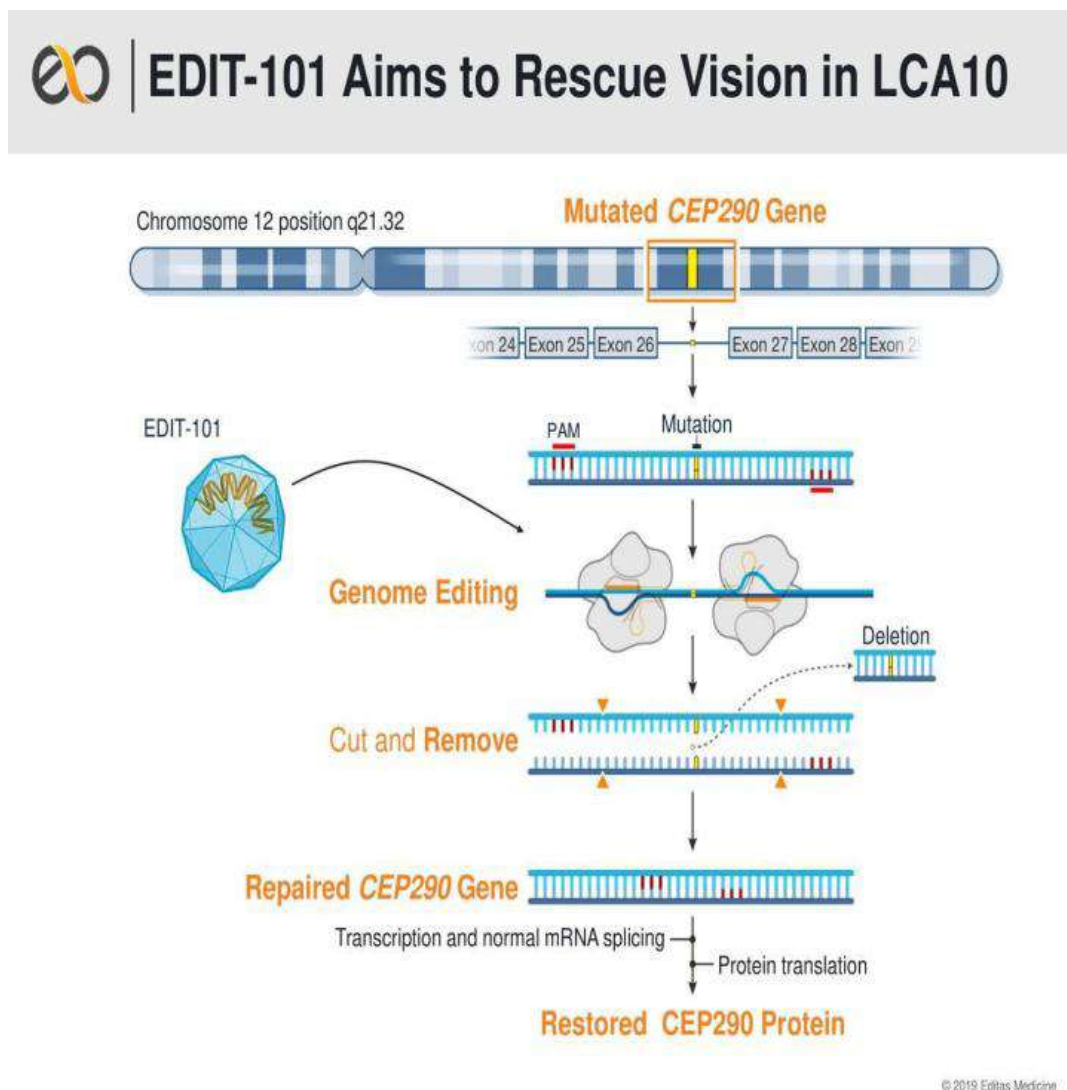


Рис. 5.43. Загальна схема усунення хвороботворної зміни нуклеотидів при амаврозі Лебера за допомогою ліків «EDIT-101» (зроблених на основі технології CRISPR/Cas9). Пояснення в тексті. Запозичено з [38]

Як видно на рисунку 5.43, вищезазначений підхід здатний усувати хвороботворні зміни нуклеотидів за рахунок вирізання визначеної ділянки в **інтроні** гена *CEP290* для відновлення як нормальної експресії білка, так і функції клітин – фоторецепторів.

На додаток до вірусних векторів, згаданих вище, **невірусні підходи** для доставки терапевтичних засобів на основі НК включають: **прямую ін'єкцію** в уражене місце; упаковку нуклеїнової кислоти в **катіонні ліпосоми** – **ліпоплекси (Lipoplexes)**, **полімери, полімерсоми (Polymersomes)**, **дендримери** (сильно розгалужена макромолекула сферичної форми); злиття нуклеїнової кислоти з іншою молекулою (наприклад, **ліпід, холестерин, фрагмент антитіла, пептиди, що проникають у клітини (Cell-penetrating peptides (CPPs))**; **транспозон або аптамер**; **міРНК, мікроРНК** тощо); використання **неорганічних нанотрубок і наночастинок**: **золото, кремнезем, оксид заліза** (наприклад, **магнітофекція**), **фосфати кальцію**; тощо (рис. 5.39, 5.44). Такі підходи, розглядаються, як **більш безпечні**, але деякі з них можуть бути не надто ефективними й вимагають великої кількості ДНК для успішного введення реципієнту.

