

ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ОРГАНИЗМЫ: ОТ БАКТЕРИЙ ДО ЧЕЛОВЕКА

Показаны перспективы использования современных ДНК-технологий для решения проблемы увеличения эффективности селекционной работы. Биотехнологические процедуры необходимо проводить при наличии популяционно-генетического контроля последствий их использования.

ДНК-технологии, селекция, популяционно-генетический контроль

Основой традиционной селекции сельскохозяйственных животных и растений является использование генетических резервов скрытой мутационной изменчивости. И.И. Шмальгаузен утверждал: «Ясно, что чем выше объем мобилизационного резерва, т.е. чем выше развит регуляторный аппарат организма, допускающий в широком масштабе скрытое мутирование и накопление нейтрализованных мутаций, тем выше потенциальная мобильность организма. Соответственно наиболее мобильны позвоночные животные, которые и достигали максимальных темпов эволюции, при благоприятных для этого условиях».

Доместикация животных и растений привела к резкому сокращению давления естественного отбора и быстрому накоплению резерва скрытой мутационной изменчивости. Это привело к исключительно быстрым темпам эволюции сельскохозяйственных животных и растений под влиянием четко направленного искусственного отбора, что было бы невозможным без накопления этого резерва. Определенную роль играли новые мутации, но главным осталось до последнего времени использование резерва скрытой мутационной изменчивости.

© В.И. Глазко, 2006

Розведення і генетика тварин. 2006. Вип. 40.

Мобилизации этих резервов способствовало широкое использование скрещивания различных популяций и сортов сельскохозяйственных организмов. Этот прием особенно широко использовался в практике селекции животных в нашей стране, когда была реализована широкая программа скрещивания местных с рядом иностранных, высокопродуктивных мировых пород. Это позволило повысить генетический потенциал продуктивности огромных популяций животных, потеряв при этом высокую приспособленность локальных пород к местным природно-климатическим условиям.

Мутационная и комбинационная вариабельность характеризуются высоким уровнем неопределенности, и только жесткий отбор в многочисленных популяциях в ряде поколений позволяет создавать животных с заданными свойствами.

Система крупномасштабной селекции, основанная на методах оценки генотипа по качеству потомства, эффективной системе воспроизводства и информационного обеспечения селекции, позволила достичь существенных результатов. Достаточно сказать, что за последние 60–70 лет в СНГ было выведено более 87 пород разных видов сельскохозяйственных животных, большое число заводских типов, линий гибридов, которые, к сожалению, не обеспечили резкий подъем генетического потенциала отечественного животноводства. Система крупномасштабной селекции продолжает совершенствоваться, но она не обеспечила основу ускорения селекционного процесса.

В настоящее время в результате интенсивной селекции и породообразования накопленный резерв изменчивости уменьшается, и это не может не сказаться на стратегических возможностях селекции сельскохозяйственных животных в перспективе.

Важность понимания этой проблемы определяется еще и тем, что в глобальном масштабе происходит заметное снижение продуктивности зерновых, основного источника продуктов питания. Так известно, что с 1960 по 2000 г. глобальная продуктивность зерновых возросла примерно в 2, 3 раза, в том числе и в расчете на 1 га, при этом вклад в увеличение урожайности зерновых с 1960 по 2000 г. увеличился: воды в 2 раза; азотистых

удобрений в 10 раз; фосфорных удобрений в 7,5 раза; пестицидов в 6 раз. Причем эффективность вклада азотистых удобрений в получение урожая зерновых с 1960 по 2000 г. упала в 4 раза.

Открытия в области структуры генома, сделанные в середине XX в., дало мощный импульс к созданию принципиально новых систем направленного изменения генома живых существ. Были разработаны методы, позволяющие конструировать и интегрировать в геном чужеродные генные конструкции. Это направление исследований быстро прогрессирует и в области растениеводства, и в промышленной микробиологии уже дает большой экономический эффект. Развивается это направление и в области создания трансгенных животных, в том числе и сельскохозяйственных. Одним из направлений является интеграция в геном животных генных конструкций, связанных с процессами регуляции обмена веществ, что обеспечивает последующее изменение и ряда биологических, и хозяйственно полезных качеств животных. Следует подчеркнуть, что при создании генетически модифицированных организмов используются приемы, реализованные в процессе эволюции всех живых организмов, которые и легли в основу современных ДНК-технологий. К таким приемам относятся, в частности, генетические модификации, связанные с происхождением высших организмов. К ним относятся и возникновение межклеточных взаимодействий в связи с половым процессом у прокариот, и акты симбиоза, в результате которых возникли ядерные клетки и такие клеточные органеллы, как митохондрии и хлоропласты. Известен также универсальный генетический ответ на стрессирующие факторы путем ускорения комбинаторики генетических процессов. Так, например, у прокариот — путем прямого горизонтального переноса генетического материала (например, см. табл. 1).

