

СИНТЕТИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ: НЕКОТОРЫЕ ИТОГИ И РИСКИ В ОБЗОРЕ НАУЧНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ

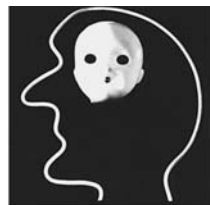
© 2015

Е.Б. Махиянова, Д.С. Андреев

Синтетическую биологию считают самой перспективной технологией будущего. Последние 15 лет этот термин использовался для обозначения междисциплинарных исследований на стыке биотехнологий, молекулярной, клеточной и эволюционной биологии, электротехники и генной инженерии.

Одним из отцов-основателей синтетической биологии можно считать биохимика, генетика и, что самое главное, успешного предпринимателя Крейга Вентера, который внес значительный вклад в знаменитый проект “Геном человека”, предложив использовать альтернативный способ для его расшифровки. Результатом исследований Вентера стал синтез ДНК, а затем, в 2006 году создание самой маленькой бактерии, способной к делению — *Mycoplasma laboratorium*. В 2010 году его научная группа объявила о получении синтетической бактериальной клетки. В этой работе из мелких фрагментов генома бактерии *Mycoplasma mycoides* были синтезированы промежуточные геномы, которые в свою очередь ввели в клетки дрожжей и других клеток. Окончательный вариант генома был пересажен опять же в бактериальную клетку вида *Mycoplasma capricolum*, из которой предварительно удалили весь генетический материал. На данном этапе Крейг Вентер рассматривает свою работу как создание синтетических организмов, этаких биологических машин, по его словам, способствующих изучению жизни и природы.

Самым классическим продуктом синтетической биологии, дошедшим до потребителя, считается артемизинин — дешевое и эффективное лекарство от малярии. Препарат представляет собой синтетический аналог действующего вещества полыни однолетней (*Artemisia annua*), которую традиционная китайская медицина сотни лет применяет для борьбы с плазмодием (возбудителем малярии). Здесь метаболическая инженерия была использована в комбинации с введением чужих генов в клетки кишечной палочки и дрожжей, которые затем были подвергнуты направленной эволюции [11].



ЧЕЛОВЕКОЗНАНИЕ: ИСТОРИЯ, ТЕОРИЯ, МЕТОД



**Махиянова
Евгения**

Борисовна — генеральный директор агентства CloudText, главный редактор журнала “Окно возможностей”. E-mail: info@cloudtext.ru



**Андреев
Денис**

Сергеевич — кандидат биологических наук, руководитель Аналитической группы Российской ассоциации содействия науке. E-mail: denis-s-andreyuk@ya.ru



Сейчас интенсивно развивается производство синтетических нуклеотидов, новых аминокислот и конструирование белков. Синтетическую ДНК используют для хранения информации, создания так называемых биосенсоров — синтетических бактерий, реагирующих на присутствие в среде определенных веществ, например, тяжелых металлов или токсинов. С помощью синтетических ДНК и искусственных бактерий создают новые программируемые наноматериалы. Важным сегментом приложения синтетической биологии служит регенерация ценных металлов из отходов с помощью синтетических бактерий. Еще одним из интенсивно развиваемых и щедро финансируемых направлений синтетической биологии является производство биотоплива. На основе растительных масел предпринимаются попытки производства биодизельного топлива, но самым перспективным считается синтез этанола с помощью дрожжей и водорослей [7].

Революция CRISPR

Уже во время расшифровки генома ученым не терпелось приступить к его редактированию — реализовать свои намерения в усовершенствовании живых организмов, имея конечной целью человека. Однако на их пути стояло значительное препятствие — редактирование генома еще несколько лет назад было долгим процессом с далеко не гарантированным результатом. Все изменилось с открытием системы, а теперь уже и технологии редактирования генома CRISPR-Cas9. Теперь в руках у ученых оказались редакторские ножницы, которыми можно со значительной точностью пометать, вырезать, изменять, вставлять локусы генома любого организма в нужной последовательности. В мире биологических наук произошла тихая революция CRISPR, итоги которой пока абсолютно не предсказуемы.

Структура CRISPR (от англ. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats — короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами) была открыта у бактерий, когда ученых заинтересовал парадокс избыточного генного материала этих одноклеточных организмов. Дело в том, что бактериальный геном включает 3 млн пар оснований, а для успешной жизнедеятельности им необходимо только 3 тыс. Значительную часть “избыточных” генов составляли короткие инвертированные (палиндромные) повторы, включающие в среднем до 32 пар оснований. У многих повторов наблюдалась обратная комплементарность в конце и начале их последовательностей, что позволяло их обоюдное взаимодействие. Повторы, большей частью одинакового состава, разделялись другими последовательностями уникального состава примерно той же длины, которые получили название спейсеры. Чередующиеся звенья (повтор + спейсер) составляют основную протя-



женность CRISPR-кассеты, число которых в геноме некоторых бактерий может достигать 1%. Сами же CRISPR-кассеты разделяются лидерными последовательностями, имеющими уникальный состав и длину — до 400 пар оснований. Лидерные последовательности не кодируют белки и не встречаются больше ни в каких местах генома, кроме своего места во главе целой CRISPR-кассеты. Структуры CRISPR чаще всего располагаются на основной хромосоме, но могут входить в состав плазмид — автономных кольцевых молекул ДНК [2].