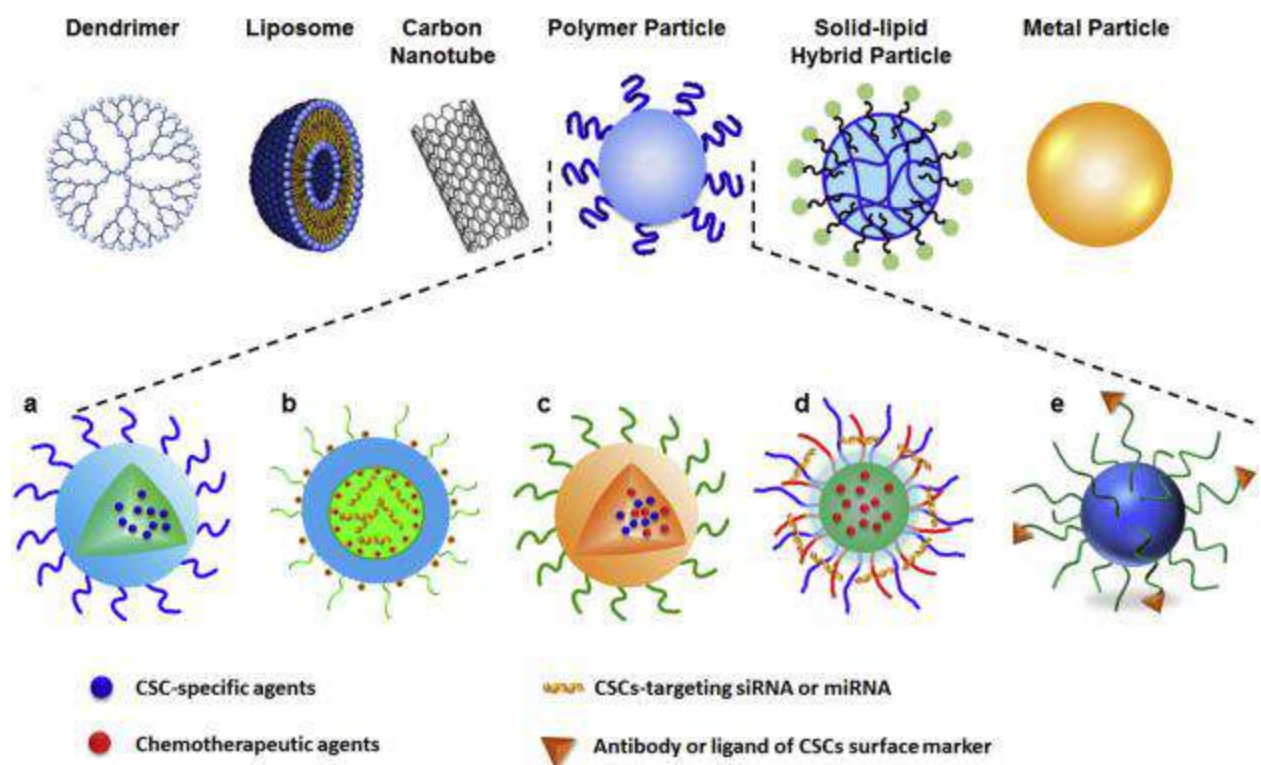


Рис. 5.44. Приклади невірусних та гібридних підходів для доставки терапевтичних засобів на основі нуклеїнових кислот. Пояснення в тексті. Запозичено з [74]

Також, на сьогодні, розробляються й **гібридні підходи** (рис. 5.45), наприклад, **віросоми (virosomes)**. Вони **поєднують ліпосоми з інактивованим вірусом ВІЛ або грипу**. Було показано, що це забезпечує **більш ефективне перенесення генів** у респіраторні епітеліальні клітини, ніж вірусні або ліпосомальні методи поодиночі. Інші гібридні методи передбачають **змішування інших вірусних векторів з катіонними ліпідами** або **гібридизацію вірусів**.

Отже, вищезазначені методи генної терапії можуть бути використані або для лікування генетичних захворювань людини, або для зменшення чи запобігання захворюванням, викликаним патогенними вірусами та іншими хвороботворними організмами. Ключовими вимогами до генної терапії є ефективна та безпечна доставка терапевтичного гена до певної тканини в достатній кількості, щоб введений ген міг полегшити перебіг певного генетичного розладу.

5.5. Біонанотехнологія: наномашини, біосенсори

Біонанотехнологія – це розділ нанотехнології, в якому задані атомні перебудови здійснюються із залученням принципів, методів та способів, «підказаних» біологією (рис. 5.45). Для біонанотехнології є обов’язковим інженерне конструювання та збірка необхідних «конструкцій» на нано-рівні, що не властиво класичній біотехнології.

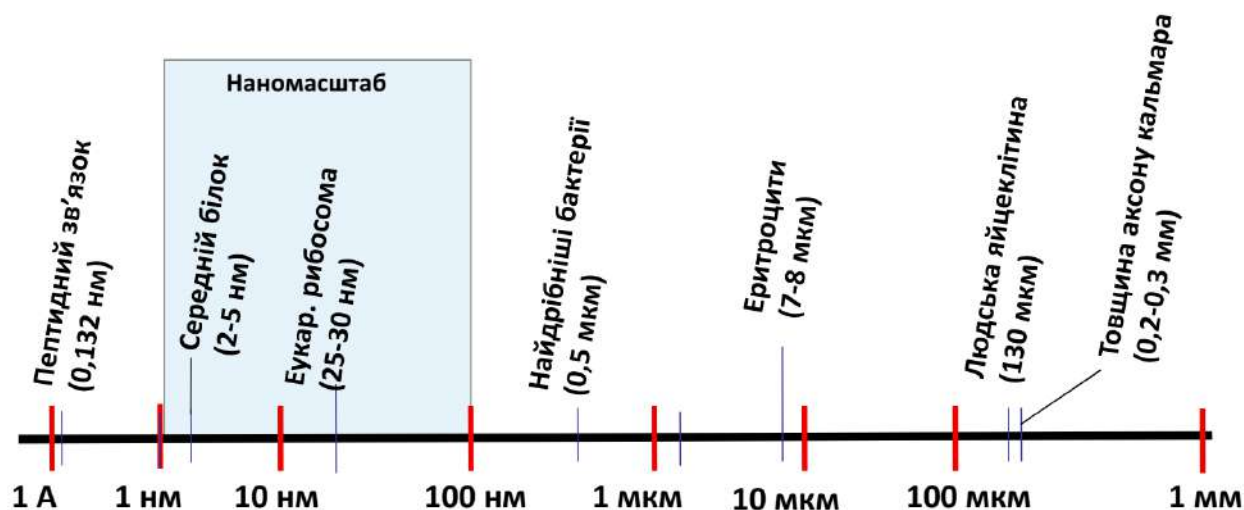


Рис. 5.45. Приклад наночастинок, які відносяться до наномасштабу.

