

Применение ДНК-технологий в медицине, биотехнологии и сельском хозяйстве

ДНК-технологии являются одним из важнейших достижений современной молекулярной биологии и представляют собой совокупность методов, позволяющих выделять, анализировать, копировать, секвенировать и целенаправленно изменять генетический материал. Развитие полимеразной цепной реакции, технологий рекомбинантной ДНК, молекулярного клонирования, секвенирования, генотипирования, биоинформатики и систем редактирования генома существенно расширило возможности фундаментальной и прикладной биологии. Если первоначально молекулярно-генетические методы использовались преимущественно для исследования структуры отдельных генов, то сегодня они позволяют анализировать целые геномы, транскриптомы и популяции организмов. Полученные генетические данные применяются для диагностики заболеваний, исследования механизмов патологических процессов, производства биофармацевтических препаратов, создания высокопродуктивных микроорганизмов, селекции растений и животных и контроля качества сельскохозяйственной продукции. Несмотря на разнообразие областей применения, общая логика большинства ДНК-технологий остается сходной: биологический образец → выделение ДНК или РНК → молекулярно-генетический анализ → получение генетической информации → биоинформатическая и статистическая обработка → биологическая интерпретация → практическое применение.

Одной из наиболее значимых областей применения ДНК-технологий является медицина. Современная молекулярная диагностика позволяет исследовать патологические процессы непосредственно на уровне нуклеиновых кислот. Одним из основных методов остается полимеразная цепная реакция — ПЦР, позволяющая обнаруживать определенные последовательности ДНК даже при небольшом количестве исходного генетического материала. Если объект исследования представлен РНК, применяется обратная транскрипция с последующей амплификацией полученной комплементарной ДНК. Количественная ПЦР в реальном времени, или qPCR, позволяет регистрировать накопление продукта во время реакции, а сочетание обратной транскрипции и qPCR применяется при исследовании РНК. Благодаря высокой чувствительности и специфичности молекулярные методы широко используются для обнаружения генетического материала инфекционных агентов, исследования экспрессии генов и анализа определенных генетических вариантов. При этом достоверность результата зависит не только от самой технологии, но и от качества биологического материала, правильности выделения нуклеиновых кислот, использования положительных и отрицательных контролей и корректной интерпретации полученных данных.

Большое значение ДНК-технологии имеют для диагностики и исследования наследственных заболеваний. Генетические заболевания могут быть связаны с однонуклеотидными вариантами, небольшими вставками и делециями, изменениями числа копий участков ДНК, крупными структурными перестройками и другими изменениями генома. Для обнаружения таких вариантов используются ПЦР, секвенирование по Сэнгеру, таргетные генетические панели, секвенирование экзома и полногеномное секвенирование. При таргетном исследовании анализируется заранее выбранная группа генов, связанных с определенным заболеванием или биологическим процессом. Whole-exome sequencing, WES, позволяет исследовать преимущественно белок-кодирующие области генома, тогда как whole-genome sequencing, WGS,

обеспечивает значительно более широкий анализ генетического материала. После секвенирования данные подвергаются биоинформатической обработке: проводится контроль качества, выравнивание относительно референсного генома, обнаружение генетических вариантов и их аннотация. Однако обнаружение варианта само по себе не означает, что именно он является причиной заболевания. В человеческом геноме существует огромное количество естественной генетической вариабельности, поэтому для интерпретации необходимо учитывать частоту варианта в популяции, его положение в гене, предполагаемое влияние на белок, данные функциональных исследований и накопленные клинические сведения. Таким образом, современная молекулярная диагностика представляет собой сочетание лабораторных методов, биоинформатики, статистического анализа и клинической интерпретации.

Особое место занимает применение геномных технологий в онкологии. Возникновение и развитие опухолевых клеток сопровождается накоплением различных генетических и эпигенетических изменений. Секвенирование опухолевого материала позволяет выявлять соматические мутации, структурные перестройки и изменения числа копий генов. Молекулярная характеристика опухоли может дополнять традиционную морфологическую диагностику и в определенных ситуациях использоваться для определения биомаркеров. Важным направлением стало исследование циркулирующей внеклеточной ДНК — cell-free DNA, cfDNA, присутствующей в плазме крови. Часть такой ДНК при опухолевом процессе может происходить из опухолевых клеток. Анализ соответствующих фрагментов лежит в основе ряда подходов, объединяемых понятием liquid biopsy — жидкостная биопсия. Возможности такого анализа зависят от конкретной клинической задачи, количества опухолевого материала в крови, характеристик используемой технологии и других факторов. Поэтому молекулярные результаты должны рассматриваться вместе с другими диагностическими данными.

