Биотехнология – достижения и проблемы

- **Современная биотехнология** — это наука о генно-инженерных и клеточных методах создания и использования генетически трансформированных биологических объектов для интенсификации производства или получения новых видов продуктов различного назначения.

Разделы биотехнологии

- **Промышленная биотехнология** (биотехнологические производства, использующие преимущественно микроорганизмы).
- **Клеточная инженерия** (культивирование растительных и животных клеток).
- **Генная инженерия** (получение трансгенных организмов с новыми или усиленными свойствами и признаками).

Промышленная биотехнология

- **Фармацевтическая биотехнология** (вакцины, ферменты, инсулин, интерфероны, витамины, антибиотики, биодеградируемые пластмассы, биосовместимые материалы, тест-системы).
- **Сельскохозяйственная биотехнология** (биологическая азотфиксация, микробные инсектициды и пестициды, кормовые препараты).
- **Биоэлектроника** (биосенсоры, биочипы).
- **Биоэнергетика** (пр-во биогаза путем метанового «брожения» отходов, дешевый спирт как топливо, фотогальванические элементы из бактериородопсина).
- **Биотехнологическая очистка сточных вод**.
- **Биогеотехнология** (извлечение металлов из руд, десульфуризация углей, борьба с метаном в угольных шахтах, повышение нефтеотдачи пластов).

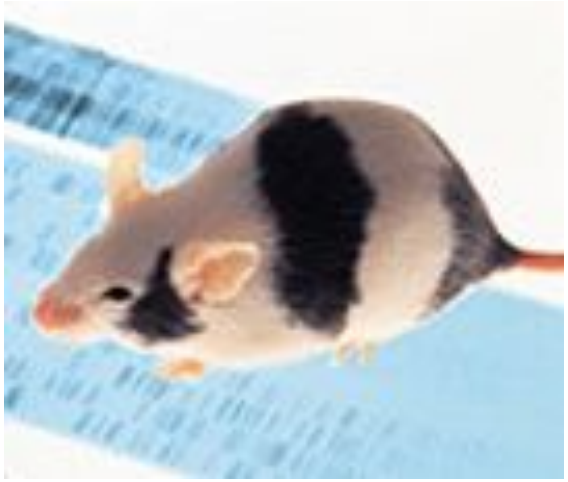
Выщелачивание меди, урана и др.

«Грибные» биотехнологические продукты

- Антибиотики (пенициллин и др.).
- Ферменты (амилазы, протеазы, целлюлаза и др.)
- Органические кислоты: лимонная, щавелевая, итаконовая, фумаровая и др.
- Аминокислоты в промышленных масштабах.
- Грибные алкалоиды (спорыньи, псилоцибе мексиканской и др.).
- Витамины (β-каротин, группа B, D и др.).
- Кормовые препараты витаминов и белков.
- Регуляторы роста растений.
- Препараты для биологической защиты растений от болезней и вредителей.

Клеточная инженерия

- конструирование клеток нового типа;
- создание химер агрегационным или инъекционным методом (генетическая мозаичность химер не наследуется);
- выращивание целого организма (клона) из одной соматической клетки или из культуры тканей.



Клонирование

- **Растений, грибов и микроорганизмов** – бесполое размножение зачатками многоклеточными или одноклеточными

- **Животных** – многоплодность за счет близнецов; создание клонов методами биоинженерии; трансплантация эмбрионов.

Клон - точная копия?

- Точное воспроизведение растения, животного или человека **невозможно**.
- Новый организм обязательно будет отличаться от материнского за счет **соматических мутаций**, **эпигенетической изменчивости**, **влияния окружающей среды** на фенотип и **случайных отклонений** в ходе онтогенеза.

Клеточная инженерия растений

- Ускоренное клональное микроразмножение растений, позволяющее из одного экспланта получать до 1 млн. растений в год;
- Получение безвирусных растений;
- Мультиферментные системы из культивируемых в суспензии клеток;
- Культивирование иммобилизованных клеток и протопластов;
- Отдалённая (до семейств) гибридизация при слиянии растительных протопластов и др.

Культуры растительных клеток в суспензиях

- **Растения**: женьшень, раувольфия змеиная, наперстянка шерстистая и пурпурная, диоскорея дельтовидная, воробейник, белладонна, паслён дольчатый, дурман обыкновенный, ландыш майский, клещевина, агава, мак снотворный и др.
- **Продуцируют**: алкалоиды, терпеноиды, гликозиды, полифенолы, полисахариды, эфирные масла, пигменты, антиканцерогены (птотецин, харрингтонин), пептиды (ингибиторы фитовирусов).

Проблемы культивирования клеток в суспензии

- Клетки растений очень крупные, и их размеры меняются в процессе онтогенеза.
- Оседание тяжёлых клеток приводит к появлению «мёртвых» зон в сосудах.
- Чем крупнее клетка, тем больше опасность её повреждения в процессе перемешивания (механический стресс).
- Клетки прилипают друг к другу и к мешалкам.

Успехи клонирования животных

Овечка ***Долли*** (1996-2003) и *Йен Уилмат* - один из ученых, проводивших эксперимент.

