

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ**

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ**

**РОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ ЗАОЧНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
(ФГБОУ ВО РГАЗ**

**ФАКУЛЬТЕТ АГРО И БИОТЕХНОЛОГИЙ
КАФЕДРА ОХОТОВЕДЕНИЯ И БИОЭКОЛОГИИ**

Реферат на тему:

«Клонирование и трансгенез животных»

**по дисциплине: «Современные проблемы
биологии»**

направление подготовки 06.04.01 «Биология»

Выполнил:

студентка 1 курса

шифр 038

Белогурова С.В

Балашиха 2023

СОДЕРЖАНИЕ:

1. История клонирования животных.....	3
2. Проблемы в клонировании животных.....	9
3. Достижения в области клонирования животных.....	12
4. Трансгеноз животных.....	15
5. Трансгенные животные и моделирование заболеваний человека.....	20
6. Заключение.....	25
7. Список источников.....	26

1. История клонирования животных

По принятому в науке определению *клонирование* является точным воспроизведением того или иного живого объекта в каком-то количестве копий. Вполне естественно, что все эти «копии» должны обладать идентичной наследственной информацией, т. е. нести идентичный набор генов. *Клон* – точная генетическая копия организма.

Для генетиков растений получение клонов вообще не составляет никаких проблем. В ряде случаев и у животных получение клона не вызывает особого удивления и является рутинной процедурой, хотя и не такой уж простой. Генетики получают подобные клоны, когда используемые ими объекты размножаются посредством бесполом путем, без предшествующего оплодотворения.

Естественно, те особи, которые будут развиваться из потомков той или иной исходной половой клетки, будут в генетическом отношении одинаковыми и могут составить клон.

У нас в стране, например, блестящие работы по клонированию такого рода выполняет на шелкопряде с помощью разработанной им специальной методики академик **Владимир Александрович Струнников**. Выведенные им клоны шелкопряда славятся на весь мир. Он, однако, продемонстрировал и то, что члены одного клона могут сильно отличаться друг от друга и обнаруживают значительное разнообразие по целому ряду количественных признаков — величине, продуктивности и плодовитости. В ряде клонов это разнообразие бывает большим, чем в генетически разнообразных популяциях.

Получают клоны и в экспериментальной эмбриологии. Если зародыша морского ежа на стадии раннего дробления искусственно разделить на составляющие его клетки — бластомеры, то из каждой разовьется целый организм. В ходе последующего развития зародышевые клетки теряют эту замечательную способность и становятся более специализированными.

У многих объектов можно также использовать ядра так называемых стволовых эмбриональных клеток от какого-нибудь конкретного раннего эмбриона, которые еще не являются очень специализированными (таковым будет их потомство). Эти ядра пересаживают в яйцеклетки, из которых удалено собственное ядро, и такие яйцеклетки, развиваясь в новые организмы, опять-таки могут образовать клон генетически идентичных животных.

У человека известны случаи своеобразного «естественного» клонирования — это так называемые однойцевые близнецы, которые возникают благодаря редко встречающемуся естественному разделению

оплодотворенной яйцеклетки на два отделяющихся друг от друга и, в последующем, самостоятельно развивающихся бластомера. Такие, как их принято называть, монозиготные (однойяцевые) близнецы очень похожи друг на друга, но не идентичны!

Однако нынче речь идет о другого рода клонировании, а именно, о получении точных копий взрослого животного, «прославившегося» какими-то своими выдающимися качествами (например, рекордные надои молока, высокий настриг шерсти и т. д.), а также ученого мужа или политика, или артиста, особо ценного для человечества в силу его, скажем, гениальности. Вот тут-то не все так просто, как порою пытается представить пресса.

История клонирования берет начало в далеких 40-х годах, когда выдающийся советский эмбриолог **Георгий Викторович Лопашов** разработал метод пересадки ядер в яйцеклетку амфибий. В июне 1948 г. он отправил в «Журнал общей биологии» статью, написанную по материалам своих экспериментов.

К сожалению, в августе 1948 г. состоялась печально известная сессия ВАСХНИЛ, запретившая генетику и утвердившая безраздельное господство в биологии «народного академика» Трофима Денисовича Лысенко. Набор статьи Лопашова, принятый к печати, был рассыпан, потому что она доказывала ведущую роль ядра и содержащихся в нем хромосом в индивидуальном развитии организмов.

Однако была опубликована короткая заметка в Докладах Академии Наук СССР, так и озаглавленная «Пересадка компонентов ядер овоцитов в оплодотворенные яйца тритонов» (1946).

Работу Лопашова забыли, а в 1952 г. американские эмбриологи **Роберт Бриггс** и **Томас Кинг** выполнили сходные опыты, и приоритет достался им, как уже часто случалось в истории нашей науки. Эти ученые осуществили перенос ядра из клеток *зародыша* лягушки в энуклеированный ооцит, получив жизнеспособных головастиков.

В дальнейшем **Джон Гердон** из Великобритании усовершенствовал методику и стал удалять из яйцеклетки лягушек собственное ядро и трансплантировать в нее разные ядра, выделенные из специализированных клеток (рис. 1). В конце концов, он дошел до того, что начал пересаживать ядра из клеток взрослого организма, в частности, из эпителия (покровные клетки) кишечника. Более того, к 1960 году Гердон добился того, что яйцеклетки с чужим ядром развивались, и в определенном проценте случаев до

поздних стадий. В результате 1—2% особей проходили стадию метаморфоза и превращались во взрослых лягушек.

Впрочем, получались такие лягушки не без дефектов, да и выглядели более хилыми по сравнению со своим «родителем», так что даже в этом случае едва ли можно говорить об абсолютно точном копировании.

Тем не менее, вокруг достижений британского ученого поднялся большой шум. И вот тут-то заговорили о клонировании млекопитающих и человека: если можно клонировать лягушку, почему бы не попробовать то же самое на других объектах. В разных лабораториях пытались пересадить в яйцеклетку млекопитающих ядра, но безуспешно. Эта операция оказалась слишком травматичной, предпочтительнее было применить метод *соматической гибридизации*, т. е. перенос чужеродного ядра с помощью слияния яйцеклетки с соматической клеткой, ядро которой требовалось в яйцеклетку «переместить». Именно такой подход использовал впоследствии **Ян Вильмут** при получении овечки Долли.