Впервые структура CRISPR была описана в 1987 году японскими исследователями (рис. 1). В середине нулевых годов несколько лабораторий, специализирующихся в микробиологии и биоинформатике, начали целенаправленное исследование этой системы бактериального генома. Позже CRISPR была обнаружена у различных бактерий и архей, поэтому были сделаны прогнозы о возможной роли этой структуры в репарации ДНК или генной регуляции. Ключевой прорыв в понимании функций CRISPR произошел в 2005 году после того, как было обнаружено, что многие спейсерные последовательности в пределах CRISPR происходят из плазмид и вирусов. После ряда открытий функций *cas*-генов и кодируемых ими ферментов было выдвинуто предположение, что система CRISPR-Cas

Рис. 1. Хронология развития знаний о системе CRISPR-Cas [1]



является адаптивной защитной системой — иммунной системой бактерий. После каждой инвазии вирусов и бактериофагов и соответственно выработки к ним иммунитета в ней остаются “записи” об этих вторжениях — антисмысловые РНК [5].

Рядом с CRISPR-кассетами расположены очень интересные гены, которые отсутствуют у других организмов без CRISPR-кассет. Это так называемые *cas*-гены (от англ. CRISPR associated — сцепленные с CRISPR). Они кодируют Cas-белки, по своим функциям являющиеся ферментами. Так, к примеру, фермент Cas1 нарезает ДНК на фрагменты длиной около 80 нуклеотидов, т.е. выполняет функции фермента эндонуклеазы; Cas2 расщепляет молекулы РНК, как рибонуклеаза; Cas3 относится к хеликазам, которые расплетают цепи двухцепочечной ДНК; Cas4 — экзонуклеаза, отщепляющая концевые нуклеотиды молекул ДНК и РНК и т.д. [2].

В 2007 году были проведены эксперименты по инфицированию бактерий молочной кислоты *Streptococcus thermophilus* литическими бактериофагами. Исследование дало первые экспериментальные доказательства существования адаптивного иммунитета бактерий на основе системы CRISPR-Cas. Таким образом, существующие естественным образом в культуре бактерий, используемых в молочной промышленности, системы CRISPR-Cas могут быть применены для иммунизации других организмов против бактериофагов. Так было проведено первое успешное применение системы CRISPR-Cas в биотехнологических целях [5].

В 2008 году было показано, что зрелые CRISPR РНК (сгРНК) могут служить в качестве направляющих структур (гидов) в комплексе с белками Cas для препятствия распространения вирусов в культуре *E. coli*. В том же году было сообщено о направленной на ДНК активности системы CRISPR-Cas, которая наблюдалась в патогенных бактериях *Staphylococcus epidermidis* [5].

Функциональные локусы CRISPR-Cas содержат CRISPR-касеты одинаковых повторов, разделенных внедренными спейсерами, нацеленными на ДНК. Эти спейсеры кодируют компоненты сгРНК и оперон *cas*-генов, которые в свою очередь кодируют компоненты белков Cas. В естественных условиях при исследовании спейсеров CRISPR можно обнаружить соответствие ДНК вирусов и их хозяев — бактерий или архей. Эти исследования показали, что вирусы постоянно эволюционируют, чтобы преодолеть защитный иммунитет системы CRISPR-Cas.

Адаптивный иммунитет бактерий развивается в три этапа [5]:

- введение короткой последовательности инвазирующей ДНК в качестве спейсера в CRISPR-кассету;
- транскрипция сгРНК-предшественника (pre-сгРНК), которая подвергается созреванию для создания отдельных сгРНК, каждая из которых состоит из части повтора и части

спейсера. Последняя направлена на ДНК инвазирующего организма;

- направляемое сгРНК расщепление инородной нуклеиновой кислоты вируса Cas-белками в сайтах, комплементарных к последовательности сгРНК в спейсерах.

Другими словами, система CRISPR-Cas вначале ассимилирует чужеродную ДНК вируса в свои последовательности, а затем вырабатывает ферменты (Cas-белки), которые расщепляют отдельные фрагменты вирусной ДНК. Для подтверждения этого механизма ученые удалили из ДНК бактерий отдельные CRISPR-кассеты, в итоге эти бактерии стали уязвимы перед вирусами, на борьбу с которыми была направлена система адаптивного иммунитета. Следовательно, по геному бактерий можно прочитать летопись взаимоотношений и борьбы данного вида с вирусами и другими бактериофагами.

Во время исследования функций этой системы были выделены три ее типа (I, II, III), в которых используются различные молекулярные механизмы для вставки чужеродной ДНК, а затем для ее расщепления. Протоспейсеры, или PAM-последовательности (PAM — protospacer adjacent motif) — это короткие последовательности, расположенные рядом с сгРНК, направленной на ДНК инвазирующего организма. Они играют существенную роль в этапах развития адаптивного иммунитета по типу I и II. Тем не менее для системы типа II требуется только один белок для опознавания и расщепления враждебной ДНК, что оказалось чрезвычайно полезным для геной инженерии. Эти белком оказался фермент Cas9.

