

# ЛЕКЦИЯ № 7

---

## Рекомбинантные белки и полипептиды

Для студентов, обучающихся по направлению подготовки «Биология» (профиль «Генетика») при изучении дисциплины «Введение в биотехнологию»

- 1.** Понятие и сущность рекомбинантной ДНК-биотехнологии
- 2.** Этапы получения рекомбинантных ДНК
- 3.** Частные технологии получения рекомбинантных белков

## 1. ПОНЯТИЕ И СУЩНОСТЬ РЕКОМБИНАНТНОЙ ДНК-БИОТЕХНОЛОГИИ

Высокая стоимость лекарственных препаратов, получаемых традиционным способом из дефицитного природного сырья, послужила предпосылкой для разработки технологии, основанной на применении генетически модифицированных микроорганизмов.

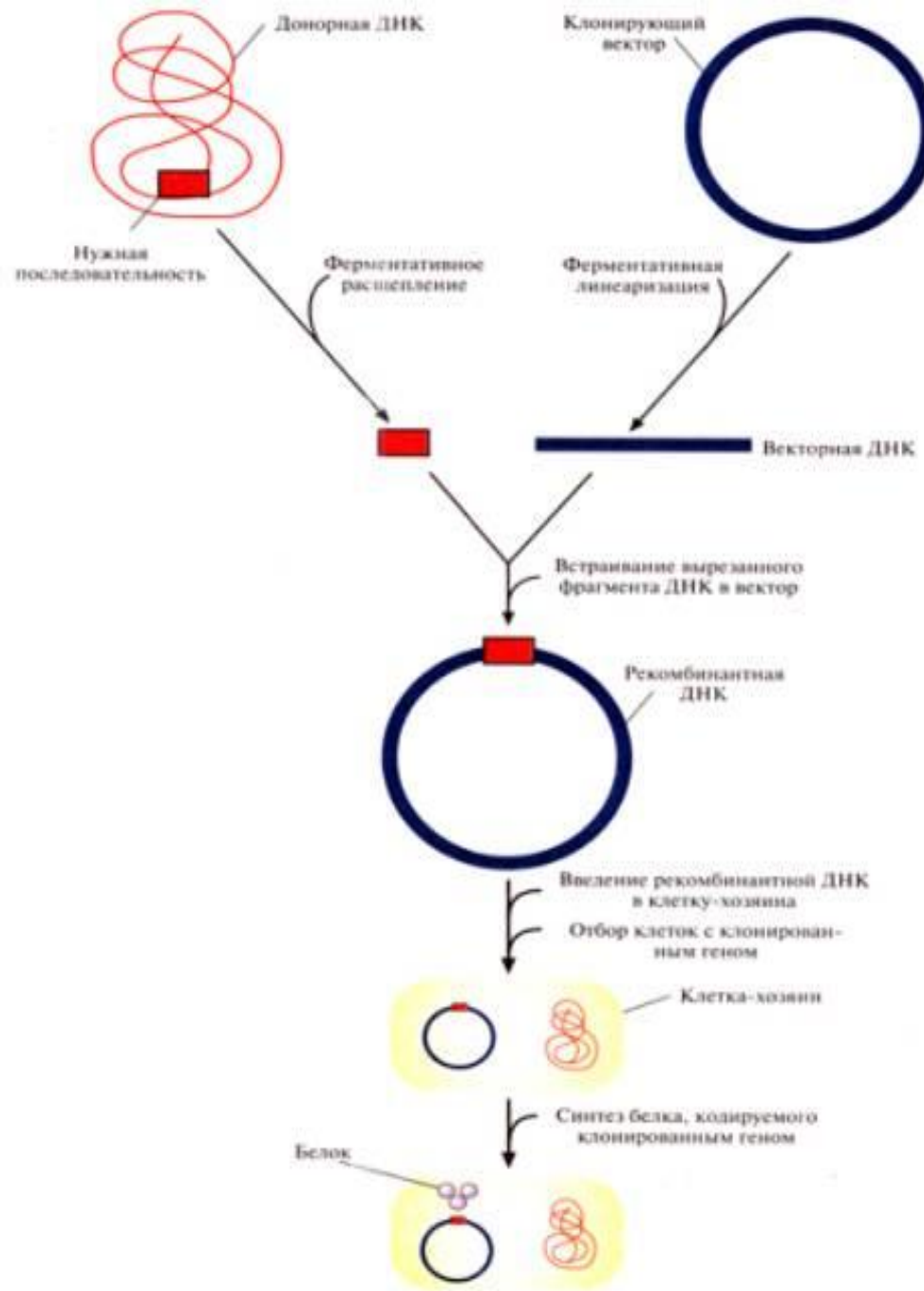
Среди белковых продуктов следует выделить белковые и пептидные гормоны. До недавнего времени их получали экстракцией из тканей животных при условии, что они не обладали выраженной видовой специфичностью. Кроме того, короткие пептидные гормоны пытались синтезировать. Однако, данный способ получения оказался нерентабельным уже для молекул, состоящих из нескольких десятков звеньев. Основным источником гормонов с выраженной видовой специфичностью были органы умерших людей.

Успехи генетической инженерии вселили надежды на возможность клонирования генов и синтеза ряда гормонов в микробных клетках. Эти надежды в значительной мере оправдались, в первую очередь, на примере получения пептидных гормонов.

Первые успешные результаты по экспрессии химически синтезированной последовательности нуклеотидов ДНК, кодирующей 14-звенный пептидный гормон соматостатин, получены в 1977 г. в США компанией «Генентек». Для предотвращения разрушения гормона в бактериальных клетках под действием пептидазы исследователи применили подход, который впоследствии успешно использован для получения других пептидных гормонов. Для этой цели был сконструирован гибридный ген, часть которого была взята из гена  $\beta$ -галактозидазы *E. coli*, а остаток представлял собой фрагмент, кодирующий соматостатин (фрагмент был синтезирован химическим путем). Введенный в бактериальные клетки гибридный ген направлял синтез белка-химеры, состоящего более чем на 90 % из аминокислотной последовательности  $\beta$ -галактозидазы, а остальную часть составлял соматостатин. На стыке участка двух исходных генов находился кодон метионина, что позволило обработать гибридный белок бромцианом, разрывающим пептидную связь, образованную метионином и среди продуктов расщепления был обнаружен соматостатин.

Данный подход был использован для получения многих пептидных гормонов, таких как :инсулин, нейропептид лейэнкефалина, брадикинин, ангиотензин и др.

## 2. ЭТАПЫ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК



**Рекомбинантная ДНК** — молекула ДНК, полученная объединением в условиях *in vitro* разнородных, совместно нигде в природе не существующих, фрагментов ДНК (ДНК содержащая чужие гены).

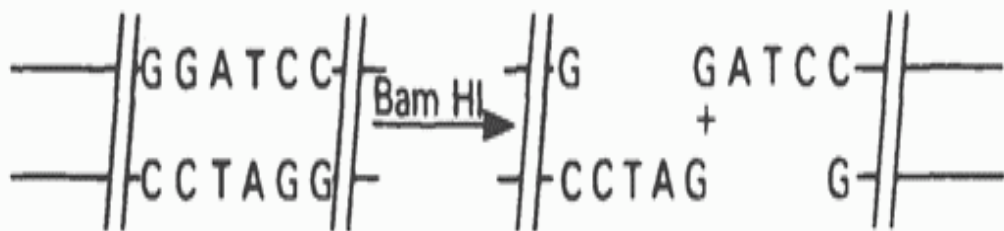
**рДНК-биотехнология** включает следующие этапы:

- ✓ получение чужеродной ДНК;
- ✓ разрезание полученной ДНК на фрагменты и их очистка;
- ✓ включение фрагмента чужеродной ДНК в вектор и получение рекомбинантной ДНК.
- ✓ введение рДНК в пермиссивные клетки и клонирование генов.
- ✓ амплификация и экспрессия рДНК.