Пояснення в тексті

Наночастинка – це ізольований твердофазний об'єкт, що чітко відмежований від навколишнього середовища та має розміри в усіх трьох вимірах від 1 до 100 нм (рис. 5.45).

Технологічні підходи в нанотехнології. Збірка «від малого до великого» (bottom-up approach) – нанооб'єкт збирається з окремих структурних елементів (атомів). Це властиво біологічним об'єктам: мономері → полімери → надмолекулярні комплекси → субклітинні структури → клітини → тканини тощо (рис. 5.46).

Альтернативний (більш популярний) підхід – «згори вниз» (top-down approach) – береться «заготівля», від якої різними інструментами та технологічною обробкою відсікається все зайве (рис. 5.46).

«Молекулярний збірник» (асемблер) – це молекулярний механізм, створений за допомогою нанотехнологій), що здатний збирати цільові нанооб'єкти атом за атомом за заданою програмою. Поки що це теоретична концепція, реальних асемблерів не існує.



Рис. 5.46. Приклади технологічних підходів у нанотехнології.
Пояснення в тексті

Молекулярні (нано)машини. Молекулярна (нано)машина – це будь-яке молекулярне утворення, що здійснює квазімеханічні рухи у відповідь на специфічні стимули. Виділяють синтетичні та біологічні наномашини. Організм людини містить понад 10000 молекулярних наномашин, деякі з яких здатні функціонувати поза організмом.

Особливості нанорівня:

- гравітацією та інерцією можна знехтувати;
- наномашинам властива атомна гранулярність (існують лише в кількох визначених станах);
- тепловий рух має велике значення;
- біонаномашини потребують водного оточення.
- значна роль гідрофобного ефекту.
- компоненти пов'язані складним набором взаємодій (зв'язуючих та антизв'язуючих);
- переважна більшість біологічних наномашин мають білкову природу; рідше – ліпідну чи нуклеїнову.

Моделювання наномашин на комп'ютері принципово не відрізняється від моделювання макрооб'єктів за допомогою різних підходів на платформ (рис. 5.47).

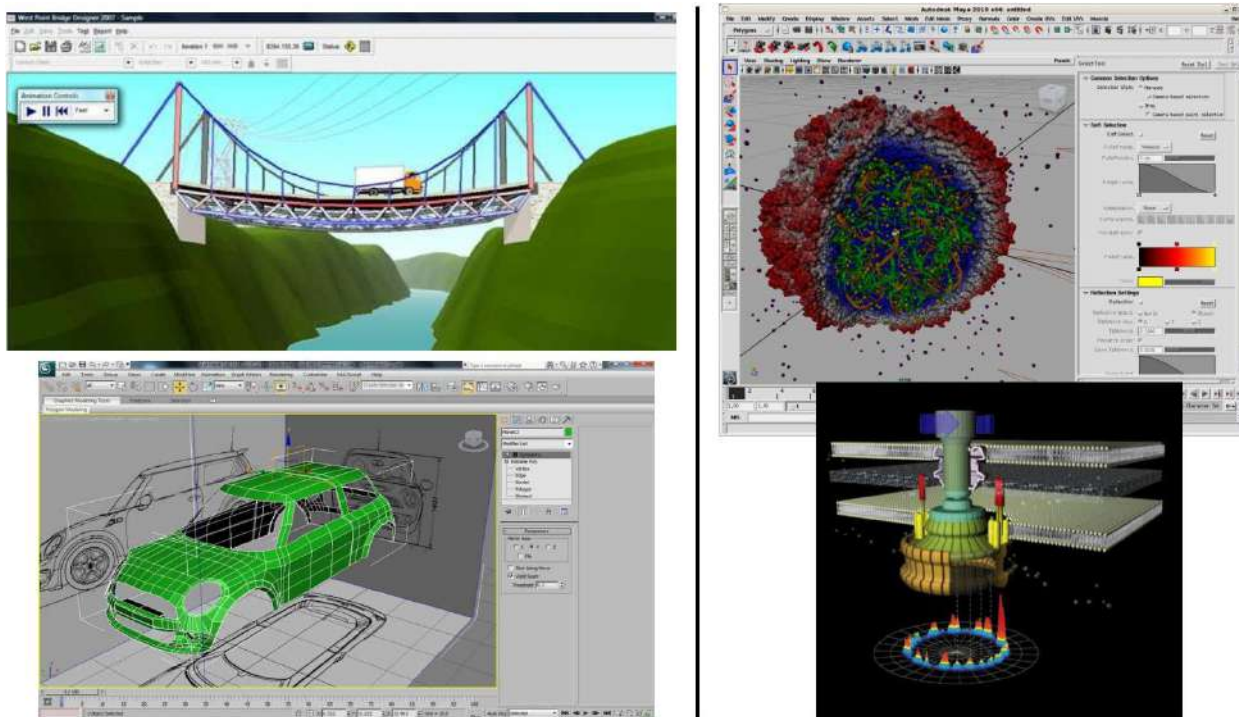


Рис. 5.47. Приклад моделювання макрооб'єктів та наномашин на комп'ютері. Пояснення в тексті. Запозичено із сайтів вищезазначених платформ «Autodesk 3ds Max», «West Point Bridge Designer»

Так, як приклад, можуть бути використані: «Autodesk 3ds Max» (професійне програмне забезпечення для 3D-моделювання, анімації і візуалізації при створенні ігор і проектуванні тощо); «West Point Bridge Designer» (безкоштовне моделювання для базового проектування мостів) тощо (рис. 5.47).

Приклади синтетичних наномашин:

- молекулярні мотори;
- молекулярні пропелери;
- молекулярні перемикачі;
- молекулярні шатли;
- молекулярний пінцет;
- молекулярні сенсори;
- молекулярні ворота.

Приклади біологічних наномашин:

- моторні білки (міозин, динейн, кінезин)
- рибосоми.

Важливо, що переважна більшість цих наномашин працює і поза організмом, що дозволяє використовувати їх у біотехнологічних цілях.

Самозбірка – процес, в ході якого невідпорядкована система з кількох компонентів без зовнішнього впливу формує впорядковану структуру.