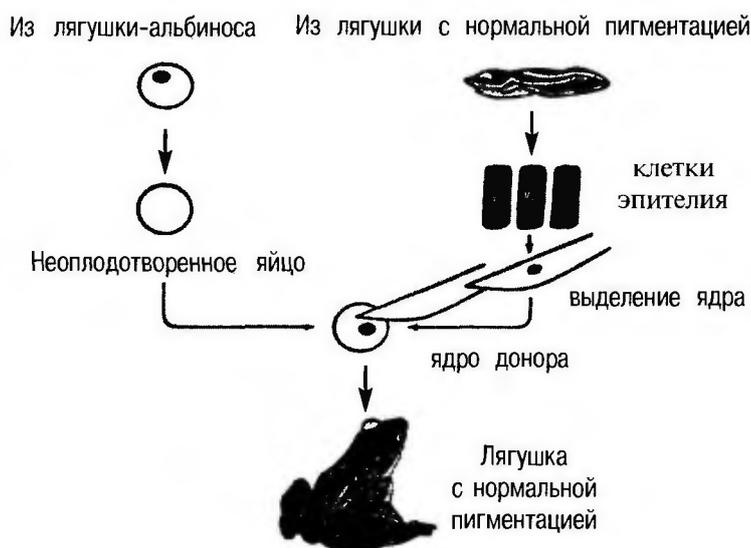


Рисунок 1 - Схема клонирования лягушки по Гердону [1]

В конце 70-х годов американец швейцарского происхождения **Карл Иллменсее** опубликовал статью, из которой следовало, что ему удалось получить клон из трех мышек. И вновь «клональный бум» вытеснил все остальные научные новости, вновь зазвучали фанфары, возвещавшие об осуществлении вековой мечты человечества о бессмертии, достижимом, впрочем, своеобразным способом — через искусственное производство себе подобных копий.

Однако в научной среде поползли слухи, что в опытах Иллменсее что-то нечисто, что их никому (даже самым искусным экспериментаторам) не

удается воспроизвести... В конце концов, была создана авторитетная комиссия, поставившая на работе Иллменсе крест, признав ее недостоверной. Таким образом, по самой проблеме был нанесен весьма болезненный удар, и поставлена под сомнение ее разрешимость. На какое-то время воцарилось спокойствие. И вдруг, как гром с ясного неба — овечка Долли!

Что же произошло? В феврале 1997 г. появилось сообщение, что в лаборатории **Яна Вильмута** в Рослинском институте (Эдинбург, Шотландия) разработан эффективный метод клонирования млекопитающих и на основе его использования получена овечка Долли. Схема экспериментов представлена на рисунке 2.

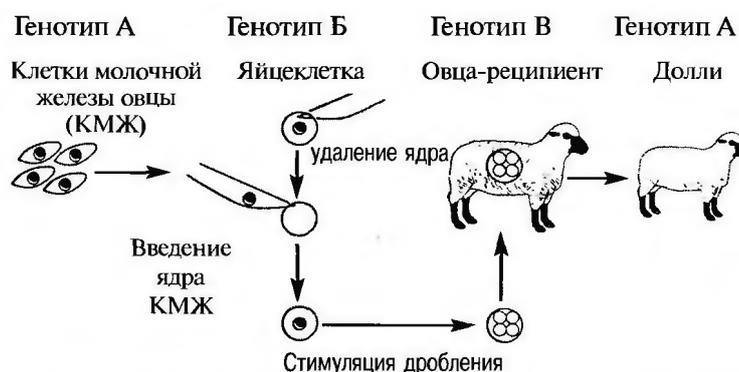


Рисунок 2 - Схема генетического клонирования овцы [1]

Прежде всего, естественно, необходимо было выделить ооциты (яйцеклетки). Их извлекли из овец Шотландская черномордая, поместили в искусственную питательную среду с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки при температуре 37°C и проводили операцию *энуклеации* (удаление собственного ядра).

В качестве донора ядра использовали диплоидные клетки молочной железы взрослой беременной овцы породы Финский дорсет (имеет белую мордочку). Эти клетки выводили из стадии роста клеточного цикла, разбавляя сыворотку, и через пять дней вводили ядро в энуклеированный ооцит через «блестящую» оболочку яйца *zona pellucida*. Слияние ядра с ооцитом достигали с помощью слабого *электрического удара*. Подобный метод намного раньше использовали в СССР, в Пущине.

Развивающийся зародыш культивировали в течение шести дней в искусственной среде или в яйцеводе овцы, перетянутом лигатурой ближе к рогу матки. На стадии морулы или бластоцисты эмбрионы (от одного до трех) трансплантировали в матку приемной матери, где они могли развиваться до рождения.

Из 236 опытов успех сопутствовал лишь одному, в результате которого и родилась овечка Долли (рис. 3), содержащая генетический материал взрослой овцы, умершей три года назад. Авторы использовали ряд методов, чтобы сопоставить геном овец-доноров и реципиентов, в частности, метод определения так называемых микросателлитных последовательностей ДНК, который позволяет идентифицировать «личность» объекта наподобие отпечатков пальцев.



Рисунок 3 - Клонированная овечка Долли и её приёмная мать [1]

После этого Вильмут заявил, что технически возможно осуществить и клонирование человека, но в этом случае возникают моральные, этические и юридические проблемы, связанные с манипуляциями над эмбрионами человека.

Перед биологией, казалось бы, открылись новые заманчивые перспективы, снова стали задумываться над глобальными проектами, всерьез обсуждать этическую сторону проблемы, а наиболее предприимчивые «организаторы науки» наперебой бросились доставать деньги под это дело. Почему-то никто не обратил внимания на то, что даже если у Вильмута было все в порядке, процент выхода рожденных животных был ничтожно мал — всего одна овечка из 236 попыток. А что с остальными? И все ли действительно у Вильмута было в порядке, достаточно ли чисто были проведены его эксперименты?

В одном из номеров авторитетного и престижного журнала «Science» появилось сообщение д-ра **Витторио Сгарамелла** из Италии и **Нортон Зайндера** из США, в котором авторы обвиняют Вильмута и его коллег в подтасовке и фальсификации результатов их экспериментов по клонированию млекопитающих. Они считают, что не представлено убедительных доказательств того, что Долли — продукт клонирования.

Кроме всего прочего оказалось, что три ведущих в данной области лаборатории пытались воспроизвести результаты опытов Вильмута, но безуспешно! Авторы статьи в «Science» указывают и на возможный источник ошибки шотландских эмбриологов. Дело в том, что овца, у которой брали соматические клетки для Долли, была беременна. А известно, что фетальные клетки (клетки зародыша) у некоторых животных могут попасть в кровотоки. Вильмут признал что упустил из виду это обстоятельство и не исключил возможности такого рода просчета в его экспериментах.

Недавно, впрочем, точными молекулярно-генетическими исследованиями было доказано, что Долли все же является клонированной овечкой и, следовательно, выдвинутые возражения можно считать снятыми.