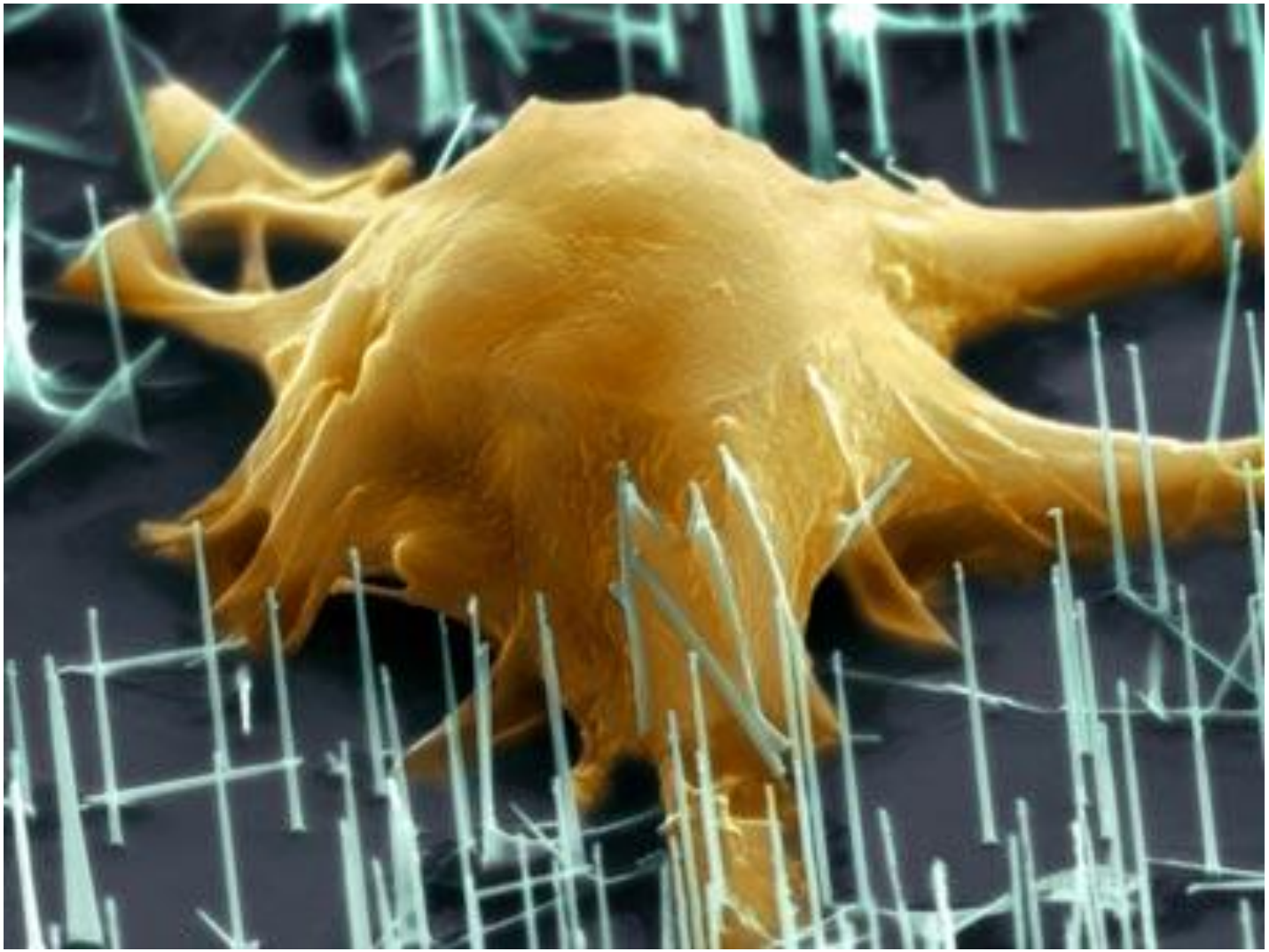
Первые клонированные животные

- 1996 — овечка Долли
- 1997 — мышь
- 1998 — корова
- 1999 — козёл
- 2000 — свинья
- 2001 — кошка, гаур (дикий бык)
- 2002 — кролик
- 2003 — лошадь, мул, олень, крыса
- 2005 — собака, волк
- 2006 — хорёк
- 2009 — верблюд

Клеточная инженерия человека

- Экстракорпоральное оплодотворение;
- Криоконсервация эмбрионов;
- Многолетнее ведение культур клеток человека, например, **HeLa**, полученных от Генриетты Лакс, умершей от рака шейки матки;
- Культивирование фибробластов и др.;
- Использование стволовых клеток в медицине и др.

Эмбриональная стволовая клетка мыши



Достижения в области изучения и терапевтического использования стволовых клеток

- Испанские хирурги провели первую в мире трансплантацию целого органа, выращенного из стволовых клеток пациента - **биоинженерную трахею**.

Трахея была выращена из стволовых клеток, полученных из костного мозга пациента.

Возможный материал для получения стволовых клеток

Создание iPS-клеток

- iPS-клетки (Induced Pluripotent Stem cells)- индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.
- Основной метод перепрограммирования для получения iPS-клеток - использование вирусных векторов - чужеродная ДНК (вируса или бактериофага) включается в генетический аппарат клетки и с помощью её обменных механизмов начинает синтезировать «свой» белок.

- Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки впервые были получены командой Шинья Яманака в Университете Киото (Япония) в 2006 году.
- Исходным материалом послужили **фибробласты** мыши.

