

Микробные объекты в биотехнологии

Принципы клеточной инженерии микроорганизмов

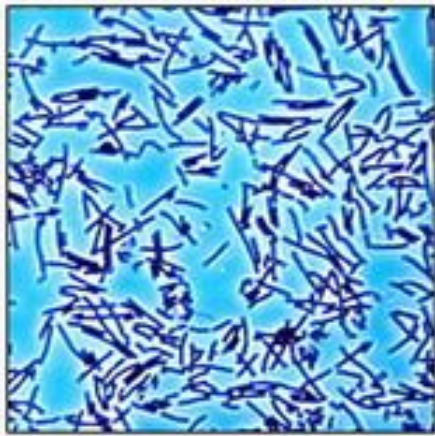
к.х.н., доцент кафедры
микробиологии
Герловский Денис Олегович

Минск, 2015

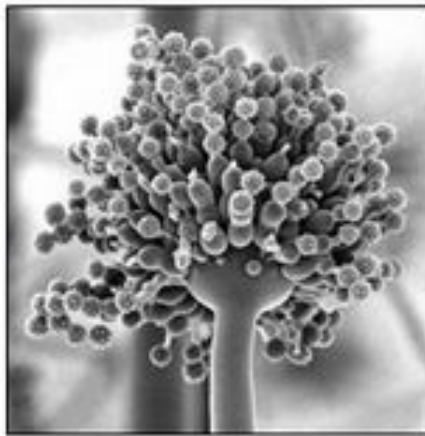
Микроорганизмы существенно отличаются друг от друга по морфологии, размерам клеток, отношению к кислороду, по потребностям к ростовым факторам, способности ассимилировать разные компоненты субстрата и т. д.

Из более 100000 известных видов микроорганизмов в промышленности используют относительно мало – около 100 видов. Они должны соответствовать следующим требованиям:

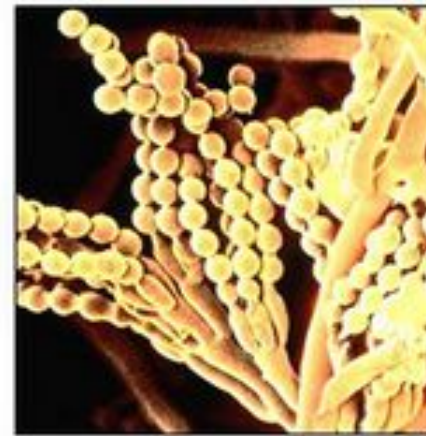
1. Растить на дешёвых и доступных субстратах;
2. Обладать высокой скоростью роста биомассы и давать высокую продуктивность целевого продукта при экономичном потреблении питательного субстрата;
3. Проявлять направленную биосинтетическую активность при минимальном образовании побочных продуктов;



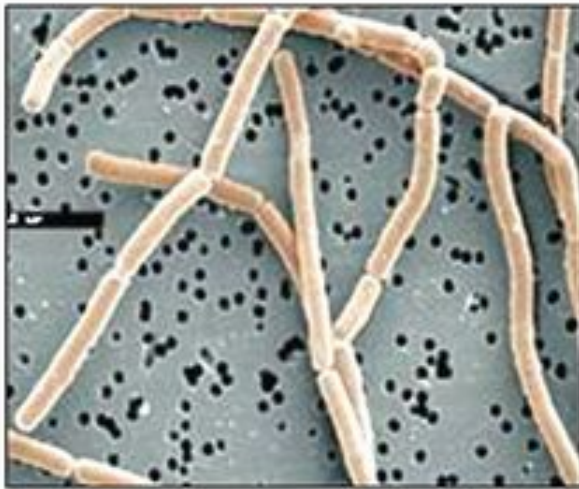
А



Б



В



Г



Д

Микроорганизмы, используемые в промышленном синтезе различных соединений

А – *Acetobacter aceti*; Б – *Aspergillus niger*; В – *Penicillium chrysogenum*; Г – *Lactobacillus delbrueckii*; Д – Производство левана при ферментации среды, содержащей *Zymomonas mobilis*

4. Быть генетически однородными, стабильными в отношении продуктивности и требований к питательному субстрату, а также условиям культивирования;
5. Быть устойчивыми к фагам и другой посторонней микрофлоре;
6. Быть безвредными (не обладать патогенными свойствами) для людей и окружающей среды;
7. Желательно, чтобы продуценты были термофильными и ацидофильными, так как в этом случае легче предохранить ферментируемый субстрат от инвазии посторонней микрофлоры;
8. Целевой продукт биосинтеза должен иметь экономическую и народнохозяйственную ценность и легко выделяться из сброженного субстрата. Возрастающий интерес представляют анаэробные микроорганизмы, поскольку при культивировании не требуют энергоёмких аэрирующих устройств.

Сверхсинтез, т. е. способность микроорганизма синтезировать определённый продукт в количествах, превосходящих его физиологические потребности, довольно часто встречается в природе. Нередко тот или иной продукт обмена веществ (органические кислоты, спирты, антибактериальные вещества), выделяемый микроорганизмом в окружающую среду, является токсичным для других видов и служит продуценту как средство защиты обитаемого пространства или как резерв питательного вещества. Микроорганизмы с такими свойствами первыми были привлечены к хозяйственной деятельности человека в тысячелетней давности и был проведён стихийный отбор наиболее продуктивных форм. Сейчас такие природные штаммы микроорганизмов, иногда после сознательного отбора, применяют для производства микробной биомассы (микробного белка) в качестве бактериальных азотных удобрений, биопестицидов, в производстве пищевых продуктов и в других отраслях народного хозяйства. Однако основной контингент промышленных микроорганизмов представлен искусственно селекционными штаммами.

