Применение генной инженерии в селекции пробиотических микроорганизмов

Общие понятия

- **ДНК** (дезоксирибонуклеиновая кислота) — молекула, обеспечивающая хранение генетической информации обо всех белках живого организма.

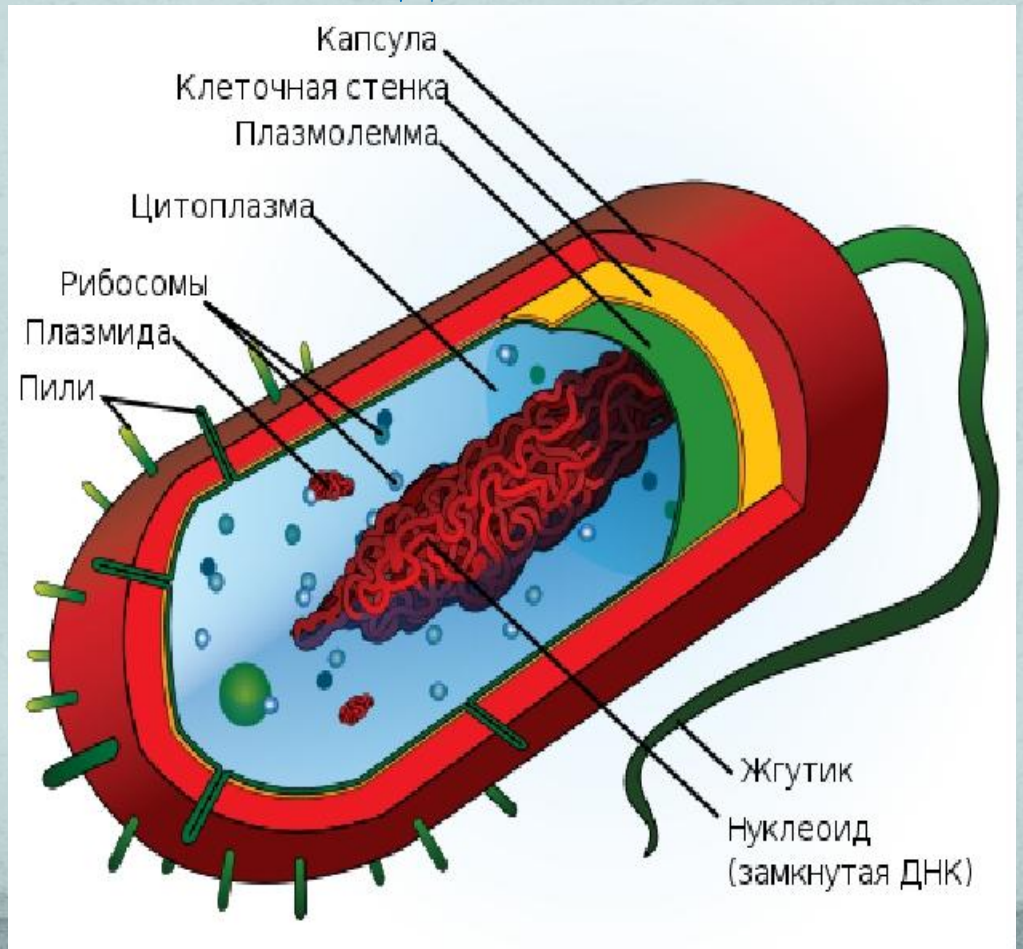
- **Ген** — участок ДНК, несущий какую-либо целостную информацию — о строении одной молекулы белка или одной молекулы РНК (рибонуклеиновой кислоты).