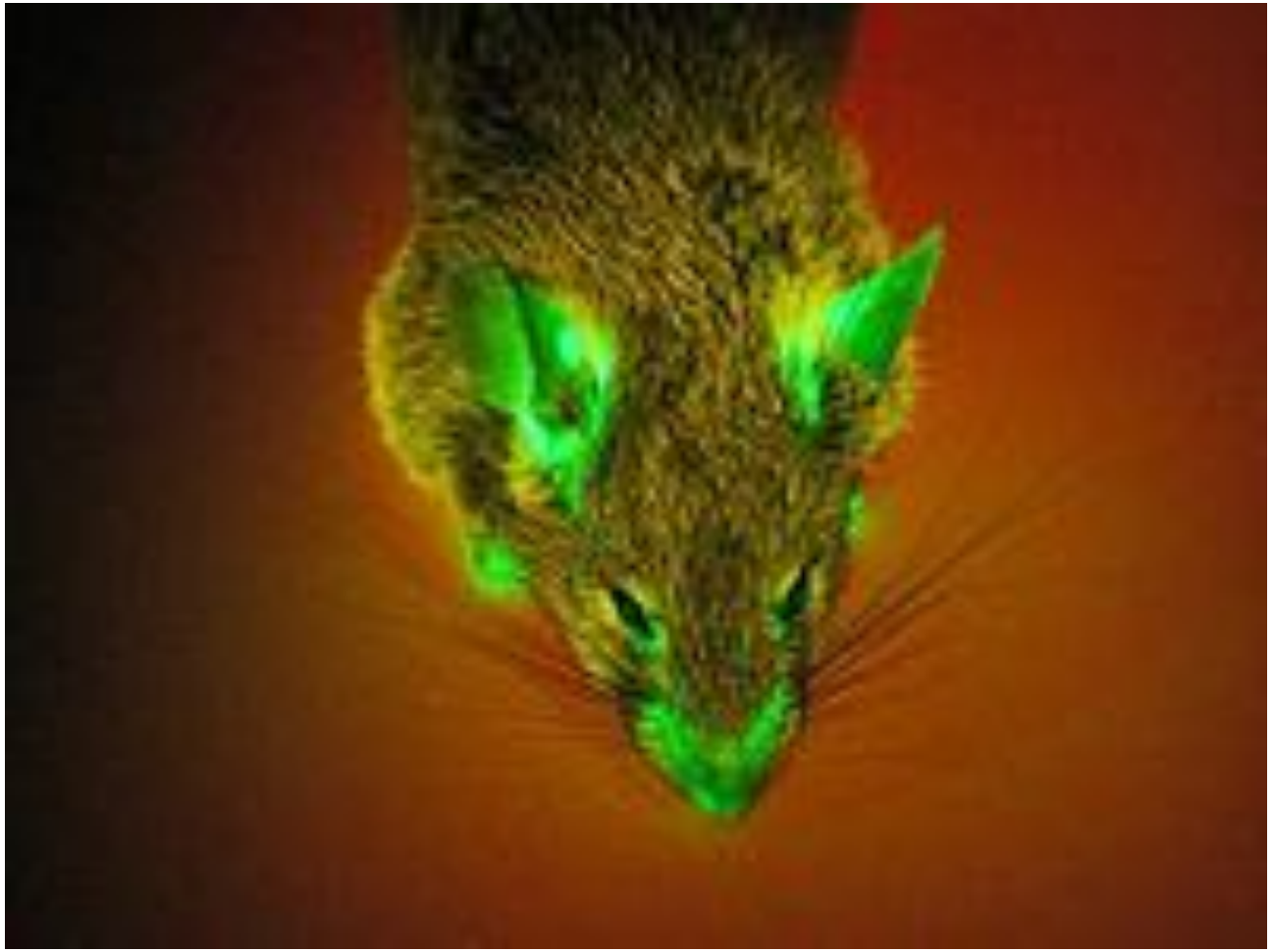
Фибробласты эмбриона мыши

Генная инженерия

- Конструирование рекомбинантных молекул ДНК, внедрение селективных и репортёрных генов;
- Генетическая паспортизация;
- Диагностика генетических заболеваний;
- Создание ДНК-вакцин;
- Генотерапия различных заболеваний;
- Международная научная программа «Нокаут всех генов»(на мышах).

История становления генной инженерии

- конструирование специальных штаммов ***кишечной палочки*** для промышленного производства человеческих гормонов – инсулина (1978 г.), гормона роста (1982 г.) и др.;
- получение ***трансгенных*** организмов с гибридной ДНК;
- создание линий (пород, сортов), устойчивых к вирусным заболеваниям, а также линий с полезными для человека признаками;
- выращивание лабораторных животных со ***светящимися*** тканями и другими маркерами.



Мышь, маркированная геном GFP

Широко используются для прижизненного мечения белков, органелл и клеток генетические флуоресцирующие маркеры типа GFP (зелёные) и RFP (красные).

Ген, кодирующий **зелёный флуоресцентный белок** первоначально был выделен из медуз, а ген, кодирующий **красный флуоресцирующий белок** - из морского анемона.

В настоящее время выведено несколько линий трансгенных мышей, крыс, свиней, обладающих светящимися тканями. Это позволяет проследить судьбу отдельных клеток и органелл при изучении стволовых клеток, трансплантантов и др.