Биоинформационный анализ впервые идентифицировал белок Cas9 (ранее COG3513, Csx12, Cas5 или Csn1) как фермент с большими и многофункциональными молекулами, имеющими две предполагаемые области нуклеазы, поэтому сейчас его еще называют Cas9-эндонуклеаза. Генетические исследования показали, что у *C. thermophilus* белок Cas9 играет важную роль в защите от вирусной инвазии — он разрывает двухцепочечную ДНК бактериофага, способен управлять умеренными фагами (профагами)¹ и плазмидами в бактериях [5].

В целом система CRISPR-Cas9 основана на действии направляемой РНК Cas9-эндонуклеазы, которая способна расщеплять ДНК в нужных местах (сайтах-мишенях). Специфичность действия нуклеазы определяется мотивом PAM и направляющей последовательностью, которая комплементарна к сайту-мишени. Направляющая последовательность состоит из 20 нуклеотидов и входит в состав направляющей РНК. Систему CRISPR-Cas II типа (или CRISPR-Cas9) можно запрограммировать на расщепление практически любой последовательности, предшествующей мотиву PAM. Для использования в биоинженерных целях были адаптированы бактериальные системы таких видов бактерий, как *Streptococcus pyogenes*, *S. thermophilus* и *Neisseria meningitidis* [1].

¹ Бактериофаги в особой неинфекционной форме, присутствующие в бактериальных культурах в течение бесчисленных поколений. В определенных условиях они способны переходить в активную вирулентную форму.



Перспективным направлением использования системы CRISPR-Cas9 является генный скрининг и генная терапия человека путем восстановления и разрушения целевых генов, разрушения участков вирусных геномов и направленное воздействие на гены путем программируемой РНК (рис. 2). В качестве второго направления следует привести систематический анализ функций генов в клетках млекопитающих. Уже создана библиотека лентивирусной sgРНК в масштабе целого генома. Этот подход был также использован для идентификации генов, необходимых для жизнеспособности клеток при раке и плюрипотентных стволовых клеток. Использование системы CRISPR-Cas9 для исследования генома позволит масштабный скрининг органов-мишеней для лекарственных препаратов [5].

Другие соответствующие примеры медицинского применения CRISPR-Cas9 включают в себя возможность исправить генетические мутации, ответственные за наследственные заболевания. У мышей уже была исправлена доминирующая мутация в гене *Crygc*, ответственным за катаракту. Путем гомологичной рекомбинации в культурах кишечных стволовых клеток, полученных от пациентов с кистозным фиброзом, был исправлен CFTR-локус, ответственный за развитие муковисцидоза. Затем путем клонирования из клеток с “отредактированным” геномом были получены органоподобные культуры клеток (органоиды), несущие желаемые и точно выполненные генетические изменения.

Одним из самых последних примеров успешного применения технологии CRISPR-Cas9 является генная инженерия растений и грибов. После демонстрации редактирования генома таких модельных растений, как *Arabidopsis thaliana* и *Nicotiana benthamiana*, была выполнена генная инженерия культурных растений — риса, пшеницы и сорго, а также сладкого апельсина и печеночника. Эта технология обещает изменить темп и ход сельскохозяйственных исследований. Например, недавнее исследование риса выявило, что гены-мишени были отредактированы до первого деления почти у 50% эмбрионных клеток, получивших конструкты Cas9 — РНК-гид. Эти генетические изменения были унаследованы следующим поколением растений без новой мутации или возврата к старому состоянию. Такие данные позволяют предположить, что модификация геномов растений для защиты от болезней и устойчивости к вредителям могут оказаться гораздо проще.

Эффективность генной инженерии резко возросла благодаря целевым модификациям генома с помощью системы CRISPR-Cas9 в зародышевых линиях клеток модельных животных — дрозофил, рыбок данио рерио, нематод, саламандр и лягушек. Эта же технология может облегчить получение модельных линий мышей, крыс, свиней и обезьян, специально предназначенных для фармакологических исследований и изучения болезней человека.



Рис. 2. Перспективные направления использования Системы CRISPR-Cas9 в синтетической биологии и генной инженерии [5]

Программируемая способность связывания Cas9 также может использоваться для получения изображения отдельных локусов в живых клетках. Вполне возможно, сейчас рождается новый метод визуализации на клеточном и молекулярном уровне. Для этого применяется специальный деактивированный белок dCas9, снабженный зелеными флуоресцентными белковыми метками. Совместно со структурно оптимизированной sgРНК он позволяет получить изображения повторов и неповторяющихся последовательностей в теломерах и генах прямо в живых клетках.

Новые технологии способны разрушать ДНК вирусов, поэтому привлекают ученых своим потенциалом в лечении вирусных инфекций. Преимуществом этой стратегии является то, что она использует уже встроенные в структуру CRISPR-Cas противовирусные адаптивные иммунные системы бактерий. Была продемонстрирована целевая методика применения системы CRISPR-Cas9 для эффективного расщепления и мутации длинного концевого повтора ВИЧ-1, а также для удаления внутренних вирусных генов из хромосом инфицированных клеток.