Наивысший процент общих ортологов обнаружен у азотфиксирующих симбиотических бактерий *S. meliloti* и *M. loti have* — соответственно 51 и 45% по отношению к р42d. Члены подкласса α -протеобактерий такие как *Caulobacter*.

У высших животных и растений в стрессирующих условиях происходит увеличение частот перемещений мобильных генетических элементов. Кроме этого, у высших растений самоопылителей в стрессирующих условиях увеличивается частота перекрестных опылений, у животных — частота рекомбинаций в мейозе при формировании гамет.

1. Горизонтальный перенос генетического материала

Виды	Количество ортологов	% сходства с p42d
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	183	50,9
<i>Mesorhizobium loti</i>	163	45,4
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58 U. Wash	115	32,0
<i>Ralstonia solanacearum</i>	114	31,7
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58 Cereon	114	31,7
<i>Caulobacter crescentus</i>	103	28,8
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	91	25,3
<i>Brucella melitensis</i>	91	25,3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	89	24,7
<i>Escherichia coli</i> O157:H7—EDL933	87	24,2
<i>Xanthomonas citri</i>	80	22,2
<i>Nostoc</i>	75	20,8
<i>Xanthomonas campestris</i>	73	20,3
<i>Escherichia coli</i> K12	72	20,0
<i>Synechocystis</i> PCC6803	68	18,9
<i>Bacillus subtilis</i>	60	16,7
<i>Xylella fastidiosa</i>	52	14,4
<i>Thermotoga maritima</i>	46	12,8
<i>Haemophilus influenzae</i>	40	11,1
<i>Helicobacter pylori</i>	38	10,5
<i>Aquifex aeolicus</i>	35	9,7
<i>Archeoglobus fulgidus</i>	35	9,7
<i>Aeropyrum pernix</i>	33	9,1
<i>Borrelia burgdorferi</i>	20	5,5
<i>Buchnera</i>	17	4,7
<i>Mycoplasma genitalium</i>	10	2,7

Спонтанные рекомбинационные процессы в ядерных геномах высших организмов к настоящему времени достаточно подробно документированы. Это и горизонтальный перенос генов между клеточными органеллами, прокариотическими симбионтами и ядерным геномом (табл. 2), между разными участками ядерного генома за счет транспозиций, а также потока ДНК-копий различных РНК (ретротранспозонов). Известен существенный вклад в эволюцию высших организмов за счет дубликаций генетических элементов, дивергенции копий (ортологов) и гомогенизации копий (паралогов). Для высших растений типично образование аутополиплоидов, аутополиплоидов, горизонтальный перенос генетического материала от агробактерий.

2. Примеры горизонтального переноса генетической информации

Вид	Гены	Чужеродная ДНК
<i>Deinococcus radiodurans</i>	Ген топоизомеразы IВ эукариот	
<i>Pseudomonas</i>	Гемоглобиноподобная протеаза эукариот	
<i>Haemophilus</i> и <i>Streptococcus</i>	Гены эукариот, кодирующие фукутинподобные белки	
<i>E. coli</i>		Около 17% ДНК-эукариот
<i>Salmonella enterica</i>		10% генов эукариот
Грамположительные эубактерии	Дигидролипоамиддегидрогеназа из архебактерии <i>Halobacterium halobium</i>	
Протеобактерии	Аденилсульфатредуктаза из архей <i>A. fulgidus</i>	
Эубактерии	Три гена сульфатредуктаз <i>A. fulgidus</i>	
Хламидии		Около 30 генов эукариотического типа
Эубактерии <i>Thermotoga maritima</i>		24% генов, сходные с архебактериальными генами

Современные методы получения генетически модифицированных организмов развиваются на основании имитаций и

применения природных рекомбинационных процессов. Это реализуется и при приготовлении искусственных генных конструкций, и при подборе векторов для их переноса, и при клонировании. У высших растений в качестве векторов часто используют генетически модифицированные агробактерии.