Змодельовані штучні наномашини. На сьогодні досягнуто такий рівень технологій, що біотехнологи здатні проектувати наномашини *in silico* та будувати (вирощувати) їх атом за атомом. На сьогоднішній день створено десятки штучних наномашин (рис. 5.48). Комбінування біологічних машин з неорганічними структурами (наприклад, антитіл та кремнієвих підложок) дозволяє створювати *гібридні прилади*.



Рис. 5.48. Приклад змодельованих штучних наномашини. Пояснення в тексті. Запозичено з <https://www.nature.com/articles/nnano.2007.104/boxes/bx1>

Біосенсиори. Це аналітичні прилади, що призначені для детекції аналітів та складаються з двох частин – біологічної (сенсор) та фізико-хімічної (детектор, перетворювач).

Біосенсиори передають сигнали двома шляхами: або змінюючи форму у відповідь на стимули, або відкриваючи канал/пору для іонів.

Сприйняття специфічних молекул досягається шляхом створення специфічних сайтів зв'язування в рецепторах.

Приклади сучасних біорецепторів:

- Антитіло/антиген;
- Фермент/субстрат;
- Нуклеїнові кислоти, аптамери (олігонуклеотиди, які можуть специфічно зв'язуватись з протеїном або іншою мішенню; приєднаний аптамер дезактивує протеїн, приводячи таким чином до активації чи дезактивації гена; у біохімії використовується при встановленні функцій окремих ділянок протеїнів).

Підсумки. Крім виявлення **генетичних, онкологічних та інфекційних захворювань людини** вищезазначеними молекулярно-біологічними підходами, медична біотехнологія має важливе застосування в **сільському господарстві, моніторингу навколишнього середовища, криміналістиці, судовій експертизі** тощо.

Розробка ефективних методів лікування генетичних захворювань була важкодосяжною, тому що в багатьох випадках відповідний генний продукт не міг бути наданий пацієнтові. Однак, коли нормальну версію гена було ідентифіковано й клоновано, його або відповідну кДНК можна безпосередньо використати для усунення знайденого дефекту у пацієнта. Для цього розробляються та вдосконалюються **вірусні й не вірусні системи доставки терапевтичного гена** в уражений організм реципієнта, у тому числі, з огляду на безпеку запропонованих підходів генної терапії.

З іншого боку, аналізується продуктивність та безпека підходів генетичної імунізації від вірусних, бактеріальних, паразитарних і навіть онкологічних захворювань людини.

За допомогою біонанотехнології здійснюється вивчення **біологічних машин**. Застосування принципів побудови та функціонування біологічних будівельних блоків, у свою чергу, використовується для вирішення інженерних завдань та створення нових областей технологічного розвитку. Вивчення структури і функцій внутрішніх механізмів біологічних систем, таких як клітини, бактерії і віруси, буде використано для поліпшення існуючих програм **нанотехнології** та для розробки абсолютно **нових підходів медичної біотехнології на доданок до існуючих методів генної інженерії**.

Контрольні запитання:

1. Опишіть біофлуоресцентні та біоломінесцентні системи детекції.
2. Як, на сьогодні, було створено нові форми флуоресцентних білків?
3. Наведіть приклади біологічних наномашин. Що таке біонанотехнологія?
4. Опишіть ідентифікаційний аналіз при проведенні експертизи спірного батьківства.
5. Які види антитіл використовуються в ІФА?
6. Як кількісно проаналізувати вміст певного білка методом ІФА?
7. Принцип конкурентного (інгібуючого) ІФА.
8. Який фермент каталізує реакцію, спряжену з утворенням світла?
9. Що таке подвійна люціферазна репортерна система аналізу?
10. Які елементи має діагностична система, що базується на гібридизації?
11. Опишіть схему хемілюмінісцентної детекції цільової ДНК за допомогою біотин-стрептавідинової системи.
12. Опишіть схему детекції муковісцидозу методом алель-специфічної гібридизації ДНК.
13. Аналіз лігування олігонуклеотидів. Принцип. Застосування.
14. Опишіть принцип функціонування Padlock-зонда.

15. На чому заснований сучасний метод ДНК-профілювання?
16. Скільки тандемних повторів входить у сучасний набір «CODIS»?
17. Переваги діагностичних тестів на основі ПЛР.
18. Опишіть принцип дії різновидів ПЛР: «FLASH» та ГіФа.
19. Опишіть застосування алель-специфічної ПЛР. «Конкурентний олігопраймінг».
20. TaqMan проби для моніторингу мікроорганізмів, що викликають низку інфекційних захворювань.
21. Опишіть схему детекції продуктів ПЛР у реальному часі за допомогою «молекулярних маячків».
22. Чому цифрова полімеразна ланцюгова реакція є більш точним методом діагностики порівняно з ПЛР у реальному часі?
23. Принцип дії за сфери застосування ДНК-мікрочипів
24. Що таке персоналізована медицина?
25. Переваги та недоліки платформи «Illumina».
26. Опишіть схему секвенування шляхом синтезу з оборотним термінуванням.
27. Що можна сказати про бар'єр вартості секвенування генома людини, на сьогодні?
28. Порівняйте спосіб генної терапії соматичних клітин *in vivo* та *ex vivo*.
29. Які віруси найчастіше використовуються в якості векторів у генній терапії?
30. Назвіть ключові вимоги до вірусних векторів.
31. CRISPR/Cas9 у генній терапії людини.
32. Навдіть приклади невірусних та гібридних підходів для доставки терапевтичних засобів на основі нуклеїнових кислот.
33. Загальний принцип створення ДНК- та РНК-вакцин.

ТИПОВІ ТЕСТОВІ ЗАВДАННЯ

1) Назвіть специфічні системи детекції в ПЛР у реальному часі

- 1) інтеркалюючий барвник SYBR Green I
- 2) лінійні проби, що руйнуються, - TaqMan
- 3) мічені праймери ампліфлури
- 4) праймери-проби («скорпіони»)
- 5) проби з інвертованими повторами («молекулярні маячки»)

2) Яка з модифікацій системи CRISPR/Cas дозволяє активувати мішені за рахунок доставки транскрипційних активаторів до енхансерів цільових генів?