Понимание системы CRISPR-Cas9 на биохимическом и структурном уровне позволяет производить инжиниринг с учетом различных вариантов фермента Cas9 — с меньшим размером молекул и повышенной специфичностью. Глубокий анализ большого перечня эволюционирующих естественным образом бактериальных ферментов Cas9 может также выявить ортологи с различными по специфичности к ДНК механизмами связывания, что расширит выбор РАМ-мотивов и, безусловно, выявит более подходящие структуры для доставки в клетки человека [1].

Способы доставки Cas9 и направляющей РНК в клетки и ткани стоят на повестке дня в исследованиях по синтетичес-



кой биологии, поскольку от этого в большой степени зависит эффективность генной терапии человека. Например, недавние эксперименты подтвердили, что для быстрого и запрограммированного по времени редактирования генома комплекс Cas9 — направляющая РНК может быть введен непосредственно в клетки с использованием нуклеофекции² или специальных проникающих в клетки пептидов. Также в этих целях используются трансгенные организмы, которые экспрессируют Cas9. Подобные захватывающие эксперименты уже были проведены. Так, комплекс Cas9 — направляющая РНК вводили взрослым мышам для редактирования генома клеток печени при лечении генетических нарушений.

Мнение Еврокомиссии относительно синтетической биологии

Возможности синтетической биологии и смежных наук и технологий поражают воображение и соответственно вызывают опасения в их бесконтрольном развитии. Тем более для правового регулирования работ в этой области очень желательно иметь четкое определение как самой науки, так и предмета ее исследований. Одним из самых фундаментальных документов в этой области является Картахенский протокол по биобезопасности (Cartagena Protocol on Biosafety to the Convention on Biological Diversity, 2000). После его принятия синтетическая биология получила десятки определений от самых различных организаций — создается впечатление, что каждый игрок на этом поле пытался внести свою лепту. Тем не менее два основных принципа этой, пока междисциплинарной науки остаются неизменными: первый — синтетическая биология занимается созданием новых, искусственных организмов (от единичных клеток бактерий до сложных многоклеточных организмов), второй — посредством различных технологий она вносит наследуемые изменения в уже существующие организмы для получения новых характеристик.

Осенью 2014 года три научных комитета Еврокомиссии — по рискам для здоровья и окружающей среды (SCHER — Scientific Committee on Health and Environmental Risks), по новым рискам для здоровья (SCENIHR — Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks) и по защите потребителей (SCCS — Scientific Committee on Consumer Safety) — выпустили основополагающий документ *Opinion on Synthetic Biology. I. Definition*, в котором дали определение новой дисциплине и объектам ее изучения, а также сделали попытку классифицировать и свести воедино основные законные акты, регулирующие ее развитие.

Согласно определению Еврокомиссии, *синтетической биологией* называется приложение науки, технологии и инженерного проектирования для облегчения и ускорения разработки,

² Метод невирусной трансфекции клеточных линий, заключается в образовании пор в клеточной мембране с помощью электрических импульсов и последующего внедрения в клетку генетического материала.

изготовления и/или модификации генных материалов в живых организмах [10].

Небезынтересными будут и определения объектов синтетической биологии, данные в этом документе [10]:

- *Организм* — любой биологический объект, способный к репликации или передаче генетического материала (Directive 2001/18/EC).

- *Современная биотехнология* — приложение разработанных *in vitro* технологий производства нуклеиновых кислот, включая ДНК, и прямое введение нуклеиновых кислот в клетки или органеллы, или технологии слияния клеток вне зависимости от их таксономической принадлежности с целью преодоления естественных физиологических репродуктивных или рекомбинантных барьеров. Эти технологии не относятся к традиционным методам разведения и селекции (Картахенский протокол по биобезопасности).

- *Генетическая модификация* — процесс, ведущий к изменению генетического материала организма с применением способа, который не существует в природе, т.е. не путем спаривания или рекомбинации (Directive 2001/18/EC и 2009/41/EC, Annex V).

- *Генетически модифицированный (микро-) организм* — организм, в котором генетический материал был изменен способом, который не существует в природе, т.е. не путем спаривания или рекомбинации (Directive 2001/18/EC and 2009/41/EC, Annex V).

- *Живые организмы* — любые биологические объекты, способные к передаче или репликации генетического материала, включая стерильные организмы, вирусы и вирионы (Картахенский протокол по биобезопасности).

- *Живые модифицированные организмы* — организмы, которые обладают новой комбинацией генетического материала, полученной путем использования современных биотехнологий (Картахенский протокол по биобезопасности).

Генетическую инженерию этот документ относит к технологиям и методам генетической модификации. Под *генетическим материалом* понимается любой физический носитель информации, который может быть унаследован потомством.

Возникает вопрос: чем тогда синтетическая биология отличается от генной модификации, или, как у нас привыкли говорить, генной инженерии? В документе Еврокомиссии дан развернутый ответ: “За последнее десятилетие появился ряд технологий, методов и принципов, которые использовались для разработки концепций и инструментов, позволяющих быстро и просто проектировать и производить ГМО. Эти подходы имеют важное значение для решения социальных проблем, таких как здравоохранение, энергетическая и продовольственная безопасность. Такие технологии, методы и принципы относятся к синтетической биологии, они включают в себя концепту-



альное развитие в области генной инженерии на основе классических инженерных концепций, например, стандартизации и модуляризации (модульности), которые ученые пытаются применить к биологическим системам. Синтетическая биология в настоящее время является составной частью генетической модификации, как определено в европейских Директивах 2001/18 / ЕС и 2009/41 / ЕС, и, вероятно, это положение останется в обозримом будущем”.