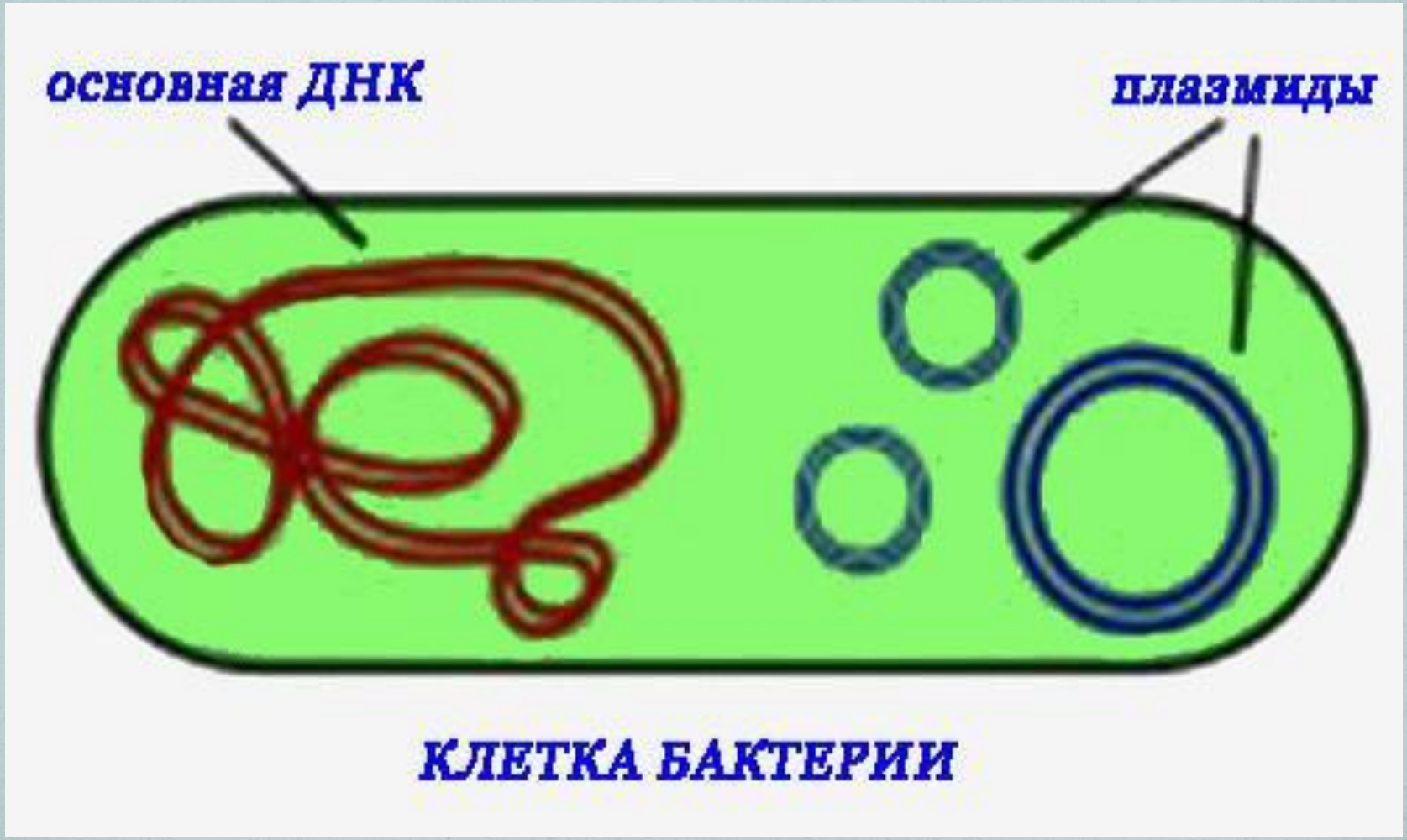
- **Генотип** — совокупность генов одного организма.

- **ГММ** — генетически модифицированные микроорганизмы — бактерии, дрожжи и мицелиальные грибы, генетический материал которых изменен с использованием методов генной инженерии.

- Сегодня появляются пробиотики нового поколения, имеющие в своей основе генетически модифицированные или, как их еще называют, рекомбинантные штаммы микроорганизмов, которым искусственно задаются определенные свойства.

- В основе всех достижений генетической инженерии лежит одна из особенностей строения генома бактерий – наличие у них небольших, отличных от хромосомы, кольцевых молекул ДНК, называемых плазмидами.




основная ДНК
плазмиды
КЛЕТКА БАКТЕРИИ

Плазмиды кодируют не основные для жизнедеятельности бактериальной клетки функции, но придающие бактерии преимущества при попадании в неблагоприятные условия существования.

Среди фенотипических признаков, сообщаемых бактериальной клетке плазмидами, можно выделить следующие:

- устойчивость к антибиотикам;
- продукцию факторов патогенности;
- способность к синтезу антибиотических веществ;
- образование колицинов;
- расщепление сложных органических веществ;

Основные этапы создания ГМО

- 1. Получение изолированного гена.
- 2. Введение гена в вектор для переноса в организм.
- 3. Перенос вектора с геном в модифицируемый организм.
- 4. Преобразование клеток организма.
- 5. Отбор генетически модифицированных организмов и устранение тех, которые не были успешно модифицированы.