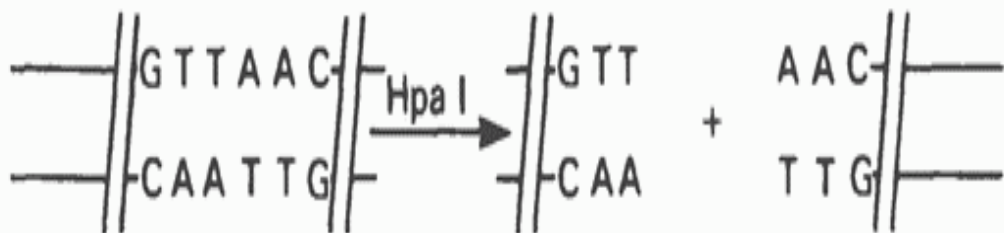
Разрезание сайта узнавания



### А "Липкие" концы



### Б "Тупые" концы



## СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ЧУЖЕРОДНОЙ ДНК

**1. ВЫДЕЛЕНИЕ ГЕНОВ ИЗ ДНК** может происходить по середине узнаваемого участка нуклеотидных пар, и тогда обе нити ДНК «разрезаются» на одном уровне. Образующиеся фрагменты имеют **двухнитевые (тупые) концы**. Другие рестриктазы расщепляют нити ДНК со сдвигом так, что образуется ступенька — одна из нитей ДНК выступает на несколько нуклеотидов, образуя **однонитевые (липкие) концы**.

Метод выделения генов из ДНК с помощью рестриктаз имеет существенный недостаток: трудно подобрать рестриктазы, позволяющие вырезать из ДНК именно тот участок, который соответствует нужному гену, в этой связи, наряду с интересующим геном фрагменты ДНК включают лишние нуклеотидные последовательности, создающие помехи для использования гена. Кроме того, рестриктаза может отщепить часть нуклеотидной последовательности нужного гена, в результате чего он теряет функциональную полноценность.

## 2. ЭТАПЫ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК

### СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ЧУЖЕРОДНОЙ ДНК

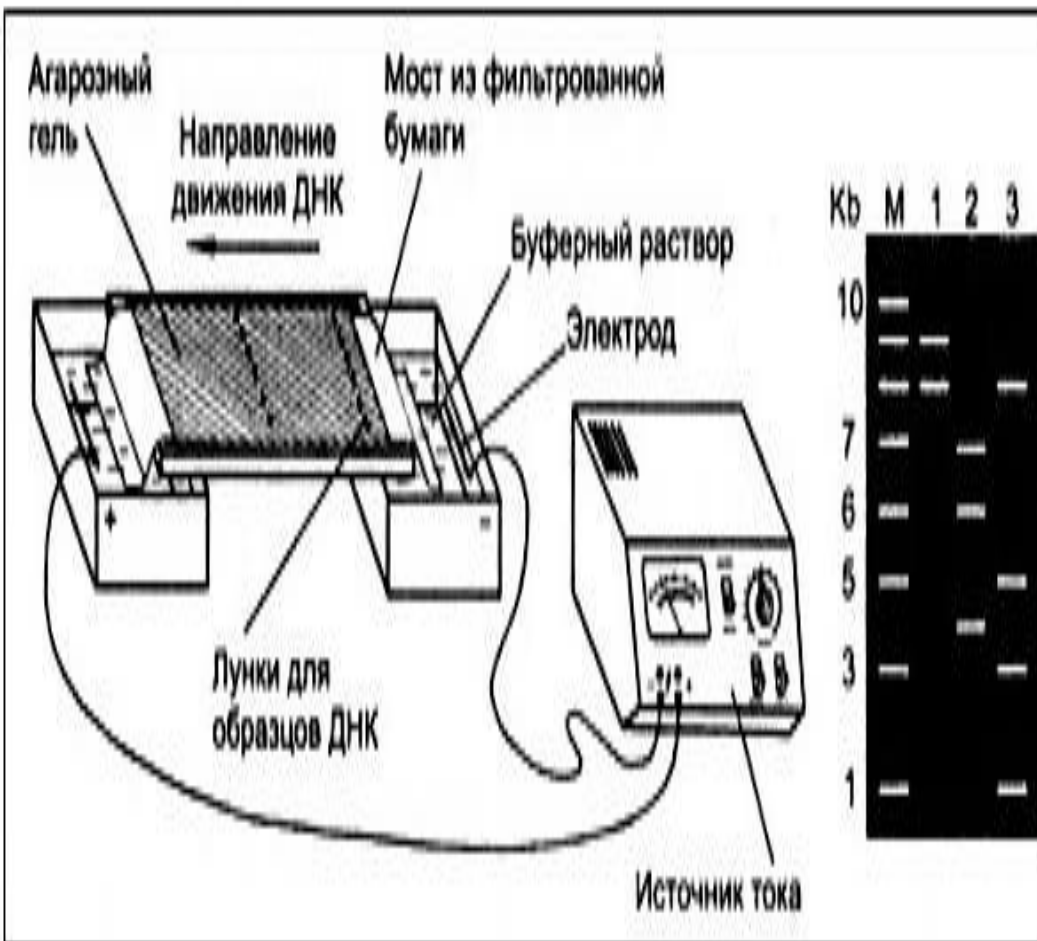
**2. ХИМИКО-ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ ГЕНОВ** является альтернативой «вырезанию» генов с помощью рестриктаз из нативной ДНК. Данный метод включает химический синтез коротких (8–16-звенных) одноцепочечных фрагментов ДНК (олигонуклеотидов) за счет поэтапного образования эфирных связей между нуклеотидами и сшивку олигонуклеотидов с помощью ДНК-лигазы с образованием двухцепочечных полинуклеотидов.

Химико-ферментативный синтез позволяет точно воссоздать минимально необходимую последовательность нуклеотидов и избежать проблем, связанных с элиминированием лишних нуклеотидных последовательностей в фрагментах ДНК, в том числе и интронов, а, следовательно, появляется возможность введения в гены участков узнавания рестриктаз, регуляторных последовательностей и т.п. Однако, для реализации данного метода необходима полная информация о нуклеотидной последовательности гена.

**3. ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ ГЕНОВ НА ОСНОВЕ МАТРИЧНОЙ РНК** – наиболее удобный метод синтеза генов. Обратная транскриптаза (ревертаза) катализирует синтез ДНК, комплементарной мРНК. Полученную ДНК используют в качестве матрицы для синтеза второй нити ДНК с помощью полимеразы или ревертазы. При этом затравкой служит олигонуклеотид, комплементарный 3'-концу мРНК.

Преимущество данного метода заключается в том, что ген получается без интронов и других нетранскрибируемых последовательностей. Кроме того, легче создать условия, когда клетка аккумулирует нужный вид мРНК, чем отбирать из смеси фрагментов ДНК.

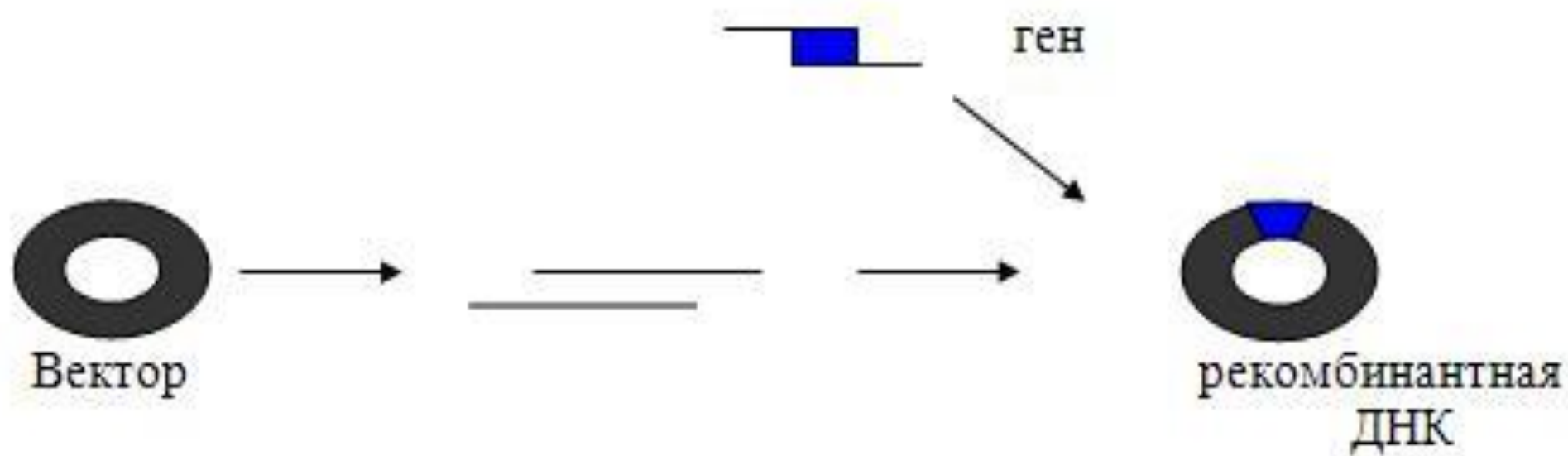
## 2. ЭТАПЫ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК



Фрагменты ДНК разделяют с помощью электрофореза на агарозном или полиакриламидном гелях, из которых их экстрагируют, вырезая соответствующие участки геля.