Упомянутые *стандартизация и модуляризация (модульность)* являются основными концепциями синтетической биологии, однако пока только на бумаге. В настоящее время отсутствуют стандартизированные блоки (модули) объектов генной инженерии, поэтому каждая научная группа создает собственные последовательности нуклеотидов. Согласно концепции модульности, тесно связанной с иерархической абстракцией, модули (гены, белковые домены, промоутеры и генетические схемы) теоретически можно использовать без учета внутренних молекулярных функциональных взаимосвязей. Такая иерархия призвана облегчить проектирование и изготовление трансгенных организмов путем разделения технологического процесса на более мелкие подпроцессы.

Продолжением концепции модульности является *ортогональность*, т.е. независимость и несвязность двух каких-либо систем. В соответствии с этой концепцией, предполагается использование узлов, собранных из более мелких модулей, которые не зависят от организма-хозяина. Например, использование систем регулирования прокариотических генов в эукариотических организмах, и наоборот. Разрабатываются и более амбициозные планы — создание носителей информации не на основе ДНК, т.е. создание искусственных генетических систем, которые функционируют независимо друг от друга и от организма-хозяина и не могут быть прочитаны организмами, которые не подверглись генной модификации.

Последняя концепция синтетической биологии — *рефакторинг*, или *реорганизация генетического кода*, заимствована из технологии разработки программного обеспечения. Она заключается в возможности значительного переписывания существующего программного кода без изменения его внешнего поведения. В генной инженерии этот подход может быть применен к перезаписи генетической информации, чтобы белок-кодирующая информация оставалась, но можно было менять последовательности в случайном порядке и заменять регуляторные элементы синтетическими участками ДНК. Целью этих манипуляций является удаление всех не идентифицированных участков и исключение любых молекулярных взаимодействий, которые могут привести к непредсказуемому поведению системы.

Другими словами, в документе Еврокомиссии предложена теоретическая платформа для введения хаоса синтетической биологии хоть в какое-то более-менее законное русло. Кроме

того, члены комитетов Еврокомиссии попытались очертить основные области приложения синтетической биологии, так сказать свести воедино основные направления ее развития на сегодняшний день.

По мнению Еврокомиссии, выделяется четыре основных направлений развития синтетической биологии. Одним из главных является *синтетическая геномика* и *синтез ДНК* для получения новых конструкторов, которые предполагается внедрять в живые организмы. В настоящее время ученые уже могут синтезировать и собирать ДНК в масштабе целых микробных геномов, а также переносить такие синтетические геномы между клетками разных видов, например, дрожжами и бактериями. В настоящее время синтез ДНК в основном используется для “химического” копирования природных геномов. Тем не менее в будущем синтез сведется к уменьшению геномов и освобождению их от избыточной генетической информации, содержащейся в “мусорной ДНК” и генах, которые не являются необходимыми для предполагаемой функции.

Особенно бурное развитие в последние годы получила *метаболическая инженерия*. Ее области применения включают в себя широкий спектр областей, таких как биохимический синтез, инженерия признаков растений, тканевая инженерия, генная терапия и создание новых лекарственных препаратов.

Оптимальное производство на базе метаболической инженерии требует сочетания нескольких подходов:

- использование генов множества различных организмов,
- проектирование нормативной схемы действия фермента — для заданного процесса биосинтеза необходима точная настройка активности фермента на разных уровнях,
- использование искусственных белковых каркасов для оптимизации стехиометрии биосинтетических ферментов.

На рынке уже присутствует значительное количество различных биохимических и химических соединений, производимых микроорганизмами, которые были спроектированы с использованием методов метаболической инженерии, включая биотопливо и очень дорогие химические вещества (лекарства, усилители вкуса, ароматические вещества).

Один из вариантов будущего приложения метаболической инженерии основан на бесклеточных системах *in vitro*. В последнее время особое внимание уделяется разработке бесклеточных производств химических веществ. В будущем бесклеточные производственные линии позволят создать биологические системы с более эффективным в плане потребления ресурсов метаболизмом, поскольку они не нужны для поддержания жизни клетки. Такие разработки позволят в итоге создать самоподдерживающееся производство биотоплива и сыпучих химических веществ.