- Зелёный флуоресцентный белок (**GFP**) впервые был выделен из медуз *Aequorea victoria* в начале 60-х гг XX в. японским ученым Осама Симомура.

- В 90-х годах Мартин Челфи успешно получал экземпляры червя *Caenorhabditis elegans* со светящимися нейронами.

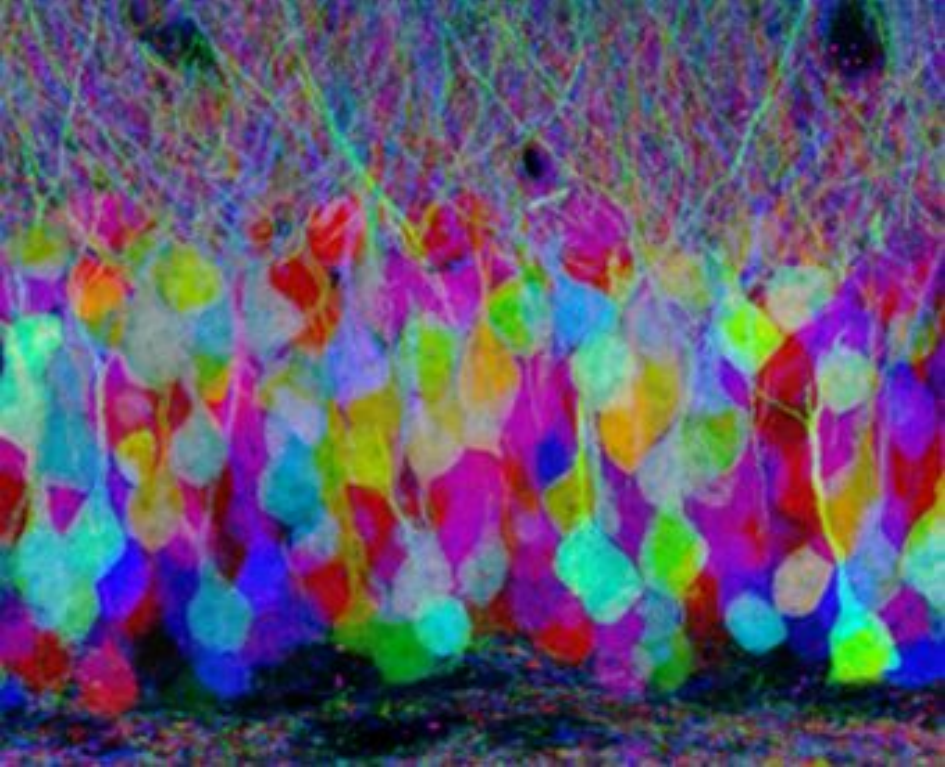
- Роджер Циен создал многоцветную «палитру» светящихся белков и множество методов их использования.

- За свои работы в области флуоресцентных белков эти ученые получили Нобелевскую премию 2008 года в области химии

«Светящиеся» ткани у трансгенных кур

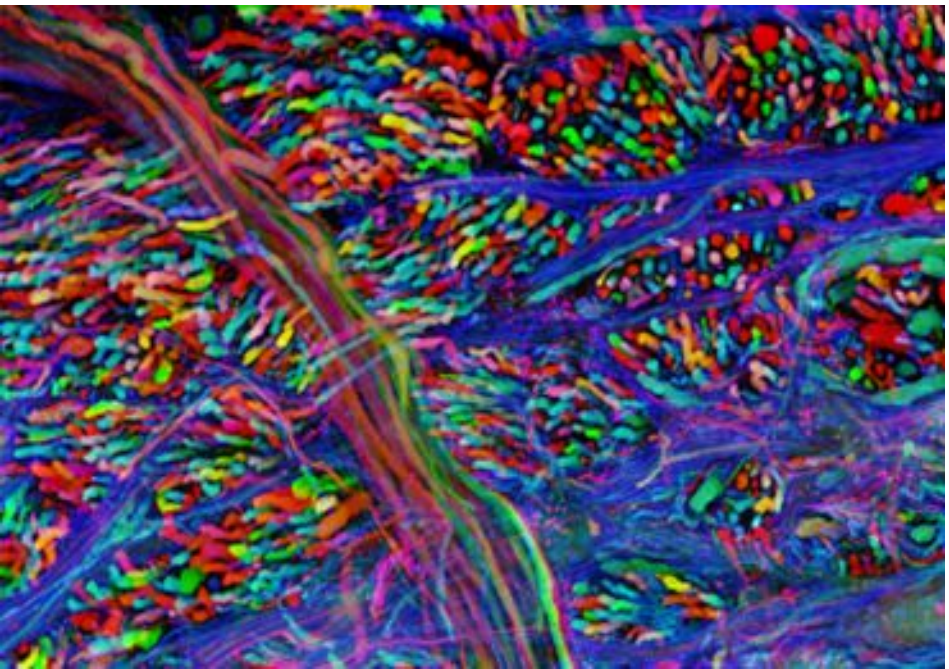
Мыши с «радужным мозгом»

- Комбинируя исходные гены (синий, желтый, красный), ученым удалось создать 100-цветную палитру «светящихся» белков.
- Выведены мыши «**brainbow**», у которых разные нейроны мозга «окрашены» в разные цвета.
- «Brain» - мозг, «rainbow» - радуга. В русском языке пока нет научного аналога «brainbow» («радужный мозг»).