Данные участки геля, расплавляют в пробирках при температуре 68 °С. Затем ДНК экстрагируют фенолом, концентрируют изобутанолом, переосаждают этанолом и проводят анализ выделенных и очищенных фрагментов.

Полученный тем или иным способом ген содержит информацию о структуре белка, но сам не может ее реализовать, поэтому необходимы дополнительные механизмы для управления его действием.



**Включение фрагмента чужеродной ДНК в вектор.** Понятие «вектор» в молекулярную биологию введено М. Томасом в 1974 г. Оно означает «способный переносить в клетку-реципиент чужеродную ДНК любого происхождения».

Векторами называются молекулы ДНК, способные акцептировать чужеродную ДНК и обеспечивающие ее репликацию, экспрессию и/или трансформацию (перенос в другие организмы), т.е. позволяющие осуществить введение в клетку дополнительной генетической информации.

Для клонирования ДНК можно использовать векторы двух классов — плазмиды и фаги.



## 2. ЭТАПЫ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК

**ВИРУСЫ** быстро транспортируются из клетки в клетку и за короткое время способны быстро поразить весь организм. Данное их свойство открывает возможность генетической модификации соматических клеток взрослого организма. Важной проблемой при использовании вирусов является аттенюация.

**Эукариотические вирусы** нашли скромное применение в качестве векторов в сравнении с плазмидами. Практически используются только **онкогенный вирус SV40** и **его производные** (дефектные вирусы, не способные давать полноценные вирусные частицы в клетке хозяина).

В **векторах на основе бактериофага  $\lambda$**  применяется следующая его особенность: большая часть его ДНК не участвует в размножении фага в клетке, что позволяет вводить чужеродную ДНК в ДНК фага  $\lambda$ .

**Фаг M13** – одноцепочечная циклическая ДНК длиной около 6500 нуклеотидов. После инфицирования бактериальной клетки одноцепочечная ДНК фага превращается в двухцепочечную репликативную форму, подобную плазмиде.

Фаговая ДНК содержит короткий участок из 500 нуклеотидов, названный **межгенной последовательностью**, не существенный для жизнедеятельности клетки. Именно в этот участок репликативной формы ДНК после ее расщепления с помощью лигазы встраивают чужеродную ДНК. Введение рекомбинантной двухцепочечной молекулы в клетки *E. coli* приводит к ее репликации, синтезу (+)-цепи, ее упаковке в белковый чехол и выделению фага в среду. При этом клетка, инфицированная нетевидным фагом, продолжает делиться, выделяя в окружающую среду большое количество фага, содержащего в вирионе одноцепочечную циклическую ДНК, в которую встроена одна из цепей чужеродной ДНК.

В поисках эукариотических систем экспрессии, для получения биологически активных белков, созданы **бакмиды** – экспрессирующие векторы на основе бакуловирусов.

Векторы на основе фага удобны для создания клонеток (банка генов), но не для тонких манипуляций с фрагментом ДНК. Для детального изучения и преобразования фрагменты ДНК переклонировать в плазмиды.

## 2. ЭТАПЫ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК

**ПЛАЗМИДАМИ** называют бактериальные репликоны, стабильно наследуемые, представляющие собой двухцепочечные кольцевые молекулы ДНК с ~~вариабельными молекулярными~~ массами.

Наибольшее применение в генетической инженерии нашли бактериальные плазмиды, которые классифицируют на **конъюгативные**, способные к переносу генетической информации от клетки к клетке путем конъюгации, и **неконъюгативные**, передающиеся от одной клетке к другой с помощью трансформации.

Каждая плазида содержит **сайт начала репликации**, без которого ее репликация в клетке хозяина невозможна.

Репликация плазмид происходит независимо от репликации хромосом. Количество копий определяется регуляторной системой клетки. Количество плазмид в клетке может варьироваться от 1 до 100 и более.

Некоторые плазмиды способны к амплификации, что резко повышает уровень фенотипического выражения генов. При конструировании векторов исследователь вводит в него участки узнавания рестриктаз, а также гены-маркеры, кодирующие легко распознаваемые признаки, по которым можно отобрать клетки, являющиеся носителем вектора.

Первый плазмидный вектор получен С. Коэном (1973 г.). Его источником была плазида *E. coli* R<sub>6-5</sub> с мол. м. 65 кДа. Данная плазида стала родоначальником серии векторов и других структур.

## 2. ЭТАПЫ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК

Плазмидные векторы очень разнообразны за счет следующих **свойств**:

- ✓ уменьшения размеров плазмиды, вследствие изъятия участков, не обязательных для репликации;
- ✓ гибридизации векторов одного рода с другими векторами или природными плазмидами. При этом вновь сконструированная рекомбинантная ДНК должна сохранить репликационные свойства исходной плазмиды;
- ✓ использование новых плазмид;
- ✓ применение транспозонов;
- ✓ создания векторов с генетическими маркерами, позволяющими вести отбор рекомбинантных клонов.

К специальным векторам с большой емкостью относятся **космиды**, представляющие собой гибридную молекулу, содержащую специальный *cos*-участок генома фага, за счет чего они могут упаковываться в головку фага  $\lambda$ , а также специальные последовательности, позволяющие им реплицироваться по плазмидному типу. Размер космиды довольно мал в сравнении с фаговым вектором – всего 5 т.н.п. и, следовательно, в нее можно встраивать чужеродную ДНК больших размеров (30–45 т.н.п.).

**Фазмиды** – гибриды между фагами и плазмидами, способные развиваться и как фаг, и как плазмида. Уступая космидам по клонирующей емкости, они позволяют отказаться от переклонирования генов из фаговых в плазмидные векторы.

## 2. ЭТАПЫ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК

Клонирование фрагментов ДНК, размером от 100 т.н.п. и более, осуществляется в специально сконструированных векторах ВАС и YАС.

**ВАС-векторы** получены на основе F-плазмид бактерий. Они содержат гены, ответственные за репликацию и копияность этих плазмид в бактериальных клетках, а также ряд дополнительных последовательностей для облегчения клонирования. Емкость ВАС-векторов при собственном небольшом размере (примерно 7 т.н.п.) огромная – 100–300 т.н.п. Это позволило во много раз уменьшить число клонов при получении геномных библиотек.

**YАС-векторы** применяются для клонирования больших фрагментов ДНК. Они представляют собой искусственную дрожжевую минихромосому. YАС-вектор содержит центромеру, теломеры и точку начала репликации. В такой вектор можно встроить фрагменты чужеродной ДНК размером более 100 т.н.п. Данная минихромосома, введенная в клетки дрожжей, будет реплицироваться и вести себя аналогично другим дрожжевым хромосомам при митотическом делении.

# КЛАССИФИКАЦИЯ ВЕКТОРОВ ПО ПРОФИЛЮ ПРИМЕНЕНИЯ

**1. Векторы для клонирования** применяют для амплификации встроенного в него фрагмента ДНК путем репликации. В этом качестве применяют бактериальные плазмиды и фаги. Для клонирования больших фрагментов генома используют искусственные бактериальные и дрожжевые хромосомы.

**2. Экспрессионные векторы** используют для анализа конкретных последовательностей генов и их белковых продуктов, а также для наработки конкретного белка. Существует огромное количество экспрессионных систем, особенно для прокариотических организмов, а также векторы для экспрессии генов в клетках дрожжей, растений и млекопитающих. Экспрессионные векторы для эукариотических организмов всегда содержат экспрессионную кассету, состоящую из промотора, способного работать в данном организме и сайта полиаденилирования.

**3. Векторы для трансформации** используют с целью введения чужеродного фрагмента ДНК в геном реципиента. Обычно такие векторы содержат специфические последовательности, способствующие интеграции в геном.

