

КАКВО Е ГЕННОТО ИНЖЕНЕРСТВО?

Генното инженерство е наименованието на техниките за получаване на ДНК молекули *in vitro*, съдържащи нови комбинации от гени или отделни последователности. То се занимава с конструиране на организми с несвойствени за дадения вид признаци. Генното инженерство се състои в извличане на гени, пренасяне и закрепване на тези гени в нови бактериални клетки. Генното инженерство е средство за вмешателство в генома на бактериалната клетка. При това не се получават нови видове, а се получават форми с нови свойства. Генното инженерство се означава като молекулно клониране на ДНК, технология за рекомбинантна ДНК, генни манипулации, генна инженерия, молекулна инженерия и др.

В природата са налице много бариери, които пречат на рекомбинацията на гени между таксономично отдалечените организми. Генното инженерство премахва тези бариери. При него се създават нови форми чрез внасяне на фрагменти от чужда ДНК.

Как работи ГИ? Ако искаме да разберем генното инженерство най-добре да започнем с някои основи на биологията.

ЩО Е КЛЕТКА?

Клетката е най-малката жива частица, основна структурна и функционална единица на живата материя, независимо дали се отнася за растения, животни или гъби. Някои организми като амеби и бактерии, а също водорасли и гъби са едноклетъчни т.е. целият им организъм се съдържа в една единствена клетка. Хората са доста по-различни и са изградени от приблизително 3 000 000 000 000 клетки.

Клетката може да приема различна форма в зависимост от нейната функция, но като цяло тя би изглеждала като тухличка със загладени ъгли или ъгловата капка - градивната частица. Клетките, подредени заедно, изграждат тъканите, органите и структурите в живите организми /мозък, черен дроб, кости, кожа, листа, плодове и т.н./.

Клетките в живия организъм са зависими една от друга с оглед на това дали изпълняват различни функции и задачи: някои клетки произвеждат ензими, други складираат захари или мазнини, различни клетки също изграждат скелета или пък са отговорни за комуникациите, като например нервните клетки. Други клетки са отговорни за защитата на организма, каквито са белите кръвни клетки или жилещите клетки при медузите или растенията. За да бъдат пълноценни функционалните части от цялото, повечето клетки съдържат еднаква информация, помощни средства и основни съставни части.

Клетките принадлежащи към висши организми /например, растения или животни/ се състоят от:

- КЛЕТЪЧНА МЕМБРАНА, ограждаща цялата клетка /Растителните клетки съдържат допълнителна, укрепваща тяхната структура стена./;
- ОРГАНЕЛИ, които са всъщност функционални компоненти, еквивалентни на органите на тялото на животно, например храносмилане, складиране, екскреция;
- ЯДРО, командният център на клетката. То съдържа цялата жизнена информация, необходима за клетката или за целия организъм, за да функционира, расте и се репродуцира. Тази информация е заложена под формата на генетични кодове върху хромозомите, които са разположени вътре в ядрото;

БЕЛТЪЦИ

Белтъците са основния градивен материал на клетката, изработени от самата клетка. Погледнати отблизо те се състоят от вериги от аминокиселини, малки обособени блокчета, които лесно се свързват. Въпреки, че в основата си структурата на протеините е линейна, те са обикновено нагънати и пренагънати в по-сложни структури. Различните протеини /белтъци/ изпълняват различни функции. Те могат да транспортират молекули /свързващият кислорода хемоглобин у червените кръвни клетки/; те могат да са антитела-изпълнители на определени функции; ензими

/например, храносмилателни ензими /; или хормони /например, растежен хормон или инсулин /.

Друга група са структурните протеини, които изграждат обвивките на тъканите или органите или осигуряват движението, еластичността и способността за контракция. Мускулните влакна, например, са основно изградени от протеини. Така че белтъците са от решаващо значение за формирането на клетката и я осигуряват с възможността да функционира както трябва.