- 1) CRISPR/wtCas9
- 2) CRISPR/Cas9 D10A
- 3) CRISPR/GFP
- 4) CRISPR/dCas9
- 5) CIRSPR/FokI

3) Вектори, які запропоновано використовувати в генній терапії людини, є на основі

- 1) ротавірусів
- 2) тогавірусів
- 3) дріжджових штучних хромосом
- 4) респіроцитів
- 5) аденовірусів

4) Вектори на основі Ті-плазмід повинні містити:

- 1) гени вірулентності та ARS
- 2) цілісну ділянку Т-ДНК Ті плазмід *Agrobacterium tumefaciens*
- 3) полілінкер, ориджин *A. tumefaciens*

- 4) ориджин *E. coli* + *A. tumefaciens*, *vir* гени, гени опінів
- 5) гени ауксинів, *vir* гени, «кілерний ген»

5) Яким чином можна швидко відібрати особу чи клітину, в яких відбулася специфічна інтеграція трансгена в певне місце генома?

- 1) схрещуванням за спеціальною схемою
- 2) рестрикційним аналізом
- 3) ПЛР
- 4) ІФА
- 5) ЗТ-ПЛР

6) Найбільш поширена з існуючих технологій NGS:

- 1) метод зворотніх термінуючих нуклеотидів («Illumina»)
- 2) метод Сенгера
- 3) секвенування з обривом ланцюга, що зростає
- 4) піросеквенування
- 5) метод прямих термінуючих нуклеотидів («Illumina»)

7) Назвіть неспецифічну систему детекції в ПЛР у реальному часі

- 1) інтеркалюючий барвник SYBR Green I
- 2) TaqMan
- 3) ROXS
- 4) бромфеноловий синій
- 5) інтеркалюючий барвник – бромистий етидій

8) Яка з перерахованих генетично модифікованих культур донедавна офіційно не вирощується в жодній з країн світу?

- 1) трансгенна кукурудза
- 2) трансгенна пшениця
- 3) трансгенний ріпак

- 4) трансгенна картопля
- 5) трансгенна бавовна

9) Трансдуковані клітини – це:

- 1) клітини, в яких один із сигнальних шляхів було транс-активовано
- 2) ембріональні стовбурові клітини, що було штучно введено в стан спокою
- 3) клітини, в які було успішно внесено трансген у складі плазмідного вектора
- 4) клітини, в які було успішно внесено трансген у складі вірусного вектора
- 5) клітини, в які було успішно внесено трансген методом мікроін'єкції ДНК

10) Внесення трансгенів для синтезу антитіл проти цільових антигенів в організмах тварин має назву:

- 1) *in vitro* імунізація
- 2) зворотна вакцинологія
- 3) *in vivo* імунізація
- 4) *ex vivo* імунізація
- 5) *in silico* імунізація

11) Оберіть вірні характеристики малих інтерферуючих РНК (siRNAs):

- 1) це одноланцюгові молекули РНК довжиною 19-25 пари нуклеотидів
- 2) використовуються в метода створення нокаутних мишей
- 3) переважно діють лише одну мРНК-мішень
- 4) переважно мають велику кількість мРНК-мішеней
- 5) це дволанцюгові молекули РНК довжиною 21-23 пари нуклеотидів

12) Створення, випробування, транспортування та використання генетично модифікованих організмів в Україні є:

- 1) повністю забороненим
- 2) повністю дозволеним
- 3) дозволеним лише для тих організмів, що внесені до державного реєстру
- 4) дозволеним за умови маркування продукції
- 5) дозволеним за умови частки трансгенів менше 5%

13) Оберіть вірні твердження стосовно використання тварин в якості біореакторів для виробництва цільових білків:

- 1) метод є етично прийнятним
- 2) цільові білки секретуються в молоко
- 3) гени цільових білків зазвичай вносяться в ген лактальбуміну
- 4) гени цільових білків зазвичай вносяться в ген β -казеїну
- 5) вівця Доллі - історична перша тварина-біореактор

14) Оберіть вірні характеристики системи Cre-LoxP:

- 1) дозволяє здійснювати інактивацію генів
- 2) білок Cre має рекомбіназну активність
- 3) білок Cre має ДНК-лігазну активність
- 4) дозволяє тканиноспецифічно нокаутувати гени
- 5) LoxP – це промотор для гена білка Cre

ВІДПОВІДІ НА ТИПОВІ ТЕСТОВІ ЗАВДАННЯ

1	2, 4, 5
2	4
3	5
4	3
5	3
6	1
7	1
8	2
9	4
10	3
11	3, 5
12	3
13	1, 2, 4
14	1, 2, 4.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ТА РЕКОМЕНДОВАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Драницина, А.С., Савчук, О.М., Гребіник, Д.М., Кравченко, О.О., Остапченко, Л.І. «Методичні рекомендації до розділу «Молекулярна біотехнологія» курсу «Загальна біотехнологія» // Електронні методичні вказівки. — https://biomed.knu.ua/images/stories/Kafedry/Biochimiya/Biblioteka/Metodychni_vkazivky_Molekul_biotechology/Metodychni_vkazivky_Molekul_biotechology.pdf, 2018.
2. Каталог фірми «Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Relative Standard Curve and Comparative C_T Experiments» (2010).
3. Каталог фірми «Thermo scientific molecular biology tools product guide» (2012-2013).
4. Малюта, С. С. (1996). Изучение полиморфизма ДНК жителей Украины, выявляемого зондом на основе фага M13. *Цитология и генетика*, 30(1), pp. 31–35.
5. Сиволоб, А. В. (2023). *Молекулярна біологія. Друге видання, виправлене та доповнене: навч. посіб.* Київ: ВПЦ «Київський університет».
6. Abd-Aziz, N., Tan, B. C., Rejab, N. A., Othman, R.Y. and Khalid, N. (2020). A New Plant Expression System for Producing Pharmaceutical Proteins. *Molecular Biotechnology*, 62, pp.240–251.
7. Abdelzaher, H. M., Gabr, A. S., Saleh, B. M., Abdel Gawad, R. M., Nour, A. A. and Abdelanser, A. (2021). RNA Vaccines against Infectious Diseases: Vital Progress with Room for Improvement. *Vaccines*, 9(1211), pp. 31–43.
8. Arnaud, C. H. (2017). Thirty years of DNA forensics: How DNA has revolutionized criminal investigation. *Chemical and engineering news*, [online] 95(37). Available at: <https://cen.acs.org/articles/95/i37/Thirty-years-DNA-forensics-DNA.html> [Accessed 8 Jul. 2022].
9. Bally, J., Fishilevich, E., Doran, R. L., Lee, K., Bolzan de Campos, S., German, M. A., Narva, K. E. and Waterhouse, P. M. (2020). Plin-amiR, a pre-microRNA-