В мозге живой мыши хорошо различимы отдельные нейроны

(зубчатая извилина гиппокампа; конфокальный микроскоп)



Разноцветные пучки аксонов

(поперечный срез ствола мозга; конфокальный микроскоп)

«Светящиеся» рыбки данио рерио (GloFish) стали первым общедоступным генетически модифицирован-ным домашним животным.

Методы введения генов в клетку

- При помощи векторов (бактериальные плазмиды, вирусы, транспозоны и др.).
- Прямое введение гена в клетку (трансфекция, микроинъекция, электропорация, метод «мини-клеток», упаковка в липосомы, электронная пушка)

«Генная пушка»

- Метод **биологической баллистики** является одним из самых эффективных методов трансформации растений, особенно однодольных (кукуруза, рис, пшеница, ячмень).
- Генные конструкции напыляют на частички вольфрама, платины или золота (0,6-1,2 мкм) и выстреливают ими из пушки по суспензии клеток с расстояния 10-15 см.
- Вместо суспензии клеток можно стрелять по пыльце (гаплоидные трансформанты табака).

Генная пушка

Введение генов животным

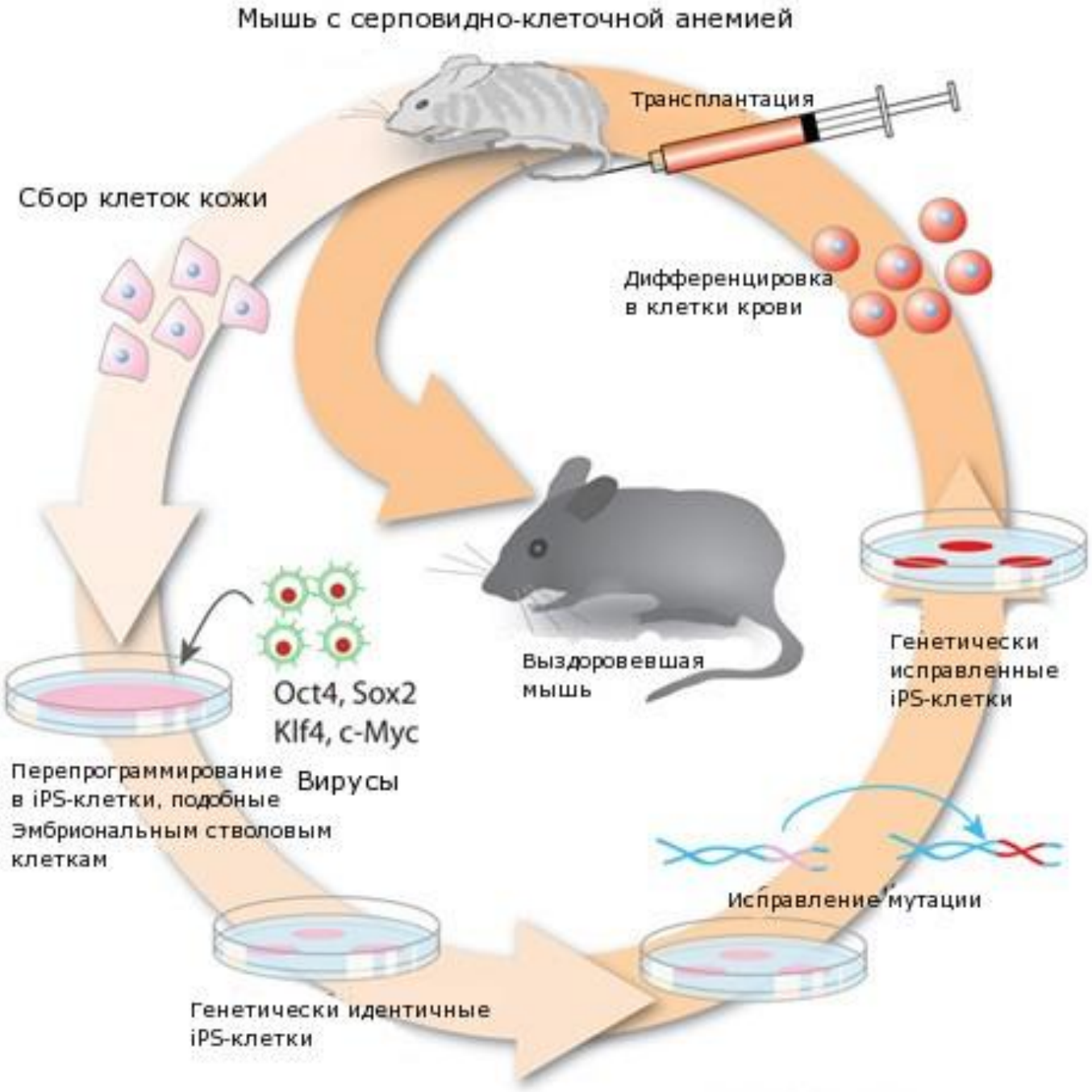
- Лучшие векторы созданы на основе ретровирусов (вирус лейкоза мышей и др.).
- Ретровирусы обеспечивают около 40% от всех трансформаций, реже используют аденовирусы (из-за сильного иммунного ответа).
- Около 25% генов вводят путем упаковки ДНК в липосомы.