Многочисленные же публикации вроде того, что в Японии уже получили клон человека или что где-то бродят стада клонированных коров являются либо ошибочными, либо сознательной мистификацией. Во всяком случае, в серьезной научной литературе подтверждения подобных сенсаций отсутствуют.

2. Проблемы в клонировании животных

Особый интерес вызывают опыты группы ученых из университета в Гонолулу во главе с **Риузо Янагимачи**. Авторам удалось усовершенствовать метод Вильмута, они отказались от электрической стимуляции слияния донорской соматической клетки с яйцеклеткой и изобрели такую микро-пипетку, с помощью которой можно было «безболезненно» извлекать ядро из соматической клетки и трансплантировать его в «обезьядренную» яйцеклетку.

Кроме того, авторы использовали в качестве донорских относительно менее дифференцированные ядра клеток, окружающих ооцит. Наконец, удалось синхронизировать процессы, протекающие в яйцеклетке и трансплантируемом в нее ядре, что позволило обеспечить «естественные» ядерно-цитоплазматические взаимоотношения между ядром и цитоплазмой, поскольку трансплантируемое дифференцированное в определенном направлении ядро и цитоплазма яйцеклетки до того работали как бы в «разных» режимах.

Суть этих экспериментов Янагимачи отражена на рис. 4. Авторы использовали для трансплантации ядра клеток, окружающих ооцит, клеток Сертоли из семенников и клеток, выделенных из мозга (авторы утверждают, что нейронов, однако из текста статьи не очень понятно, нейронов или глии).

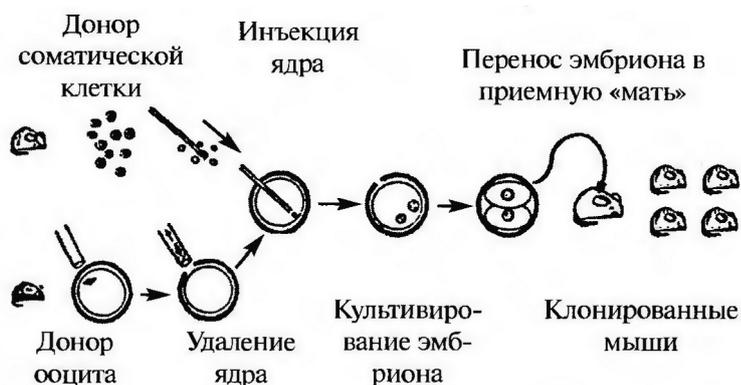


Рисунок 4 - Схема клонирования мышей по Янагимачи [1]

Ядра, выделенные из соматических клеток, инъецировали в энуклеированное яйцо с помощью микропипетки. Яйцо активировали к развитию помещением в специальный раствор. Эмбрионов культивировали до стадии 2-8 клеток и затем трансплантировали в матку приемной матери, где многие из них имплантировались и некоторые (15-16%) продолжали развитие. Процент «выхода» рожденных мышат (их извлекали с помощью кесарева сечения на 18—19-й дни беременности) был, однако, низок — в разных сериях экспериментов от 2 до 3%.

Молекулярные исследования доказали принадлежность ядер рожденных мышат к клеткам донора соматических клеток. Следовательно, получение клона принципиально возможно и в этом случае. Однако получение клона еще не означает получения *точной копии* клонированного животного.

Исследованиями В. А. Струнникова было показано, что в партеноклонах шелкопряда разнообразие по многим признакам может быть даже выше, чем в обычной популяции. А однояйцевые (монозиготные) близнецы человека, развиваются в матке одной матери, т. е. в абсолютно равных условиях, так что пределы колебаний различных признаков в рамках нормы реакции сведены к минимуму, тем не менее, и у них обнаруживают отличия, иногда существенные.

В случае использования приемных матерей при клонировании млекопитающих столь идеальные условия создать невозможно, и, значит, абсолютная точность копирования исходной особи едва ли может быть обеспечена.

Следовательно, хотя работы Яна Вильмута и ученых из Гонолулу являются, бесспорно, выдающимся достижением, перспективы их дальнейшего развития следует оценивать с осторожностью. На самом деле получить абсолютно точную копию данного конкретного животного (а

именно такая конечная цель ставится сейчас в экспериментах по клонированию!) намного сложнее, чем это представляется при поверхностном знакомстве с проблемой. А скорее всего — невозможно!

И дело вовсе не в технической разработке методов клонирования. Дело в том, что структурно-функциональные изменения ядер в ходе индивидуального развития животных достаточно глубоки: одни гены активно работают, другие — инактивируются и молчат, при этом сам зародыш представляет собой своеобразную *мозаику* полей распределения таких функционально различных генов.

И чем организм более специализирован, чем выше ступенька эволюционной лестницы, на которой он стоит, тем эти изменения глубже, и тем менее обратимы.

У некоторых организмов, например у известного кишечного паразита *аскариды*, генетический материал в будущих зародышевых клетках остается неизменным в ходе развития, а в других, соматических клетках, выбрасываются целые большие фрагменты ДНК — носителя наследственной информации (*диминуция* генетического материала).

В эритроцитах крови птиц ядра «сморщиваются» в маленький комочек и не «работают», а потому из эритроцитов млекопитающих, стоящих эволюционно выше птиц, они вообще выбрасываются за ненадобностью.

У плодовой мушки дрозофилы особенно четко выражены процессы, свойственные и другим организмам, — селективное умножение или, наоборот, недостача каких-то участков ДНК, по-разному проявляющиеся в разных тканях.

Кстати, клонированные мышки отличаются друг от друга по некодирующей, так называемой микросателлитной ДНК, которая играет важную роль в регуляции индивидуального развития. *Так что о полной генетической идентичности говорить не приходится.*

Работами американских ученых доказано, что у клонированных животных примерно четыре процента генов работают ненормально. Следовательно, невозможно ожидать точного копирования образцов. Более того, такие аномалии в работе генов непременно приведут к развитию уродств.

А ведь широкую известность получила еще одна работа, в которой показано, что в соматических клетках в ходе их развития хромосомы последовательно укорачиваются на своих концах, в зародышевых же клетках специальный белок *теломераза* достраивает, восстанавливает их, т. е.

полученные данные опять-таки свидетельствуют о существенных различиях между зародышевыми и соматическими клетками.

И, следовательно, встает вопрос, способны ли ядра соматических клеток полностью и эквивалентно заменить ядра зародышевых клеток в их функции обеспечения нормального развития зародыша.

Карл Иллмензее исследовал, насколько дифференцированные ядра дрозофилы способны обеспечить нормальное развитие из яйца. Оказалось, что до поры, до времени зародыш развивается нормально, но уже на ранних стадиях эмбриогенеза наблюдаются отклонения от нормы, возникают уродства, и такой эмбрион не способен превратиться даже в личинку, не говоря уже о взрослой мухе!