## ОСОБЕННОСТИ ВЕКТОРОВ:

- ✓ вектор должен иметь субстратные участки для определенных эндонуклеаз рестрикции, что обеспечивает возможность встраивания в него фрагмент чужеродной ДНК;
- ✓ вектор должен обладать определенной емкостью и не абортировать встроенный фрагмент;
- ✓ вектор должен иметь свойства репликона;
- ✓ вектор должен содержать один или несколько маркерных генов, которые после проникновения вектора в клетку придают ей фенотип, свидетельствующий о присутствии вектора.

## 2. ЭТАПЫ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК

После конструирования рДНК, их путем трансформации вводят в реципиентный организм – бактериальную, грибную, растительную или животную клетку.

Процесс инфицирования клеток с помощью чужеродных ДНК, приводящий к образованию зрелого фагового потомства, называется трансфекцией.

Общий способ трансформации и трансфекции основан на том, что при обработке клеток бактерий хлористым кальцием их мембрана становится проницаемой для ДНК. Однако, среди бактерий, подвергающихся трансформации, только небольшая часть оказывается трансформированной. Их отделение от общей массы осуществляется в процессе клонирования.

Для клонирования бактериальную суспензию определенной концентрации помещают на плотную среду в чашке Петри из расчета 5–10 бактерий на 1 см<sup>2</sup> поверхности. Бактериальная клетка на поверхности плотной начинает делиться с образованием колонии (клона). Причем из каждой клетки образуется свой клон, все клетки которого имеют свойства бактерии-родоначальника.

Для клонирования ДНК используют перmissive клетки, к которым предъявляются следующие требования:

- ✓ не разрушают чужеродные ДНК или РНК собственными ферментами;
- ✓ срабатывает механизм репликации вектора;
- ✓ проявляется выраженная активность промотора и/или терминатора транскрипции рДНК;
- ✓ отмечается полный сплайсинг мРНК;
- ✓ наблюдается активная трансляция мРНК;
- ✓ отсутствует выраженная активность пептидогидролаз, катализирующих реакции гидролиза экспрессируемых чужеродных белков.

Для отбора трансформированных клеток применяют разные селективные гены, детерминирующие отличительные фенотипические особенности: возможность детоксикации антибиотика, утилизации определенного субстрата или роста на обедненных средах

## 2. ЭТАПЫ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК

### МЕТОДЫ И ПРИНЦИПЫ АНАЛИЗА ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТОК И ТРАНСГЕННЫХ ОРГАНИЗМОВ

МЕТОДЫ	ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ
Фенотипический отбор	Анализ основан на использовании специфических свойств, проявляемых нужным клоном: морфологические изменения трансформированных клеток (характер их роста) или синтез определенных соединений, которые можно идентифицировать при помощи стандартных биохимических методов
Иммунохимический анализ	Для проведения идентификации белка, кодируемого перенесенным геном, используют специфические антитела. Детектирование связывания антител с нужным белком проводят при помощи вторичных антител, специфичных в отношении первых, меченых ферментом или радиоактивной меткой
Полимеразная цепная реакция	Проводят амплификацию последовательности перенесенного гена при помощи специфических праймеров. Идентификацию ПЦР-продуктов проводят при помощи гель-электрофореза
Гибридизация	Изолируют тотальную ДНК, обрабатывают рестриктазами и фракционируют с помощью гель-электрофореза. Денатурируют ДНК в геле и переносят на нейлоновую мембрану. Мембрану инкубируют с денатурированным радиоактивным фрагментом (зондом), гомологичным перенесенному гену. Отожженный зонд детектируют при помощи радиоавтографа. Аналогично проводят гибридизацию ДНК-зонда с тотальной мРНК, выделенной из трансформированных клеток



## 2. ЭТАПЫ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК

**Клонирование в *Bacillus subtilis*.** *B. subtilis* – непатогенный почвенный микроорганизм, клеточная стенка которого имеет простую структуру, позволяющую секретировать многие белки в культуральную жидкость. В них обнаружены плазмиды и фаги, генетика которых хорошо изучена. Клонирование осуществляется с помощью челночных векторов, способных реплицироваться в клетках нескольких хозяев (*B. subtilis*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*). Векторы получены комбинацией *in vitro* фрагментов плазмид *S. aureus*, *E. coli* и хромосомных фрагментов *B. subtilis*. Полученные рекомбинантные штаммы несут признаки устойчивости к антибиотикам.

**Клонирование в стрептомицетах.** Стрептомицеты применяют в биотехнологии в качестве продуцентов антибиотиков. Конструирование векторов для клонирования в них началось с выделения плазмиды *Scp2* из *Streptomyces coelicolor*, на основе которой были созданы векторы, придающие стрептомицетам устойчивость к антибиотикам.

**Клонирование в дрожжах.** Среди дрожжей наиболее полно изучен вид *Saccharomyces cerevisiae*. У этого вида в гаплоидных клетках содержится 17 хромосом, в составе которых идентифицировано несколько сот генов. Большинство штаммов дрожжей содержат автономно реплицирующуюся кольцевую ДНК длиной 2 мкм. Плазида *Scp1 S. cerevisiae* содержит около 6300 пар оснований и имеет 50–100 копий в клетку. Ее гибриды с плазмидами обычно используют в качестве векторов. Работа с дрожжами облегчается тем, что подобно бактериям они могут расти в жидкой среде и давать колонии на твердой среде. Кроме того, они имеют небольшое время регенерации, вследствие малого размера генома. Процедура введения ДНК в клетках дрожжей проста. Обычно целлюлозную клеточную стенку удаляют обработкой ферментами, получая сферопласты, которые инкубируют с ДНК в присутствии хлорида кальция и ПЭГ. Мембрана при этом становится проницаемой для ДНК. Дальнейшая инкубация сферопластов в среде с агаром восстанавливает клеточную стенку. Селекция дрожжевых клонов, трансформированных рекомбинантными плазмидами, основана на применении в качестве клеток-хозяев определенных мутантов, не способных расти на среде, в которой отсутствует тот или иной компонент. Векторная плазида содержит гены, которые при попадании в клетку хозяина придают ей недостающий признак. Трансформанты легко отбираются по способности давать колонии на обедненной среде.

## 2. ЭТАПЫ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК

**Клонирование в клетках растений.** Растительные клетки не содержат плазмид, поэтому для переноса генов в качестве трансформирующих векторов применяют рекомбинантные векторы на основе *Ti*-плазмиды почвенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens*. *Ti*-плазмиды содержат разные уникальные гены, одна часть которых экспрессируется исключительно в бактериальных клетках, а другая – в эукариотических. После прикрепления агробактерии к растительной клетке и активации механизма переноса, T-ДНК переносится в растительную клетку и интегрируется в геном растения.

Существует два типа векторов на основе *Ti*-плазмид.

**Бинарный (челночный) вектор** содержит 2 *ori* гена для репликации плазмиды в клетках агробактерий и *E. coli*, но лишен *vir*-генов. После накопления генов в *E. coli*, вектор переносят в агробактериальный штамм, содержащий плазмиду-помощника с *vir*-функцией.

**Коинтегративный вектор** может существовать только в клетках *E. coli*, имеет области гомологии с неонкогенной *Ti*-плазмидой. После переноса этого вектора в агробактериальный штамм, он практически полностью встраивается в *Ti*-плазмиду. В данной конфигурации чужеродный ген в составе T-ДНК может быть перенесен в растительные клетки.

Агробактериальная система трансформации применима не для всех видов растений. В природных условиях агробактериальной трансформации подвержены только двудольные растения, тогда как однодольные растения агробактериями не трансформируются. Для них применяют методы прямого переноса ДНК в клетки.

Для прямого переноса генов используются растительные протопласты. Обработка клетки ферментами вызывает гидролиз клеточной стенки, приводя к получению протопласта, окруженного плазматической мембраной, проницаемой для ДНК. После трансформации протопласты восстанавливают клеточную стенку.

При проведении электропорации растительные протопласты помещают в раствор рДНК высокой концентрации и воздействуют высоковольтным импульсом. Для трансформации протопластов также применяются методы микроинъекции ДНК в ядро и упаковки ДНК в липосомы.

Бомбардировка микрочастицами (биолистика) – метод трансформации однодольных растений: частицы золота или вольфрама покрывают плазмидной ДНК и выстреливают ими в клетки из «пушки». При этом частицы разгоняются до скорости 300–600 м/с, пробивая клеточную стенку и мембраны. Попав в клетку, генетический материал, нанесенный на частицы, интегрируется в растительную ДНК.