В настоящее время в промышленности применяют три вида штаммов:

1. Природные штаммы, нередко улучшенные естественным или искусственным отбором;
2. Штаммы, изменённые в результате индуцированных мутаций;
3. Штаммы культуры, полученные методами генной или клеточной инженерии.

Принципы селекции организмов. Начиная сознательную селекцию микроорганизмов, человек ставил целью создать промышленные организмы с необычными для диких микробов свойствами. Методологически эту цель человек решает двумя путями:

1. Коррекцией генетической информации микробной клетки, исключая не желаемые для промышленного синтеза свойства и усиливая нужные признаки.
2. Индукцией совершенно новой информации в генетической программе клетки.

Для этого необходимо также решить следующие задачи:

1. Существенно увеличить продуктивность, свойственную данному виду микробов и его продукту обмена веществ;
2. Генетически запрограммировать биосинтез таких веществ, которые несвойственны данному виду или даже несвойственны микробному миру.

В отличие от селекции культурных растений и домашних животных, имеющей тысячелетнюю историю и богатый опыт, целенаправленный отбор и селекция микроорганизмов начались только после узнавания микромира и развивались параллельно с достижениями генетики как научной дисциплины.

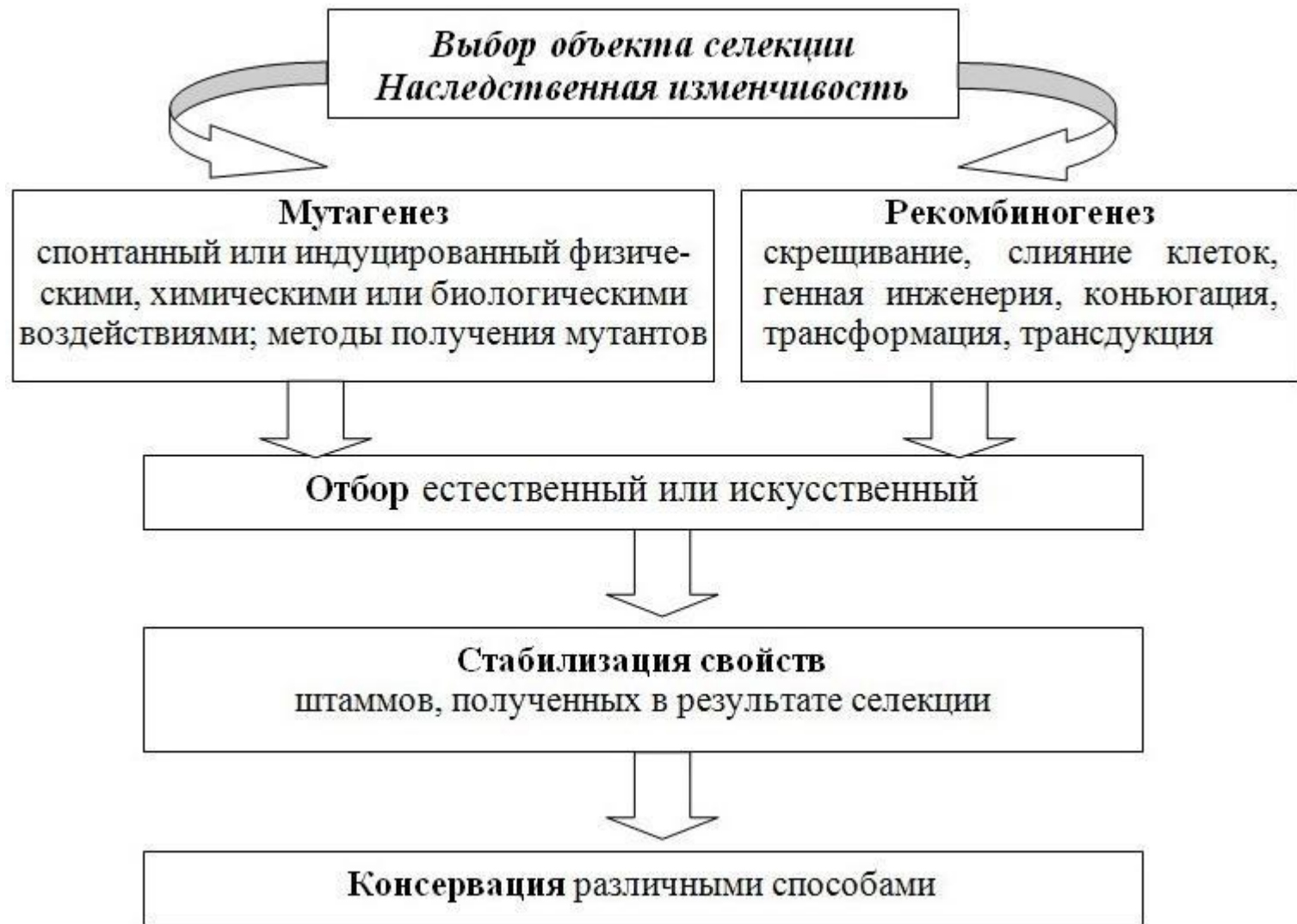
Селекционируя любой живой организм, человек опирается на естественные движущие силы эволюции — наследственные изменения и отбор положительных экземпляров. Однако микроорганизмы, как объект селекции, имеют ряд особенностей:

1. Выращивание микробной культуры из одной клетки – обычный для микробной селекции приём – приводит к тому, что в руках селекционера в качестве исходного материала селекции всегда оказывается особь клона (имеющего генетическую однообразность). С другой стороны, клон микроорганизмов быстро достигает такой численности, что за счёт естественных мутаций превращается в популяцию – совокупность клеток с разными генотипами;
2. Большинство микроорганизмов гаплоидные, с одним экземпляром хромосом, поэтому у них нет скрытой изменчивости, являющейся основой селекции высших организмов;
3. У большинства микроорганизмов, имеющих промышленное значение, до сих пор не известна способность к гибридизации (половому размножению). Это означает, что селекцию клеток можно вести только вегетативным путём;

4. Микроорганизмы характеризуются исключительно быстрой сменой поколений, поэтому возможностей для отбора положительных экземпляров у селекционера микробиолога значительно больше. Оценку выбранного микроорганизма можно провести за считанные дни выращивания в отличие от макроорганизмов, где результаты работы видны через несколько лет;
5. Селекционер микроорганизмов имеет огромное число индивидуумов для отбора, что принципиально расширяет его возможности, но для оценки продуктивности каждого клона требуется трудоёмкая работа.

Культуру, подлежащую селекции, можно выбрать из собранных в коллекции культур (музейные культуры); можно использовать известные промышленные продуценты; можно изолировать микробы из природных субстратов.

Представления о биохимии и физиологии микроорганизмов ориентируют селекционера на определённые группы микроорганизмов с наиболее вероятным потенциалом *сверхсинтеза* интересующего вещества. Продуценты антибиотиков, главным образом, встречаются среди грибов аскомицетов и актиномицетов, сверхсинтез аминокислот легче получить у коринебактерий, внеклеточные ферменты часто синтезируют дрожжи. Главные этапы селекции микроорганизмов отражены на рисунке



Клеточная инженерия

Конструирование специальными методами клеток нового типа. Клеточная инженерия включает реконструкцию жизнеспособной клетки из отдельных фрагментов разных клеток, объединение целых клеток, принадлежавших различным видам (и даже относящихся к разным царствам — растениям и животным), с образованием клетки, несущей генетический материал обеих клеток, и другие операции. Клеточная инженерия используется для решения теоретических проблем, в биотехнологии, для создания новых форм растений, обладающих полезными признаками и одновременно устойчивых к болезням, и т. п.

Клеточная инженерия,

создание клеток нового типа на основе их гибридизации, реконструкции и культивирования.

В узком смысле слова под этим термином понимают гибридизацию протопластов или животных клеток, в широком

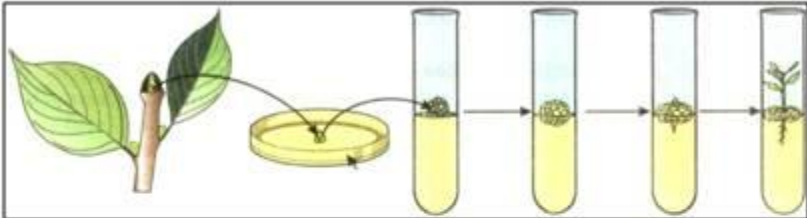
различные манипуляции с ними, направленные на решение научных и практических задач. Является одним из основных методов биотехнологии.

Культивирование клеток — это метод сохранения жизнеспособности клеток вне организма в искусственно созданных условиях.

Задачи клеточной инженерии:

1. Получение и применение культур клеток животных, человека, растений и бактерий для культивирования вирусов с целью создания вакцин, сывороток, диагностических препаратов.
2. Культивирование культур клеток для получения биологически активных веществ.
3. Получение моноклональных антител (гибридом) для использования в медицине и ветеринарии. Генно-инженерные манипуляции с клетками для получения новых форм, новых культур клеток, биопрепаратов и др.