Фетальная генотерапия животных

- Лечение мышей с наследственным дефицитом **гормона роста**, наследственным дефицитом основного белка **миелина** и наследственным дефицитом бета-цепи **глобина**.
- Трансгенные животные получаются из 15-20% яйцеклеток с инъецированной ДНК, и лишь у 20-30% животных введенный ген экспрессируется.
- Велика опасность повреждения гена хозяина (инсерционный мутагенез), что может стать причиной злокачественного новообразования .

Соматическая генотерапия животных

в 2007 г. мыши, больные человеческой **серповидноклеточной анемией**, были вылечены с помощью перепрограммированных клеток своей кожи.

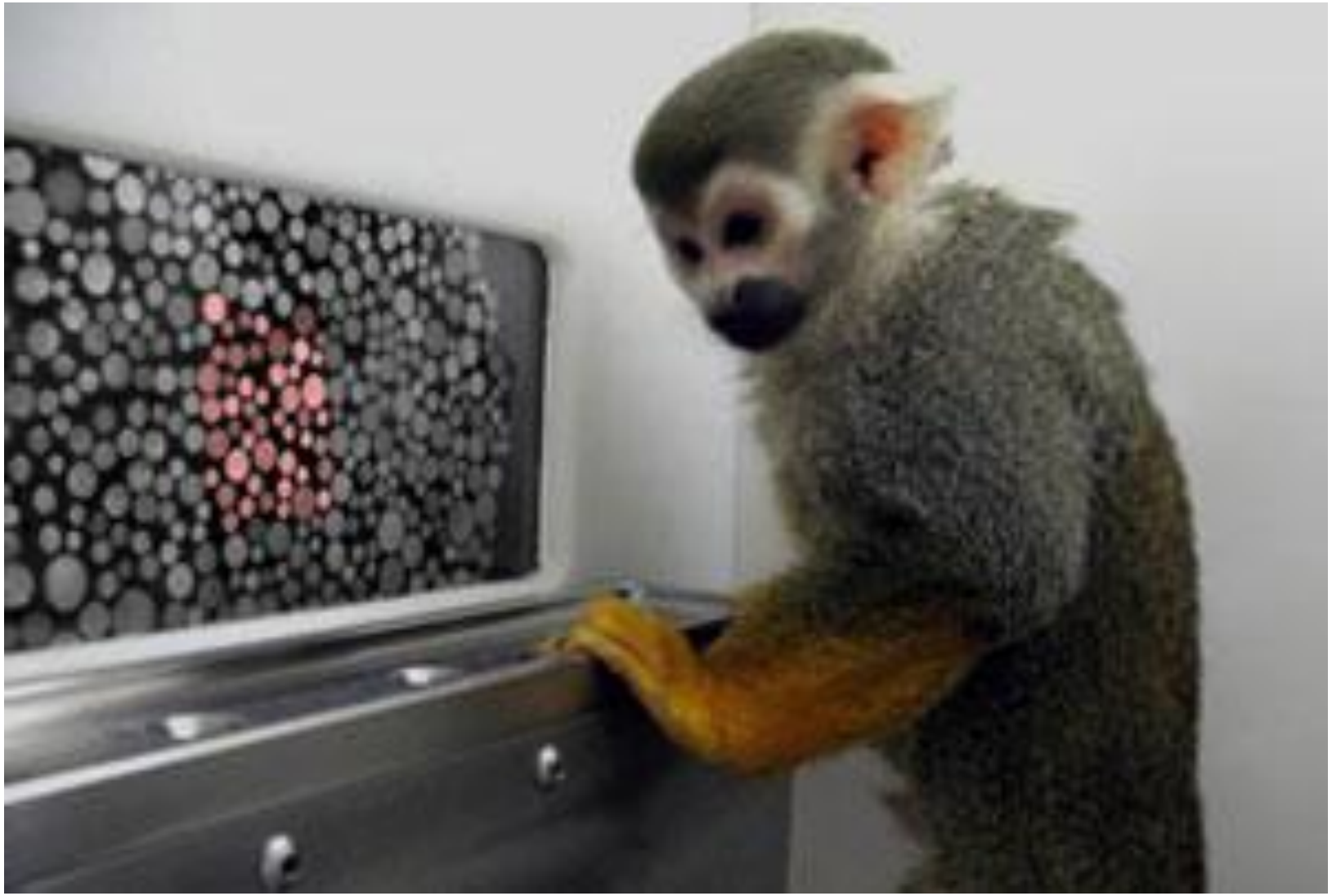

Мышь с серповидно-клеточной анемией
Трансплантация
Сбор клеток кожи
Дифференцировка
в клетки крови
Выздоровевшая
мышь
Генетически
исправленные
iPS-клетки
Oct4, Sox2
Klf4, c-Myc
Вирусы
Перепрограммирование
в iPS-клетки, подобные
Эмбриональным стволовым
клеткам
Исправление мутации
Генетически идентичные
iPS-клетки

- В 2008 г. биологи Гарвардского университета сумели перепрограммировать взрослые клетки в эмбриональные **непосредственно в живом организме**, не извлекая из него эти клетки.