Еще одним важным медицинским направлением является фармакогеномика, которая изучает влияние генетических особенностей человека на реакцию на лекарственные препараты. Генетические варианты могут изменять активность ферментов метаболизма лекарств, транспортных белков, рецепторов и других молекулярных компонентов. В определенных клинических ситуациях такая информация может использоваться вместе с другими данными при выборе лекарственной стратегии. Фармакогеномика является частью более широкой концепции прецизионной медицины, цель которой состоит в использовании молекулярных и других индивидуальных характеристик пациента при принятии медицинских решений. ДНК-технологии применяются и в пренатальной генетике. Например, анализ внеклеточной ДНК в крови беременной женщины используется в неинвазивном пренатальном скрининге некоторых хромосомных нарушений. При этом необходимо четко различать скрининговые и диагностические исследования: скрининг оценивает вероятность определенного состояния и при соответствующих результатах может потребовать дальнейшего медицинского подтверждения.

Современные ДНК-технологии используются не только для анализа генетической информации, но и для ее направленного изменения. Развитие технологий ZFN, TALEN и CRISPR/Cas создало возможности для редактирования определенных участков генома. В биомедицинских исследованиях такие подходы используются для изучения функции генов, создания клеточных моделей и разработки генных и клеточных технологий. Особенно большое внимание уделяется CRISPR/Cas-системам, поскольку в них адресность воздействия во многих случаях определяется направляющей РНК. Геномное редактирование может осуществляться ex vivo, когда клетки генетически изменяются вне организма и затем проходят необходимую

проверку, или *in vivo*, когда молекулярная система должна быть доставлена непосредственно к определенным клеткам организма. При медицинском применении принципиальное значение имеют эффективность, специфичность, возможные внецелевые изменения, качество клеточного материала, способ доставки и безопасность. Таким образом, развитие медицинских ДНК-технологий можно представить как последовательный переход от обнаружения генетической информации к ее функциональной интерпретации и, в некоторых случаях, к направленному воздействию на генетические процессы.

Не менее важное значение ДНК-технологии имеют в биотехнологии, где живые организмы, клетки и биологические молекулы используются для производства необходимых человеку веществ. Одним из фундаментальных достижений стало создание технологий рекомбинантной ДНК. Их принцип заключается в получении определенной генетической последовательности, ее включении в подходящий вектор и использовании клеточной системы для экспрессии целевого гена. Общую последовательность можно представить следующим образом: целевой ген → получение и подготовка последовательности → экспрессионный вектор → клетка-хозяин → экспрессия → получение целевого продукта → очистка → контроль качества. В качестве клеток-хозяев могут использоваться бактерии, дрожжи, клетки насекомых, культуры клеток млекопитающих и другие системы. Выбор продуцента зависит от особенностей целевого продукта. Некоторые относительно простые белки можно эффективно получать в бактериальных клетках, тогда как для сложных эукариотических белков могут потребоваться клеточные системы, способные осуществлять необходимые посттрансляционные модификации.

Классическим примером практического использования технологии рекомбинантной ДНК стало получение рекомбинантного человеческого инсулина. Развитие генной инженерии позволило использовать генетически модифицированные клетки для производства человеческого белка. Этот принцип стал основой производства многих других биофармацевтических продуктов. Рекомбинантные технологии применяются для получения терапевтических белков, отдельных компонентов вакцин, ферментов и других биологически активных молекул. Большое значение имеют технологии производства моноклональных антител и других рекомбинантных белковых препаратов. Таким образом, современная биофармацевтическая промышленность тесно связана с молекулярным клонированием, генетической инженерией, секвенированием и контролем генетической стабильности производственных клеточных линий.

ДНК-технологии широко используются и для создания промышленных микроорганизмов-продуцентов. В традиционной биотехнологии продуктивные штаммы получали путем отбора природных вариантов и мутагенеза. Современная генетическая инженерия позволяет более направленно изменять определенные гены и регуляторные системы. Особое направление представляет метаболическая инженерия, задача которой заключается в изменении метаболических путей клетки для увеличения образования необходимого вещества. Клеточный метаболизм представляет собой сложную сеть взаимосвязанных реакций, поэтому увеличение продукции определенного соединения может требовать изменения активности нескольких генов. Можно усиливать необходимые этапы биохимического пути, уменьшать образование конкурирующих продуктов или изменять регуляцию метаболизма. Общую логику можно представить следующим образом: анализ метаболического пути → определение ключевых генов и ферментов → генетическая модификация → изменение метаболического потока → оценка продукции → оптимизация штамма. Такие подходы

используются при разработке продуцентов аминокислот, органических кислот, витаминов, ферментов и других веществ.