Использование клеточных культур

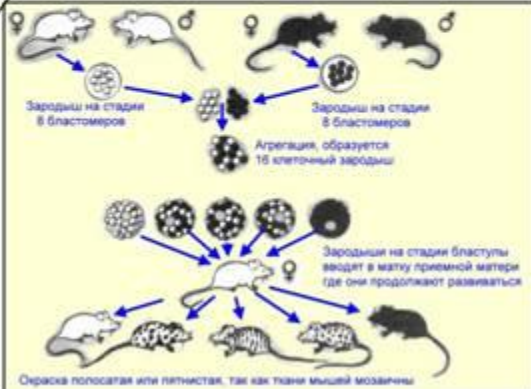


Получение гибридом



Методы клеточной инженерии

Клонирование



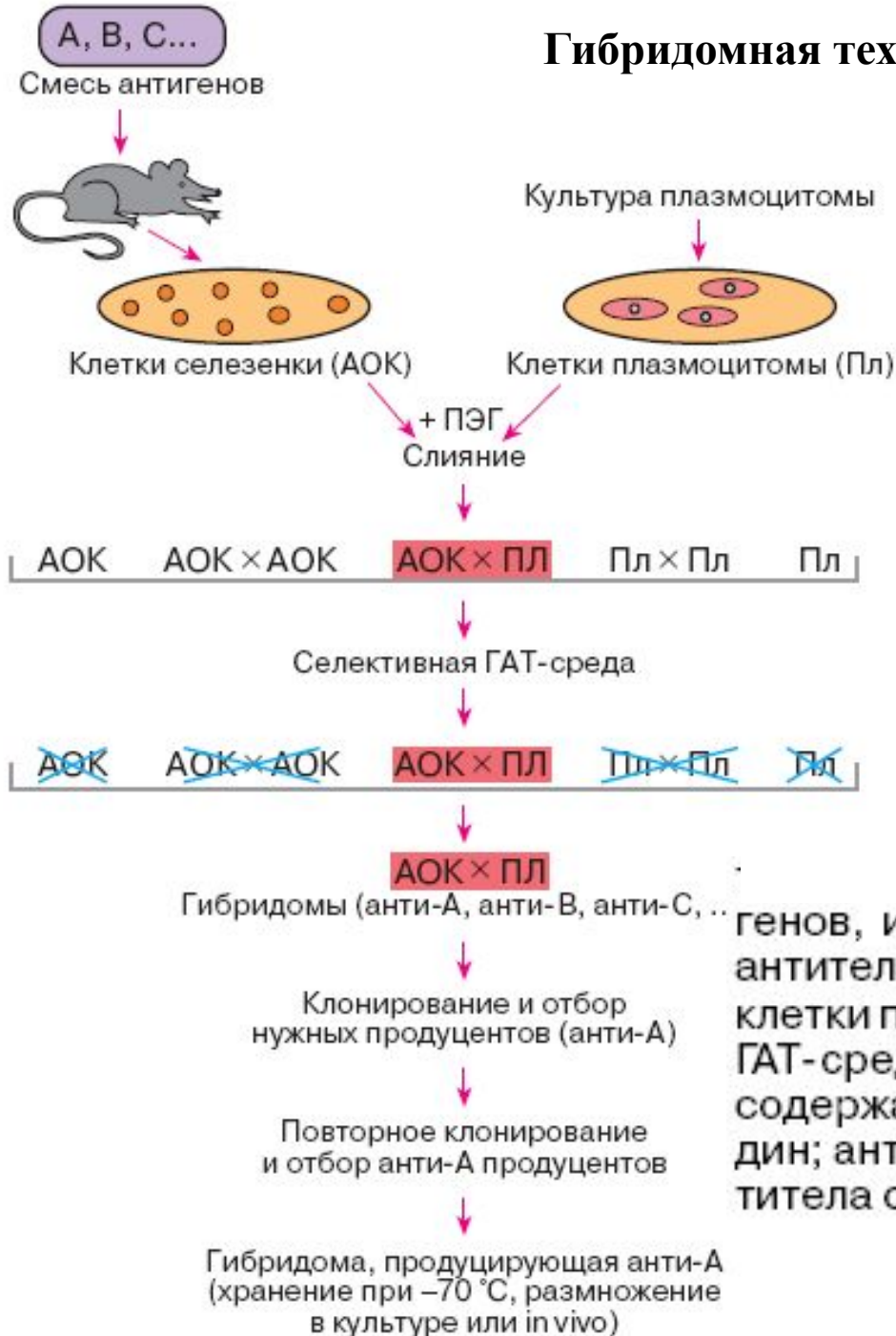
Слияние эмбрионов, получение химер



Гибридизация соматических клеток

В основе метода лежит слияние клеток, в результате чего образуются гетерокарионы, содержащие ядра обоих родительских типов. Образовавшиеся гетерокарионы дают начало двум одноядерным гибридным клеткам. В 1965 английский ученый Г. Харрис впервые получил гетерокарионы, образованные клетками мыши и человека. Такую искусственную гибридизацию можно осуществлять между соматическими клетками, принадлежащими далеким в систематическом отношении организмам и даже между растительными и животными клетками. Гибридизация соматических клеток животных сыграла важную роль в исследовании механизмов реактивации генома покоящейся клетки и степени фенотипического проявления (экспрессивности) отдельных генов, клеточного деления, в картировании генов в хромосомах человека, в анализе причин злокачественного перерождения клеток. С помощью этого метода созданы гибридомы, используемые для получения моноклональных (однородных) антител.