Еще одна возможность создания векторов для растений связана с применением фитовирусов. Чужеродные гены встраиваются в геном вируса путем слияния с вирусными генами или замены их части. Вирусная ДНК не встраивается в геном растительной клетки, но целевой белок нарабатывается в больших количествах в клетках, инфицированных вирусом. Такая экспрессия носит название транзитной (временной).

## 2. ЭТАПЫ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК

**Клонирование в животных.** Введение чужеродной ДНК в животные клетки можно осуществить физическими методами (микроинъекция, электропорация и др.) или при помощи вирусных векторов.

Предварительно клонированные гены вводят в клетку животных разными путями. Сущность одного из них состоит в трансформации клеток нужным геном, соединенным с одним из генов, для которых осуществляется селекция. Для идентификации, содержащих интегрированную ДНК, разработан метода маркера. Селективные маркеры позволяют вводить в клетки млекопитающих любой ген, заранее лигированный с клонированным маркером.

В последние годы сконструировано большое число челночных векторов и их рекомбинантных производных, способных к репликации в животной и бактериальной клетках, экспрессирующие клонируемый ген в животной клетке. К числу этих векторов относятся векторы из плазмиды *pBR322* и интактного района транскрипции ДНК *SW-40*.

В вирусах животных размеры несущественных областей малы и в них нельзя внедрить большие фрагменты чужеродной ДНК. В большинстве случаев чужеродная ДНК замещает существенные гены, в результате рекомбинантные вирусы утрачивают способность к репликации. Для ее функционирования используют «вирусы-помощники», синтезирующие продукты недостающих генов, за счет которых и существует рекомбинантный вирус.

Представляет интерес микроинъекции ДНК в ядро клетки. Микроинъекцию клонированных генов проводят в один или оба пронуклеуса оплодотворенной яйцеклетки мыши. После инъекции яйцеклетку немедленно имплантируют в яйцевод приемной матери или позволяют развиваться в культуре до стадии бластоцисты, а затем имплантируют в матку. Таким путем были инъецированы гены интерферона и инсулина человека, ген глобина кролика, ген тимдинкиназного вируса герпеса и др. Выживает обычно 10–30 % яйцеклеток, а доля мышей, родившихся из трансформированных яйцеклеток, составляет от нескольких до 40 %.

Уровень экспрессии чужеродного гена зависит от места интеграции ДНК с хромосомами, от дифференцировки тканей.

Несмотря на определенные успехи в области интеграции чужеродных генов в эмбриональные клетки животных, до сих пор не удалось встроить чужеродную ДНК в заданный участок хромосомы, вытеснить ген и заменить его новой нуклеотидной последовательностью, подчинить новый ген системе регуляции организма.

### 3. ЧАСТНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ

При выборе продуцента чужеродного белка необходимо:

- ✓ наиболее полно изучить геном;
- ✓ подробно исследовать метаболизм на уровне вида;
- ✓ микроорганизм должен обладать умеренной патогенностью (в идеальном случае желательно ее полное отсутствие);
- ✓ микроорганизм должен расти в условиях производства на простых, доступных и экономичных питательных средах.

В качестве продуцентов рекомбинантных белков чаще всего используют *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*. Первые два микроорганизма – прокариоты, последний – эукариот. Они достаточно безопасны. Однако, их поступление во внешнюю среду нежелательно. В связи с этим существуют принятые и тщательно соблюдаемые правила работы с рекомбинантами.

Безопасность должна соблюдаться на генетическом и физическом уровнях.

**Безопасность на генетическом уровне** означает, что в геном продуцента чужеродного белка (кроме, чужеродных генов) вносится еще одно изменение – из него удаляются некоторые гены, существенные для роста микроорганизма. Если такие клетки оказываются вне среды, то они не размножаются, т.е. опасность заражения территории предприятия культурой рекомбинанта значительно уменьшается.

**Меры безопасности на физическом уровне:** на всех участках выброса газа устанавливают микробиологические фильтры. После завершения рабочего цикла без разъединения системы, оборудование стерилизуют. На производстве должны соблюдаться все требования «Правил организации производства и контроля качества лекарственных средств» (GMP).

## **СТАДИИ ПРОИЗВОДСТВА РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ**

- 1.** Рестриктазное расщепление из организма-донора нужных генов нативной ДНК.
- 2.** Быстрая расшифровка всех нуклеотидов в очищенном фрагменте ДНК, позволяющая определить точные границы гена и аминокислотную последовательность, кодируемую геном;
- 3.** Обработка рестрикционными эндонуклеазами вектора для клонирования, который может реплицироваться в клетке хозяина.
- 4.** Сшивка с помощью лигазы двух фрагментов ДНК с образованием новой рекомбинантной молекулы, т.е. конструкции вида: «клонированный вектор – встроенная ДНК».
- 5.** Введение данной конструкции в клетку хозяина (реципиента), в которой она реплицируется и передается по наследству. Это процесс называется трансформацией. После трансформации бактериальная клетка воспроизводит фрагмент клонируемой ДНК миллионами идентичных клеток.
- 6.** Идентификация и отбор клеток, несущих рекомбинантную ДНК.
- 7.** Получение специфического белкового продукта, синтезированного клетками хозяина.

## БИОТЕХНОЛОГИЯ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ

В качестве продуцентов интерлейкинов используют культуры нормальных лимфоцитов или макрофагов, клоны трансформированных (опухолевых) клеток, Т-клеточные гибридомы и рекомбинантные штаммы.

Продуценты культивируют в условиях *in vitro* в ферментерах. После завершения процесса ферментации интерлейкины выделяют из культуральной среды, концентрируют и очищают.

Для увеличения выхода интерлейкинов культуру продуцента стимулируют митогенами, в качестве которых используют глобулярные растительные белки и компонент клеточной стенки бактерий.

Для создания рекомбинантных штаммов – продуцентов интерлейкинов, гены, контролирующие их синтез, вводят в составе вектора в микробную клетку, выделяют и размножают клон рекомбинантов и культивируют полученный продуцент с целью накопления целевого продукта.

В качестве рекомбинантных продуцентов интерлейкинов используют *E. coli* (ИЛ 1, ИЛ 2) и дрожжи-сахаромицеты (ИЛ 2). Причем дрожжи более удобны, т.к. *E. coli* накапливает интерлейкины внутриклеточно, а дрожжи секретируют в культуральную жидкость, что облегчает выделение и очистку целевого продукта.

В настоящее время английская компания Celltech Ltd и японская компания Sakyо Company предлагают синтезированный генно-инженерными штаммами бактерий интерлейкин-1, наряду с другим тьюлипептидным агентом — фактором некроза опухолей – для лечения ряда опухолевых заболеваний (B. Sikyта et al., 1986).

### *3. ЧАСТНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ*

**Получение  $\alpha$ -ИНФ** основано на способности лейкоцитов образовывать ИНФ под действием вируса. Лейкоциты из периферической крови человека культивируют при температуре 37°C в течение 16–20 ч. на специальной среде, содержащей сыворотку крови человека и вирус Сендай. Затем лейкоциты отделяют центрифугированием, вирус инактивируют за счет снижения значения рН до 2,5. Нативный ИНФ, находящийся в надосадочной жидкости, осаждают сульфатом аммония, очищают и концентрируют хроматографией на сефадексах.

Активность препарата ИНФ определяется по его защитному противовирусному действию на культуру клеток эмбрионов человека, зараженных вирусами. Через 2–3-е суток культивирования с ИНФ фиксируется степень разрушения монослоя клеток.

Получение  $\alpha$ -ИНФ из лейкоцитов человека имеет существенное ограничение, обусловленное необходимостью использования большого количества донорской крови (из 1 л крови можно выделить всего 1 мкг ИНФ, т.е. примерно на одну дозу для инъекции).

### 3. ЧАСТНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ

**$\beta$ -ИНФ** получают из культур фибробластов, выращенных в монослое *in vitro*. Фибробласты удается поддерживать в культуре, поэтому они пригодны для массового производства ИНФ. ~~Данный способ получения ИНФ проще, в сравнении с его получением из лейкоцитов.~~

В качестве интерферогена используют двухцепочечную РНК. Выход ИНФ усиливают ингибиторы метаболизма (противоопухолевый антибиотик актиномицин Д, ингибирующий синтез РНК).