Получение изолированного гена

- С помощью специальных ферментов – рестриктаз, плазмида, несущая какой-нибудь маркерный ген, например, ген устойчивости к определенному антибиотику, разрезается в строго определенном месте с образованием с каждой стороны нескольких (от одного до пяти) неспаренных оснований – «липких концов».

Введение гена в вектор для переноса в чужеродный организм

- Чтобы встроить ген в плазмидный вектор (небольшая молекула ДНК, способная акцептировать чужеродные фрагменты ДНК и реплицироваться в чужеродном организме), используют ферменты — рестриктазы и лигазы.

- С помощью рестриктаз ген и вектор можно разрезать на кусочки. С помощью лигаз такие кусочки можно «склеивать», соединять в иной комбинации, конструируя новый ген или заключая его в плазмидный вектор.

Перенос вектора с геном в модифицируемый организм

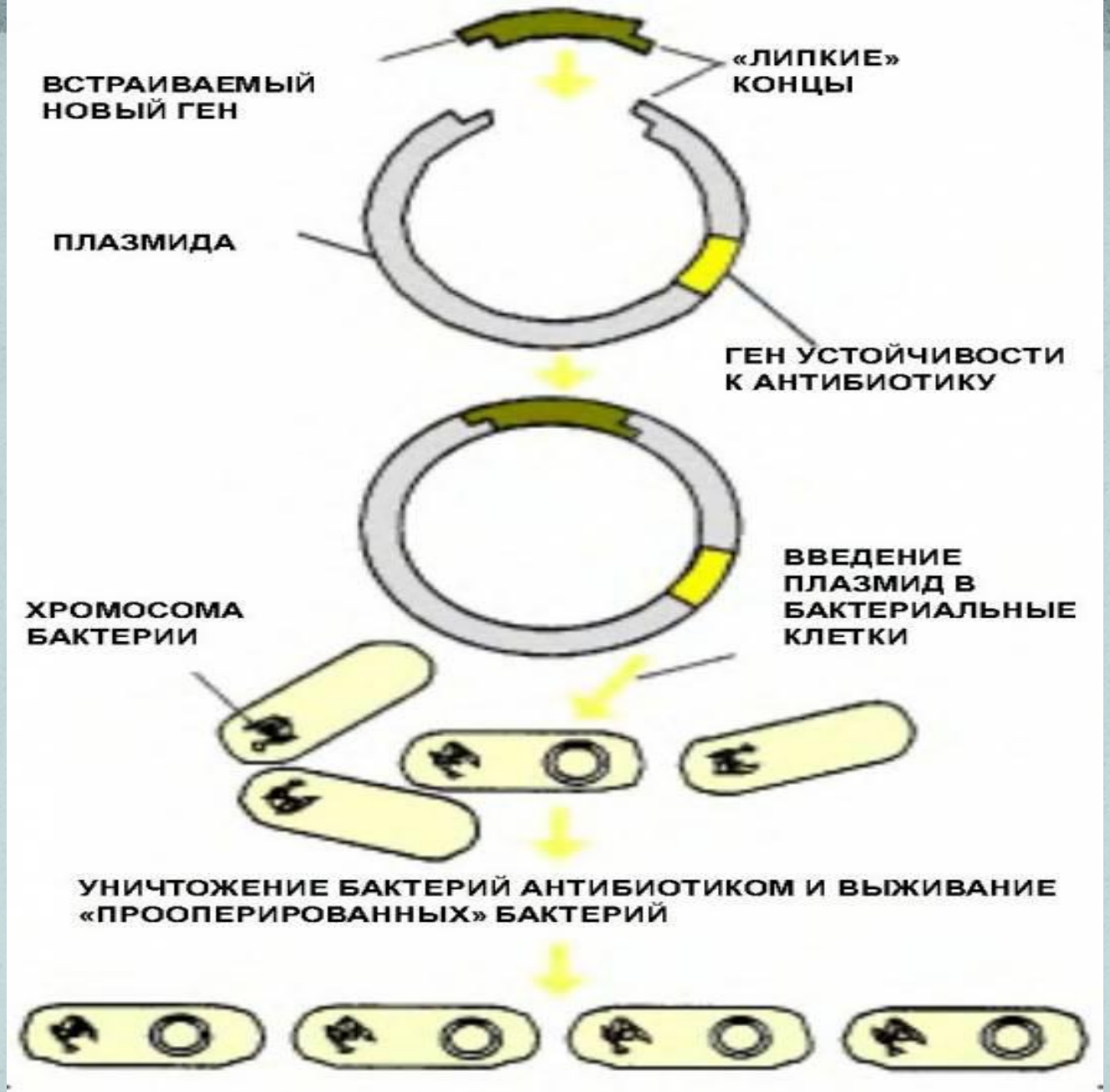
- Такой процесс – включение чужеродной ДНК в бактериальную клетку носит название трансформации, а молекула ДНК – вектор. Это явление иногда встречается в природе, что говорит о том, что трансформация – это естественный биологический процесс.

