

ОСОБАЯ РОЛЬ ВИРУСОВ В ЖИВОЙ ПРИРОДЕ. ВИРУСЫ, КАК ИНСТРУМЕНТ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Владимир Подольный

1. Что такое вирусы

Мне в руки попал журнал, на обложке которого были изображены бактериофаги, атакующие бактерию. Бактериофаг - это вирус, поражающий бактерии. На обложке журнала заглавие: Вирусы как лекарство. Такое название необычно. Ведь вирусы, как и бактерии, хорошо известные возбудители различных инфекционных заболеваний. Об их противоположном действии известно очень мало. Я немного расскажу об этом. Но прежде всего надо познакомиться с тем, что же такое вирусы.



Рис. 1. Обложка журнала. Бактериофаги атакуют бактерию

в кишечной палочке, которая сама по себе – один из классических объектов для исследования бактерий.



Рис.2. Лист табака, пораженный табачной мозаикой

Это позволило предположить, что в водном фильтрате находится либо яд, либо некие

Вирусы – самые маленькие и просто устроенные живые существа, идеально приспособленные к паразитированию. Они могут жить только в живых организмах: в бактериях, растениях, животных и человеке. Кроме того, они важный инструмент в исследованиях всех других разделов биологии.

По своему поведению вирусы можно сравнить с кукушкой, которая откладывает свои яйца в гнёзда певчих птиц, тем самым эксплуатируя их родительский инстинкт и заставляя выкармливать свое потомство. Так и вирусы, захватывают главный центр управления клетки – её наследственный аппарат - и заставляют его работать на себя. После захвата клетка больше не принадлежит себе. Все её органеллы (органы клетки) заняты только одним: производством и сборкой элементов захватчика. Основным, эталонным, объектом исследований стала группа вирусов, которая была названа «Бактериофаги», т.е. «пожиратели бактерий». Они живут, например,

Впервые о существовании вирусов предположил Дмитрий Иванович Ивановский в 1892 году. Он исследовал причины заболевания табака – «Табачную мозаику», при которой листья покрываются белыми пятнами и становятся непригодными для производства табака. Более того, даже вытяжка из больных растений, профильтрованная через фильтры, задерживающие бактерии, сохраняла способность заражать здоровые растения.

сверхмалые существа. Позднее, это предположение подтвердилось, когда в 1939 году появились первые электронные микрофотографии вируса табачной мозаики.

Электронная микроскопия позволила понять, почему вирусы такие маленькие. В отличие от клеток других организмов, даже таких простых как бактерии, в вирусах нет многих органелл, которые нужны для жизнедеятельности. На рисунке 3 представлена схема строения бактерии. На ней показаны органеллы, необходимые для жизнедеятельности любой бактериальной клетки.

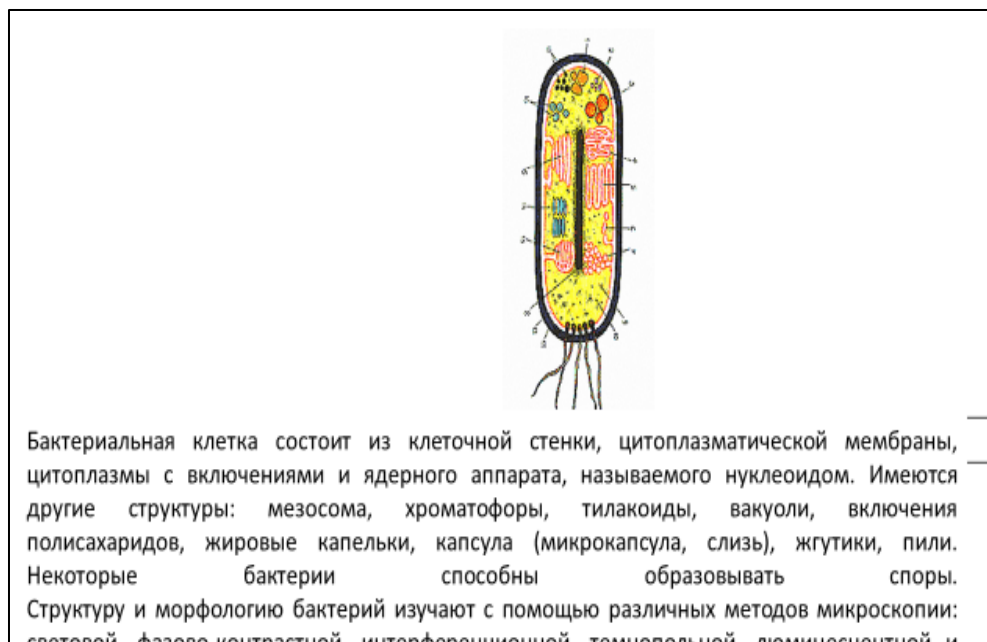


Рис. 3. Схема внутреннего устройства бактерии

Напротив, в бактериофаге, даже при сильном увеличении электронного микроскопа, мы не видим органелл, обычных для бактерий (рис. 4). Внутри находится только свёрнутая

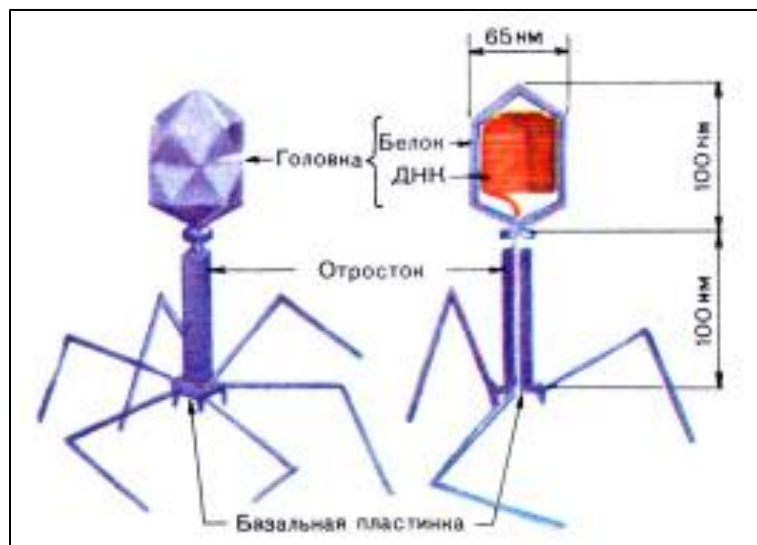


Рис.4. Схема устройства бактериофага

спираль ДНК. Есть ещё некоторые ферменты, необходимые для встраивания вирусной ДНК в ДНК бактерии или клетки хозяина, а так же оболочки, покрывающие вирус. Других органелл вирусу не надо. Он - «суперпаразит», в его распоряжении находятся все органеллы клетки хозяина. Если мы посмотрим на размеры, то вирусы - настоящие нано-организмы. Так у бактериофага основное тело составляет 100 нанометров, а ширина 65 нм.