- based technology for controlling herbivorous insect pests. *Plant Biotechnology Journal*, 18(9), pp. 1925–1932.
10. Barbosa, A., Mantovani, H. and Jain, S. (2017). Bacteriocins from lactic acid bacteria and their potential in the preservation of fruit products. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(7), pp. 852–864.
 11. Bath, J. and Turberfield, A. J. (2007) DNA nanomachines. *Nature Nanotechnology*, 2, pp. 275–284.
 12. Buckingham, L. and Flaws, M. (2007). *Molecular diagnostics: fundamentals, methods and clinical applications*. Philadelphia: F.A. Davis Company.
 13. Canto, T. (2016). Transient Expression Systems in Plants: Potentialities and Constraints. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, pp. 287–301.
 14. Cao, J., Zhao, J.-Z., Tang, J., Shelton, A. and Earle, E. (2002). Broccoli plants with pyramided cry1Ac and cry1C Bt genes control diamondback moths resistant to Cry1A and Cry1C proteins. *Theoretical and Applied Genetics*, 105, pp. 258–264.
 15. Chaudhuri, A., Halder, K. and Datta, A. (2022). Classification of CRISPR/Cas system and its application in tomato breeding. *Theoretical and Applied Genetics*, 135, pp. 367–387.
 16. Cheong, K. H., Koh, J. M. and Jones, M. C. (2019). "Black Swans of CRISPR: Stochasticity and Complexity of Genetic Regulation". *BioEssays*., 41(7), 1900032.
 17. CRISPR: Biology and Applications, First Edition. Edited by Rodolphe Barrangou, Erik J. Sontheimer, and Luciano A. Marraffini. © 2022 American Society for Microbiology. DOI: 10.1128/9781683673798.ch11
 18. Cummings, M. R., Klug, W. S. *Concepts of Genetics*. (1997). «Prentice Hall international editions».
 19. El-Sayed, A. S. A., Abdel-Ghany, S. E. and Ali, G. S. (2017). Genome editing approaches: manipulating of lovastatin and taxol synthesis of filamentous fungi by CRISPR/Cas9 system. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 101(10), pp. 3953–3976.

20. Elleuche, S., Schröder, C., Sahm, K. and Antranikian, G. (2014). Extremozymes – biocatalysts with unique properties from extremophilic microorganisms. *Curr Opin Biotechnol*, 29, pp. 116–123.
21. Erlich, H. (1992). *PCR technology: principle and applications for DNA amplification*. New York: W.H.Freeman and Company.
22. Gao, Y., Wu, H., Wang, Y., Liu, X., Chen, L., Li, Q., Cui, C., Liu, X., Zhang, J. and Zhang, Y. (2017). Single Cas9 nickase induced generation of NRAMP1 knockin cattle with reduced off-target effects. *Genome Biology*, 18, p. 13.
23. Gary, E.N. and Weiner, D.B. (2020). DNA vaccines: prime time is now. *Current Opinion in Immunology*, 65, pp. 21–27.
24. Glick, B.R. and Patten, C.L. (2022). *Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA*, 6th ed. Washington DC by «ASM Press».
25. Hahn-Löbmann, S., Stephan, A., Schulz, S., Schneider, T., Shaverskyi, A., Tuse, D., Giritch, A. and Gleba, Y. (2019). Colicins and Salmocins – New Classes of Plant-Made Non-antibiotic Food Antibacterials. *Frontiers in Plant Science*, 10(437), pp. 1–16.
26. https://bpsbioscience.com/catalogsearch/result/index/?_q=NANOLUC&o=NANOLUC&q=nanoluc [Электронный ресурс]
27. <https://indolabutama.com/catalogue/nanoluc-genetic-reporter-vectors/> [Электронный ресурс]
28. https://www.biocat.com/bc/pdf/LR00XX_09508.pdf [Электронный ресурс]
29. <https://www.eurekalert.org/> [Электронный ресурс]
30. www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/countrylist/default.asp [Электронный ресурс]
31. <https://www.neb.com/tools-and-resources/feature-articles/crispr-cas9-and-targeted-genome-editing-a-new-era-in-molecular-biology> [Электронный ресурс]
32. <https://innovativegenomics.org/news/crispr-clinical-trials-2022/> [Электронный ресурс]
33. <https://www.fda.gov/> [Электронный ресурс]