В русле общей концепции синтетической биологии стоит отметить еще одно направление — *разработка ортогональных*

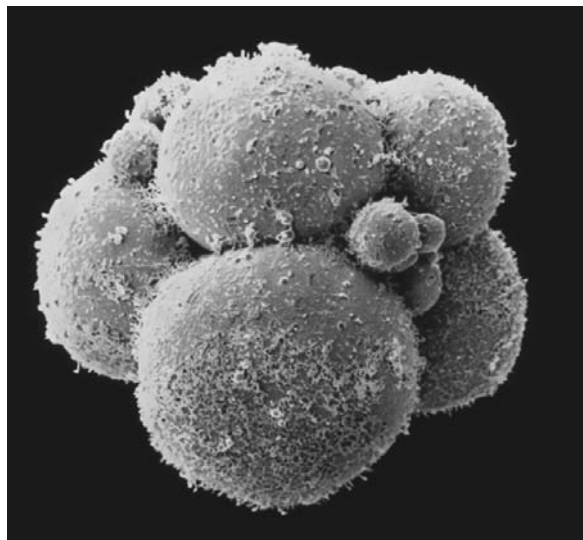


Рис. 3. Редактирование генома в клетках человеческих эмбрионов стало причиной разногласий в научном сообществе [6]

биосистем и ксенобиология. В большинстве разработанных технологий синтетической биологии используются существующие биохимические компоненты, такие как ДНК в качестве основного носителя информации и 20 канонических аминокислот как основные компоненты белка. В последние годы успешно развивается отрасль синтетической биологии по проектированию альтернативных биохимических компонентов для биоинженерии. Большая часть работы в этой области сосредоточена на использовании аналогов нуклеиновых кислот — ксенонуклеиновых кислот (Xeno Nucleic

Acids) как ортогональных носителей информации, не используемых естественными биологическими системами. Кроме того, биологи начали изменять генетический код путем перепрограммирования таблицы соответствий кодонов и аминокислот и расширения номенклатуры канонических аминокислот. Использование новых неканонических аминокислот увеличивает биохимическую функциональность белков.

Большая часть работ в области синтетической биологии начинается с какой-то уже существующей природной биосистемы, которая затем подвергается направленным изменениям для достижения конкретных целей. Другой подход к проектированию новых биологических систем работает строго “снизу вверх”, чтобы построить новые живые системы простейшей формы. Для этого в ходе химических и физических процессов в качестве сырья используются только неорганические материалы. В настоящее время биосистемы, построенные по принципу “снизу вверх” из неорганических материалов, представляют собой химические пузырьки, или так называемые *протоклетки*. Долгосрочной целью этой линии исследований является создание протоклеток, обладающих достаточным количеством функций, чтобы использоваться в качестве носителей или каркаса (“монтажной панели”), в которые можно ввести синтетический наследуемый материал для получения новой жизни — самореплицирующихся организмов. Уже разработаны некоторые базовые системы, например, продемонстрировано биохимическое копирование РНК-матриц внутри протоклетки, но более сложные протоклетки с большим функционалом (особенно со способностью к устойчивой саморепликации) пока не созданы. Хотя протоклетки (так же, как “голые” молекулы ДНК) нельзя назвать живыми тканями, они представляют собой первые шаги в направлении синтеза живых организмов.

Протоклетки могут быть предназначены для расширения функциональности живых клеток, например, путем расширения возможностей для взаимодействия с окружающей средой.

Обоснованные опасения ученых

Непредсказуемость научного процесса в наш век биологии вызывает большие опасения у видных ученых. Практически одновременно с обнародованием мнения Еврокомиссии профессор Массачусетского технологического института Кеннет Ойе опубликовал статью в журнале *Science* [9]. Ойе является признанным специалистом в области синтетической биологии и неоднократно выступал с призывами более осторожного и вдумчивого подхода к развитию этой науки. Статья в *Science* — *Regulating gene drives* — была написана в составе большой группы ученых из разных стран, которые серьезно озабочены сложившимся положением. Основной темой статьи, как следует из заголовка, являются так называемые *гены-драйвы* (*gene drives*) — активные гены, которые с большой вероятностью будут унаследованы следующими поколениями. Именно в них Кеннет Ойе видит самую большую угрозу, особенно если их пересаживать в клетки организмов, размножающихся половым путем [9].

В качестве примера ученый взял известный эксперимент Остина Берта из Имперского колледжа в Лондоне. Десять лет назад Берт предложил спроектировать новые гены-драйвы у moskitov, которые являются природными переносчиками малярии, лихорадки денге и других опасных инфекционных болезней, чтобы снизить их опасность как вектора инфекции. Его работа получила широкое освещение в СМИ, однако действующим ученым ее результаты показались очень сомнительными. Дело в том, что на современном уровне развития той же синтетической биологии невозможно точно “редактировать” генетические последовательности, чтобы придать им нужный вид, а тем более предсказать последствия даже в ближайшей перспективе [8].

Ситуация, тем не менее, очень быстро меняется. Мощный инструмент редактирования генома — система CRISPR-Cas9 позволяет ученым вставлять, заменять, удалять и управлять генами. Фермент Cas9 способен вырезать практически любой ген, этот механизм работает в большинстве клеток растений и животных, поэтому его можно использовать для создания генов-драйвов в любом размножающемся половым путем организме.

Если вернуться к примеру с экспериментом Берта, то благодаря генам-драйвам можно как затруднить москитам передачу инфекции, так и усилить эту способность. Однако Ойе и его соавторов больше заботит не целенаправленное злоупотребление возможностями синтетической биологии. Самую главную опасность, по его мнению, представляют непредсказуемые последствия выпуска синтетических генов-драйвов в природную среду. Слишком мало времени прошло с момента создания тех



же трансгенных насекомых, чтобы делать выводы об их влиянии на популяции диких комаров, другие виды дикой фауны, сельскохозяйственных животных и в конечном итоге на человека в силу горизонтального переноса генов и других пока еще не известных процессов.