Преобразование клеток организма

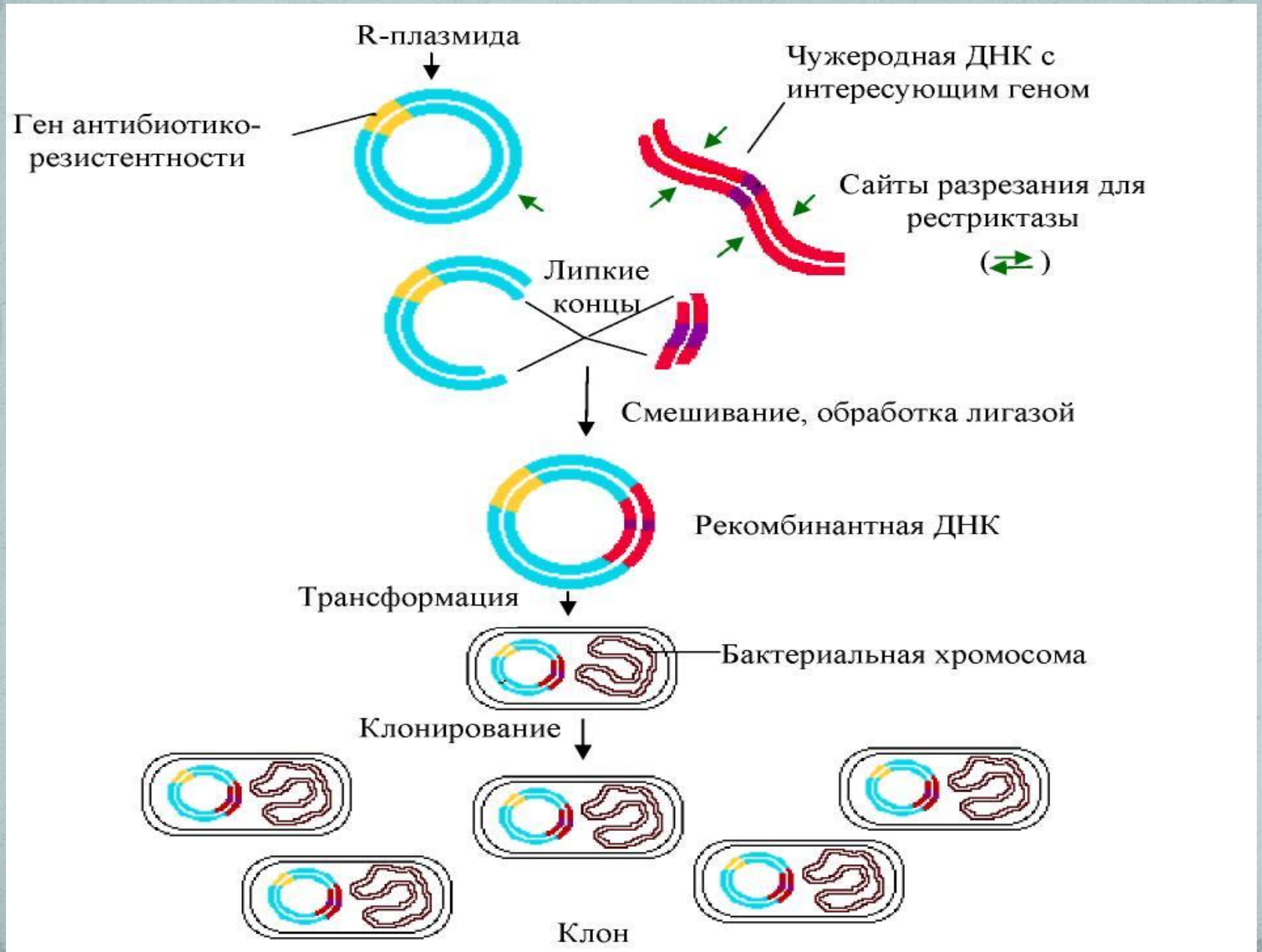
- Модифицированную плазмиду вводят в клетки микроорганизма, дают им размножиться и выделяют из культуры бактерий точные копии нужной плазмиды. Теперь можно заражать ими клетки других микроорганизмов.