Вирусы живут практически во всех организмах. В ряде случаев вирусная инфекция, особенно в детском возрасте, помогает выработать иммунитет к инфекции. Так, инфекции дыхательной и пищеварительной систем часто встречаются у здоровых младенцев и проходят бессимптомно благодаря антителам матери. Человек, кстати, нормальное убежище для многих вирусов. Было обнаружено большое разнообразие

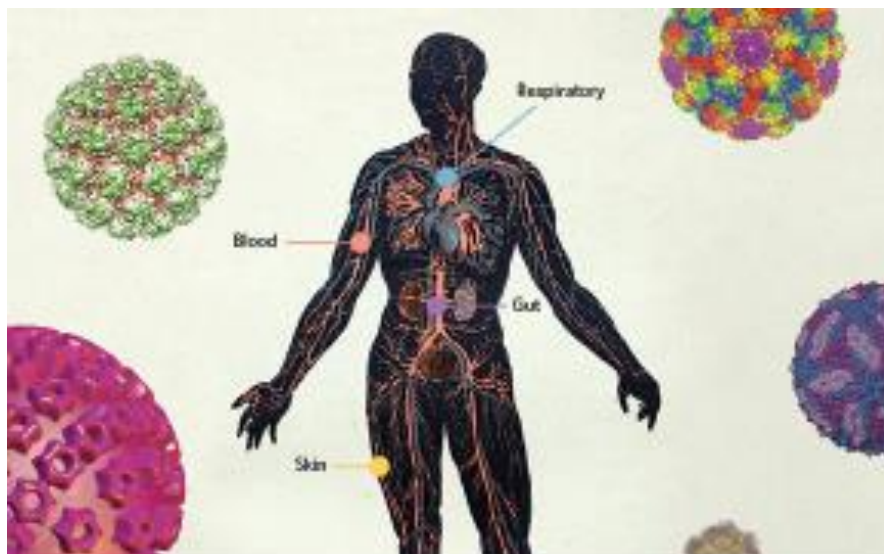


Рис. 5. Вирусы человека

размеру (рис. 6.). Это и палочки, и кубики, и многогранники, и шары. Они могут быть очень маленькими, как например, полиомавирус, или довольно большими, как вирус коровьей оспы или свинки.

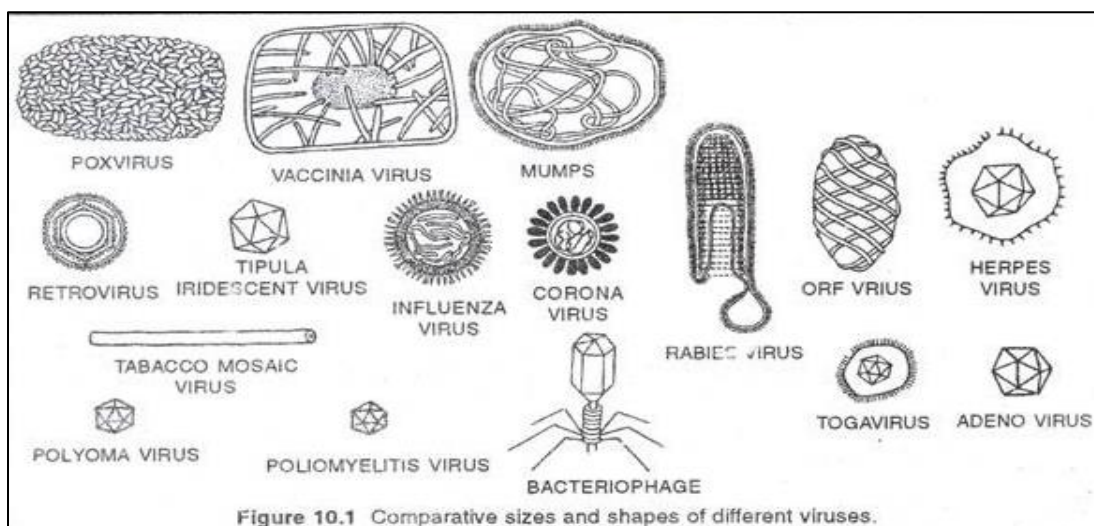


Рис.6. Разнообразие вирусов по внешнему виду и размеру

Много вирусов находится в морях и океанах, естественно, паразитируя на их обитателях. Там их жизнедеятельность может быть даже полезной: размножаясь в водорослях и морских бактериях, они разрывают их оболочки и органика, накопленная там в процессе фотосинтеза, становится доступной другим жителям океанов. Таким образом, вирусы ускоряют обмен питательных веществ в океанах и увеличивают продуктивность океанов. Они важный и необходимый элемент любой экосистемы. Ниже мы расскажем об участии вирусов и в других жизненно важных процессах, а пока сделаем вывод из сказанного.

Итак: Вирусы - самые маленькие и самые вездесущие паразиты на земном шаре. Тем не менее, они играют важную роль в жизни на земле.

2. Индивидуальная, «личная жизнь» вирусов

Если вы помните, в нашей прежней «доамериканской» жизни мы смотрели милый мультипликационный фильм «Сотворение мира» с рисунками Жана Эффеля. Там были

такие слова: Есть у природы свой закон – плодиться, размножаться. В этих словах кратко описана цель «личной жизни» каждого живого существа. Вирусы – не исключение.