ХРОМОЗОМИ

Хромозома буквално означава “оцветено телце”, което може да се види под светлината на микроскопа, като се използват специални оцветявания. Те изглеждат като завързани на възли и примки дълги, и тънки нишки. Хромозомите са мястото за складиране на всичко генетично т.е. наследствена, генетична информация. Тази информация е записана по протежение на тънката нишка, наречена ДНК. ДНК е съкратено от дезоксирибонуклеинова киселина, специфичен киселинен материал, който може да се открие в ядрото.

Генетичната информация е записана под формата на кодове, почти както музиката на магнетофонна лента. За да е сигурно, че нишката ДНК и информацията са в стабилно състояние и защитени, природата е употребила засукана двойно верижна нишка - знаменитата двойна спирала. Когато клетката се размножава, тя я копира и предава на дъщерната клетка. Цялата генетична информация на даден организъм се нарича геном.

Клетките на хората, например, притежават два набора от по 23 хромозоми-единият от майката, а другият от страна на бащата. ДНК от коя да е човешка клетка би съответствувала на два метра ДНК в случай, че тя би била цялостно разтегната. Така че, от решаващо значение е начинът по който е организирана ДНК в хромозомите, за да бъдат избегнати възли, уплитания или прекъсвания по нейното протежение.

Дължината на ДНК която се съдържа в човешкото тяло е приблизително 60 000 000 000 километра. Тя е еквивалентна на разстоянието до луната и обратно 8000 пъти!

Информацията, съдържаща се в хромозомите и съответно в ДНК, е записана и закодирана по начин, разбираем за всички видове на земята. Затова се нарича универсален код на живота.

При тази система на кодиране клетките се нуждаят само от четири символа, наречени нуклеотиди, които дават инструкция как да се произведе даден протеин. Нуклеотидите са композиции от единици ДНК, чиито собствени имена за улеснение са съкратени в букви от латинската азбука А, В, G и Т.

Тези букви се построяват в трибуквени думи, които в дадена последователност представляват код за обособена аминокиселина, както е показано по-горе. Информацията за това, как която и да е клетка е построена или как тя функционира е закодирана в обособени единици, наречени гени.

Генът представлява определен сегмент /дължина/ от ДНК, носещ специфични инструкции за производството на най-общо казано един протеин. Кодирането на последователността на гените представлява средно около 1000 букви дължина т.е. генни кодове например за инсулин, храносмилателни ензими, кръвосъсирващи протеини или пигменти

КАК СЕ РЕГУЛИРА ГЕННАТА ЕКСПРЕСИЯ?

Как клетката знае кога да произведе даден протеин, точно кой протеин и в какво количество?

Пред всеки един ген съществува протежение ДНК, което съдържа регулаторните елементи за този специфичен ген, в повечето случаи познато като промотер. То функционира като “контролна кула”, постоянно държейки флагчето във вдигнато състояние по отношение на гена, който контролира.

Да вземем например производството на инсулина, който ние произвеждаме, за да изгаряме кръвните захари. Когато пристигне съобщение под формата на молекула, която съобщава за “повече инсулин”, “контро-лиращата инсулина кула” ще даде сигнал за локализацията на инсулиновия ген и ще каже “насам”. Молекулата-пратеник ще “акустира” и така ще “превключи” началото на целия процес на генната експресия.

Как информацията, съдържаща се в ДНК, се превръща в протеин в точно определено време?

Всеки ген съдържа 3 основни компонента: “контролираща кула” /промотор/, информационен блок и поли-А сигнален елемент.

Ако даден специфичен протеин не е в достатъчно количество в клетката, то ще бъде изпратено съобщение към ядрото, за да бъде открит съответният ген. Ако “контролната кула” разпознае съобщението като валидно, то тя ще отвори “портата” към информационния блок. Незабавно информацията се копира - или превежда - към нишковидните молекули, наречени РНК. РНК е много подобна на ДНК, само че тя е едноверижна. След като копирането завърши, редица от 200 “А” типа нуклеотиди - поли-А опашка се добавя към нейния край /фиг.2/. Този процес се нарича поли-аденилация и се инициира от поли-А сигнала, разположен към края на гена. Счита се, че поли-А опашката стабилизира РНК-заповедта срещу евентуално разлагане за ограничено време. Сега вече РНК-копията на гена напускат ядрото и биват разпределени в клетката под формата на малки “работни” единици, които превеждат информацията в протеини.