Отбор генетически модифицированных организмов

- На селективной среде ведут отбор трансформированных бактериальных клеток, несущих какой-либо селективный маркер, который должен был появиться в процессе образования рекомбинатного микроорганизма. Если, например, вектор содержал ген устойчивости к антибиотику ампициллину, то в селективную среду добавляют этот антибиотик и все выжившие клетки будут содержать данный вектор.



«Вклеивание» нужного гена в клетки агробактерии.


R-плазмида
Ген антибиотико-
резистентности
Чужеродная ДНК с
интересующим геном
Сайты разрезания для
рестриктазы
Липкие
концы
Смешивание, обработка лигазой
Рекомбинантная ДНК
Трансформация
Бактериальная хромосома
Клонирование
Клон

Перечень ГММ и пищевых продуктов на основе ГММ, имеющих официальное разрешение на применение в пищевой промышленности Российской Федерации*

№№	Название ГММ или продукта с ГММ	Область применения
1	Чистая культура спиртовых дрожжей Saccharomyces cerevisiae Y-1986 с геном альфа-амилазы из B. licheniformis	Производство этилового спирта, сбраживание крахмалистого сырья
2	Ферментный препарат из B. licheniformis с генами B. stearothermophilus, кодирующими альфа-амилазу	Производство этилового спирта
3	Ферментный препарат из Aspergillus niger с генами Aspergillus niger, кодирующими глюкоамилазу	Производство этилового спирта
4	Ферментный препарат из B. licheniformis с геном альфа-амилазы из B. stearothermophilus	Крахмалопаточная промышленность
5	Ферментный препарат из B. licheniformis с геном термостабильной альфа-амилазы из B. licheniformis	Крахмалопаточная промышленность

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 33491— 2015

ПРОДУКТЫ КИСЛОМОЛОЧНЫЕ, ОБОГАЩЕННЫЕ БИФИДОБАКТЕРИЯМИ БИФИДУМ

Технические условия

Пробиотические штаммы бифидобактерий *Bifidobacterium bifidum* должны отвечать следующим требованиям:

- должны быть задепонироеаны в национальной или международной коллекции промышленных микроорганизмов;
- не являться генетически модифицированными организмами (ГМО);
- штаммы должны быть клинически апробированы на взрослых;

- Большой интерес для медицинской практики представляют данные использования генетически модифицированных микроорганизмов, перспективных для получения препаратов-пробиотиков, обладающих максимальным спектром заданных полезных свойств.

- К таким свойствам относится продуцирование бактериями антибиотикоподобных и различных целевых протеинов иммунокомпетентных клеток человека, гены в которых клонированы на различных векторах и переданы в определенный штамм-носитель.

- Насчитываются десятки рекомбинантных штаммов микроорганизмов, несущих гены, ответственные за синтез интерферонов, различных типов интерлейкинов, факторов некроза опухолей.

- Преимуществом лечебно-профилактических препаратов, создаваемых на основе ГММ, является простота изготовления, не требующая дорогостоящей очистки лекарственной субстанции и получения биомассы, с последующей ее сублимацией, что в свою очередь обеспечивает простоту хранения.

- Пероральный прием является наиболее простым и безопасным способом введения таких препаратов.

- Однако широкое внедрение в медицинскую практику генно-модифицированных штаммов микроорганизмов ограничено возможным непредсказуемым влиянием их на организм хозяина (человека или животного), а также на экосистемы.

- Активно обсуждается возможность неконтроли-руемого переноса рекомбинантных ДНК новым

- К микроорганизмам, активно исследуемым на предмет возможности создания рекомбинантных пробиотиков, относятся бактерии родов *Lactobacillus, Lactococcus, Bifidobacterium, Bacillus, Escherichia* и многие другие.

- Бактерии рода *Bacillus* являются одними из наиболее перспективных для создания рекомбинантных пробиотиков благодаря их высокой антагонистической активности и удобству клонирования в них чужеродных генов.

- Кроме того, бактерии рода *Bacillus* не образуют биопленок на слизистых оболочках организма хозяина, вследствие чего лишены способности

- Количество рекомбинантных представителей рода *Bacillus* в ЖКТ, а также длительность их нахождения в нем регулируются специально отработанными дозами и курсами применения пробиотиков.