Гибридная технология



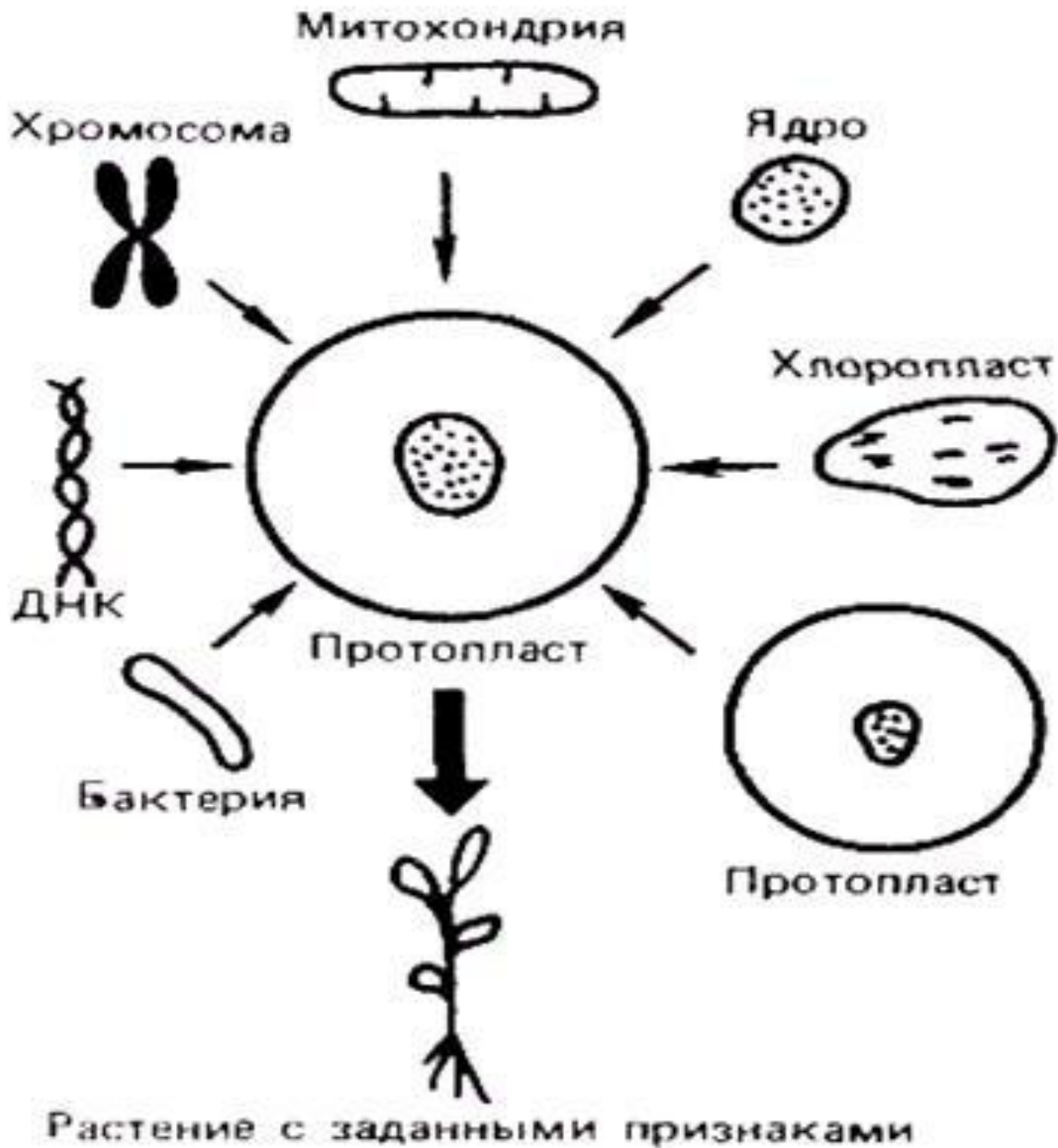
А, В, С – многокомпонентная смесь антигенов, использованная для иммунизации; АОК – антителообразующие клетки селезенки; Пл – клетки плазмцитомы, не растущие в селективной ГАТ-среде; ПЭГ – полиэтиленгликоль; ГАТ – среда, содержащая гипоксантин, аминоптерин, тимидин; анти-А, анти-В, анти-С – моноклональные антитела соответственно к А-, В-, С-антигенам

Первый межвидовой гибрид при слиянии протопластов из клеток разных видов табака был получен в 1972 П. Карлсоном (США). Гибриды, полученные при слиянии протопластов, имеют важные отличия от половых гибридов поскольку несут цитоплазму обоих родителей. Возможно создание гибридов, наследующих ядерные гены одного из родителей наряду с цитоплазматическими генами обоих родителей. Особый интерес представляют гибриды растений, несущие цитоплазматические гены устойчивости к различным патогенам и стрессорным факторам от дикорастущих видов или цитоплазматические гены мужской стерильности. Слияние протопластов используют также для получения гибридов с ценными в хозяйственном отношении свойствами между отдаленными видами, которые плохо или вообще не скрещиваются обычным путем. Удалось, например, «ресинтезировать» рапс, являющийся естественным амфидиплоидом между турнепсом и капустой, получить соматический гибрид картофеля с томатами и т. д. При слиянии протопластов создают и новые клеточные линии-продуценты важных соединений.