Выход  **$\gamma$ -ИНФ**, синтезирующегося в культурах иммунных Т- или В-лимфоцитов, еще меньше, чем  $\alpha$ - и  $\beta$ -ИНФ. Однако  $\gamma$ -ИНФ обладает высокой противоопухолевой и иммуномодулирующей активностью.

**Человеческий лимфобластоидный ИНФ** получают в глубинной суспензионной культуре лимфоидных клеток. Эти клетки можно культивировать в биореакторах объемом до 500 л. Для индукции синтеза ИНФ используют вирус Сендай, а для увеличения его выхода лимфобласты обрабатывают 5-бромдезоксипурином или кортикостероидами, замедляющими все реакции метаболизма клеток, кроме синтеза ИНФ. При добавлении указанных антиметаболитов, клетка практически целиком переключается на синтез ИНФ и через определенный промежуток времени погибает.

В целом все методы получения ИНФ, синтезирующихся лейкоцитами, лимфобластами, фибробластами и лимфоцитами характеризуются:

- ✓ низкими выходами;
- ✓ высокой стоимостью;
- ✓ низкой чистотой препарата.



Первоначально в качестве рекомбинантного продуцента ИНФ использовали *E. coli*, накапливающие продукт внутриклеточно, что затрудняет его выделение и очистку. Еще один недостаток *E. coli* как продуцента ИНФ – отсутствие в бактерии аппарата гликозилирования эукариотических белков. И хотя роль гликозилирования полностью неясна, а негликозилированные  $\beta$ - и  $\gamma$ -ИНФ практически полностью сохраняют противовирусную активность, эта особенность требует осторожного подхода к их применению в медицинской практике.

Более перспективными оказались бактерии *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas aeruginosa*, способные секретировать рекомбинантные белки в окружающую среду.

Из эукариот хорошим продуцентом генно-инженерного ИНФ являются дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, которые растут на доступных средах, легче отделяются от культуральной жидкости и не подвергаются действию бактериофагов. При их использовании производство ИНФ возросло в 10 раз. *S. cerevisiae* обладают особым преимуществом при синтезе гликопротеидов высших организмов, поскольку гликозилирование в них осуществляется по тому же механизму, что и в клетках животных.

## ПРИНЦИПАЛЬНАЯ СХЕМА ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРФЕРОНА

1. Выделение иРНК, несущую информацию о структуре молекулы ИНФ.
2. Получение кДНК на матрице иРНК.
3. Встраивание кДНК в векторную плазмиду с участием рестриктаз и лигаз и получение рДНК, содержащей ДНК вектора с генетическими маркерами и ДНК, кодирующую синтез целевого продукта.
4. Трансформация рДНК в реципиентную микробную клетку.
5. Получение клонов рекомбинантных продуцентов, способных синтезировать ИНФ (на плотной среде).
6. Размножение клоновой культуры – продуцента в жидкой среде.
7. Отделение клеток из культуральной жидкости центрифугированием.
8. Выделение целевых белков из нативного раствора или лизата биомассы продуцента (осаждение сульфатом аммония и др.).
9. Очистка ИНФ после растворения осадка с помощью аффинной хроматографии с использованием сорбента, связанного с моноклональными антителами к ИНФ. При пропускании раствора, содержащего целевой продукт и балластные вещества через колонку с иммуносорбентом происходит высокоспецифическое связывание антигена (ИНФ) с моноклональными антителами, остальные вещества не задерживаются. Затем ИНФ элюируют слабой кислотой, происходит диссоциация комплекса «антиген-антитело».

### 3. ЧАСТНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ

В 1981 г. в США впервые для синтеза **лейкоцитарного интерферона человека** (ЛИЧ) были использованы генетически сконструированные клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Большое количество исследований посвящено химическому синтезу гена, кодирующего ЛИЧ, состоящего из 166 аминокислотных остатков. Ген ЛИЧ из 514 н.п. оказался самым крупным геном, синтезированным в 1982 г. группой английских ученых. В России в 1984 г. осуществлен полный синтез гена ЛИЧ размером 600 н.п. (Институт биоорганической химии, под рук. М.Н. Колосова).

Предпринято несколько попыток создания **интерферонов с комбинированными свойствами**, используя тот факт, что члены семейства  $\alpha$ -ИНФ различаются по степени и специфичности своей противовирусной активности. Теоретически этого можно достичь, соединив части последовательностей генов разных  $\alpha$ -ИНФ. Это приведет к образованию гибридного белка с иными свойствами, чем у исходных белков.

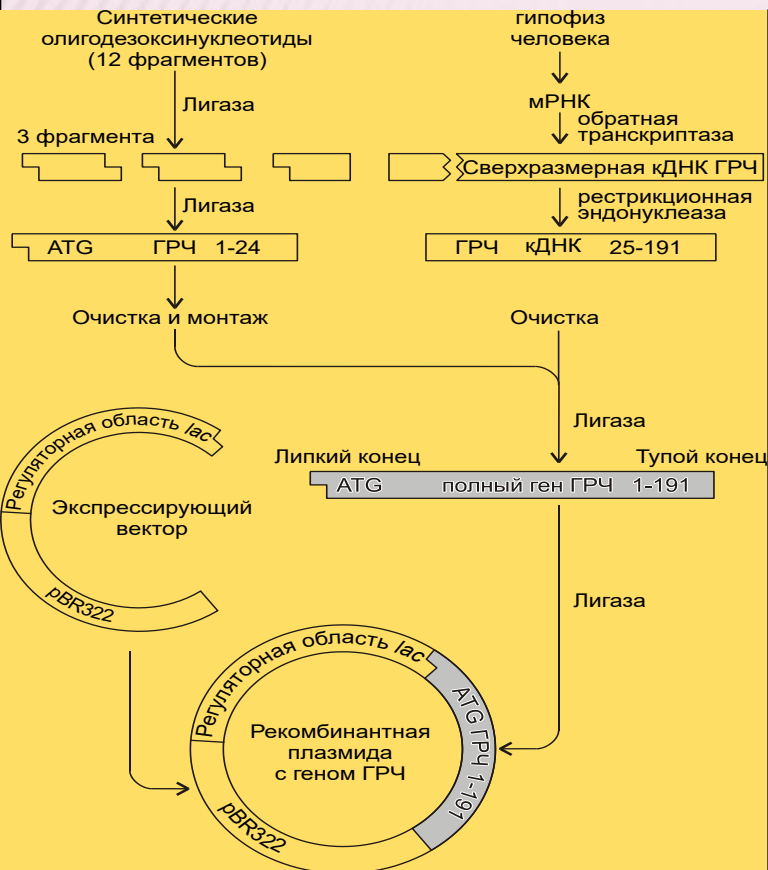
Сравнение последовательностей кДНК ИНФ $\alpha_1$  и ИНФ $\alpha_2$  показало, что они содержат одинаковые сайты рестрикции в позициях 60, 92 и 150. После расщепления обеих кДНК в этих сайтах и последующего лигирования фрагментов получено несколько гибридных генов. Эти гены экспрессировали в *E. coli*.

Проверка защитных свойств гибридных ИНФ на культуре клеток млекопитающих показала, что некоторые из них проявляют большую активность, чем родительские молекулы. Кроме того, многие гибридные ИНФ индуцировали образование 2',5'-олигоденилатсинтетазы в контрольных клетках. Этот фермент участвует в синтезе 2'–5'-связанных олигонуклеотидов, которые активируют латентную клеточную эндорибонуклеазу, расщепляющую вирусную мРНК.

Другие гибридные ИНФ проявляли большую, чем родительские молекулы, антипролиферативную активность в культурах раковых клеток человека.

### 3. ЧАСТНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ

## БИОТЕХНОЛОГИЯ ГОРМОНА РОСТА



Гормон роста человека в клетках *E. coli* и в культуре клеток животных получен в 1982 г. одновременно в Институте Пастера (Париж) и в Институте молекулярной биологии (Москва). Оказалось, что в бактериальных клетках возможен синтез аналогов гормона роста, с помощью которых изучались участки молекулы, важные для стимулирования роста и процесса неоглюкогенеза на молекулярном уровне.