Для контроля процессов синтетической биологии Ойе вместе с соавторами предлагают десять шагов [9], которые должны пройти все разработчики новых генов-драйвов, прежде чем организмы с отредактированными генами-драйвами выйдут за стены лабораторий. Помимо этих мероприятий ученые настаивают на разработке новых законов и даже проведении неких законодательных реформ, которые поставят барьеры на пути бесконтрольного распространения генов-драйвов.

Первые итоги революции CRISPR — скандал с китайскими эмбрионами

Кеннет Ойе и его коллеги в своей статье не зря сделали акцент на опасности редактирования генов-драйвов у организмов, размножающихся половым путем. В этом ключе опасная генная модификация не только обычных или стволовых клеток взрослого человека, которая уже является отработанной технологией, но самое главное — угрозу представляет вторжение в геном половых клеток (гамет), а тем более уже образовавшихся зигот (оплодотворенных яйцеклеток).

В конце апреля одной из самых обсуждаемых новостей по всему миру стало сообщение китайских ученых об искусственном изменении генома человеческих эмбрионов³. Работу не стали публиковать такие известные научные журналы, как *Nature* и *Science*, поэтому статью взяли в малоизвестный китайский журнал *Protein & Cell*, издателем которого является Министерство образования КНР [6]. Наблюдатели отмечают, что работа китайских исследователей имела государственное финансирование, однако в тех же Соединенных Штатах подобные исследования возможны только в организациях, работающих за счет внебюджетных фондов [6]. До выхода этой статьи в мировой научной прессе еще ни разу не публиковались статьи о редактировании генома сразу в эмбриональных клетках.

В статье сообщается о работе большой группы китайских ученых из Университета Сунь Ят-сена в Гуанчжоу, которые с помощью технологии CRISPR-Cas9 решили отредактировать ген гемоглобин-В (*HBB*), ответственный за развитие тяжелой болезни крови бета-талассемии. Для своих экспериментов ученые взяли в клинике экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) 86 человеческих эмбрионов — зигот, т.е. оплодотворенных яйцеклеток, которые еще не начали делиться. По словам авторов, эмбрионы были нежизнеспособными — имели лишний набор хромосом, поскольку в них одна яйцеклетка была оплодотворена двумя сперматозоидами. Руководитель научной группы

³ CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human trippronuclear zygotes. Puping Liang, et al. // *Protein & Cell*. 2015. № 6 (5).

Цзюньцзю Хуан отметил, что проект был утвержден советом по этике Университета Сунь Ят-сена и полностью соответствовал международным этическим стандартам, поскольку для экспериментов были выбраны нежизнеспособные зиготы [4].

Через два дня после введения молекул, содержащих запрограммированные структуры CRISPR-Cas9, выжившими оказались 54 эмбриона, к этому моменту они состояли уже из восьми клеток. Только у четырех эмбрионов наблюдались желаемые изменения целевого гена. Однако в целом с этими эмбрионами все обстояло далеко ненормально — они были мозаичными, т.е. только в отдельных клетках наблюдались эти изменения. Кроме того, ученые отметили большое количество потенциально вредных мутаций во всем геноме.

Эффективность технологии CRISPR-Cas9 для редактирования генома человеческих эмбрионов была настолько низкой, что исследователям пришлось заявить, что клиническое применение этой методики еще преждевременно. Их поразил удивительно высокий уровень нецелевых мутаций, хотя эта технология была достаточно опробована на клетках взрослых людей и эмбрионах животных с хорошими результатами. Следует отметить, что направленные мутации производились только на отдельном участке генома — экземе. По словам Хуана: “Если бы мы задействовали весь геном, нецелевых мутаций было бы гораздо больше” [4].

Сейчас Хуан со своей группой ищет способ, чтобы снизить число нецелевых мутаций, однако в своих экспериментах он собирается использовать обычные клетки человека и эмбрионы животных и применить другую технологию редактирования генома. По словам китайского источника, близкого к работам по этой теме, еще четыре научные группы в Китае ведут работы по редактированию человеческих эмбрионов.

Работа китайских генетиков расколола научное сообщество. Так, ученые из Союза регенеративной медицины, куда входит более 200 исследовательских институтов, частных компаний и правозащитных групп, заявили, что недопустимо сейчас проводить подобные исследования. Специалисты призвали к добровольному мораторию на этот вид исследований по всему миру. С таким же призывом к мировому сообществу выступило и Международное общество исследований стволовых клеток (ISSCR) [6].

Однако, если большие ассоциации ученых единым фронтом выступают против вмешательства в геномы эмбрионов человека, то отдельные исследователи не видят крамолы в работах Хуана. Некоторые считают, что международные принципы, разработанные для редактирования геномов стволовых клеток, позволяют проводить эксперименты с человеческими эмбрионами, если последним не дают развиваться более 14 дней. Более того, такое вмешательство вполне оправдано, если его целью является борьба с тяжелыми наследственными заболеваниями. Молекуляр-



ный генетик Джордж Черч из Гарвардского университета указывает на давно существующий консенсус относительно экспериментов на “бракованных” эмбрионах из ЭКО клиник. Единственным новшеством Хуана, по его словам, было использование технологии CRISPR. Он уверен, что такие плачевные результаты были предсказуемы, поскольку китайские исследователи использовали устаревшую версию системы CRISPR-Cas9 [6].