Дальнейшим развитием генной и метаболической инженерии стала синтетическая биология. Она объединяет молекулярную биологию, генетику, инженерные подходы, биоинформатику и системную биологию. В синтетической биологии генетические элементы рассматриваются как функциональные модули, из которых можно создавать более сложные системы. Исследователи проектируют промоторы, регуляторные последовательности, генетические кассеты и метаболические сети. Один из распространенных принципов организации работы выражается циклом Design–Build–Test–Learn, то есть проектирование, создание, тестирование и анализ результатов. После получения экспериментальных данных конструкция может быть изменена и повторно проверена. Такой итерационный подход постепенно позволяет улучшать характеристики биотехнологической системы. В настоящее время эти методы дополняются геномным секвенированием, транскриптомикой, протеомикой, метаболомикой и компьютерным моделированием.

Третьей важнейшей областью является сельское хозяйство, где ДНК-технологии используются для исследования генетического разнообразия, идентификации сортов и пород, молекулярной диагностики, селекции и геномного редактирования. Традиционная селекция основана на наследственной изменчивости и отборе организмов с желательными фенотипическими признаками. Однако фенотип определяется взаимодействием генотипа и окружающей среды, поэтому внешнее проявление признака не всегда позволяет непосредственно определить его генетическую основу. Молекулярные технологии дают возможность анализировать наследственную информацию на уровне самой ДНК. Одним из основных направлений является использование генетических маркеров. В качестве маркеров могут использоваться различные типы полиморфизмов, включая SNP. Если определенный генетический маркер надежно связан с хозяйственно важным признаком, информация о нем может применяться в селекционной работе. Такой подход получил название *marker-assisted selection* — маркер-ассоциированная селекция. Его общая схема выглядит следующим образом: популяция → выделение ДНК → генотипирование → определение генетических маркеров → анализ связи с фенотипическим признаком → использование генетической информации при селекционном отборе.

Более масштабным развитием молекулярной селекции стала геномная селекция, при которой учитывается информация о большом количестве генетических вариантов, распределенных по всему геному. На основании генотипических и фенотипических данных создаются статистические модели, позволяющие оценивать генетический потенциал животных или растений по определенным признакам. Этот подход особенно полезен для сложных количественных признаков, которые контролируются множеством генов и одновременно зависят от факторов окружающей среды. В отличие от анализа одного предполагаемого гена, геномная селекция стремится использовать информацию всего генома. Развитие высокопроизводительного генотипирования и секвенирования значительно расширило возможности подобных исследований.

ДНК-технологии применяются для изучения генетического разнообразия сельскохозяйственных видов. Генетическое разнообразие является важным ресурсом селекции, поскольку определяет наличие различных аллелей и генотипов, которые могут использоваться для формирования новых комбинаций признаков. Молекулярные маркеры позволяют оценивать степень родства между линиями, сортами и породами, исследовать структуру популяций и контролировать сохранение генетических ресурсов. Аналогичные методы применяются для идентификации сортов и пород,

установления происхождения биологического материала и контроля селекционных линий.

Современные методы геномики позволяют искать участки генома, связанные с важными сельскохозяйственными признаками. Для этого используются генетическое картирование, ассоциативные исследования, секвенирование и функциональная геномика. После обнаружения потенциально значимого гена необходимо определить механизм его действия. Поэтому исследование может включать последовательность: генетический вариант → изменение экспрессии гена → изменение структуры или количества белка → изменение физиологического процесса → изменение фенотипического признака. Такой подход позволяет перейти от статистической связи к пониманию биологического механизма. При этом необходимо помнить, что большинство хозяйственно важных признаков являются сложными и зависят одновременно от большого количества генетических и средовых факторов.

Отдельное направление сельскохозяйственной биотехнологии связано с трансгенными технологиями и редактированием генома. При классическом трансгенезе в организм вводится новая генетическая конструкция, которая может обеспечивать формирование определенного признака. Геномное редактирование имеет другую концепцию: системы ZFN, TALEN и особенно CRISPR/Cas позволяют направленно воздействовать на определенные участки уже существующего генома. Благодаря этому можно исследовать функции генов и получать целевые генетические изменения. CRISPR/Cas широко применяется в исследованиях растений благодаря возможности сравнительно быстро перепрограммировать систему для разных генетических мишеней. Однако получение генетического изменения является только частью исследования: необходимо подтвердить изменение последовательности, оценить его стабильность, изучить фенотип и учитывать требования биобезопасности и действующего регулирования.

В животноводстве ДНК-технологии используются для генотипирования, оценки родства, исследования наследственных признаков и геномной селекции. Анализ большого количества генетических маркеров позволяет получать дополнительную информацию о генетическом потенциале животных. При этом геномные данные должны анализироваться вместе с достоверной фенотипической информацией. Если качество фенотипических данных низкое, даже большое количество генетических маркеров не гарантирует точности биологической интерпретации. Поэтому современная геномная селекция представляет собой сочетание молекулярной генетики, статистики, биоинформатики и классических методов селекции.