Биосинтез соматотропина осуществлен Гедделем с сотр. На первом этапе клонировали двухнитиевую ДНК-копию мРНК и расщеплением рестрикционными эндонуклеазами получили последовательность, которая кодирует всю аминокислотную последовательность гормона, за исключением первых 23 аминокислот, - с фен. до лей. Затем клонировали синтетический полинуклеотид, соответствующий аминокислотам от 1-й до 23-й и, наконец, два полученных фрагмента объединили вместе, и «подстроили» к паре промоторов и участку связывания рибосом.

Конечный выход гормона составил 2,4 мкг на 1 мл культуры или 1 % от растворенных белковых клеток генетически сконструированного штамма *E. coli* (100000 молекул на клетку).

Полученный гормон обладал нужной мол. М. и не был связан с каким-либо бактериальным белком, от которого его необходимо было отщепить. Однако, он содержал на N-конце полипептидной цепи дополнительный остаток метионина, который удалялся при длительном выращивании *E. coli*.

В июне 1978 г. исследователи компании «Генентек» представили данные, доказывающие, что соматотропин с дополнительным остатком метионина, синтезированный в генетически сконструированных клетках бактерий, обладает биологической активностью нативного гормона. С 1984 г. после испытаний на токсичность компанией «Генентек» начато широкомасштабное производство бактериального соматотропина.

## $\beta$ -ЭНДОРФИН

$\beta$ -эндорфин – опиат мозга, состоящий из 31 аминокислотного остатка, синтезирован в генетически сконструированных бактериальных клетках в 1980 г. группой ученых из Австралии и США.

$\beta$ -эндорфин получен в клетках *E. coli* в виде гибридного белка с  $\beta$ -галактазидазой.

Процедура синтеза  $\beta$ -эндорфина включала получение путем обратной транскрипции мРНК – кДНК, кодирующей белок-предшественник, содержащей кроме последовательности  $\beta$ -эндорфина последовательность аденокортикотропного гормона и  $\beta$ -липотропина, в дальнейшем удаляемых.

$\beta$ -эндорфин, полученный из гибридного белка, очищенный, обладал значительной биологической активностью. Он специфически взаимодействовал с антисывороткой против  $\beta$ -эндорфина.

От  $\beta$ -эндорфина человека генно-инженерный  $\beta$ -эндорфин отличался по двум аминокислотам. Эти отличия можно легко устранить на нуклеотидном уровне путем замены двух кодонов в ДНК бактериальной плазмиды.

## СОМАТОСТАТИН

Соматостатин – гормон гипоталамуса. Его молекула состоит из 14 аминокислотных остатков. Соматостатин подавляет выделение инсулина и гормона роста человека.

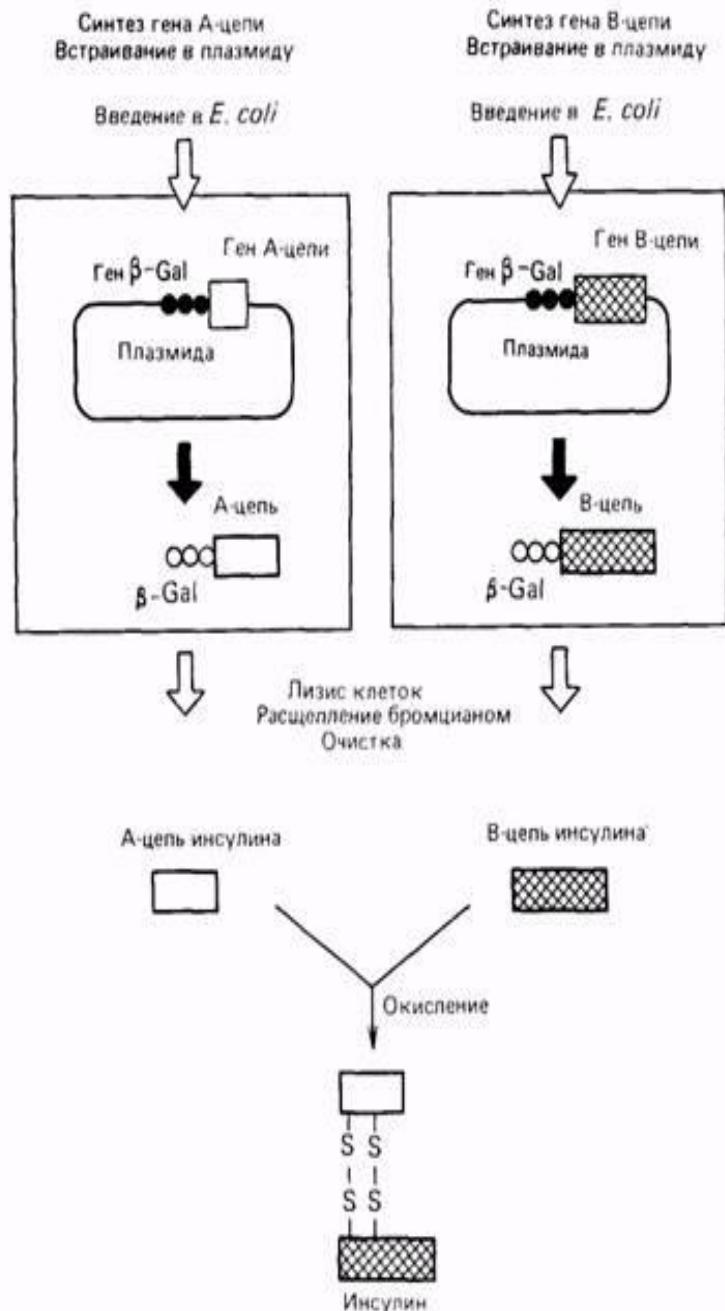
В национальном медицинском центре «Хоуп» осуществлен химико-ферментативный синтез гена длиной в 42 нуклеотида, способного кодировать соматостатин. Участок ДНК, кодирующий соматостатин, получен путем соединения тринуклеотидов. Из 52 н.п. синтетического гена 42 пары составляли структурный ген гормона, а остальные служили для присоединения синтетического гена к плазмиде *pBR322*, а также к сегменту лактозного оперона из генома *E. coli* или к  $\beta$ -галактазидазному гену. Данную чужеродную ДНК встраивали непосредственно за бактериальным геномом (или внутри него) после расщепления ДНК рестриктазами с образованием в результате трансляции гибридного белка.

Синтетический ген соматостатина был встроен в плазмиду *pBR322 E. coli* вблизи конца гена, кодирующего  $\beta$ -галактазидазу. Между двумя генами был помещен кодон метионина. После введения рекомбинантной плазмиды в бактериальную клетку, *E. coli* стала синтезировать гибридный белок. Часть его (соматостатин) затем отщепляли от  $\beta$ -галактазидазы бромцианом.

Такой сложный способ получения гормона был необходим, т.к. соматостатин, синтезированный в виде свободных молекул, быстро деградирует под действием бактериальных протеаз.

Первый синтез соматостатина генно-инженерным способом осуществлен в 1977 г. Бойером. Выход гормона составил 10000 молекул на 1 клетку. Из 100 г биомассы *E. coli*, выращенной в ферментере объемом 8 л, удалось выделить 5 мг соматостатина, т.е. столько, сколько можно его выделить из 100 г овечьих мозгов.