По мнению известного молекулярного биолога Дженнифер Даудна из Калифорнийского университета в Беркли, эксперимент Хуана не был так уж необходим, поскольку метод редактирования генома с использованием технологии CRISPR слишком далек от совершенства. Она считает, что статья китайских ученых представляет небольшую ценность для науки и, по-видимому, предназначена для “привлечения внимания”. На основании слишком малого срока, прошедшего с момента подачи статьи и до ее опубликования, Даудна высказывает сомнения в том, что она прошла процедуру рецензирования. Сейчас она занимается организацией большой международной конференции для широкого обсуждения этой темы, поскольку, по ее словам: “После выхода первой статьи о редактировании эмбрионального генома необходимо безотлагательное обсуждение этой проблемы” [6].

* * *

XXI век называют веком биологии, более половины всех публикуемых работ ведутся в различных отраслях этой науки — особенно в клеточной биологии, молекулярной биологии, биохимии, биофизике и биоинформатике, которые в большой степени задействованы в процессах синтетической биологии. В биологические исследования вкладываются колоссальные деньги, поэтому нет сомнений, что исследования по поиску новых и совершенствованию уже имеющихся инструментов по редактированию генома будут продолжаться на широком фронте. Приоритет “зеленой энергетики” будет стимулировать создание новых метаболических путей для производства биотоплива методами метаболической инженерии, а развитие нано- и компьютерных технологий — синтез искусственной ДНК для использования ее в качестве носителя информации. Примеры приложений синтетической биологии можно продолжать бесконечно, настолько разрослась эта научная область, причем процесс этот во многом идет хаотично.

Сейчас мы наблюдаем именно ту точку, когда технологии и результаты их приложения появляются настолько быстро, что не остается времени не только просчитать и спрогнозировать их последствия, но даже просто осмыслить, что в данный момент создали ученые. На этом фоне удручающим выглядит мнение Еврокомиссии, поскольку основано на механистическом подходе к разработке синтетических организмов, как к какому-то пусть сложному, но вполне реализуемому программно-

му или аппаратному обеспечению, в котором в любой момент можно заменить код или негодную деталь.

Однако жизнь намного сложнее, и ее сложность вряд ли когда-либо будет постижима человеческим разумом, даже при небывалом развитии технологий. Современная наука обладает исключительно фрагментарным знанием о процессах, идущих в живой природе, не представляя себе ни общей картины, ни основных принципов, согласно которым развивается и существует жизнь на нашей планете. Отсюда постоянная смена концепций и парадигм, что происходит не только в биологических науках. Самым опасным в этой ситуации видится страстное стремление ученых (и инвесторов) сразу воплощать свои открытия в промышленном масштабе, испытывать новые организмы сразу в дикой природе (вспомним о трансгенных москитах, выпущенных в Африке) и замахиваться практически сразу на редактирование генома человека, не просто не думая, а не представляя себе последствий подобных необратимых решений. Поэтому регулирующим органам во всем мире так важно прислушаться к мнению ведущих ученых, которые обладают достаточными знаниями проблем современной науки, но самое главное — мудростью и здравым смыслом, чтобы рекомендовать хотя бы первичные меры, способные стать препятствием на пути неконтролируемого развития науки и технологий.

Литература

1. *Васильева Е.А., Мелино Д., Барлев Н.А.* Применение системы направленного геномного редактирования CRISPR-Cas к плюрипотентным стволовым клеткам // *Цитология*. 2015. Т. 57. №1.
2. *Гоглева А.А., Артамонова И.И.* CRISPR-системы: структура и гипотетические функции // *Природа*. 2014. № 6.
3. *Гоглева А.А., Артамонова И.И.* CRISPR-системы: механизм действия и применения // *Природа*. 2014. № 7.
4. *Cyranoski D., Reardon S.* Chinese scientists genetically modify human embryos // *Nature News*. April 22. 2015.
5. *Doudna J., Charpentier E.* The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 // *Science*. Vol. 346. No 6213.
6. *Kaiser J., Normile D.* Chinese paper on embryo engineering splits scientific community // *Science Insider*. April 24. 2015.
7. *König H., Frank D., Heil R., Coenen C.* Synthetic Genomics and Synthetic Biology Applications Between Hopes and Concerns // *Curr Genomics*. 2013. № 14 (1).
8. *Oye K.* Proceed with caution: A promising technique for synthetic biology is fraught with risks // *MIT Technology Review*. August 19. 2014.
9. *Oye K., Esvelt K., Appleton E., Catteruccia F., Church G., Kuiken T., Barry Lightfoot S., McNamara S., Smidler A., Collins J.* Regulating gene drives // *Science*. 2014. Vol. 345. No 6197.
10. Scientific Committee on Health and Environmental Risks, Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks, Scientific Committee on Consumer Safety of the European Commission (June 4, 2014). Preliminary opinion on synthetic biology I. http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/scenih_r_o_044.pdf.
11. *Venton D.* Core Concept: Synthetic biology—change, accelerated // *PNAS*. 2014. Vol. 111. No. 48.