Реконструкция клеток

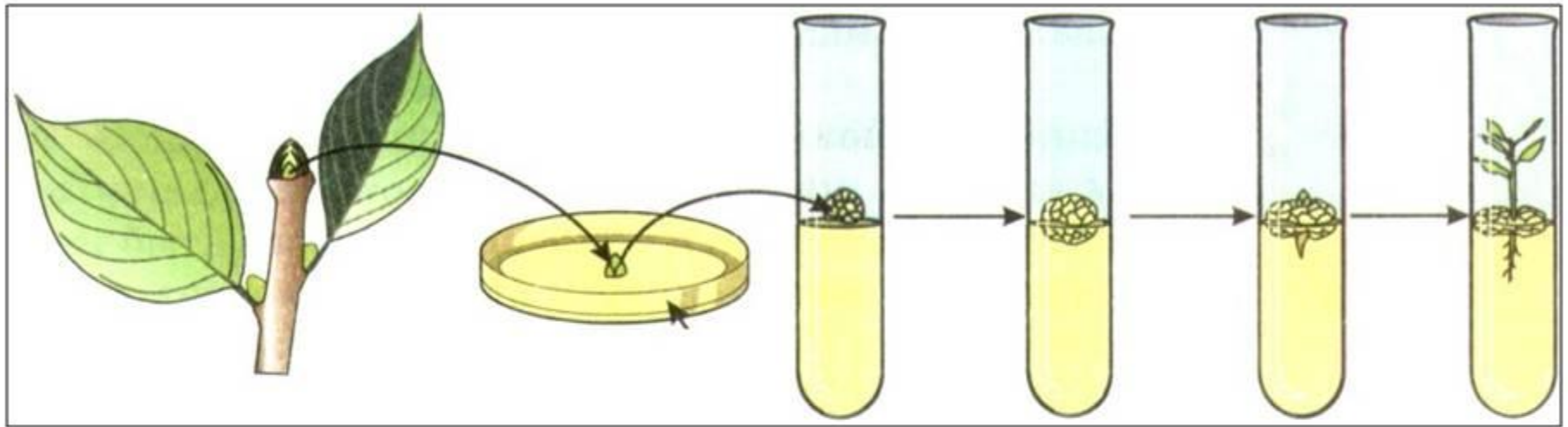
Одним из способов модификации клеток является введение в них индивидуальных генов, т.е. метод генетической инженерии. Встраивание активного гена на место отсутствующего или поврежденного открывает путь для лечения генетических заболеваний человека. Изменять свойства клеток можно, вводя клеточные органеллы (ядра, хлоропласты), изолированные из одних клеток, в протопласты других клеток. Так, одним из путей активизации фотосинтеза растительной клетки может служить введение в нее высокоэффективных хлоропластов. Искусственные ассоциации растительных клеток с микроорганизмами используют для моделирования на клеточном уровне природных симбиотических отношений, играющих важную роль в обеспечении растений азотным питанием в природных экосистемах.

Рассматривается возможность придания растениям способности к фиксации молекулярного азота при введении в них целых клеток азотфиксирующих микроорганизмов. Реконструкцию клеток проводят также при слиянии клеточных фрагментов (безъядерных, кариопластов с ядром, микроклеток, содержащих лишь часть генома интактной клетки) друг с другом или с интактными (неповрежденными) клетками. В результате получают клетки с различными свойствами, например, гибриды, либо клетки с ядром и цитоплазмой от разных родителей. Такие конструкции используют для изучения влияния цитоплазмы в регуляции активности ядра.



Растение с заданными признаками

Клеточная инженерия



Методы клеточной инженерии связаны с культивированием отдельных клеток в питательных средах, где они образуют *клеточные культуры*. Оказалось, что клетки растений и животных, помещенных в питательную среду, содержащую все необходимые для жизнедеятельности вещества, способны делиться. Клетки растений обладают еще и свойством *тотипотентности*, то есть при определенных условиях они способны сформировать полноценное растение.

Улучшение растений и животных на основе клеточных технологий

Выращиваемые на искусственных питательных средах клетки и ткани растений составляют основу разнообразных технологий в сельском хозяйстве. Одни из них направлены на получение идентичных исходной форме растений (оздоровление и клональное микроразмножение на основе меристемных культур, создание искусственных семян, криосохранение генофонда при глубоком замораживании меристем и клеток пыльцы). Другие — на создание растений, генетически отличных от исходных, путем или облегчения и ускорения традиционного селекционного процесса или создания генетического разнообразия и поиска и отбора генотипов с ценными признаками.

В первом случае используют искусственное оплодотворение, культуру незрелых гибридных семян и зародышей, регенерацию растений из тканей летальных гибридов, гаплоидные растения, полученные при культивировании пыльников или микроспор. Во втором — новые формы растений создаются на основе мутантов, образующихся *in vitro*, и трансгенных растений. Таким путем получены растения, устойчивые к вирусам и другим патогенам, гербицидам, растения, способные синтезировать токсины, патогенные для насекомых-вредителей, растения с чужеродными генами, контролирующими синтез белков холодоустойчивости и белков с улучшенным аминокислотным составом, растения с измененным балансом фитогормонов и т. д.

Важную роль в животноводстве сыграла разработка методов длительного хранения спермы в замороженном состоянии и искусственного осеменения. Реально же развернулись исследования по клеточной и генной инженерии на млекопитающих только с освоением техники оплодотворения *in vitro*, обеспечившей получение достаточного количества зародышей на ранних стадиях развития. Генетическое улучшение животных связано с разработкой технологии трансплантации эмбрионов и методов микроманипуляций с ними (получение однойяйцевых близнецов, межвидовые пересадки эмбрионов и получение химерных животных, клонирование животных при пересадке ядер эмбриональных клеток в энуклеированные, т. е. с удаленным ядром, яйцеклетки). В 1996 шотландским ученым из Эдинбурга впервые удалось получить овцу из энуклеированной яйцеклетки, в которую было пересажено ядро соматической клетки (вымени) взрослого животного. Эта работа открывает широкие перспективы в области клонирования животных и принципиальную возможность клонирования в будущем и человека.