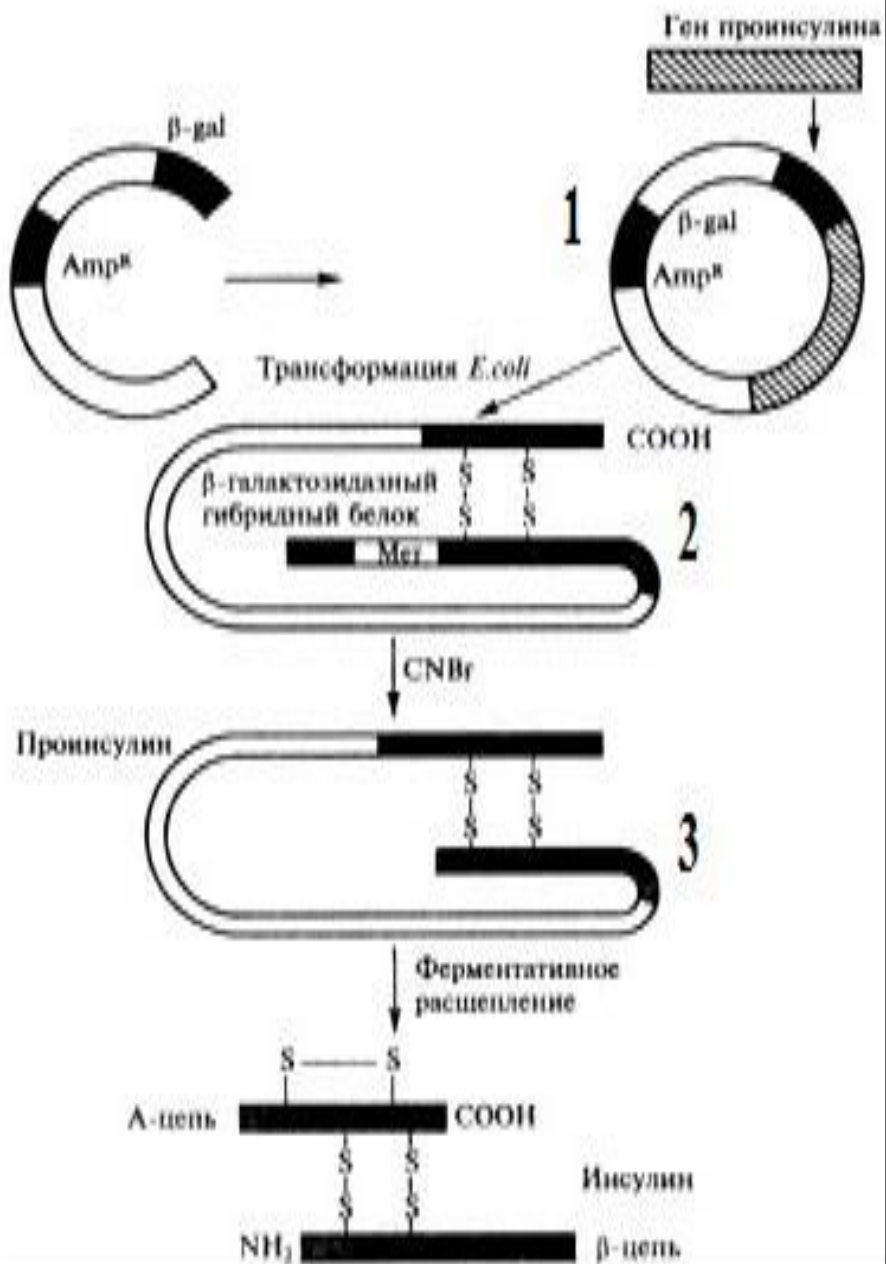
## ИНСУЛИН



Согласно схеме получения генно-инженерного инсулина, разработанной фирмой «Eli Lilly» в сотр. с фирмой «Genenotech Inc.», на первом этапе воссоздают последовательность ДНК по аминокислотной последовательности инсулина, отдельно синтезируя искусственные гены его А- и В-цепей. На 5'-конце каждого из них располагается кодон метионина, который в синтезированном белке оказывается N-концевым, а на 3'-конце — терминирующие последовательности. Каждый из генов встраивается в ген  $\beta$ -галактозидазы плазмид, и их вводят в клетки *E. coli*. Поскольку бактерии растут на среде с галактозой, то в них индуцируется синтез  $\beta$ -галактозидазы, а вместе с ней А- и В-цепей инсулина, присоединенных через остаток метионина.

После лизиса бактерий и обработки бромцианом, который специфически расщепляет белки по остатку метионина, цепи инсулина отделяют от  $\beta$ -галактозидазы. Затем проводят очистку цепей и их объединение, при этом образуется нативный двухцепочечный инсулин. Показано, что он не содержит белков *E. coli*, эндотоксинов и пирогенных веществ, по физическим свойствам неотличим от инсулина из поджелудочной железы человека и в тест-системе проявляет полную биологическую активность.

## ИНСУЛИН



**Альтернативный метод:** в 1980 г. У. Гилберт с сотр. выделили мРНК инсулина из опухоли  $\beta$ -клеток поджелудочной железы крысы и с помощью обратной транскриптазы получили с нее кДНК, которую встроили в плазмиду *pBR322 E. coli* (в среднюю часть гена пенициллиназы). Рекombинантная плазида содержала информацию о структуре проинсулина. В результате трансляции мРНК в клетках синтезировался гибридный белок, содержащий последовательности пенициллиназы и проинсулина, который выщепляли из него трипсином. Затем полученный ген проинсулина вводили в *E. coli*. После очистки проинсулина его расщепляли трипсином и  $\beta$ -карбоксипептидазой и получили нативный инсулин.

Наиболее предпочтительным в настоящее время является получение инсулина именно в виде предшественника, обеспечивающее правильность замыкания дисульфидных связей.



#### ЛЕЙЦИН-ЭНКЕФАЛИН И БРАДИКИНИН

В 1978 г. сотруд. Института биоорганической химии под рук. акад. Ю.А. Овчинникова осуществлен синтез двух структурных генов, кодирующих синтез нейропептидов – лейцин-энкефалина и брадикинина. Синтезированный ген лейцин-энкефалина имел два липких конца. Полученный синтетический ген был встроен вместе с фрагментом природной ДНК, содержащим промотор и проксимальную часть гена  $\beta$ -галактозидазы *E. coli*, в плазмиду *pBR322* и обработан смесью рестриктаз – *EcoRI* и *VamHI*. Полученная рекомбинантная плазида *pE<sub>k</sub>* была трансформирована в *E. coli*. В результате экспрессии встроенного гена бактерия начала продуцировать гибридный белок, содержащий на N-конце участок  $\beta$ -галактозидазы, а на C-конце – последовательность нейропептида. С помощью бромциана гибридный белок расщепляли *in vitro* и получали лейцин-энкефалин.

#### ФАКТОРЫ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ

В одном из вариантов получения факторов свертывания кровки использовали рДНК, содержащую промотор  $\beta$ -лактальбумина. Данный промотор обеспечивает транскрипцию гена  $\beta$ -лактальбумина (белок молока). Если его соединить с другим геном (ген фактора IX), то промотор будет включать транскрипцию данного гена и синтез соответствующего белка.

Рекомбинантную плазмиду с промотором  $\beta$ -лактальбумина и геном человека вводят в яйцеклетку овцы, после ее имплантируют в матку овцы. Некоторые особи из ее потомства будут содержать в своем геноме ген человека. Трансгенные животные синтезируют белок, кодирующийся геном человека. Поскольку промотор  $\beta$ -лактальбумина функционирует только в молочной железе, а в других органах он неактивен, то белок, кодируемый геном человека (фактор IX), синтезируется в молочной железе и секретируется с молоком. Синтезированный белок выделяют из молока трансгенных животных.

Биотехнологическим путем получают и другие факторы свертывания крови – фактор VIII (с помощью культуры клеток млекопитающих) и фактор IX (с помощью генно-инженерного штамма *E. coli*), применяющихся в терапии разных форм гемофилии.

### 3. ЧАСТНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ

#### ЭРИТРОПОЭТИН

Эритропоэтин – гликопротеин, необходимый для созревания (дифференцировки) эритроцитарных клеток. Этот белок видоспецифичен. Он вырабатывается в почках.

Эритропоэтин применяют при анемии, вызываемой почечной недостаточностью, а также при анемиях, возникающих при гемотрансфузии, облучении и химиотерапии опухолей, т.е. во всех случаях, сопровождающихся угнетением кроветворения.

Технология получения рекомбинантного эритропоэтина имеет существенную особенность – ген человеческого эритропоэтина встраивается не в микробные клетки, а в клетки животных (яйцеклетки китайского хомячка), в которых белок может быть гликозилирован. При этом процесс культивирования реализуют в монослойной культуре данных клеток.

#### ПЕПТИДНЫЕ ФАКТОРЫ РОСТА ТКАНЕЙ

Эти многочисленные биорегуляторы обладают видовой и тканевой специфичностью. Иногда применительно к ним используют определение – гормоны, образующиеся вне желез внутренней секреции.

Их наработка с целью медицинского применения возможна лишь в результате микробиологического синтеза с использованием генно-инженерных штаммов.

В настоящее время подробно изучены эпидермальный фактор роста и некоторые другие факторы роста тканей. Исследования в этом направлении продолжаются. Уже получены положительные экспериментальные данные, например, ускорение заживления ран при применении эпидермального фактора роста тканей. Хотя остается нерешенным вопрос о полной гарантии отсутствия возникновения злокачественного перерождения тканей.