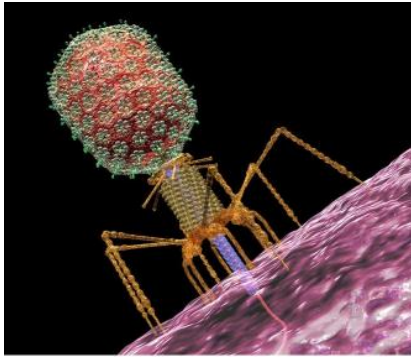


Рис. 7. Вирус вводит свою ДНК в клетку

Сначала вирус должен найти на поверхности клетки специальные участки, где он может впрыснуть свою ДНК в клетку хозяина (Рис.7). На поверхности клетки есть рецепторы, специфичные для данного вируса. ДНК вводится в клетку в линейном, распрямлённом виде. В дальнейшем возможны два сценария (Рис.8). Первый сценарий - вирусная ДНК встраивается в циркулярную хромосому бактерии-хозяина (на рисунке стрелка налево), становясь частью её. Или, второй сценарий (стрелка направо) - не встраивается в хозяйскую хромосому и остается обособленной. Первый сценарий: после ряда делений инфицированных бактерий, вирусная ДНК может выделиться обратно из хромосомы бактерии и, используя генетический аппарат хозяина, синтезировать множество копий своих ДНК и, отдельно,

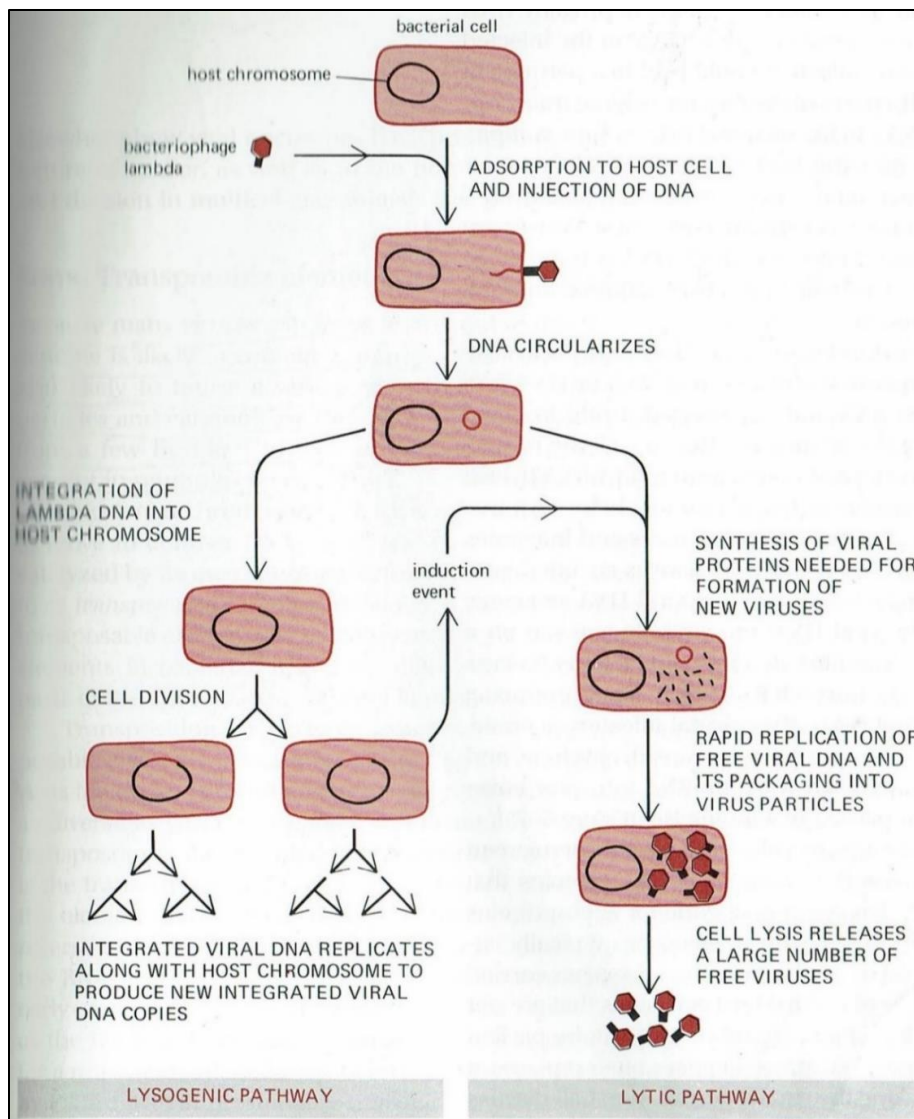


Рис.8. Разные типы поведения вирусов, на примере бактериофага Лямбда, в инфицированной клетке кишечной палочки

бактериальной хромосомы и оставлять там свои. Тоже происходит при заражении клеток растений, животных и человека. Это ещё один бесполой способ передачи генетической

белковые оболочки вирусов, потом происходит их упаковка в зрелые вирусы. Оболочка хозяина разрывается, вирусы выходят на свободу и могут заражать новые бактерии. То же происходит и при втором сценарии, когда вирус не встраивается в бактериальную хромосому, но также размножается, делая множественные копии своей ДНК и оболочки, используя генетический аппарат хозяина. Кстати, время от входа вируса в клетку и до выхода из неё занимает примерно один час.

Интересно, что встраиваясь в бактериальную хромосому и выходя из неё, вирус может захватывать какие-то участки

информации, вдобавок к хорошо известной передаче от родителей к детям. Такая способность вирусов, быть переносчиком генетической информации, используется в молекулярной биологии, когда надо перенести какой-то участок ДНК из одной бактерии в другую, или даже из клетки более сложного организма в другой организм. Исследователи работают над тем, как использовать такую «вирусную терапию», чтобы заменить нарушенный ген на здоровый. В распоряжении исследователей есть специальные вирусы, которые могут это делать, но остаётся очень трудная задача выделения только нужного гена из одной клетки и его доставки в нужное место в другой клетке.