Еще одной важной областью является молекулярная диагностика заболеваний растений и животных. ПЦР и другие методы анализа нуклеиновых кислот позволяют обнаруживать генетический материал определенных возбудителей. Это имеет значение для фитопатологии, ветеринарии и контроля сельскохозяйственной продукции. Генетические методы используются и при анализе пищевого сырья, например для определения биологического происхождения компонентов. Важным направлением стала также метагеномика, позволяющая исследовать сложные микробные сообщества непосредственно по их генетическому материалу. С помощью метагеномных методов изучают микробиом почвы, растений и животных. Такие исследования позволяют лучше понять роль микроорганизмов в круговороте питательных элементов, взаимодействии растений с почвой и функционировании агроэкосистем.

Несмотря на различия между медициной, промышленной биотехнологией и сельским хозяйством, эти направления основаны на сходных молекулярных принципах. В медицинском исследовании может изучаться генетический вариант, связанный с определенным заболеванием; в сельском хозяйстве — вариант, связанный

с хозяйственно важным признаком; в промышленной биотехнологии — ген, изменение активности которого влияет на продуктивность микроорганизма. Во всех случаях исследователь движется от генетической информации к пониманию функции: ДНК → генетический вариант или ген → экспрессия → белок → клеточный процесс → фенотип → практическое применение. Поэтому одни и те же методы — ПЦР, секвенирование, генотипирование, молекулярное клонирование, редактирование генома и биоинформатика — могут использоваться в совершенно разных прикладных областях.

Особое значение в современных ДНК-технологиях имеет биоинформатика. Высокопроизводительное секвенирование создает огромные объемы цифровых данных, которые невозможно полноценно интерпретировать без компьютерных методов. После секвенирования выполняются контроль качества, фильтрация, выравнивание последовательностей, сборка генома, обнаружение вариантов и функциональная аннотация. Далее результаты подвергаются статистическому анализу и сопоставляются с биологическими базами данных. В медицинской геномике это позволяет исследовать потенциально клинически значимые варианты, в сельскохозяйственной геномике — искать маркеры, связанные с признаками, а в промышленной биотехнологии — анализировать геномы и метаболические возможности штаммов. Таким образом, современная ДНК-технология представляет собой сочетание лабораторной и вычислительной частей исследования.

Необходимо учитывать и ограничения молекулярно-генетических методов. Обнаружение статистической ассоциации между генетическим вариантом и фенотипом не всегда доказывает причинно-следственную связь. Генетический вариант может находиться рядом с настоящим функциональным вариантом или быть связан с ним через неравновесие по сцеплению. Поэтому результаты ассоциативных исследований желательно дополнять функциональными экспериментами. Аналогично изменение уровня экспрессии гена еще не доказывает, что именно этот ген является причиной исследуемого фенотипа. Современный подход стремится объединять геномные, транскриптомные, протеомные и метаболомные данные, а затем подтверждать ключевые выводы экспериментально.

Расширение применения ДНК-технологий сопровождается также этическими вопросами и требованиями биобезопасности. В медицине особое значение имеют конфиденциальность генетической информации, информированное согласие, правильная интерпретация результатов генетического тестирования и безопасность геномного редактирования. В сельском хозяйстве рассматриваются вопросы воздействия генетически измененных организмов на окружающую среду, сохранения биоразнообразия и регулирования новых геномных технологий. В промышленной биотехнологии необходимо контролировать генетическую стабильность производственных штаммов и предотвращать нежелательное распространение генетически модифицированных организмов. Следовательно, специалист должен оценивать не только техническую возможность использования определенной ДНК-технологии, но и ее биологическую обоснованность, безопасность и ограничения.

Таким образом, применение ДНК-технологий можно представить как единую систему, объединяющую фундаментальные знания о геноме с практическими задачами. В медицине ДНК-технологии обеспечивают молекулярную диагностику, исследование наследственных заболеваний, онкогеномику, фармакогеномику, развитие прецизионной медицины и генных технологий. В биотехнологии они используются для создания рекомбинантных белков, инженерии микроорганизмов, метаболической инженерии, производства биофармацевтических препаратов и развития синтетической биологии. В сельском хозяйстве они применяются для молекулярной селекции,

генотипирования, анализа генетического разнообразия, диагностики, геномной селекции и редактирования генома растений и животных. Все эти направления объединяет общая последовательность: биологический объект → ДНК/РНК → молекулярный анализ → генетические данные → биоинформатика → функциональная интерпретация → практическое решение. Главная роль современных ДНК-технологий заключается поэтому не только в возможности прочесть последовательность генома, но и в способности понять функцию генетической информации и использовать эти знания для решения задач медицины, биотехнологии и сельского хозяйства.