- Российскими и украинскими учеными создан рекомбинантный штамм *Bacillus subtilis* 2335/105. Введенная в клетку *B. subtilis* плазмидная ДНК содержит ген интерферона человека, а также гены устойчивости к канамицину.

- Важнейшей характеристикой рекомбинантных штаммов микроорганизмов — основы пробиотиков — является стабильность введенной плазмидной ДНК

- Экспериментально доказано, что плазмида, использованная для получения ГММ стабильно сохраняется даже после многоразовых пересевов *Bacillus subtilis*.

- Изучение биологических свойств рекомбинантного штамма *B. subtilis* 2335/105 подтвердило синтез интерферона человека, а также высокую антагонистическую активность в отношении патогенных и условно патогенных микроорганизмов.

- При использовании оральных лекарственных форм интерферона необходимо защищать лекарственную субстанцию от деградирующего влияния протеолитического содержимого секретов слизистой желудочно-кишечного тракта, при этом используют таблетированные, инкапсулированные формы.

- Альтернативным способом доставки интерферона к поверхности слизистой являются препараты на основе живых рекомбинантных бактерий, продуцирующих интерферон. Иммунологическая активность *B. Subtilis* была показана в исследованиях на добровольцах.

- Изучение возможности горизонтальной передачи плазмидной ДНК *B. subtilis* 2335/105 *in vitro* и *in vivo* свидетельствовало о невозможности передачи плазмидной ДНК от *B. subtilis* 2335/105 другим микроорганизмам — как представителям нормальной микрофлоры, так и патогенам.

- Проведена также оценка экологической безопасности *B. subtilis* 2335/105, показавшая, что в случае попадания в окружающую среду штамм не способен к длительному и бесконтрольному росту и, следовательно, к конкуренции с аборигенной микрофлорой.

- Из вышеизложенного следует, что генетически модифицированные бактерии *B. Subtilis* при пероральном применении синтезируют интерферон, проявляющий иммуностимулирующее, антивирусное и противоопухолевое действие.

- Российскими учеными создан штамм *B. Subtilis* pBColE2, способный продуцировать колицин , который проникает через клеточные мембраны патогенных для человека микроорганизмов родов *Escherichia, Pseudomonas, Salmonella, Haemophilus, Streptococcus,* вызывая деградацию бактериальной ДНК.

- Сконструированный штамм *B. subtilis* pBColE2 можно использовать для создания пробиотиков с антибактериальными и антиоксидантными свойствами.

- Российскими учеными создан рекомбинантный штамм *B. licheniformis* 2336/105 с помощью трансформации клеток исходного штамма *B. licheniformis* 2336 специальной плазмидой. Сконструированный штамм способен продуцировать интерферон человека и характеризуется антагонистической активностью относительно патогенной и условно патогенной микрофлоры. Экспериментально подтверждена стабильность введенной плазмиды и безопасность рекомбинантного штамма

- Бактерии рода *Escherichia* способствуют гидролизу лактозы, участвуют в расщеплении протеинов и углеводов, метаболизме холестерола, жирных и желчных кислот, синтезируют витамины группы В, биотин, витамин К, никотиновую и пантотеновую кислоты, а также колицины (*вещества белковой природы обладающие свойст-вом убивать микроорганизмы того же рода).*

- Создан рекомбинантный штамм *E. coli* M17/pColap, способный синтезировать колицин Е1, отвечающий за его повышенную антагонистическую активность и устойчивость к ампициллину.

- Зарубежными исследователями создан рекомбинантный штамм *E. coli* CWG308:pLNT, в который введена плазмида с генами гликозилтрансферазы. Данный штамм способен синтезировать липополисахариды, которые могут связываться с энтеротоксинами *E. Coli* и *Vibrio cholerae*.

- Таким образом, штамм *E.coli* CWG308:pLNT является перспективным для создания рекомбинантных токсинсвязывающих пробиотиков, эффективных при лечении и для профилактики диареи, вызванной энтеротоксигенной *E. coli* и *Vibrio cholerae*.

- Молочнокислые бактерии, в том числе и представители родов *Lactobacillus, Bifidobacterium, Lactococcus, Streptococcus,* благодаря своей безопасности для человека и широкой распространенности как в пищевой, так и в фармацевтической промышленности, давно привлекают внимание специалистов генной инженерии.