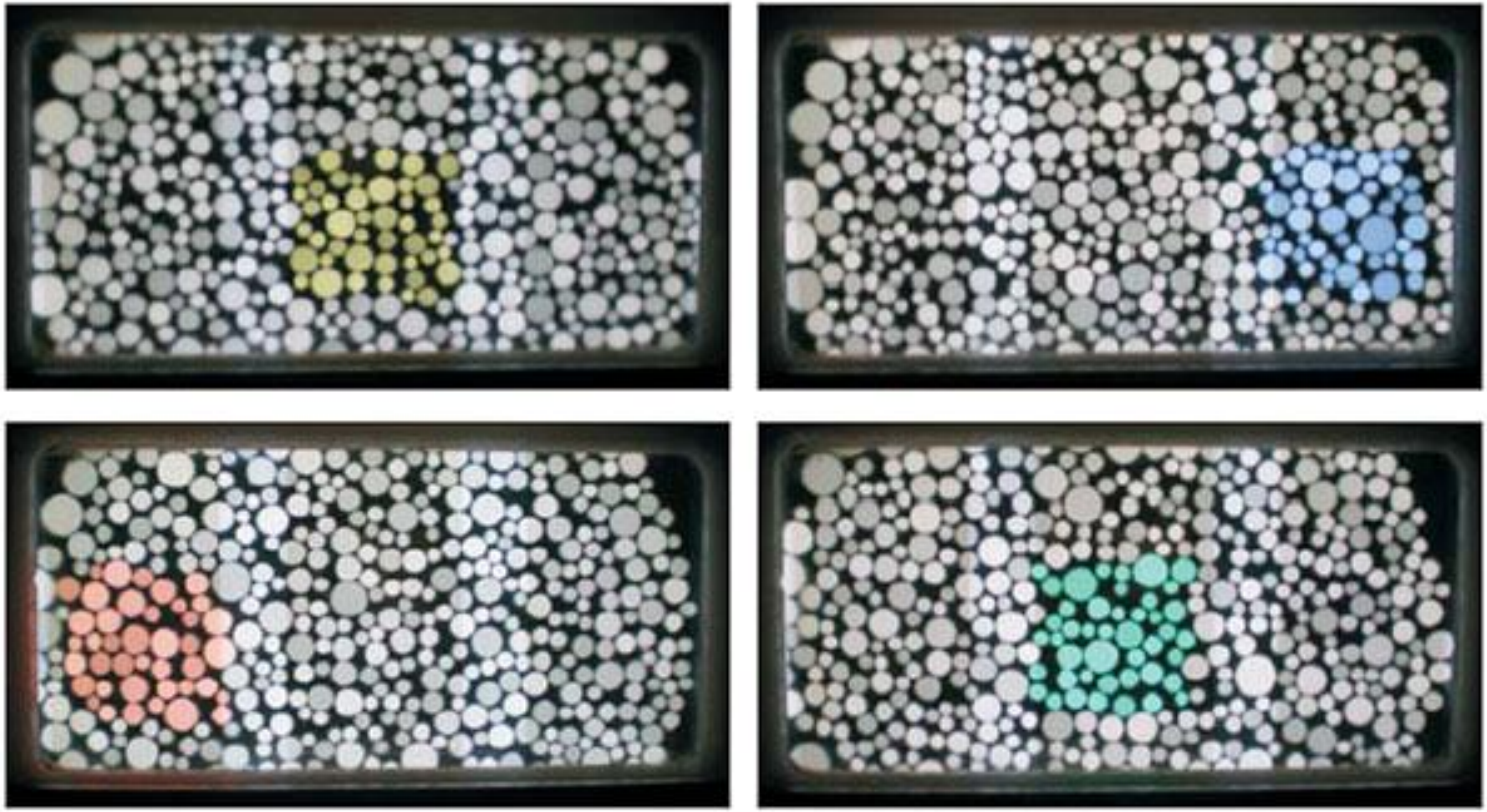
- Эксперимент был проведен на клетках поджелудочной железы взрослых мышей, в результате этого из обычных клеток были получены клетки, производящие **инсулин**.

Успехи генетической инженерии в экспериментах над приматами

- Доказана возможность «вживления» искусственно модифицированного гена в ткани взрослых особей приматов;
- Доказана пластичность центральной нервной системы, которая готова принять сигналы от новых рецепторов без глубоких качественных перестроек.



Саймири в эксперименте по «вживлению» гена «длинноволнового» опсина в сетчатку глаз.



- Через несколько недель после инъекции вектора (аденовируса с встроенным геном длинноволнового опсина) взрослые обезьяны из дальтоников превратились в обезьян с **трехцветным** зрением.

Соматическая генотерапия человека

- **Амавроз Лебера** - врождённая слепота. Инъекция вектора с геном, кодирующим светочувствительный пигмент, в сетчатку глаза.
- **Муковисцидоз** - поражение эпителия лёгких и др. Аденовирусный вектор или липосомы вводят в форме аэрозоля в дыхательные пути больного.
- **Прогрессирующая мышечная дистрофия Дюшенна**. Ген дистрофина инъецируют в мышцы.

Начало применения генной инженерии в сельском хозяйстве

- Первые трансгенные растения (растения табака со встроенными генами из микроорганизмов) были получены в 1983 г.
- Первые успешные полевые испытания трансгенных растений (устойчивые к вирусной инфекции растения табака) были проведены в США в 1986 г.