Основные направления использования современных ДНК-технологий имеют свою специфику у разных организмов. Так у прокариот создают генетически модифицированные микроорганизмы для решения проблем ремедиации, ДНК-технологии используют в целях изучения структуры микробных сообществ, создания новой геномной систематики живых организмов, выявления возбудителей инфекционных болезней, создания микроорганизмов, стимулирующих рост растений. В создании генетически модифицированных растений (ГМ) главными направлениями являются ГМ растения, устойчивые к насекомым-вредителям; ГМ растения, устойчивые к гербицидам; ГМ растения, устойчивые к болезням; ГМО — растения, устойчивые против вирусов и вириодов; фиторемедиация; использование ГМ как биореакторов и для разработки вакцин. В создании генетически модифицированных животных существенными аспектами являются генетические модификации на уровне индивидуальных генов, методы получения ГМ животных (в том числе и биореакторов по производству белков, необходимых для фармакологии), а также клонирование — манипулирование на уровне целых геномов. У человека развиваются методы генной терапии, моделирования наследственных и приобретённых заболеваний, дородовая диагностика, изучение эволюции человека.

В то же время, несмотря на очевидные успехи, достигнутые как в получении трансгенных организмов, так и в клонировании высших организмов, остаются недостаточно исследованными риски, которые появляются при использовании современных ДНК-технологий. К таким рискам относятся, в частности, следующие: возможности возникновения инсерционного мутагенеза после встройки в геном хозяина чужеродной конструкции; недостаточная изученность вопросов контроля «адреса» встройки и количества ее копий, неисследованность взаимоотношений между плазмомом (совокупностью цитоплазматического генетичес-

кого материала) и трансплантируемым ядром при трансплантации ядер в энуклеированные яйцеклетки.

Кроме того, в наших собственных исследованиях было обнаружено сходство изменений экспрессии генов «домашнего хозяйства» (конститутивно экспрессирующихся генов) при получении трансгенных кроликов и у кроликов, подвергавшихся действию генотоксического ионизирующего излучения. Полученные данные о сходстве изменений экспрессии различных генетико-биохимических систем под влиянием ионизирующего излучения и интеграции чужеродного генетического материала совпадают с литературными данными об увеличении у трансгенных кроликов в клетках крови частот встречаемости классических «лучевых» маркеров, таких как дицентрики (Кленовицкий и др., 2001), которые широко используются для реконструкции полученных доз ионизирующего облучения у ликвидаторов (Пилинская, 1999). Такое сходство позволяет предполагать, что оба феномена могут быть обусловлены энергетическими затратами внутриклеточного метаболизма, направленными на компенсацию общей дестабилизации, в частности генетического материала, индуцируемой как интеграцией в геном чужеродной трансгенной конструкции, так и ионизирующим излучением.

В наших исследованиях выявлена также прямая связь между нарушенной стабильностью хромосомного аппарата и сохранением способности клеток эмбриональных стволовых клеточных линий формировать эмбрионы, то есть у них наблюдается сохранение тотипотентности как результат повышенной нестабильности генетического материала.

Все эти риски однозначно указывают на то, что использование современных биотехнологий, основанных на манипуляциях с генетическим материалом, возможно только при наличии специального генетического контроля последствий их применения. Так в наших исследованиях обнаружено, что при трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота, полученных при использовании в качестве донора яйцеклеток одной коровы, резко возрастает вероятность распространения в потомстве генетических дефектов, носителем которых она является (в частности, повышенной ломкости хромосом). Отсутствие генетического контроля может приводить к распространению в потомстве и

других генетически детерминированных заболеваний, например дефицита адгезивности лейкоцитов у голштинской породы (BLAD).