- Однако использованию молочнокислых бактерий

в качестве объектов для клонирования препятствует слабая по сравнению с другими классическими объектами (*Bacillus subtilis, Escherichia coli, Saccharomyces cerevisiae*) изученность их генетики и подходящих векторов

- Сама процедура трансформации до недавнего времени была трудоемкой и малоэффективной.

  Применение электропорации во многом способствовало развитию генной инженерии лактобактерий и лактококков, а соответственно, усовершенствованию методов клонирования.

- **Электропорация** основана на том, что импульсы высокого напряжения обратимо увеличивают проницаемость биомембран.

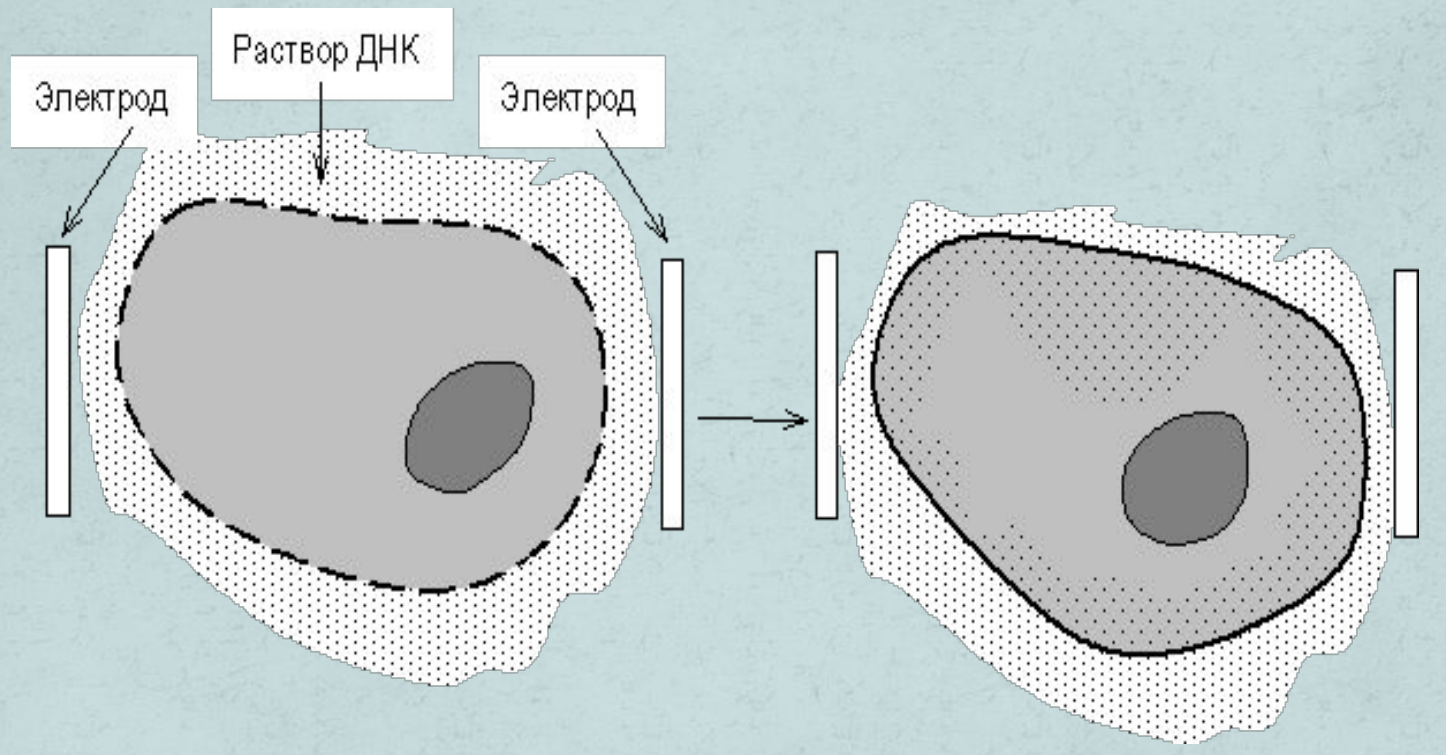


Схема электропорации

- В Японии фирмой Snow Brand Milk Products на основе двух штаммов бифидобактерий — одного, выделенного из тканей человека и активно снижающего уровень холестерола в крови, и другого — из тканей животных, устойчивого к кислороду и кислотам, создан новый штамм бифидобактерий, который фирма планирует использовать для профилактики и лечения атеросклероза и связанных с ним заболеваний сердечно-сосудистой системы.

