

УДК 577.21

**С. Л. Пастернак**  
**СИНТЕТИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ -**  
**ПУТЬ К РУКОТВОРНОЙ ЖИЗНИ**

Научный руководитель: канд. биол. наук, доцент А. М. Андриевский  
Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,  
биологический факультет,  
кафедра генетики и молекулярной биологии, пер. Шампанский, 2,  
г. Одесса, 65058, Украина, e-mail: uruz-pas@mail.ru

*Pasternak S. L. Synthetic biology - the way to man-made life.* In this review, an analysis of recent English-language scientific literature on synthetic biology has been provided. Synthetic biology - is a new scientific discipline that deals with the creating synthetic (non-existent in nature) biological functions and systems. The main achievements in this area, development prospects, and problems of bioethics has been discussed.

*Keywords:* artificial systems, genes, genomes, synthetic biology.

## **Введение**

В последние годы наряду с молекулярной биологией, которая стремится к пониманию сущности жизни путём «разборки» живых систем на составляющие её элементы (молекулярные комплексы, молекулы и атомы), появилась новая научная дисциплина – синтетическая биология. Её подход обратный – синтез живых (или близких к живым) систем из составляющих – атомов и молекул. Это новая область исследования объединяет науку и инженерию с целью проектирования и построения новых (несуществующих в природе) биологических структур и систем [1, 2].

Главные её цели следующие:

1. Узнать о жизни больше, строя её из атомов и молекул, а не разбирая на части, как это делалось ранее.

2. Сделать генную инженерию достойной её названия – превратить её из искусства в строгую дисциплину, которая могла бы непрерывно развиваться, стандартизируя предыдущие искусственно созданные структуры и повторно комбинируя их с целью создания более сложных живых системы, ранее не встречавшихся в природе.

3. Стереть границу между живыми системами и машинами, дабы прийти к действительно программируемым организмам.

К сожалению, на данный момент в странах СНГ нет возможности заниматься этим направлением биологии по причине отсутствия финансовой базы. Для отечественных биологов эта область остаётся мало известной, что доказывает отсутствие русско- и украиноязычных обзорных статей по синтетической биологии. Данный обзор призван частично заполнить этот пробел.

## **Основные достижения синтетической биологии**

Все работы в современной синтетической биологии ведутся в двух основных направлениях:

1. Создание живых систем из нехарактерных для земной жизни соединений.

2. Создание живых систем из стандартных нуклеотидов и аминокислот, но с заданными, часто не встречающимися в природе, свойствами.

Началом первого направления синтетической биологии стала работа Стивена Беннера и Питера Шульца. В 1989 г. С. Беннер из ETH (Eidgenössische Technische Hochschule) в Цюрихе создал ДНК, содержащую кроме четырёх известных нуклеотидов ещё два – изогуанозин и изоцитидин [3]. Следующим шагом стало доказательство способности таких ДНК к репликации. Увы, пока она не идёт полностью самостоятельно: Беннер использует полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и считает, что через пару лет его команде удастся добиться самовоспроизведения синтетических

ДНК без ПЦР. «Это и будет искусственная жизнь», – резюмирует учёный. Заметим, такая «жизнь» будет биохимически отличаться от известной нам «жизни».

Работы Беннера – не единственные по созданию искусственных аналогов ДНК. И другие биологи-синтетики пытаются создать новые, не встречающиеся в природе формы ДНК. Так, Джек Шостак из Массачусетского госпиталя проводит различные эксперименты с нуклеиновой кислотой TNA, в которой рибоза заменена более простым сахаром – треозой [4, 5]. Эрико Кул из Стэнфордского университета сконструировал xDNA из 8 нуклеотидов – 4 стандартных и 4 не встречающихся в природе [6]. Эти аналоги ДНК способны к репликации *in vitro* при помощи ПЦР. Они более стабильны, чем обычная ДНК и, вероятно, лучше подходят для перепрограммирования клеток. К тому же они способны образовывать комплексы с ДНК, что полезно для многих работ в области молекулярной биологии. Такими свойствами обладают и ПНК – пептидо-нуклеиновые кислоты, которыми занимается в контексте синтетической биологии Стин Расмуссен из Американской национальной лаборатории в Лос-Аламосе. Он помещает их в оболочку из жирных кислот и намерен на их основе создать искусственную форму жизни [7]. Существуют также аналоги ДНК, в которых остатки фосфорной кислоты заменены на фосфоротиоат (аналог фосфата, в котором атом кислорода заменён на серу) [8]. Так называемые «закрытые» нуклеиновые кислоты (Locked Nucleic Acid, LNA) содержат фуранозное кольцо, метилированное по четвёртому углеродному атому и по атому кислорода у второго углеродного атома. Они образуют крайне стабильные дуплексы между собой и с ДНК [9]. Также образовывать устойчивые дуплексы способны гекситолнуклеиновые кислоты (ГНК, HNA) [10]. Среди ациклических аналогов биогенных нуклеиновых кислот, кроме вышеописанных ПНК, интерес представляют формилглицеролнуклеиновые кислоты (FNA) [11]. Возможно, именно они были предшественниками РНК на заре РНК-мира [12]. Существуют также аналоги, образующие дуплексы без участия водородных связей, но с помощью гидрофобных взаимодействий [13]. Все эти соединения, несомненно, представляют теоретический интерес, но пока никому из исследователей не удалось добиться функционирования генов, создаваемых на основе каких-либо аналогов ДНК, т. е. транскрипции и трансляции. Первое, что предстоит сделать учёным, – заставить все описанные конструкции работать в клетках живых организмов [14 – 16].