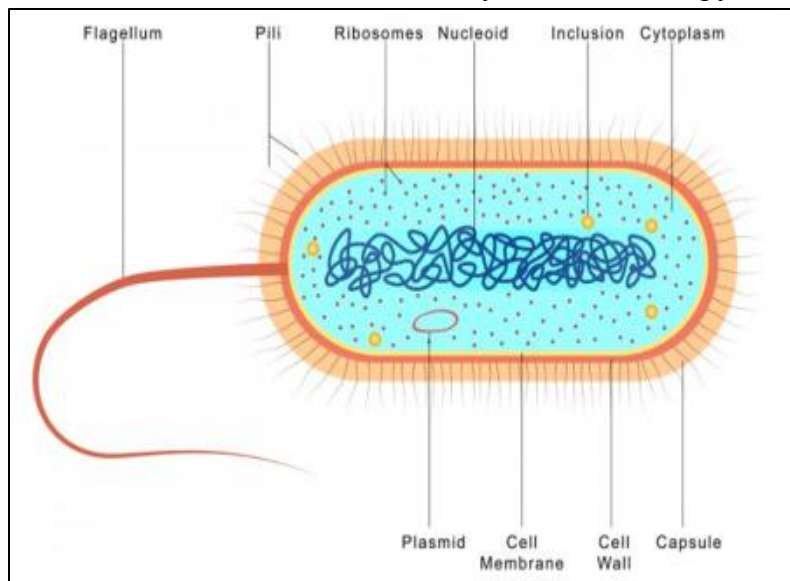


Рис.9. Плазмида (plasmid) в бактериальной клетке

Но есть и ещё один вариант, когда вирус не выходит из клетки и остаётся в ней жить, как одна из постоянных органелл бактериальной клетки. Он становится плазмидой (plasmid на рис.9).

Плазмида часто становится защитницей бактерии, необходимой для её выживания. В ней могут находиться важные дополнительные гены. Например, гены устойчивости к антибиотикам. Дело в том, что в микромире идёт постоянная война.

Микроорганизмы продуцируют антибиотики для защиты от захватчиков, а вирусы и плазмиды находят способы их нейтрализации, и так далее без конца. Идёт постоянное взаимное приспособление. Такая же война идёт и между патогенными для человека микроорганизмами и медиками. Поэтому исследователи постоянно ищут всё новые и новые продуценты антибиотиков. Правда, окончательной победы здесь вряд ли можно достигнуть. Когда мы не долечиваемся и прерываем приём антибиотиков до полного истребления патогена, мы помогаем появлению и выживанию его устойчивых форм. Их популяция увеличивается и для борьбы с ними надо искать новые антибиотики.

В плазмидах также могут быть гены, обуславливающие патогенность бактерий, и таким образом, способствующих распространению инфекции. Так холерный токсин продуцирует не бактерия холерного вибриона, а находящаяся в нём плазмида.

Итак, «личная жизнь» вирусов коротка. Она длится примерно один час, от входа в клетку и до выхода из неё. Тем не менее, она разнообразна: есть несколько стратегий её прохождения. Вирусы могут быть переносчиками генетической информации.

3. Приручение вирусов.

В ряде случаев вирусы выступают в роли не врагов, а помощников в борьбе с инфекцией. Так, в Индии реку Ганг называют «Святой Ганг» потому что её воды не только главный источник холеры в мире, но также, могут вылечить от неё (рис. 10). В 1896 году британский бактериолог Эрнст Ханкин тестировал воды Ганга и его притоков и обнаружил у них способность уничтожать специфических патогенов. Позднее, в 1917 году, британец Творт и канадец д'Ерелл впервые опубликовали работу о вирусах, убивающих бактерии, положив начало термину «бактериофаг». Ещё через 2 года в 1919 году д'Ерелл выделил из фекалий больных, переболевших дизентерией, фаг и успешно использовал его для лечения



Рис. 10. Некоторые факты из истории борьбы с вирусной инфекцией

детей, больных дизентерией. В 1928 году был открыт пенициллин и фаговая терапия на многие годы была забыта. Однако, с появлением патогенных бактерий, устойчивых к нескольким антибиотикам, наступило время возврата к фаговой терапии.

Вернёмся к плазмидам. Благодаря своим особым свойствам, взятым от вирусов, они стали одним из важнейших инструментов в переносе генетической информации.