- В современной клинической практике основными методами коррекции повышенного уровня холестерола в сыворотке крови (гиперхолестеринемии,) являются препараты, угнетающие абсорбцию холестерола и стиролов в кишечнике. К сожалению, все гипохолесте-ринемические лекарственные препараты (снижающие уровень сывороточного холесте-рола) дорогостоящие и обладают рядом побочных эффектов, прежде всего гепато-токсичностью, а также вызывают расстройства пищеварительной и дыхательной, центральной и периферической нервной систем, увеличение массы тела и др.

- Во многих экспериментальных исследованиях показано, что молочнокислые бактерии способны снижать уровень холестерола сыворотки.

- Экспериментально показана высокая холестеразная активность, т. е. способность снижать уровень сывороточного холестерола, высокопробиотических штаммов бактерий родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* в опытах *in vitro* (в культуральной среде) и *in vivo* (на модели экспериментальной гиперхолестеролемии у мышей).

- Изучение холестеразной активности молочнокислых бактерий позволило разместить их по проявлению гипохолестеролемического действия в следующий ряд: *Lactobacillus casei* > *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* > *Lactobacillus acidophilus* > *Bifidobacterium longum* > *Bifidobacterium bifidum*.

- Также экспериментально было доказано, что различные штаммы лакто- и бифидобактерий способны усиливать свои полезные свойства при их комбинации друг с другом в различных соотношениях.

- Проводятся исследования по увеличению холе-стеразной активности молочнокислых бактерий методами генной инженерии.

- Пробиотики, содержащие холестеролассимили-рующие штаммы молочнокислых бактерий, могут рационально дополнить комплексную терапию больных сердечно-сосудистыми, онкологически-ми и другими заболеваниями.

- Бактерии рода *Lactococcus* не являются типичными представителями микроорганизмов ЖКТ человека, тем не менее пробиотики на их основе толерантны к действию желчи и способны угнетать развитие болезнетворных энтерококков.

- Некоторые виды лактококков способны выживать в желудке, но не образуют колонии. Они лизируются в двенадцатиперстной кишке, освобождая при этом большое количество энзимов (*белковые молекулы, катализирующие химические реакции в живых системах*) .

- Лактококки продуцируют ряд бактериоцинов, угнетающих рост патогенных и условно патогенных микроорганизмов возбудителей острых кишечных инфекций.
- Низин, один из бактериоцинов лактококков, эффективен против граммпозитивных бактерий, в том числе рода *Clostridium*, диплококцин — против золотистого стафилококка, а также известны лактострепцин, лактококцин и др. Доказано, что лактококки способны угнетать размножение таких микроорганизмов, как *Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Clostridium perfringens, Salmonella typhimurium, E. Coli* и *Clostridium dificile*.

- Все это свидетельствует об актуальности создания рекомбинантных лактококков с улучшенными биологическими свойствами. Сегодня известен ряд пробиотиков, в состав которых входят лактококки: Апибакт, Пролакт, Пролам, Симбилакт, Симбиотик, Симбитер и другие.

- Нидерландские исследователи, используя методы генной инженерии, создали рекомбинантный штамм *Lactococcus lactis* MG 1363. В экспери-ментах *in vitro* и *in vivo* доказана высокая эффективность пробиотика на основе *L. lactis* MG 1363 при лечении болезни Крона (тяжелое хроническое воспалительное заболевание кишечника) и язвенного колита.

- Ученые США создали рекомбинантный штамм кишечной палочки, «запрограммированный» на синтез глюкагоноподобного пептида. В организме здорового человека этот белок синтезируется клетками кишечника и, среди прочих эффектов, запускает продукцию инсулина в поджелудочной железе.

- Авторы продемонстрировали, что в лабораторных условиях в присутствии глюкозы секретирующие данный белок бактерии запускают синтез инсулина в культуре клеток кишечника человека.

- Введение новых бактерий в диету мышей с искусственно вызванным диабетом за 80 дней снизило уровень глюкозы в крови животных до нормального, в то время как у животных контрольной группы, не употреблявших бактерий, этот показатель оставался повышенным.

- Бактерии синтезируют определенное количество белка, соответствующее ситуации в организме хозяина, что минимизирует необходимость самостоятельного мониторинга состояния организма.

- Исследования продолжаются.

ВЫВОД

Актуальны исследования по созданию рекомбинантных штаммов микроорганизмов с различным спектром биологических свойств.