Нито една клетка не може да употреби цялата закодирана в нея ДНК. Клетките разпределят работата помежду си, т.е. те се специализират. Мозъчните клетки не биха произвели инсулин, чернодробните - слюнка, нито пък кожните клетки биха произвели кост. Ако това ставаше, то в нашето тяло би настъпил хаос.

Същото се отнася и за растенията - коренчевите клетки не биха произвели зеления хлорофил, нито пък листата биха произвели полени или нектар. Още повече, че генната експресия зависи от възрастта - младите фиданки не могат да проявят коя да е генна експресия, свързана с узряването на плодовете. У старите хора обикновено не започват да никнат нови зъби /въпреки, че са познати изключения/.

И въобще, регулирането на гените е много специфична функция, зависеща от средата в която е поставена клетката. Тя също така е свързана и със съответния стадий на развитие на даден организъм. Така че, ако аз пожелаая листата на маковото растение да произвеждат червен цвят на чашката на цветето, аз не бих бил способен да сторя същото с помощта на традиционните методи за отглеждане, въпреки факта, че клетките на листата съдържат цялата необходима за това генетична информация. Съществува нещо, което блокира и предотвратява оцветяването на листата в червено. Две неща могат да причинят това блокиране:

- "Червеният" ген е бил постоянно изключен и напълно затворен във всичките клетки на листата. Така информацията става недостъпна.

- Клетките на листата не се нуждаят от червения цвят и така не изискват РНК-копия от тази информация. Следователно, няма да има и молекула-пратеник, която да акустира до "червената" контролна кула, за да активира съответния ген.

- Разбира се, може да се предположи, че съществува някакъв трик, така че растението да бъде "измамано" и то да се обърне против собствената си воля. Ние бихме могли да внесем червения ген подобно на "Троянски кон", скрит под контролната кула в друг, различен от този ген. Но за това трябва да "срежем" гени и да ги "слепим" отново в друга, различна форма. Това е мястото, където свършва отглеждането с цел селекция и започва генното инженерство.

ГЕННО ИНЖЕНЕРСТВО

Основни моменти при генното инженерство

При генноинженерните технологии има три основни момента: получаване на фрагменти от чужда (външна) ДНК, присъединяване на гени към вектори (преносители) и внасяне на вектор на ДНК в реципиентни клетки.

Получаване на фрагменти от чужда ДНК. То се изразява в получаването на чиста ДНК по възприетите стандартни методи. Получената молекула на ДНК се нарязва на линейни фрагменти, които са носители на различен брой гени.

Нарязването се извършва с помощта на ензими- “молекулни скалпели”, наречени рестриктази или рестриktionни ендонуклеази. Те са способни да разкъсват молекулата на ДНК в участъци с определена нуклеотидна последователност. Чрез използването на определени рестриктази се получават линейни фрагменти от ДНК, които са носители на определени гени.

При ензимното разкъсване на ДНК се получават фрагменти с два типа краища. Едни от краищата на фрагментите са с едноврешна нуклеотидна последователност и се наричат лепливи краища. Те могат да се свързват комплектарно в определени участъци, където съвпадат азотните бази. Краищата на фрагментите на ДНК, при които и двете вериги са отрязани в една позиция, се наричат **тъпи краища**. Фрагментите с тъпи краища не могат да се свързват с молекулата на ДНК, освен в случаите, когато по изкуствен начин са създадени лепливи краища.

Присъединяване на гени към вектори. За вектори (преносители) на фрагменти на чужда ДНК се използват бактериални плазмиди или умерени фаги. Присъединяването на чуждата ДНК към плазмидите или фагите се осъществява с помощта на специфични ензими, наречени ДНК-лигази. Свързването се извършва комплектарно с лепливите краища на фрагментите на чуждата ДНК.