34. <https://jcarrbiomed.com/agrobacterium-tumefaciens/> [Электронный ресурс]
35. <https://tetiivmiskrada.gov.ua/novini/shcho-my-znayemo-pro-hmoroslyny-27-01-2022/> [Электронный ресурс]
36. <https://www.addgene.org/vector-database/1918/> [Электронный ресурс]
37. explorer.bio-rad.com
38. <https://www.genengnews.com/news/editas-wins-fda-approval-for-ind-of-crispr-treatment-for-lca10/> [Электронный ресурс]
39. <http://www.illumina.com/> [Электронный ресурс]
40. <https://www.irri.org/> [Электронный ресурс]
41. <https://www.glofish.com/> [Электронный ресурс]
42. <https://www.planetnatural.com/> [Электронный ресурс]
43. <https://www.scq.ubc.ca/bt-corn-is-it-worth-the-risk/> [Электронный ресурс]
44. <https://med.virginia.edu> [Электронный ресурс]
45. <https://www.woodzymes.eu> [Электронный ресурс]
46. Jazayeri, S. D. and Poh, C. L. (2019). Recent advances in delivery of veterinary DNA vaccines against avian pathogens. *Vet. Res.*, 50(78), pp. 211–223.
47. Ji, Xiao-Jun, Ledesma-Amaro, R. (2020). Microbial Lipid Biotechnology to Produce Polyunsaturated Fatty Acids. *Trends in Biotechnology*, 38(8), pp. 832–834
48. Jin, X., Kightlinger, W. and Hong, S. (2019). Optimizing Cell-Free Protein Synthesis for Increased Yield and Activity of Colicins. (2019). *Methods and Protocols*, 2(2), pp. 1–12.
49. Jolany vangah, S., Katalani, C., Boone, H. A., Hajizade, A., Sijercic, A. and Ahmadian, G. (2020). CRISPR-Based Diagnosis of Infectious and Noninfectious Diseases. *Biological Procedures Online*, 22, pp. 1–14.
50. Kaygusuz, D., Vural, S., Aytekin, A.O., Lucas, S. J. and Elitas, M. (2019). DaimonDNA: A portable, low-cost loop-mediated isothermal amplification platform for naked-eye detection of genetically modified organisms in resource-limited settings. *Biosens Bioelectron*, 15(141), 111409.

51. Kumar, K., Gambhir, G., Dass, A., Tripathi, A.K., Singh, A., Jha, A.K., Yadava, P., Choudhary, M. and Rakshit, S. (2020). Genetically modified crops: current status and future prospects. *Planta*, 251(4), 91.
52. Kumariya, R., Garsa, A., Rajput, Y. S., Sood, S. K., Akhtar, N. and Patel, S. (2019). Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 128, pp. 171–177.
53. Ledford, H. (2020). CRISPR treatment inserted directly into the body for first time. *Nature*, 579, p. 185.
54. Lobato-Gómez, M., Hewitt, S., Capell, T., Christou, P., Dhingra, A. and Girón-Calva P. S. (2021). Transgenic and genome-edited fruits: background, constraints, benefits, and commercial opportunities. *Horticulture Research*, 8, pp. 166.
55. Li, C., and Zhang, J. (2019). Stop-codon read-through arises largely from molecular errors and is generally nonadaptive. (2019). *PLOS Genetics*, 15(5), pp. 1–16.
56. Li, Ying, Ai, Yuqing, Zhang, Junzheng, Fei, Jingxuan, Liu, Bingnan, Wang, Jing, Li, Meng, Zhao, Qiancheng and Song, Jinzhu (2020). A novel expression vector for *Corynebacterium glutamicum* with an auxotrophy complementation system. *Plasmid*, 107, pp. 102476.
57. Litvin, D., Syvura, V., Kurylo, V., Olenieva, V., Yemets, A. and Blume, Ya. (2014). Creation of transgenic sugar beet lines expressing insect pest resistance genes cry1C and cry2A. *Cytology and Genetics*, 48(2), pp. 69–75.
58. Liu, Y., van Bennekom, E. O., Zang, Y., Abee T. and Smid E. J. Long-chain vitamin K2 production in *Lactococcus lactis* is influenced by temperature, carbon source, aeration and mode of energy metabolism. (2019). *Microbial Cell Factories*, 18(129).
59. Liu, Y., Wang, E., Pan, C., Dong, X. and Ding, M. (2019). Biosynthesis of α -lipoic acid in *Gluconobacter oxydans* increases the production of vitamin C by one-step fermentation. *Chinese Journal of Bioengineering*, 35(7), pp. 1266–1276.

60. Liu, Z., Dong, H., Cui, Y., Cong, L. and Zhang, D. (2020). Application of different types of CRISPR/Cas-based systems in bacteria. *Microbial Cell Factories*, 19(172), pp. 1–14.
61. Madigan, M.T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M. and Stahl, D. A. (2017). *See Less. Brock Biology of Microorganisms, 15th Global Edition*. Pearson.
62. Makarova, K. S. and Koonin, E. V. (2018). Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems. *Methods Mol Biol.*, 2015(1311), pp. 47–75.
63. Niazian, M., Sadat Noori, S., Galuszka, P. and Mortazavian, S. (2017). Tissue culture-based *Agrobacterium*-mediated and in planta transformation methods. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 53(4), pp. 133–143.
64. Simons, A., Alhanout, K. and Duval, R. (2020). Bacteriocins, antimicrobial peptides from bacterial origin: overview of their biology and their impact against multidrug-resistant bacteria. *Microorganisms*, 8(5), p. 639.
65. Milone, M. C. and O'Doherty, U. (2018). Clinical use of lentiviral vectors. *Leukemia*, 32(7), pp. 1529–1541.
66. Ozyigit, I. I., Dogan, I. and Tarhan, E. A. (2013). *Agrobacterium rhizogenes* – Mediated Transformation and Its Biotechnological Applications in Crops. In: Rehman, K. Hakeem, P. Ahmad and M. Ozturk. *Crop Improvement*. Springer Verlag. Ch. 1, pp. 1–48.
67. Pardi, N., Hogan, M. J., Porter, F. W. and Weissman, D. (2018). mRNA vaccines - a new era in vaccinology. *Nature Reviews - Drug Discovery*, 17, pp. 261–279.
68. Park, J. W., Lagniton, P. N. P., Liu, Y. and Xu, R.-H. (2021). mRNA vaccines for COVID-19: what, why and how. *Int. J. Biol. Sci.*, 17, pp. 1446–1460.
69. Perleberg, C., Kind, A. and Schnieke, A. (2018). Genetically engineered pigs as models for human disease. *Dis Model Mech.* 11(1): dmm030783.
70. Purnick, P.E. and Weiss, R. (2009). The second wave of synthetic biology: from modules to systems. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 10(6), pp. 410–422.