Прямым подтверждением этого утверждения являются полученные нами данные на крупном рогатом скоте породы салерс, о наличии прямой, статистически достоверной корреляции между частотой встречаемости метафаз с хромосомными aberrациями (до гормональной обработки животных) в клетках периферической крови коров-доноров эмбрионов и количеством вымытых у них эмбрионов (табл. 3). То есть, чем менее стабильным был хромосомный аппарат у коров-доноров, тем большее количество эмбрионов было у нее вымыто и тем большая вероятность была ее вклада в поколение потомков, получаемых после трансплантации эмбрионов.

3. Связь между количеством вымываемых эмбрионов и нестабильностью хромосомного аппарата коров-доноров породы салерс

Характеристики	AI	AI	III	PB	XA	APCP	Э
Анеуплоидия I типа ($2n \pm >1$), AI	1.00						
Анеуплоидия II типа ($2n \pm 1$), A2	-.39	1.00					
Полипloidия (III)	-.23	.34	1.00				
Центромерные слияния (PB)	-.43	.45	.61	1.00			
Хромосомные aberrации (XA)	.37	-.29	-.38	-.58	1.00		
Асинхронное расщепление центромерных районов хромосом (APCP)	-.07	.09	.01	-.09	-.40	1.00	
Количество вымытых эмбрионов (Э)	-.15	-.24	-.43	-.31	.58*	-.45	1.00

* $P < 0,05$.

Оценивались корреляционные взаимоотношения между разными характеристиками дестабилизации кариотипа в периферической крови коров-доноров эмбрионов и количеством вымытых эмбрионов (от 2 до 15).

Большие надежды возлагаются на использование современных биотехнологий для решения вопросов сохранения генофондов различных пород сельскохозяйственных видов. Оказалось,

что и в этом случае, при воспроизведении генофондов пород с использованием трансплантации эмбрионов, необходим популяционно-генетический контроль. Так нами был выполнен сравнительный анализ генетических структур абердин-ангусов, полученных после трансплантации эмбрионов, с типичной для этой породы генетической структурой, описанной в литературе (табл. 4). Полученные данные свидетельствуют о том, что животные, рожденные после эмбриопересадок, отличаются от типичной генетической структуры этой породы, в частности, существенным уменьшением частоты встречаемости аллеля TfA и увеличением — аллеля TfE. Причем уже у потомства таких животных наблюдается увеличение представленности этого аллеля. Такое изменение генетической структуры может быть обусловлено относительно сниженной выживаемостью при эмбриопересадках эмбрионов, несущих аллель TfA.

4. Распределение аллелей по локусу трансферрина (TF) у абердин-ангусов

Абердин-ангусы					
Типичное распределение аллелей трансферрина в мире (Chung et al., 1993)	Абердин-ангусы в Украине (распределение аллелей трансферрина)				
	«Ворзель»	«Переяслав-Хмельницкий»	агрофирма «Свитанок» американская селекция		
			полученные после пересадки эмбрионов	первое поколение потомков	
TfA 0,485	0,677	0,500	0,333	0,450	
TfD1 0,111	0,177	-	0,150	0,045	
TfD2 0,126	0,145	0,250	0,167	0,136	
TfE 0,278	-	0,250	0,350	0,364	

Таким образом, накопленные к настоящему времени данные свидетельствуют о перспективности использования современных ДНК-технологий для решения увеличения эффективности селекционной работы. Однако выделяется ряд рисков, связанных с их использованием, которые могут приводить к увеличению генетического груза в виде новых мутаций, распространения гене-

тически детерминированных заболеваний, селективного исключения из воспроизводства отдельных генотипов и, таким образом, существенно снижать как скорость, так и эффективность селекционной работы. Для решения этой проблемы использование биотехнологических процедур необходимо проводить при наличии популяционно-генетического контроля последствий их применения.

ГЕНЕТИЧНО МОДИФІКОВАНІ ОРГАНІЗМИ: ВІД БАКТЕРІЙ ДО ЛЮДИНИ. В.І. Глазко

Показано перспективи використання сучасних ДНК-технологій для розв'язання проблеми збільшення ефективності селекційної роботи. Біотехнологічні процедури треба проводити за наявності популяційно-генетичного контролю наслідків їхнього використання.

GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS: FROM BACTERIA TO MAN. V.I. Glazko

The prospects of the use of modern DNA-technology for the decision of problem of increase of efficiency of selection work are shown. Biotechnological procedures must be conducted at presence of population-genetic control of consequences of their use.