У лягушки, как существа менее развитого, чем млекопитающие, ядерные изменения менее выражены, и то, во-первых, процент успеха при клонировании, как уже отмечалось, невысок (1-2%), во-вторых, даже те лягушки, которые достигают в опытах по клонированию взрослого состояния, не без дефектов, так что о точном копировании донора, к сожалению, трудно говорить даже в этом простейшем случае.

Но млекопитающие значительно сложнее лягушек по своему устройству и степени дифференцированности клеток. Естественно, у них процент успеха будет, по крайней мере, не выше (о чем и свидетельствуют результаты опытов Янагимачи). В связи с этим встает проблема — как вернуть изменившиеся ядра соматических клеток в исходное состояние, чтобы они могли обеспечить нормальное развитие той яйцеклетки, в которую их трансплантировали. Успех будет зависеть от того, удалось ли «поймать» такую соматическую клетку (из числа так называемых *стволовых*), ядро которой еще не утратило свой потенциал, да еще и не повредить это ядро в процессе сложных хирургических с ним манипуляций.

Кроме всего прочего, условия развития в матке разных приемных матерей будут различаться, а существует такое понятие как норма реакции — т. е. определенные пределы колебаний проявления данного гена в фенотипическом признаке. Это означает, что в разных условиях развития зародыша одинаковые гены будут обнаруживать свое действие немножко по-разному. А ведь таких генов — тысячи! Следовательно, вероятность полного сходства «клонированных» животных будет не очень велика.

Но даже если все проблемы удастся решить и все трудности преодолеть, клонирование человека едва ли будет реальным. Действительно, допустим, что трансплантировали развивающиеся яйцеклетки с

чужеродными ядрами нескольким сотням приемных матерей (ведь процент выхода низкий!), чтобы получить хотя бы одну единственную живую и точную копию видного политического деятеля. А что будет с остальными зародышами? Ведь большая часть погибнет в утробе матери или разовьется в уродов, некоторые из которых, к несчастью, родятся.

Страшные последствия таких экспериментов — сотни искусственно полученных человеческих уродов! (Неслучайно «создатель» Долли Ян Вильмут вместе с выдающимся специалистом по эмбриологии млекопитающих Янишем в 2001 г. опубликовали в журнале «Science» заметку «*Не клонируйте людей!*»). Во многих странах мира изданы законы, запрещающие клонирование людей и манипуляции с эмбрионами, в том числе в России.

Что касается млекопитающих, то можно говорить о том, что техническая задача получения «клонированных» животных решена, однако, как уже говорилось, основной вопрос заключается в том, насколько точно эти животные будут копировать соответствующий прототип. И второй вопрос — оправдают ли результаты работ по получению подобных клонов те затраты, которых они потребуют.

Все дело в том, что *состояние здоровья клонированных животных вызывает серьезные опасения*. Продолжительность жизни клонированных животных ниже нормы. Так, овечка Долли дотянула лишь до половины средней продолжительности жизни овец, промучившись более 6 лет. Ее австралийский «двойник» — Матильда погибла через два года после рождения. Клонированные в различных лабораториях мыши характеризуются пониженной жизнеспособностью и «выдерживают» на этом свете не более половины средней продолжительности жизни, их обучаемость по сравнению с «исходным образцом» оставляет желать лучшего (это к вопросу о клонировании гениев! Как бы вместо гениев не получились идиоты).

Следовательно, практическое использование клонирования млекопитающих весьма проблематично. Тем не менее, опыты по клонированию продолжаются, поскольку они имеют важное фундаментальное значение. Только в таких экспериментах можно понять, что же все-таки происходит с клеточным ядром, с его компонентами, с ДНК в процессе индивидуального развития, как взаимодействуют генные сети в ходе клеточной дифференцировки и можно ли этой дифференцировкой управлять.

3. Достижения в области клонирования животных

После рождения Долли путем клонирования появилось много животных, представляющих несколько видов млекопитающих. Успешно были клонированы свиньи, овцы, козы, кошки, кролики, коровы (десять клонированных телят родились от одной взрослой коровы породы джерси) и, совсем недавно, мул (но пока не собаки и не обезьяны). Клонированный мул по кличке Айдахо-Джем привлек к себе особое внимание, поскольку этот биологический вид – гибрид лошади и осла – в нормальных условиях не может иметь потомства. Примечательно, что клонирование не всегда приводит к внешнему сходству, как обстояло дело с клонированной в 2001 г. домашней кошкой Си-Си, которая своим окрасом отличалась от генетического донора. За окрас кошки "отвечают" несколько генов, присутствующих в X-хромосоме, и некоторые из них произвольно теряют активность в ходе развития зародыша кошек - самок, поскольку у них две X-хромосомы. Таким образом, некоторые клетки, даже полученные у одного и того же донора, будут "окрашивать" кошку в черный цвет при подавлении других цветообразующих генов, тогда как другие клетки, помещенные в энуклеированное ядро и развившиеся в котенка, дадут рыжий окрас.

Основной целью развития методики клонирования животных является содействие их генетической инженерии (трансгенозу). Как правило, новая ДНК, предназначенная изменить гены животных, может вводиться лишь в совсем молодые эмбрионы, обычно на стадии одной или двух клеток. Но будут ли эти гены приняты зародышем, полностью зависит от случайности.

Поэтому доля успешных экспериментов очень мала, а сам процесс очень трудоемкий. При клонировании ДНК вводится в выращенные в лабораторных чашках клетки, число которых достигает нескольких тысяч или даже миллионов. Затем появляется возможность определить, какие клетки интегрировали перенесенную ДНК, и лаборанты могут пересадить такие клетки в энуклеированные яйцеклетки в целях развития зародышей, содержащих модифицированную ДНК. Таким образом, клонирование животных представляло бы интерес для некоторых отраслей фармацевтической промышленности и производства продуктов питания, если бы смогло обеспечить постоянный выпуск высококачественной рыночной продукции, такой, как молоко или мясо, терапевтических белков из козьего или коровьего молока либо белка куриного яйца (так называемый "фарминг") или даже внутренних органов свиньи для пересадки человеку без риска отторжения его иммунной системой.

В 1997 г. биотехнологическая компания PPL Therapeutics Inc. совместно с Рослинским институтом клонировала овцу по кличке Полли из генетически измененной зародышевой клетки. В молоке Полли содержится белок, вызывающий свертывание крови человека, который может быть использован для лечения гемофилии. Международные нормы регулирования такой методики пока что не установлены, а те или иные эксперименты по клонированию животных тем временем продолжаются.