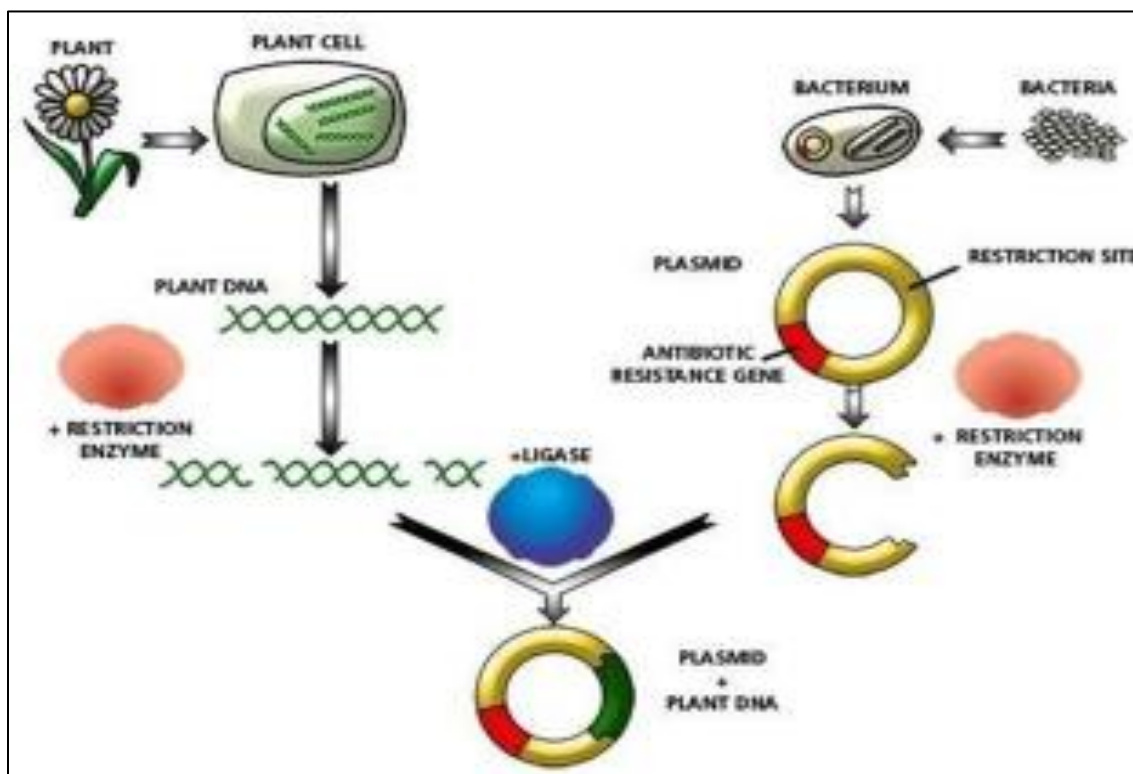


Рис. 11. Пример использования плазмид в генной инженерии

Фармацевтические компании производят и продают плазмиды с разными характеристиками, так что можно выбрать то, что подходит исследователям. Посмотрим на примерную схему использования плазмид (рис. 11).

Из бактерий выделяют находящиеся в них плазмиды (показано на рис. справа). Также из растений выделяют ДНК, содержащую интересующий нас ген (показано на рис. слева). И плазмиду и растительную ДНК разрезают специальным ферментом – рестриктазой. Края разрезов в обоих случаях должны совпадать (рис.12). Так что вырезанный из растительной ДНК участок может быть вставлен в разрез плазмиды. Их концы должны совпадать как, например, концы у вырезанных столяром деталей. Другие специальные ферменты сшивают разрезы и получается плазида, несущая ген растения (plasmid + plant DNA). В дальнейшем плазмиду внедряют в бактерию, чтобы размножить её вместе с бактерией и получить достаточное количество генетического материала.

На рис.12 показано, как рестриктаза разрезает двух-цепочечную ДНК. Участок ДНК, который должна обнаружить рестриктаза, должен обладать особым типом симметрии. Он представляет собой «полииндром». У полииндрома верхняя цепочка ДНК, если читать её слева направо, симметрична нижней цепочке, если читать её справа налево. Разрез идёт по определенным местам, специфическим для каждой рестриктазы. После того как ДНК разрезана получают концы, легко соединяющиеся обратно. Если между этими концами попадёт другой участок ДНК, с такими же концами, то он вставится в разрез.

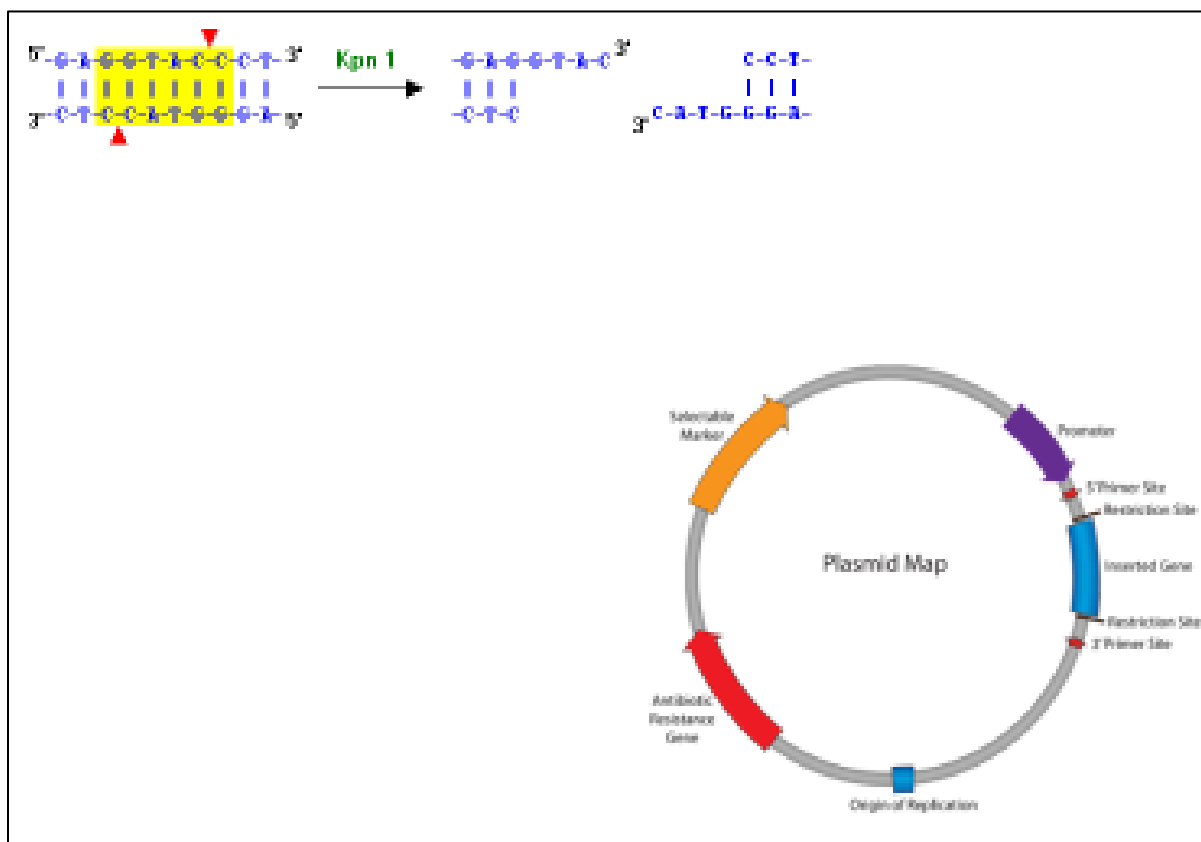


Рис. 12. Двух-цепочечная ДНК, разрезанная рестриктазой Kpn1, и плазида

Фармацевтические компании производят самые разнообразные рестриктазы. И исследователи работающие в области геной инженерии имеют богатый выбор этих молекулярных инструментов. Покажу два из них из каталога одной из фармацевтических компаний (рис.13).