Пересадка ядер соматических клеток в яйцеклетку и получение головастика

1. Эритроциты крови



2. Извлечение ядра из эритроцитов



3. Введение ядра в яйцеклетку на первой стадии мейоза



4. Удаление ядра яйцеклетки

5. Дробление



Интересен метод пересадки ядер соматических клеток в яйцеклетки. Таким способом возможно *клонирование* животных, получение генетических копий от одного организма. В настоящее время получены клонированные лягушки, получены первые результаты клонирования млекопитающих.

В этой же лаборатории было получено еще пять клонированных ягнят, в геном одного из которых был встроен ген белка человека. Клеточная инженерия позволяет конструировать клетки нового типа с помощью мутационного процесса гибридизации и, более того, комбинировать отдельные фрагменты разных клеток, клетки различных видов относящиеся не только к разным родам, семействам, но и царствам. Это облегчает решение многих теоретических проблем и имеет практическое значение. Клеточная инженерия – широко используется в селекции растений. Выведены гибриды томата и картофеля, яблони и вишни. Регенерированные из таких клеток растения с измененной наследственностью позволяют синтезировать новые формы, сорта, обладающие полезными свойствами и устойчивые к неблагоприятным условиям и болезням. Этот метод и широко используется для «спасения» ценных сортов, пораженных вирусными болезнями. Из их ростков в культуре выделяют несколько верхушечных клеток, еще не пораженных вирусом, и добиваются регенерации из них здоровых растений, сначала в пробирке, а затем пересаживают в почву и размножают.

Кратко рассмотрим основные направления использования достижений клеточной инженерии.

1. В области селекции с переходом на клеточный уровень стало возможным вести клеточную и гаметную селекцию на устойчивость к биотическим и абиотическим стрессам, преодолевать барьеры нескрещиваемости и создавать принципиально новые формы, несущие различные наборы ядерных и цитоплазматических генов в результате соматической гибридизации, изменять уровень ploидности и ускорять селекционный процесс путем использования гаплоидов, сохранять генофонд в виде культуры клеток посредством криосохранения в жидком азоте. Следует также отметить, что технологии создания трансгенных растений, как правило, включают и культивирование клеток и тканей *in vitro*.

2. В области семеноводства создана индустрия производства оздоровленного от вирусов и других патогенов посадочного материала вегетативно размножаемых культур (картофель, плодовые, ягодные, овощные, декоративные растения)

3. В области защиты растений получены на основе достижений генной и клеточной инженерии растения, устойчивые к насекомым, вирусам, болезням, и другим патогенам; созданы новые средства защиты растений путем культивирования бактерий и грибов (антагонистов патогенов), биологически активных веществ, полученных при культивировании организмов и т.д.

4. Путем клеточной инженерии созданы новые штаммы микроорганизмов, повышающие усвоение азота и фосфора, подавляющие развитие вредной микрофлоры, что позволяет конструировать микробоценоз, достигая повышения плодородия почвы и продуктивности растения.

5. Принципиально новые возможности открываются в области защиты окружающей среды. Новые штаммы микроорганизмов позволяют решить экологически безопасным путем проблему утилизации отходов промышленности и сельского хозяйства, получая при этом энергию. Этот же подход позволяет уменьшить действие поллютантов (тяжелые металлы, нефтепродукты, пестициды и др.) на экосистемы и человека.

Создание на основе генной и клеточной инженерии растений с максимальным накоплением поллютантов позволит извлекать их из загрязненного субстрата (почва, вода), а растения с минимальным накоплением дадут возможность получать экологически безопасную продукцию.

6. Культивирование новых микроорганизмов и растений-суперпродуцентов биологически активных веществ позволит более эффективно решить проблему создания и производства новых лекарств и препаратов для медицины и ветеринарии. Важным направлением практического применения клеточной инженерии является микробиологический синтез белка и незаменимых аминокислот. Область применения достижений клеточной инженерии постоянно расширяется по мере пополнения методов культивирования клеток и тканей и различных манипуляций с ними и разработки этих подходов для новых видов растений, животных и микроорганизмов.

Слияние протопластов (парасексуальная гибридизация)

Изолированные протопласты, еще не образовавшие клеточной стенки, могут сливаться между собой. Слияние протопластов - своеобразный метод гибридизации, так называемая парасексуальная, или соматическая гибридизация. В отличие от обычной, где сливаются половые клетки (гаметы), в качестве родительских при парасексуальной гибридизации используются диплоидные клетки.

Парасексуальная гибридизация важна для анализа как ядерных генов, так и внеядерных геномов. Цитоплазматический геном кодирует ряд признаков - скорость фотосинтеза, устойчивость к патогенам, абиотическим факторам и т. д. Наличие косегрегация генов (признаки, контролируемые внеядерным геном, сегрегируют совместно) свидетельствует о физическом сцеплении генов.

Слияние бывает спонтанным (чаще у протопластов из молодых тканей или суспензионных культур) и индуцированным. Для стимуляции слияния протопластов предложен ряд методов, как физических, так и химических.