Сообщения об успешном клонировании животных привлекают внимание общественности, однако результаты, которых добиваются ученые, далеко не безупречны. Уровень выхода жизнеспособных клонированных эмбрионов зависит от биологического вида и типа используемых клеток, однако остается, как правило, очень низким. Даже при успешных родах у клонированного животного наблюдается целый ряд аномалий и дефектов, в том числе так называемый *синдром большого (крупного) потомства*: клонированные животные часто оказываются слишком крупными для нормальных родов, а плацента разрастается больше нормы. Такие дефекты пока что до конца не объяснены, но одной из возможных причин может быть *неполное репрограммирование* ядра, пересаженного из соматической клетки. Одни считают, что такие проблемы методики клонирования будут решаться по мере развития научного прогресса, другие утверждают, что клонирование абсолютно здорового потомства невозможно в принципе и что даже вполне здоровые на первый взгляд клонированные животные могут иметь генетические болезни.

Вымершие виды, которые проще всего клонировать[2]. Несмотря на то, что вымирание видов – процесс естественный, и в живой природе это происходит регулярно, защитники природы весьма жалеют об утрате некоторых из них и не прочь повернуть время вспять. Учёные уже задумываются о возможности клонирования некоторых животных с хорошо сохранившейся цепочкой ДНК. Наиболее вероятными кандидатами являются следующие виды.

1. Это, конечно же, всем знакомый *мамонт*, размеры которого немногим отличаются от размеров современного слона, а генетического материала предостаточно. Если бы не политическая истерия вокруг клонирования, вполне вероятно, что мы уже могли бы лицезреть первых мамонтов в зоопарке.

2. Почему бы не возродить самую большую птицу в мире – гигантскую *моа*? Тем более, что её птенцы без проблем может высидеть обыкновенная страусиха. Извлечение ДНК моа из её костей и яиц, найденных в новозеландских пещерах, возможно.

3. *Шерстистый носорог*, как и мамонт, почти не отличается от своих потомков, и его ДНК находится в отличном состоянии.

4. *Сумчатый волк*. Последний сумчатый волк (тилацин) из зоопарка Хобарта отправился в мир иной в 1936 году.

5. *Саблезубые тигры* могли бы снова появиться если не в лесах, то хотя бы в зоопарках... если бы не два препятствия. Во-первых, их останки, сохранившиеся более-менее прилично, лежат в смоляных шахтах Ла-Брея – следовательно, извлечению цепочки ДНК препятствует смола. Во-вторых, получить разрешение и достать мать-донора будет достаточно тяжёлой задачей, ведь тигры сейчас занесены в Красную Книгу.

6. Если бы не запрет на клонирование человека, учёные в первую очередь озаботились бы воссозданием *неандертальцев*.

Также можно было бы клонировать такие виды как ирландский лось, короткомордый медведь, гигантский ленивец и глиптодон, если бы не их размеры. Основная сложность в их клонировании заключается в нахождении подходящей суррогатной матери – все самки близких видов слишком малы [2].

4. Трансгенез животных

Термин «*трансгенез*» возник в начале 70-х годов, значительно ранее того момента, когда он стал использоваться в современном значении этого слова. Первоначально им обозначали перенос генов в клетки, растущие в культуре, т.е. *in vitro*. В настоящее время этот термин используют применительно к переносу генов в целые организмы (система *in vivo*), а сами такие генетически измененные организмы называют *трансгенными*.

В 1980 г. **Гордон** с помощью микроинъекций "голой" ДНК в мужской пронуклеус зиготы мыши получил первых животных, содержащих в своем геноме искусственно введенную экзогенную ДНК. Такие животные в дальнейшем и были названы трансгенными, а сам процесс их получения - трансгенезом. Первоначальный вариант трансгенеза, использованный Гордоном, сейчас называют классическим (рис. 5).

С развитием техники молекулярного клонирования генов число публикаций по получению и исследованию трансгенных мышей стремительно

росло, постепенно расширялся спектр проблем и задач, решаемых с помощью трансгеноза. Одной из самых впечатляющих работ на ранних этапах развития трансгеноза были эксперименты **Пальмитера** с соавт. (1982) по микроинъекции в зиготы мышей гена гормона роста крысы, находящегося под контролем сильного промотора гена металлотиенина мыши МТ-1 мыши. Перенос такого искусственного *конструкта* привел к ускоренному росту мышей и значительному увеличению веса трансформированных животных, развившихся из прооперированных зигот (рис. 6).

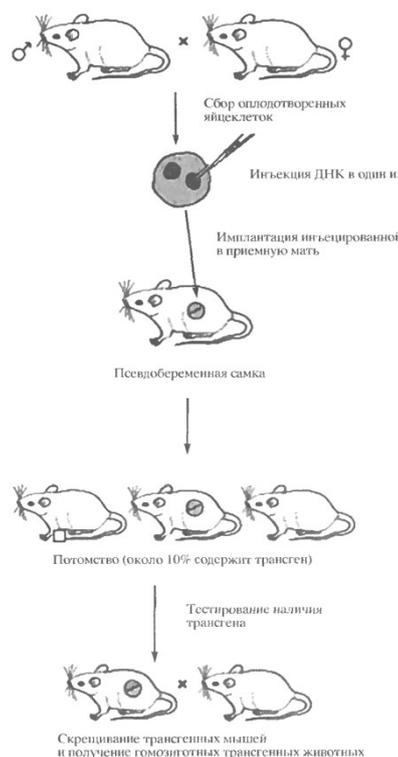


Рисунок 5 - Классическая схема трансгеноза [3]

Вскоре анализу экспрессии в организме мышей были подвергнуты сотни структурных генов, генов различных вирусов, онкогенов, антионкогенов и др. К середине 80-х годов были начаты эксперименты по созданию трансгенных сельскохозяйственных (с/х) животных. К этому времени были подобраны оптимальные условия для визуализации пронуклеусов зигот с/х животных, поскольку большинство зигот имеет значительное количество пигментных и жировых гранул, затрудняющих процесс микроинъекции.

Попытки переноса *гена гормона роста* быка, овец, человека, гена релизинг-фактора гормона роста человека (выход гормона роста в кровь находился под контролем эндогенных регуляторов) в дальнейшем были

продолжены на зиготах овец, свиней, кроликов и рыбах как в нашей стране, так и за рубежом.



Рисунок 6 - Трансгенная мышь с геном гормона роста быка (слева) и контрольная [3]

Трансгеноз открыл новые пути направленного изменения продуктивности разных видов с/х животных (повышение темпов роста, изменение количества и качества молока, шерсти, увеличение плодовитости), получения животных - биореакторов ценных биологически активных препаратов (таких как фактор свертываемости крови, альфа-антитрипсин, гемоглобин и антитела в молоке, крови или моче), создание новых форм и пород животных, приспособленных к биомедицинским исследованиям, которые могут быть источниками органов для ксенотрансплантации, пород устойчивых к различным заболеваниям. В частности, с успехом для направленной экспрессии фармакологически ценных белков используются гены, кодирующие основные белки молока - *казеины*.