HindIII		      
#R0104S	10,000 units\$53	Source: An <i>E. coli</i> strain that carries the cloned HindIII gene from <i>Haemophilus influenzae</i> Rd (ATCC 51907)
#R0104L	50,000 units\$212	
for high (5X) concentration		Reaction Conditions: NEBuffer 2 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM dithiothreitol (pH 7.9 @ 25°C). Incubate at 37°C.
#R0104T	10,000 units\$53	
#R0104M	50,000 units\$212	Ligation and Recutting: After 200-fold overdigestion with HindIII, > 95% of the DNA fragments can be ligated and recut.
5'...A [▼] AGCTT...3' 3'...TTCGA [▲] A...5'		Concentration: 20,000 and 100,000 units/ml. Assayed on λ DNA.
		Time-Saver: Digests λ DNA in 5 minutes.
		Storage Conditions: 250 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 500 µg/ml BSA and 50% glycerol. Store at -20°C.
		Diluent Compatibility: Diluent B, see p. 297.
		Heat Inactivation: 65°C for 20 minutes.
HinfI		now NEBuffer 4       
#R0155S	5,000 units\$53	Source: An <i>E. coli</i> strain that carries the cloned HinfI gene from <i>Haemophilus influenzae</i> Rf (ATCC 49824)
#R0155L	25,000 units\$212	
for high (5X) concentration		Reaction Conditions: NEBuffer 4 50 mM potassium acetate, 20 mM Tris-acetate, 10 mM magnesium acetate, 1 mM dithiothreitol (pH 7.9 @ 25°C). Incubate at 37°C.
#R0155T	5,000 units\$53	
#R0155M	25,000 units\$212	Ligation and Recutting: After 100-fold overdigestion with HinfI, > 95% of the DNA fragments can be ligated and recut.
5'...G [▼] ANTC...3' 3'...CTNAG [▲] ...5'		Concentration: 10,000 and 50,000 units/ml. Assayed on λ DNA.

Рис.13. Рестриктазы Hind3 и Hinf1 разрезают двух-цепочечную ДНК

Это Hind3 и Hinf1. На рисунке показан биологический источник фермента и условия для его успешной работы: состав буфера и др. параметры. Hind3 разрезает между буквами AA, Hinf1 разрезает между буквами GA.

Плазмида вводится в кишечную палочку, которая затем выращивается в больших колбах или же в специальных чанах. Потом из накопившейся бактериальной массы выделяют наработанный рекомбинантный белок или саму рекомбинантную ДНК.

Фармацевтические компании поставляют на выбор много различных плазмид. Из их каталогов можно выбрать те, которые больше подходят исследователям. Это большой бизнес.

Посмотрим на одну из плазмид из каталога. Например, pUC19.