При физическом способе слияния протопластов, разработанном Г. Циммерманом с сотрудниками в 1981 году, протопласты помещают в камеру с неоднородным электрополем. На электродах образуются агрегаты из 2 - 3 протопластов, либо цепочки из 5 - 6 протопластов между электродами. Дополнительный единичный импульс постоянного тока приводит к образованию пор в сильно сжатых мембранах, происходит перетекание цитоплазмы, так как переменный ток удерживает протопласты вместе некоторое время, и протопласты в таких агрегатах сливаются. Затухающий ток приводит к возвращению сферической формы у слившихся протопластов. В основе слияния лежит различное действие постоянного и переменного электрического тока на плазмалемму. Постоянное электрическое поле сжимает мембраны, ведя к их локальному разрушению, а переменное электрополе вызывает латеральную диффузию белков мембраны, образуя свободные от гликопротеидов липидные области, где противоположные мембраны могут установить контакт.

Чаще для индукции слияния протопластов используют методику "ПЭГ - высокие значения рН - высокая концентрация Ca^{2+} ", которая дает до 50% слившихся протопластов (рН 9 - 11, концентрация Ca^{2+} 100 - 300 ммоль/л). В присутствии полиэтиленгликоля наблюдается сильная адгезия протопластов, после удаления полиэтиленгликоля и добавления кальция - их слияние. Предполагают, что рН и ионы кальция увеличивают текучесть мембран, что связано с их жидкостно-мозаичной структурой.

При слиянии различных протопластов, например, А и В, могут с равной вероятностью образовываться комбинации АА, ВВ и АВ. Желаемый продукт слияния - АВ, поэтому разрабатываются способы увеличения частоты слияния именно такого типа и избирательного выделения только продукта слияния АВ.

Один из таких методов заключается в следующем. Поверхность протопласта обычно несет отрицательный заряд. Путем обработки ее фосфолипидом, несущим положительный заряд, можно временно придать поверхности протопласта положительный заряд. Если теперь протопласты А, имеющие положительный заряд, смешать с необработанными протопластами В, несущими отрицательный заряд, то будут в основном образовываться комбинации АВ в результате притяжения разноименных зарядов.

Разработаны также методы маркирования протопластов того или иного вида с помощью разных флуоресцентных красителей. Если обработать протопласты одного вида флуоресцеинизотиоцианатом (FITC), а протопласты другого вида родаминизотиоцианатом (RITC), то можно, не изменяя активности клеток, пометить их желто-зеленой (FITC) или красной (RITC) флуоресценцией. Гибриды, образовавшиеся путем слияния разных типов клеток, будут иметь оба цвета флуоресценции - желто-зеленый и красный.

Судьба геномов (ядерного и цитоплазматического) после слияния протопластов может быть различной:

1. Ядерные генетические детерминанты наследуются как дву-, так и однородительно. В последнем случае ядра не сливаются и впоследствии сегрегируют в процессе клеточных делений.
2. Внеядерные генетические детерминанты наследуются двуродительно. При этом в межвидовых комбинациях прослеживается тенденция к соматическому выщеплению и элиминации одного из родительских цитоплазматических геномов.
3. Возникновение гибридных клеток и растений в результате слияния более чем двух родительских клеток.

Таким образом, слияние протопластов приводит либо к образованию гибрида, либо к образованию цибрида. Соматический гибрид - продукт слияния и цитоплазмы, и ядра обоих протопластов. Цибрид (цитоплазматический гибрид) - регенерант, содержащий цитоплазму обоих родителей и ядро одного из них. Цибриды получают, облучая перед слиянием один из протопластов γ -лучами для разрушения ядра. Скрининг таких клеток проводится по генам – маркерам ядерного и цитоплазматических (митохондриального и хлоропластного) геномов. Есть указания на рекомбинацию ДНК митохондрий и хлоропластов в гибридных клетках.

При слиянии могут образовываться и так называемые асимметричные гибриды – продукты слияния, имеющие полный хромосомный набор одного из партнеров и часть хромосом другого партнера. Такие гибриды часто возникают при слиянии клеток организмов, филогенетически удаленных друг от друга. В этом случае вследствие неправильных делений клетки, обусловленных некоординированным поведением двух разнородных наборов хромосом, в ряду поколений теряются частично или полностью хромосомы одного из родителей. Асимметричные гибриды бывают устойчивее, плодовитее и жизнеспособнее, чем симметричные, несущие полные наборы генов родительских клеток. В целях асимметричной гибридизации возможна избирательная обработка клеток одного из родителей для разрушения части его хромосом. Возможен прицельный перенос в клетку нужной хромосомы.

Гибриды могут быть получены путем слияния трех и более родительских клеток. Из таких гибридных клеток могут выращены растения – регенеранты.

Лишь недавно этот метод генетической рекомбинации был испытан и на бактериях: получали протопласты и затем индуцировали их слияние путем обработки полиэтиленгликолем. Из слившихся протопластов в определенных экспериментальных условиях регенерировали морфологически полноценные клетки, из которых получались стабильные рекомбинанты, обладавшие некоторыми признаками обоих родительских штаммов. Пока этот метод успешно применялся только в отношении грамположительных бактерий, таких как *Bacillus* и *Streptomyces*. Следует ожидать, что в будущем он найдет более широкое применение.

Спасибо за внимание