В России, например, в 1999 г. были получены трансгенные мыши, экспрессирующие в молоко ценный медицинский препарат - гамма-интерферон человека (600 мкг гамма-интерферона на 1 мл молока). Соответствующая генетическая конструкция может быть использована для получения *трансгенных коз*, в молоке которых будет экспрессироваться лекарственный белок.

Вместе с тем с самого начала работ по трансгенозу были выявлены некоторые сложности, связанные с этой технологией. В первую очередь процедура получения трансгенных животных пока еще остается малоэффективной. Трансгенные животные часто менее жизнеспособны, чем природные особи. Имеются проблемы и со стабильностью экспрессии трансгена. Все это, а также ряд других причин, включая настороженное отношение общественности к данной проблеме, и обусловили ту ситуацию, что до сих пор трансгенные животные (в отличие от трансгенных растений) находят пока лишь ограниченное применение в практике.

Кроме традиционного (классического) способа введения чужеродной ДНК с помощью микроинъекций в пронуклеус зиготы, получили развитие новые системы и способы переноса генов в геном животных (рис. 64). Они позволяют повысить эффективность трансгеноза, что особенно важно для дорогостоящих экспериментов в области биотехнологии с/х животных. Показано, например, что эффективность получения с помощью микроинъекций трансгенных коров, по меньшей мере, в 40 раз ниже, чем у мышей.

Одним из таких альтернативных подходов является использование *сперматозоидов* в качестве векторов для привнесения чужеродной ДНК в яйцеклетку при ее искусственном оплодотворении. Известно, что сперматозоиды ряда видов животных в отсутствие семенной жидкости способны захватывать чужеродную ДНК. Легкость и простота использования этого метода привели к многочисленным попыткам трансформировать таким образом геном мышей, свиней, крупного рогатого скота, овец, рыб, морского ежа, насекомых, птиц, шпорцевой лягушки, моллюсков.

Необходимо отметить, однако, что существует опасность непреднамеренного введения экзогенного генетического материала, который может случайно находиться в окружающей среде, при использовании метода *внутрицитоплазматической инъекции сперматозоидов* (ICSI) в клиниках по искусственному оплодотворению человека. Показано также, что отмывка сперматозоидов человека после инкубации в растворе с ДНК вируса папилломы человека не приводила к полному удалению экзогенной ДНК из клеток. Часть ДНК прочно связывалась со сперматозоидами и интернализировалась вместе с ними.

Еще одним подходом, обеспечивающим увеличение эффективности переноса генов, является использование в качестве векторов *ретровирусов*. Основное преимущество этих векторов заключается в том, что они способны эффективно инфицировать большое число различных клеточных типов. Чтобы избежать опасности неконтролируемого распространения ретровирусов, используют *дефектные* по репликации вирусные векторы с *вирусом-помощником*.

Ретровирусные векторы обеспечивают интеграцию единичной копии трансгена в эмбрионы на разных стадиях развития. Однако успешная интеграция вирусного генома с хозяйским геномом происходит только в *митотически активных* клетках (исключение составляют *лентивирусы*). Показано, что для транслокации ретровируса в ядро клетки обязательен

разрыв *ядерной оболочки*. Основываясь на этом, **Чан** с соавт. в 1998 г. предложили новый метод введения ретровирусного вектора в геном крупного рогатого скота, который заключался в следующем. Ооциты, находящиеся на стадии метафазы II второго деления мейоза и *не имеющие ядерной оболочки* на этой стадии вплоть до образования пронуклеусов после оплодотворения, инфицировали ретро-вирусным вектором, сконструированным на основе вируса мышиной лейкемии Молони (MoMLTV), упакованного в оболочку, в состав которой входил гликопротеин псевдотипа вируса везикулярного стоматита G. В результате оплодотворения инфицированных ооцитов и их культивирования *in vitro* часть из них развилось до стадии бластоцисты. После переноса бластоцист реципиентам 4 эмбриона развились до рождения. И хотя количество животных, полученных таким путем, было ограниченным, все они (100%) оказались трансгенными и экспрессировали трансген.

Сообщалось о рождении *трансгенной обезьяны*, полученной аналогичным путем. Указанный вектор, содержащий в своем составе ген, кодирующий зеленый флуоресцентный белок (GFP) под промотором гена альфа-1-фактора элонгации человека, был инъецирован под блестящую оболочку ооцитов макак резусов. Оплодотворение проводили методом ICSI. Эмбрионы на стадии дробления пересаживали суррогатным самкам. 3 эмбриона развивались до рождения, один из новорожденных оказался трансгенным и экспрессировал трансген в клетках ногтей и волос (Чан, 2001).

В 2002 г. был предложен простой и эффективный метод получения трансгенных мышей, крыс и других животных путем инфицирования оплодотворенных яйцеклеток с помощью рекомбинантного *лентивирусного* вектора. 10-100 пкл раствора данного вектора, содержащего ген GFP, вводили непосредственно под блестящую оболочку зигот мышей. 80% полученных таким образом потомков оказались трансгенными, почти у всех потомков была обнаружена экспрессия трансгена (Луи и др., 2002).

В результате прогресса в развитии трансгеноза появились возможности для крупномасштабных изменений генома, включая манипуляции с фрагментами или целыми хромосомами. Последняя технология получила название *хромосомная инженерия*. Ей способствовала разработка подходов к созданию искусственных хромосом млекопитающих, обязательными элементами которых являются центромера, теломеры и *ori* репликации. Искусственные хромосомы предоставляют уникальную возможность для изучения взаимосвязи между хромосомными структурами и их функциями.

Использование хромосомного трансгеноза позволяет осуществлять перенос *очень больших генов* и *целых кластеров генов* со всеми окружающими их природными генетическими элементами. При этом также полностью исключается негативное влияние эффекта положения на трансген. Использование нового подхода на базе эмбриональных стволовых клеток (ЭСК), получившего название опосредованного микроклетками транспорта хромосом, позволило получать химерных мышей с целыми хромосомами человека или их фрагментами (*транسخромосомные* мыши). В частности, были получены мыши, содержащие фрагменты хромосом человека с локусами легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов, которые оказались способными синтезировать специфические человеческие антитела.

Молекулярные механизмы трансгеноза. При микроинъекции в пронуклеусы экзогенной ДНК встройка трансгена происходит, как правило, в единичный участок генома в виде тандемов (до 50 и более копий, расположенных чаще всего в ориентации голова-хвост). Единичные фрагменты генов удается встраивать в геном при использовании в качестве вектора ретровирусов.