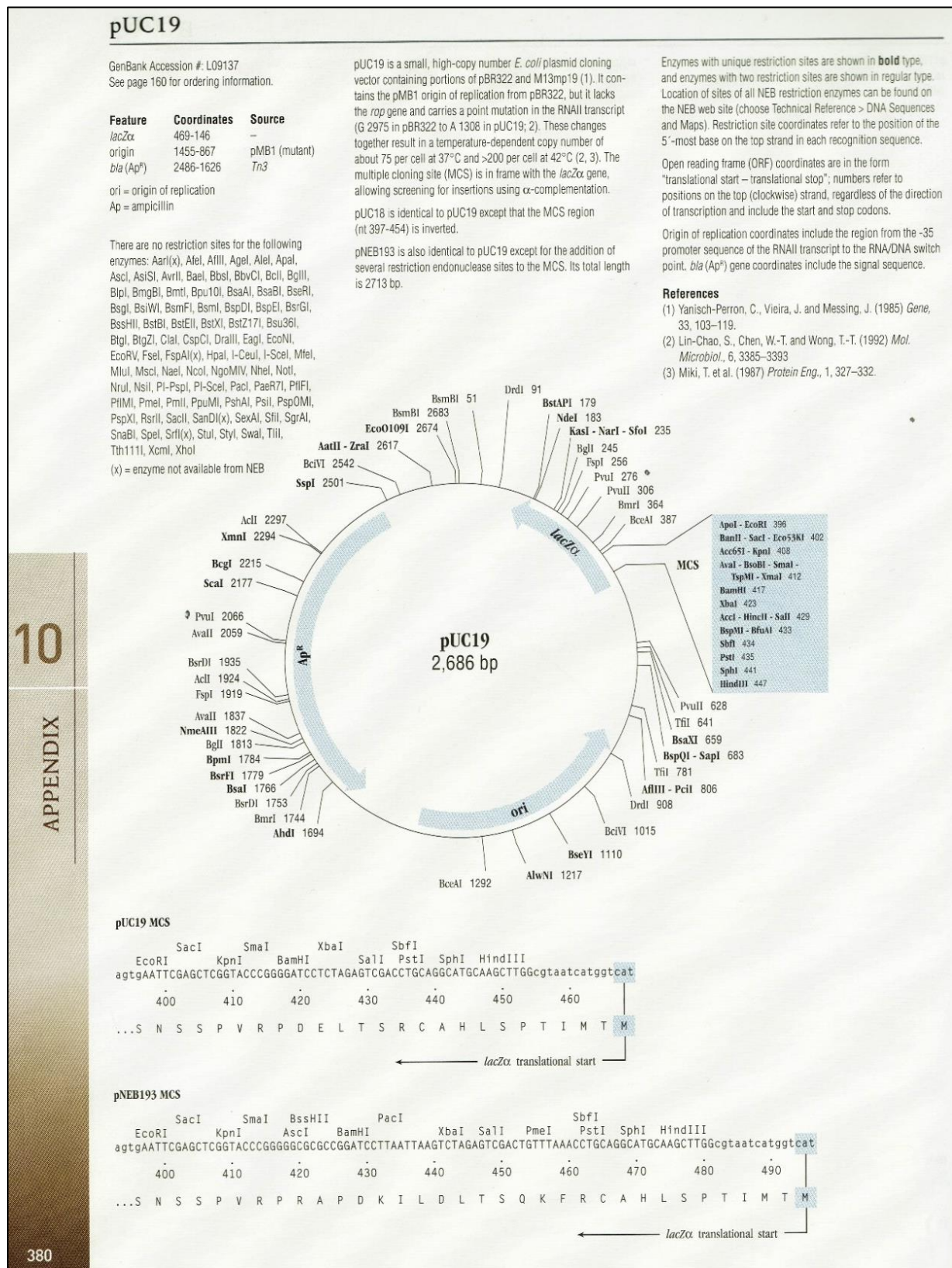


Рис.14. Коммерческая плазмида

На ней жирными буквами обозначены рестриктазы, которые делают только один разрез. Эти уникальные места разрезания особенно важны в генной инженерии. Некоторые рестриктазы режут в двух и более местах. Есть также участки, где уникальные места разрезания расположены близко. Плазмида несёт в себе гены устойчивости к антибиотикам. В данном случае это ампицилин (на рисунке обозначен как Ap). Бактерия, несущая в себе плазмиду с геном устойчивости к ампицилину, выживет в среде с этим антибиотиком. Таким образом, мы сможем отобрать бактерии, несущие плазмиды со вставленными генами. Здесь показаны все рестриктазы, которые разрезают данную плазмиду. Но нас интересуют только те из них, которые разрезают только один раз.

Итак, бактериофаги могут быть «природным лекарством» для борьбы с инфекционными бактериями. Специально сконструированные плазмиды используются для получения генных конструкций в генной инженерии.

4. Ретровирусы

Есть особая группа вирусов «ретровирусы», на которых стоит отдельно остановиться. Однако, чтобы лучше понять что это такое, сделаем небольшое отступление: в живом мире, включая вирусы, главным носителем основных программ для исполнения жизненных функций является ДНК. Это гигантская молекула. Она - самое важное хранилище наследственной информации. Её можно сравнить с жёстким диском компьютера. С неё можно делать отдельные копии нужных нам генов. Если нужна программа для синтеза какого-нибудь отдельного белка, то нужный участок ДНК переписывается на другую, временную молекулу - РНК. И дальше запись в РНК реализуется в белки. Отличия между ДНК и РНК минимальны: у ДНК звенья цепи представлены сахаром дезоксирибозой, у РНК эту роль выполняет сахар рибоза. Эти сахара отличаются только отсутствием одного атома кислорода у ДНК, а также тем, что у РНК вместо тимина находится урацил. Тем не менее, эти небольшие различия позволяют ДНК существовать в виде двойной спирали, что придает ей большую устойчивость и позволяет быть надёжным хранилищем генетической информации. РНК, наоборот, легче разрушается. Напомним, что она временная молекула. Она существует в виде одной цепочки, обладает большей гибкостью и у неё намного больше функций в живых организмах. Если искать химическое соединение, с которого могла бы начаться жизнь, то это, вероятнее всего будет не ДНК, не аминокислоты, а РНК. Т.е. можно предположить, что РНК – древнейшая информационная молекула. Итак, обычный, нормальный ход процесса:

- **Транскрипция: ДНК → РНК**
- Транскрипция — биологический процесс, в результате которого информация, содержащаяся в участке ДНК, копируется на синтезируемую молекулу **мРНК**. Транскрипцию осуществляют **факторы транскрипции** и **РНК-полимераза**.

Рис.15. Транскрипция

- **Обратная транскрипция: РНК → ДНК**
- Обратная транскрипция — перенос информации с РНК на ДНК, процесс, обратный нормальной транскрипции, осуществляемый ферментом **обратной транскриптазой**. Встречается у **ретровирусов**, например, **ВИЧ** и в случае **ретротранспозонов**.

Рис.16. Обратная транскрипция

Ретровирусы являются исключением. У них начальная генетическая информация записана не в ДНК, а в РНК и затем переписывается на ДНК. Т.е. процесс на начальном этапе идёт как бы вспять, ретро. Идёт обратная транскрипция. Поэтому эти вирусы и называли ретро-вирусы. Они были **открыты** **двумя** нобелевскими

лауреатами 1970 года Говардом Темным и Дэвидом Балтимором.

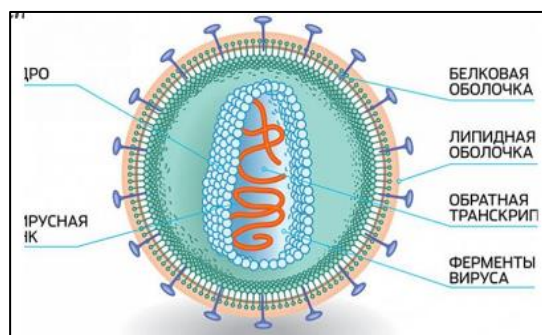


Рис. 17. Схема строения ретровируса

На следующем рисунке показано строение ретровируса. (рис. 17). Внутри у него есть спираль, но не двух-цепочечной ДНК, а одно-цепочечной РНК. Также есть специальный фермент «обратная транскриптаза», которая переписывает генетическую информацию с РНК на ДНК.

Ретровирус «нагружен» больше, чем обычный бактериофаг, поэтому и процесс входа в клетку происходит немного по-другому.