Присъединяването на линейните участъци на чуждата ДНК към молекулата на ДНК на плазмидите става чрез вставка (инсерция). Предварително плазмидната молекула на ДНК се нарязва със същите рестриктази, с които е нарязана и чуждата ДНК. По такъв начин се получават краища, които комплектарно съвпадат с краищата на линейните фрагменти на чуждата ДНК. В резултат на това, линейните фрагменти на чуждата ДНК се свързват, “съшиват” към молекулата на ДНК на плазмидите с помощта на ДНК-лигази. Получават се хибридни плазмиди. Тяхната ДНК е рекомбинантна ДНК. Нарича се още хибридна ДНК или ДНК- химера. Последният термин идва от древногръцката митология, където “химера” означава чудовище с глава на лъв, тяло на коза и опашка на змия.

През последните години се получават хибридни плазмиди с изкуствено синтезирана по

химичен начин на чужда ДНК. Това дава възможност за получаване на точно определена последователност на нуклеотидите и на хибридни плазмиди, които да детерминират точно определени особености.

Внасяне на рекомбинантна ДНК в клетката- реципиент. Получените плазмиди или фаги с рекомбинантна ДНК се внасят в реципиентната клетка чрез трансформация или трансфекция. Като реципиенти се използват най- често клетки на *Esch. coli*, които могат да приемат голям брой плазмиди или фаги. Получава се нова бактерийна популация, която се нарича кло

Методът на нейното получаване се нарича молекулно клониране на ДНК. Потвърждаването на клонирания ген в популацията става чрез генно картиране и секвениране. Завършващ етап в генното инженерство е генна експресия, при която се изявява клонираният ген. Внесените в реципиентната клетка хибридни плазмиди или фаги започват да се реплицират несинхронно. Това е свързано с получаването на голямо количество биопродукт.

Перспективи на генното инженерство. Генното инженерство е велико постижение на науката, нов етап в развитието на генетиката и биологията. То разкрива неограничени възможности за получаването на клетъчни популации с рекомбинантна ДНК с нови особености, неизвестни досега. Технологията на рекомбинантната ДНК се превърна в широко използван метод за получаване на щамове от *Esch. coli* с рекомбинантна ДНК на човешки растежен хормон (соматостатин), на инсулин, на интерферон и други нови биотехнологични производства.

Генното инженерство разкрива неограничени възможности за конструиране на микроорганизми, с помощта на които да се разграждат замърсителите в природата, както и за усвояване на азота от атмосферата. То може да доведе до полезни резултати с голяма научна и практическа стойност, като лекуването на генетични недостатъци, разкриване на нови възможности за борба със заразните заболявания. Освен това молекулното клониране носи голям, засега трудно предвидим и контролируем, потенциален биологичен риск. Налице са опасности от получаване на патогенни бактерии с повишена вирулентност, както и създаване на нови онкогенни вируси.

Голяма опасност крият опитите за нов тип биологично оръжие, което е античовечно използване на големите възможности на генното инженерство. Това налага прилагането на генноинженерните технологии да става в регламентирани лаборатории с подходящо обзавеждане и висококвалифициран персонал под строг международен контрол.

Генното инженерство /ГИ/ ползва вземането на гени и сегменти от ДНК от един вид, например, риба и внедряването им в друг вид, например, домати. За да стане това ГИ осигурява набор от техники за срязване на ДНК или на сляпо, или на определен брой специфични места. Веднъж изолирани, различните сегменти от ДНК биха могли да се изучават, да се размножават и да се закачат /слепват/ до някоя друга ДНК от друг организъм. ГИ прави възможно прекрещването на видовата бариера и разбъркването на информацията между свършено различни и по никакъв начин несвързани видове: например, закачането на ген против измръзване, от риба, у домати или ягоди; ген, обуславящ продукцията на убиващ насекомите токсин от бактерия в царевица, памук или маслодайна ряпица, или гени от човек у свиня.

Все още обаче съществува проблем - генът от риба не би проработил, ако няма промотер с "флаг", който клетките на домата да разпознаят. Такъв контрол върху последователността на клетъчната функция може да е или последователността на домата, или нещо подобно. Повечето компании и учени си спестяват това и дори не си правят труда да потърсят подходящ промотер на домата, което би отнело години, за да се разбере, как работят вътрешно-клетъчните комуникации и регулации. За да се избегне дългото тестване и окомплектоване, в повечето случаи ГИ при растенията се осъществява с т.н. вирусни промотери.