При этом в большинстве случаев чужеродная ДНК встраивается в *произвольные* участки генома. Между тем постепенно накапливаются данные, свидетельствующие о том, что существуют некоторые «*предпочтительные*» зоны, с которыми интегрирует экзогенная ДНК. Таковыми, по-видимому, являются транскрибирующиеся участки генома, "горячие" точки рекомбинации, области начала репликации, а также разнообразные повторяющиеся последовательности. Последние облегчают встраивание трансгенов за счет механизмов негомологичной рекомбинации.

5. Трансгенные животные и моделирование заболеваний человека

Очень важным направлением использования трансгенных животных является создание моделей различных патологий человека. Это, с одной стороны, позволяет подтвердить роль тех или иных генов в определенном заболевании, а, с другой, создать модель, на которой можно более детально исследовать молекулярные механизмы нарушений и осуществлять целенаправленный подбор лекарственных средств. Использование для этих целей мышей важно с той точки зрения, что у них примерно такой же размер генома и такое же число генов, как у человека. В настоящее время с помощью трансгеноза осуществлено моделирование множества различных

заболеваний человека, таких, например, как рак груди, рак простаты, нейрофиброма, эритролейкемия, диабет и др.

На модели трансгенных животных проведены многочисленные исследования по выяснению роли различных онкогенов в злокачественных перерождениях клеток млекопитающих. Благодаря этим экспериментам установлено, в частности, что отдельные онкогены, перенесенные в мышей и крыс, могут определять появление у трансгенных особей опухолей в тех тканях, где они экспрессируются. Так, ген *c-myc* под контролем регуляторных элементов гена иммуноглобулина (гены иммуноглобулинов экспрессируются тканеспецифично в В-клетках) вызывал у трансгенных мышей лимфомы В- и пре-В-клеток, а этот же онкоген под контролем LTR вируса ММТВ обуславливал возникновение аденокарциномы в молочной железе самок, т.е. в том органе, где экспрессируются гены вируса ММТВ.

С использованием трансгенных мышей продемонстрировано онкогенное свойство мутантного гена *p53*. В кооперации с онкогеном *ras* мутантный ген *p53* вызывал злокачественное перерождение клеток. У 20% трансгенных животных возникали аденокарциномы легких, остеосаркомы и лимфомы. Полученные данные позволили прийти к заключению о том, что нормальный ген *p53* является не онкогеном, а антионкогеном, продукт которого инактивируется при наличии мутантного белка *p53*.

Другим примером моделирования патологий человека может служить болезнь *Альцгеймера* (БА), которая является наиболее распространенной причиной прогрессирующей деменции в пожилом возрасте. Была показана важная роль в этом мутаций в трех генах: APP, пресенилинах 1 и 2 (PSEN 1 и 2). Первые попытки смоделировать БА у млекопитающих заключались в получении трансгенных мышей, экспрессирующих ген APP, несущий мутации, приводящие к развитию заболевания у человека.

Такие мыши развивались нормально, но с возрастом накапливали множественные отложения нерастворимого *амилоида*, а также в ряде случаев демонстрировали отклонения в поведении. Трансгенные мыши, несущие мутантный ген APP, были использованы для разработки нового подхода к терапии БА - Р-амилоидной иммунизации.

Сообщалось о переносе целой экзогенной *митохондриальной ДНК* (мтДНК) в эмбрионы мышей. Цитопласты (энуклеированные клетки), несущие в мтДНК мутацию, связанную с энергетическим метаболизмом, сливали с эмбриональными стволовыми клетками (ЭСК) с инактивированными митохондриями. Затем эти ЭСК использовали для

получения химер. В результате химерные мыши и их потомки имели ряд аномалий, сходных с клиническими проявлениями болезни человека, обусловленной аналогичной мутацией в мтДНК (Хирано, 2001).

Эмбриональные стволовые клетки и таргетинг генов. Все вышеперечисленные системы получения трансгенных животных имеют тот недостаток, что вводимая этими способами ДНК интегрируется с реципиентным геномом случайным образом, зачастую в виде множества копий, часто наблюдаются перестройки трансгена, мутации в геноме хозяина вплоть до летальных. Вследствие этого нередко экспрессия одного и того же трансгена может варьировать в широких пределах у трансгенных животных до полного ее отсутствия. Однако в последнее десятилетие техника введения чужеродной ДНК в геном животных усовершенствовалась так, что стало возможным осуществлять направленное введение ДНК в любую желаемую часть генома или конкретного локуса.

Основой новой технологии послужило создание **эмбриональных стволовых клеток (ЭСК)**. В 1981 г. одновременно в двух лабораториях были получены первые культуры клеток, выделенных из внутренней клеточной массы *бластоцист* мыши (Evans, Kaufman, 1981; Martin, 1981). Все ЭСК имеют нормальный диплоидный кариотип, обладают активностями щелочной фосфатазы и теломеразы, экспрессируют ряд других маркеров, характерных для недифференцированных клеток. Это состояние поддерживается в определенных условиях культивирования, в частности, при наличии в культуре фидерного слоя эмбриональных фибробластов и/или фактора ингибирования лейкемии LIF. При удалении последних ЭСК начинают дифференцироваться в многоклеточные агрегаты, состоящие из дифференцированных и недифференцированных клеток, называемые *эмбрионными телами*. Несколько позднее были получены культуры эмбриональных *герминативных* клеток (ЭГК), выделенные из первичных половых клеток мыши (Donovan, 1994). Затем были выделены линии клеток, подобные ЭСК, из эмбрионов кролика, хомячка, норки, свиньи, коровы, овцы, обезьян и, наконец, в последние годы такие линии выделены из бластоцист и первичных половых клеток человека.

ЭСК и ЭГК сохраняют высокие **плюрипотентные** свойства при длительном культивировании *in vitro* и, будучи вновь введенными в эмбрион, способны формировать химер, участвуя в развитии тканей всех трех зародышевых листков, включая образование гамет. Однако способность ЭСК

к формированию химер и наследованию этих клеток у их потомков твердо установлена пока только для ЭСК мышей.

Уникальная способность ЭСК сохранять длительное время *in vitro* свои плюрипотентные свойства открыла широкие возможности для различных манипуляций с их генами. Были разработаны пути и методы направленного введения чужеродной ДНК в ЭСК путем *гомологичной рекомбинации* с экзогенной ДНК. При трансформации ЭСК *in vitro* в результате такой рекомбинации происходит вставка эндогенной ДНК в «ген-мишень». Затем, после отбора ЭСК с модифицированным геномом, их инъецируют в полость бластоцисты другой линии мышей или агрегируют с зародышами более ранних стадий развития, после чего их пересаживают в матку приемной матери. Среди потомков отбирают *химерных* животных, в результате скрещивания которых получают гомозиготных мышей. Генотип гомозигот представлен исключительно модифицированными ЭСК. Общая схема осуществления направленного изменения генов у животных приведена на рис. 7.