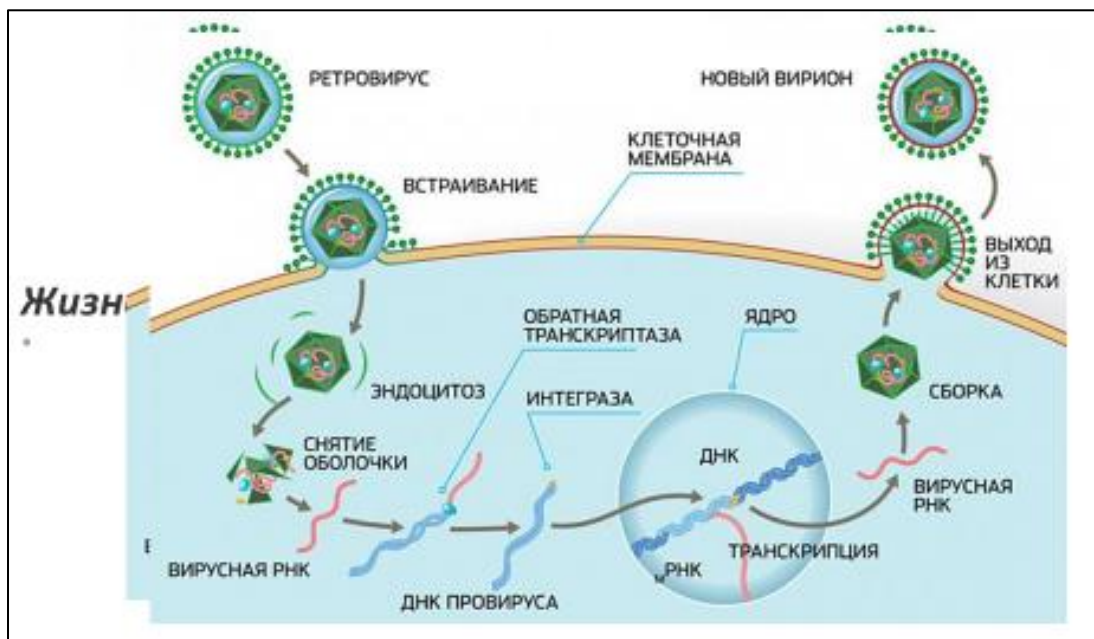


Рис.18. Вход ретровируса в клетку

Вирус встраивается в мембрану клетки, проходит внутрь и освобождает РНК вместе с ферментом «обратная транскриптаза». Обратная транскриптаза копирует одно-цепочечную РНК в двух-цепочечную ДНК. Эта вирусная ДНК затем интегрируется в ДНК клетки хозяина с помощью фермента «интегразы». И уже с этой ДНК делаются множественные копии вирусной РНК. Одновременно синтезируются элементы оболочки, затем, как на заводе, происходит сборка и готовые вирусы покидают клетку.

С изобретением новых методов прочтения записи генов всего организма, закодированной в ДНК и РНК, выявилась особая роль вирусов и, прежде всего ретровирусов. Стало очевидным, что в геноме многих животных, включая человека, находятся остатки древних вирусов. Это следы прошлых встреч живых организмов с вирусами. Миллионы лет назад они атаковали клетки живших тогда организмов. Если организм не погибал, а справлялся с атакой, то вирусы в разобранном, деактивированном состоянии остались в клетках, потеряв способность к инфицированию. Если они заражали клетки половой линии, то вирус или его остатки передавались из поколения в поколение, путешествуя по геномам иногда миллионы лет.

Ретровирусы могут находиться, также, в виде «транспозонов». Транспозон это последовательность ДНК, способная перемещаться внутри генома с одной хромосомы на другую или на плазмиды. Для этого у них есть специальные ферменты, помогающие им внедряться в новое для них место. Транспозоны ещё называют прыгающие гены или мобильные элементы.

Предполагается, что ретротранспозоны сослужили хорошую службу, передав человеку и другим живым организмам структурные элементы, ставшие впоследствии нашими генами. Известен ряд генов, берущих своё начало от ретровирусов и транспозонов. Это некоторые гены, участвующие во внутриутробном развитии плода, в частности, в эволюции плаценты. Плацента позволила предкам человека продлить внутриутробное развитие. С этим связывают увеличение размеров мозга и развитие умственных способностей.

Таким образом, вирусы играют особую роль в эволюции и разнообразии жизни на земле. И это тем более удивительно, что в 70-х годах было представление, что вирусы можно рассматривать, как неживые биомолекулы. Эта точка зрения, в частности, поддерживалась работами Нобелевского лауреата 1946 года Венделл Мередит Стенли. Ещё в 1935 году она смогла получить кристаллы вируса табачной мозаики. Эти кристаллы сохраняли свои биологические свойства и были способны инфицировать клетки. В настоящее время получение кристаллов биомолекул, в частности белков, стало рутинным методом при исследовании механизма их действия.

Недавно были обнаружены многочисленные гигантские вирусы. Их размер и размер их генома близок к таковому у бактерий. (Rault, 2014.). В 2003 году Рауль объявил об обнаружении Мими вирусов, которые долгое время рассматривались как бактерии. Они - паразиты амёб. В 2013 году были обнаружены Пандоравирусы, тоже внутри амёб. Обнаружение этих вирусов заставляют пересмотреть прежние представления о классификации живых существ. К этому надо добавить появление новых методов прочтения генома. Всё это позволило исследователям начать понимать, что большинство организмов, на самом деле, являются химерами, состоящими из генов самого разного происхождения. Значит нужно учитывать перемещение генов между видимым и микроскопическим мирами. Анализ генома свидетельствует, что высшие организмы являются результатом древних взаимодействий различных микроорганизмов. В этих случаях вирусы выполняют функцию челноков, переносящих генетический материал (Rault, 2013).

В качестве общего вывода для нашего сообщения можно привести слова Рауля, взятые из его статьи: «С появлением метода сиквенсинга (прочтения генетической записи) целого генома, исследователи начинают понимать, что большинство организмов представляют собой, на самом деле, химеры, содержащие гены из различных источников: высших (юкариотов), низших (прокариотов) и также вирусов».

Источники

- B. Albert, D. Bray, J. Lewis Cell.1989. Viral chromosome can integrate into host chromosomes. 252-253.
- [https://ru.wikipedia.org/wiki. Бактериофаги.](https://ru.wikipedia.org/wiki/Бактериофаги)
- B. Kirby, J. Barr. 2013. Going viral. The Scientist. 27.9.46-51.
- J. Madhusoodanan. 2016. Viral Soldiers. 2016. The Scientist. 30.1. 27-33.
- New England BioLabs, Inc. 2010. Catalog.
- Ржевский А. Популярная механика. Ретровирусы - «пятая колонна ДНК. www.popmech.ru/Science/178711-retrovirusy-pataya-colonna-dnk.
- D. Rault.2014. Viruses reconsidered. The discovery of more and more viruses of record-breaking size calls for reclassification of life on Earth. The Scientist. 28.3.41-45.
- D. Rault 2013. TRUC or need for a new microbial classification. Intervirology. 56.349-353.
- N. Philippe et al. 2013. Pandoraviruses: Amoeba viruses with genomes up to 2.5 Mb reaching that of parasitic eucariotes. The Science. 341. 281-286.