Первые трансгенные продукты появились в продаже в США в 1994 г.

- **томаты** «Flavr Savr» с замедленным созреванием, созданные фирмой «*Calgen*»;
- гербицид-устойчивая **соя** компании "*Monsanto*".

Уже через 1-2 года биотехнологические фирмы поставили на рынок целый ряд генетически изменённых растений: томатов, кукурузы, картофеля, табака, сои, рапса, кабачков, редиса, хлопчатника.

Трансгенные томаты

Переживание бактериоза: слева трансгенное растение томата, справа - обычное

Трансгенный хлопчатник

- В 1997 году в Китае начали выращивать трансгенный хлопчатник, в геном которого был вставлен ген бактерии *Bacillus thuringiensis*.
- Белок, кодируемый этим геном, токсичен только для гусениц некоторых бабочек.
- Повысились урожаи хлопка.
- Резко сократилось использование химических ядов, что сильно улучшило экологическую обстановку в сельскохозяйственных районах Китая.

Гусеница хлопковой совки (*Helicoverpa armigera*)

- В 1999 г. трансгенные растения были высажены на общей площади порядка 40 млн. га;
- В США генетически модифицированные растения (GM Crops) составляют около 50% посевов кукурузы и сои и более 30-40% посевов хлопчатника;

- В XXI веке начала развиваться «**метаболическая инженерия**» - получение организмов, содержащих ценные белки, модифицированные полисахариды, съедобные вакцины, антитела, интерфероны и другие "лекарственные" белки.

Успехи в выведении трансгенных животных

- В 1980-х гг. фирма «*AquaBounty*» (Массачусетс) ввела в икринки **атлантического лосося** конструкцию из «антифризного» гена бельдюги и изменённого гена гормона роста лосося - получился ген, синтезирующий избыток гормона роста и работающий круглый год, а не только в теплые месяцы.
- Позже были выведены гигантские форели, тиляпии, палтусы и другие рыбы.

Трансгенные рыбы

За год трансгенные лососи (а) вырастают в 10 - 11 раз крупнее обычных, тиляпии (в) в 1,5 - 2 раза крупнее обычных

Трансгенный КРС

- Созданы трансгенные коровы, в молоке которых содержится человеческий белок **лактоферрин**, необходимый для питания грудных детей, больных и ослабленных людей.

- В литре молока обычной коровы содержится 0,02 г лактоферрина. В литре молока коров корпорации «*Gene Farm*» – 1 грамм человеческого лактоферрина. Все они – потомки быка по кличке Герман, который родился в 1990 году в Голландии.

Трансгенные козы

- совместный российско-белорусский проект «*БелРосТрансген*», работа началась в 2002 году;
- цель проекта - промышленный выпуск детского питания для грудных детей на основе козьего молока с человеческим лактоферрином;
- задача – получить коз, выдающих до 50 г/л лактоферрина в молоке;
- в 2007 году родились первые трансгенные козлики Лак-1 и Лак-2;
- весной 2009 родились четыре козочки и восемь козликов, половина потомства наследует необходимый ген.

Лак-1 и Лак-2 (г. Жодино, 2007 г.)

Потомственный «лактоферриновый» козленок
(Жодино, весна 2009 г.)

Трансгенные овцы

- В начале 90-х гг. в Институте биологии гена Российской академии наук созданы овцы с геном **химозина** из КРС.
- В 1999 году началось промышленное производство химозина из молока трансгенных овец в ГПЗ «Трудовой» (Саратовская обл.). Себестоимость в 4-5 раз ниже, чем при получении из сычугов забитых молочных телят.
- От одной овцы за сезон можно получить достаточно фермента, чтобы приготовить 30 тонн сыра.
- Для процесса сыроварения химозин можно не выделять, а просто залить 50 тонн молока КРС несколькими литрами овечьего молока и перемешать.

Трансгенные свиньи

- В нашей стране были получены свиньи, несущие ген **соматотропина** (гормона роста). В отличие от мышей, трансгенных по соматотропину, свиньи не выросли вдвое, но зато стали менее жирными и более мясными.
- Трансгенные свиньи со встроенным геном **инсулиноподобного фактора** были созданы для изучения цепи биохимических превращений инсулина, а побочным эффектом оказалось укрепление иммунной системы свиней.

Трансгенные куры

- В 2005 г. фирма «*Origen Therapeutics*» (Калифорния) в куриных яйцах получила антитела к **раку предстательной железы** человека. Противораковая активность этих антител оказалась в 10-100 раз большей, чем у антител, полученных другими методами.
- В 2005 г. британская «*Oxford Biomedica*» в сотрудничестве с американской компанией «*Viragen*» и Рослинским институтом получила в белке трансгенных яиц антитела против одного из видов рака кожи – **меланомы**.

В настоящее время биотехнологические продукты составляют около четверти всех товаров в мире.

Спасибо за внимание!

ссылки

- www.biotechnolog.ru
- www.transgen.ru
- www.xumuk.ru
- elementy.ru
- humbio.ru
- ru.wikipedia.org

Презентация подготовлена О.А.Корниловой,
д.б.н., проф. каф. зоологии РГПУ им. А.И.Герцена