Данная технология позволяет получать направленные изменения в любом желаемом гене (технология «*gene targeting*» или «*knock out*»). Совокупность перечисленных выше методов можно определить как генетическую модификацию генома на уровне индивидуальных генов. Они позволили применять, по крайней мере, к мышам такие два основных генетических подхода как «от фенотипа к гену» и «от гена к фенотипу». Это имело революционизирующее воздействие как в фундаментальных научных, так и во всевозможных прикладных исследованиях.

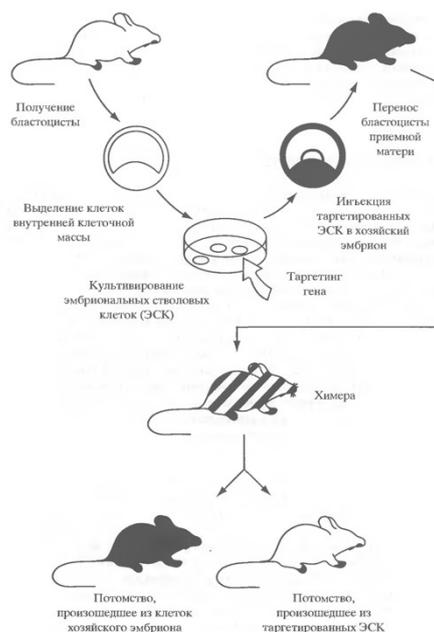


Рисунок 7 - Схема получения трансгенных мышей путем таргетинга генов в ЭСК[3]

В первую очередь технология **таргетинга** внесла существенный вклад в генетику мыши и анализ различных аспектов функции генов *in vivo*. В результате использования таргетинга генов были созданы многочисленные трансгенные мыши с различными целенаправленными изменениями генов, начиная от точечных мутаций и кончая хромосомными перестройками.

Важнейшим моментом в развитии методологии направленного изменения генов явилось создание различных технологий **сайт-специфического** встраивания генов, с помощью которых можно встраивать любой ген или участок ДНК в любой заданный сайт хромосомы. В результате внедрения в практику этих технологий в настоящее время получены принципиально новые данные о функции тысяч различных генов.

Таким образом, генный нокаут, как и перенос новых генов, митохондрий и целых хромосом, позволяет не только определять функцию гена, но и моделировать многие патологии человека. В настоящий момент этот прием становится одним из ключевых в молекулярной генетике. Его чрезвычайная важность на данном этапе исследований определяется массовым переходом от исследований по структурной генетике к функциональной генетике.

Трансгенез и клонирование животных. Как известно, первая технология клонирования млекопитающих была разработана Вилмутом в 1997 г. Сама техника клонирования была основана на переносе ядер **соматических** клеток донора в цитоплазму энуклеированного ооцита реципиента.

Альтернативным подходом к решению этой проблемы явилась трансформация чужеродными генами клеток **фибробластов плодов** с последующей пересадкой их ядер в энуклеированные ооциты овец и коров (1998), что привело к рождению трансгенных потомков. Вскоре появилось первое сообщение (МакКрет и др., 2000) о целенаправленном введении в *клеточную культуру фибробластов плода овцы* вектора, созданного на основе альфа -1-проколлагенового гена овцы, содержащего в своем составе ген альфа -1-антитрипсина человека под промотором бета-лактоглобулина. Были отобраны клоны фибробластов, прошедшие гомологичную рекомбинацию и экспрессирующие альфа- 1-антитрипсин человека. Ядра этих фибробластов пересадили в энуклеированные ооциты овец, а эмбрионы, развившиеся из них до стадии морулы или бластоцисты, были перенесены суррогатным матерям для их дальнейшего развития. Из 16 проанализированных плодов и новорожденных 15 содержали в своем геноме *таргетированную* аллель. 14 потомков развилось до рождения, и трое из них достигли годовалого возраста. У одной из самок был обнаружен в молоке альфа -1-антитрипсин в количестве 650 мкг/мл.

Аналогичным путем были получены трансгенные **свиньи**, в которых был нокаутирован один аллель локуса альфа -1,3-галактозилтрансферазы, ответственной за острую реакцию *отторжения органов* при ксенотрансплантации. Трансгенные особи были получены с использованием техники клонирования, когда в качестве доноров ядер были использованы нокаутированные по данной аллели клетки фибробластов плода свиньи (Лей и др., 2002).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

Таким образом, за последние два – три десятилетия научные достижения в эмбриологии, молекулярной биологии, генетике и структурной геномике, появление новых методов и подходов в трансгенной технологии модификации генома животных создали основу для решения большого числа общебиологических, биомедицинских и биотехнологических задач. Если генная инженерия послужила основой для развития структурной геномики, то трансгеноз стал основной технологией, способствующей прогрессу в функциональной геномике. Без всякого сомнения, в ближайшие годы широкое применение и дальнейшее развитие получают такие направления, как классический трансгеноз, направленный таргетинг генов в определенных типах клеток и/или на определенных стадиях развития организмов.

Технология получения трансгенных животных с заданными хозяйственно ценными признаками будет в дальнейшем одним из перспективных направлений современной биотехнологии. Она позволит создавать разнообразные организмы, обладающие свойствами, не имеющими аналогов в природе. Трансгенные животные помогут решению ряда проблем, с которыми человечество сталкивается на всем протяжении своей истории. Это, прежде всего проблема создания лекарственных препаратов и их получения в достаточном количестве, а также потенциально - продовольственная проблема.

Сочетание же клонирования с трансгенозом может стать очень эффективным путем как для дальнейшего развития функциональной геномики, так и для решения различных прикладных задач. В перспективе эти подходы, наряду с генной терапией, могут быть весьма полезными для клеточной и органной терапии человека.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ:

1. Геном, клонирование, происхождение человека. – Под ред. Л.И. Корочкина. – Фрязино: «Век 2», 2004. – 224 с.
2. Вымершие звери и птицы, которых проще всего клонировать. – Электронный ресурс. – 2013.
3. Андреева, Л.Е., В.З. Тарантул. Трансгенные животные: фундаментальные и прикладные аспекты / Л.Е. Андреева, В.З. Тарантул // Проблемы и перспективы молекулярной генетики. Том 1 / Отв. ред. Е.Д.Свердлов. – М.: Наука, 2003. – С. 184 – 217.
4. Клонирование человека. Вопросы этики. – Париж, Изд-во ЮНЕСКО, 2004. – 21 с.