71. Rahman, M. M., Zhou, N. and Huang, J. (2021). An Overview on the Development of mRNA-Based Vaccines and Their Formulation Strategies for Improved Antigen Expression *in Vivo*. *Vaccines*, 9(244), pp. 120–140.
72. Rawat, J. M., Bhandari, A., Raturi, M. and Rawat, B. (2019). *Agrobacterium rhizogenes*. Mediated Hairy Root Cultures: A Promising Approach for Production of Useful Metabolites. *Microbial Secondary Metabolites Biochemistry and Applications*, Ch. 8, pp. 103–118.
73. Revuelta, J. L., Serrano-Amatriain, C., Ledesma-Amaro, R. and Jiménez, A. (2018). Formation of folates by microorganisms: towards the biotechnological production of this vitamin. *Appl Microbiol Biotechnol*. 102(20): pp. 8613–8620.
74. Shen, S., Xi, Jin-Xing and Wang, Jun. (2016). Nanomedicine-mediated cancer stem cell therapy. *Biomaterials*, 74, pp. 1–18.
75. Schneider, T., Hahn-Löbmann, S., Stephan, A., Schulz, S., Giritch, A., Naumann, M., Kleinschmidt, M., Tuse, D. and Gleba, Y. (2018). Plant-made Salmonella bacteriocins salmocins for control of Salmonella pathovars. *Scientific Reports*, 8(1), pp. 1–10.
76. Shim, G., Kim, D., Park G. T., Jin H., Suh, Soo-Kyung and Oh Yu-Kyoung. (2017). Therapeutic gene editing: delivery and regulatory perspectives. *Acta Pharmacol Sin.*, 38(6), pp. 738–753.
77. Shmid, R.D. (2016). *Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik*. Wiley-Blackwell.
78. Simons, A., Alhanout, K. and Duval, R. (2020). Bacteriocins, antimicrobial peptides from bacterial origin: overview of their biology and their impact against multidrug-resistant bacteria. *Microorganisms*, 8(5), p. 639.
79. Sims, D., Sudbery, I., Ilott, N. E., Heger, A. and Ponting, C. P. (2014). Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. *Nature Reviews Genetics*, 15, pp. 121–132.
80. Soltani, S., Farahani, A., Dastranj M., Momenifar, N., Mohajeri, P. and Darb Emamie, A. (2018). DNA Vaccine: Methods and Mechanisms. *Advances in Human Biology*, 8(3), pp. 132–139.

81. Tatineni, S., Sato, S., Nersesian, N., Alexander, J., Quach, T., Graybosch, R. A. and Clemente, T. E. (2020). Transgenic Wheat Harboring an RNAi Element Confers Dual Resistance Against Synergistically Interacting Wheat Streak Mosaic Virus and Triticum Mosaic Virus. *Mol Plant Microbe Interact.*, 33(1), pp. 108–122.
82. Trovato, M., Mattioli, R, and Costantino P. From A. rhizogenes RolD to Plant P5CS: Exploiting Proline to Control Plant Development. (2018). *Plants*, 7(4), p. 108.
83. Verbekea, R., Lentackera, I., De Smedta, S. C. and Dewitte, H. (2019). *Nano Today*, 28, pp. 111-153.
84. Vetter, V., Denizer, G., Friedland, L.R., Krishnan, J. and Shapiro, M. (2018). Understanding modern-day vaccines: what you need to know. *Annals of medicine*, 50(2), pp.110–120.
85. Wang, Cai-Yun, Li, Ye, Gao, Zi-Wei, Liu, Li-Cheng, Zhang, Meng-Yue, Zhang, Tian-Yuan, Wu, Chun-Fu, Zhang, Yi-Xuan. (2018). Establishing an innovative carbohydrate metabolic pathway for efficient production of 2-keto-L-gulonic acid in *Ketogulonigenium robustum* initiated by intronic promoters. *Microb Cell Fact.*, 7(1), p.81.
86. Watters, K. E., Kirkpatrick, J., Palmer, M. J. and Koblentz, G. D. (2021). The CRISPR revolution and its potential impact on global health security. *Pathogens And Global Health*, 115(2), pp. 80–92.
87. Weinberg, R. A. (2007). *The biology of cancer. Second edition.*, Garland Science.
88. Weiss, R., Scheiblhofer, S. and Thalhamer, J. (2017). Generation and Evaluation of Prophylactic mRNA Vaccines Against Allergy. *Methods Mol. Biol.*, 1499, pp. 123–139.
89. Williams, A., Henao-Mejia, J. and Flavell, R. A. (2016). Editing the Mouse Genome Using the CRISPR–Cas9 System. *Cold Spring Harb Protocols*, 7, pp. 1–15.

90. Witharana, C. (2021). DNA Vaccine: An insight. *IJMCCR*, 4(6), pp. 111–116.
91. Xie, X., Nobrega, R. and Pšenička, M. (2020). Spermatogonial Stem Cells in Fish: Characterization, Isolation, Enrichment, and Recent Advances of In Vitro Culture Systems. *Biomolecules*, 10(4): 644.
92. Yao, N. and Wang, Z. L. (2005). *Handbook of microscopy for nanotechnology*. Boston: Kluwer Academic Publisher.
93. Zaib, S., Saleem, M. A. and Khan, I. (2022). CRISPR-Cas9 Genome Engineering: Trends in Medicine and Health. *Mini Rev Med Chem*, 22(3), pp. 410–421.
94. Zeng, W., Cai, W., Liu, L., Du, G., Chen, J., and Zhou, J. (2019). Efficient biosynthesis of 2-keto-D-gluconic acid by fed-batch culture of metabolically engineered *Gluconobacter japonicus*. *Synth Syst Biotechnol.*, 4(3), pp. 134–141.
95. Zhang, C., Maruggi, G., Shan, H. and Li, J. (2019). Advances in mRNA Vaccines for Infectious Diseases. *Frontiers in Immunology*, 10, pp. 21–33.
96. Zhang, Y., Chen, M., Siemiatkowska, B., Toleco, M. R., Jing, Y., Strotmann, V., Zhang, J., Stahl, Y. and Fernie, A. R. A (2020). Highly Efficient *Agrobacterium*-Mediated Method for Transient Gene Expression and Functional Studies in Multiple Plant Species. *Plant Communications*, 1(5), pp. 1–12.
97. Zhou, H. (2020). Glia-to-Neuron Conversion by CRISPR-CasRx Alleviates Symptoms of Neurological Disease in Mice. *Cell.*, 181(3), pp. 590–603.