Вирусите както е известно са много активни. Нищо или почти нищо не би могло да ги спре, ако те си намерят нова жертва или хазяин. Те интегрират тяхната генетична информация в ДНК на клетките на хазяина /същите като вашите/, размножават се, инфектират съседните клетки и се размножават отново. Това е възможно, защото вирусите са разгърнали могъщи промотери, които издават команди в клетката-хазяин, която постоянно "чете" вирусните гени и произвежда вирусните протеини. Просто казано, чрез вземането на контролния елемент /промотера/ от растителен вирус и поставянето му пред информационния блок на рибния ген можете да добиете този комбиниран вирус риба-ген, познат като "конструкт", за да заработи той когато и където желаете в дадено растение.

Това би прозвучало като нещо велико, само че връщане назад няма. Този процес нито

може да се спре, нито пък да бъде изключен. Растението е вече “лишено от правото” на глас по отношение на експресията на новия ген, дори и тогава, когато постоянното и не доброволно продуциране на “новия” продукт отслабва защитата растеж на растението или неговия

Още повече, че няма пълно съответствие между теорията и практиката. Често без видима причина новият ген проработва за определен период от време, след което остава “безмълвен”. Обаче, такова нещо не би могло да се установи предварително.

Въпреки, че този метод често се провъзгласява за прецизен метод, финалната фаза от разполагането на нов ген във висшия организъм-реципиент е всъщност по-скоро груб и страдащ от сериозен недостиг както на прецизност, така и на предвидимост. Новият ген може да застане къде да е, непосредствено до кой да е друг ген или дори в обхвата на друг ген, смущавайки неговата функция или управление. Ако новият ген се внедри в т.н. “тихи” не изразени части на клетъчната ДНК, то много вероятно е той да попречи на регулирането на генната експресия на този цял участък. Това също може потенциално да причини активизирането на гени от “тихата” част на ДНК.

Често генното инженерство ползва не само информацията на един ген и я поставя зад промотера на друг ген, но също взема парченца и по-големи частици от други гени и други видове. Въпреки, че с това се цели да се подобри експресията и функцията на “новия” ген, това също е вмешателство в дейността на клетката и увеличава рисковете от непредвидими последици.

КОЕ СЧИТАМЕ ЗА ПОГРЕШНО В ГЕННОТО ИНЖЕНЕРСТВО?

Генното инженерство е тестова наука с все още ограничени възможности, преждевременно употребена при производството на храни. Проследеният в тестови условия ген може да ни даде информация за това, какво той извършва или какво е неговото поведение в такива тестови условия. Той не може да ни каже, каква е неговата роля нито в организма от който идва, нито пък каква ще бъде тя, ако го разположим в организма на свършено различен друг вид. Гените, обуславящи червен цвят, внедрени у петунията не само променят цвета на чашките на цветчетата ѝ, но също намаляват плодовитостта на растението и променят растежа на корените и листата му. Съомгата, инженерана с помощта на растежен хормон не само расте твърде бързо, но и добива зелен оттенък. Такива са непредвидимите странични ефекти, които учените наричат

плейотропни ефекти.

Ние също знаем твърде малко за това, какво даден ген би могъл да отключи или прекъсне, в зависимост от това, къде той е бил внедрен в новия организъм-хазяин /растение или животно/. Това са все още откритите въпроси около т.н. позиционални ефекти. А какво да кажем за генното потискане и генната нестабилност?

Как бихме могли да знаем, че генно инженерно растение, което се отглежда с цел производство на храна, няма да произведе нови токсини и алергизиращи вещества или да увеличи нивото на “дремещи” такива, т.е. съдържатели се в незначителни количества в техните не генно-инженерни варианти? Какво бихме могли да кажем за тяхната хранителна стойност? И какви биха били последствията за околната среда и дивия свят? Всички тези въпроси са от голямо значение и все още няма отговор за тях. Докато ние нямаме отговор на всичко това, генното инженерство трябва да бъде затворено само в рамките на тестовите условия. Съществува тенденцията бракът между биотехнологията и корпорациите да пренебрегва не само предпазния принцип, но и някои основни научни принципи.