В 2001 г. Ли Вонг и Питер Шульц из Океанографического института Скриппса в Ла-Холья (Калифорния) встроили в клетку *Escherichia coli* все генетические элементы, которые необходимы для декодирования амбер-

кодона (один из стоп-кодонов) в не встречающуюся в природе аминокислоту *n*-аминофенилаланин [17]. Необходимо было так модифицировать клетки, чтобы необычная аминокислота включалась в полипептидную цепь наряду с природными аминокислотами, образуя при этом белки, которые в норме не синтезирует ни один известный организм. Для этого учёные использовали мутантную тирозил-тРНК-синтетазу *Methanococcus jannaschii*, способную присоединять *n*-аминофенилаланин к мутантной тирозин-тРНК (амбер-супрессорная тРНК) того же вида архей. Мутантный белок и РНК получили методом подбора наиболее специфично взаимодействующей пары. Позже Шульц сообщил, что ему удалось получить и дрожжевые клетки, также наделённые этими необычными свойствами [18]. «Трансляционный аппарат дрожжей мало чем отличается от такового у человека, – отмечает Эштон Кропп из лаборатории Шульца. – Нам уже удалось заставить дрожжевые клетки синтезировать необычные аминокислоты шести типов, и теперь учёные пытаются адаптировать систему к клеткам человека». Данные разработки в первую очередь важны для биомедицины. Учёные планируют создание лейкоцитов, которые могли бы синтезировать необычные белки, мгновенно разрушающие патогенные микроорганизмы или раковые клетки [19].

Другие учёные придумали, как заставить клетку синтезировать белки сразу из нескольких нестандартных (неприродных) аминокислот по заранее заданному сценарию. Достижение продемонстрировала группа специалистов из Кембриджа во главе с Джейсоном Чином. Так как все триплеты уже кодируют какую-либо аминокислоту и три из них являются стоп-кодонами, то, чтобы получить белок сразу с несколькими неприродными аминокислотами, необходимо полностью изменить генетический код – расширить его. Именно это и проделали учёные из Кембриджа. Они заставили рибосомы *Escherichia coli* по-новому прочитывать генетический код, а именно: распознавать нуклеотиды – буквы кода – в группах сразу по четыре, а не по три, как это происходит во всех живых организмах. Таким образом, было получено 256 комбинаций нуклеотидов, из которых большинство не соответствовали каким бы то ни было существующим аминокислотам. Для этого помимо мутантной пары тРНК/тРНК-синтетаза была использована мутантная рибосома Q1, способная распознавать мРНК квадрофлектами. Рибосома была получена методом отбора мутантных 16S рРНК на способность распознавать квадрофлекты. Также методом отбора была получена тРНК, имеющая квадрофлет на антикодонной петле [20]. Похожие эксперименты, но без мутантной рибосомы, проделали ещё в 2004 году учёные из Беркли. Они включили в полипептидную цепь сразу 2 неприродные аминокислоты

– гомоглутамин и *O*-метилтирозин. Для этого также необходимо было заставить рибосомы распознавать квадроуплет, но только один – AGGA [21].

Позже биологам удалось проделать опыт с внедрением в белки новой, не стандартной, аминокислоты в организме животного – *Caenorhabditis elegans* [22].

Другие исследователи пошли ещё дальше в создании биологических систем, не встречающихся в природе. Некоторые из них предприняли попытки создания подобия жизни на основе неорганических соединений. Так, Ли Кронин из университета Глазго считает, что комплекс неорганических соединений способен самовоспроизводиться и эволюционировать так же, как это делают клетки из органических веществ. В подтверждение этой теории он выполнил несколько опытов. Свое изобретение Ли называет «неорганические химические клетки» (Inorganic Chemical Cells – iCHELLs) [23]. «Мы пытаемся создать самовоспроизводящиеся, развивающиеся неорганические клетки, которые, по существу, были бы живыми. Вы могли бы назвать это неорганической биологией», – говорит профессор Кронин. Чтобы структуру из множества неорганических веществ можно было назвать клеткой, это образование для начала должно иметь границу – мембрану с избирательной проницаемостью для разных соединений. Мембрана изолировала бы несколько химических процессов внутри клетки, обеспечивала бы энергетический обмен со средой. На роль таких стенок Ли назначил катионообменные полиоксометаллаты. Учёный на опыте показал, что у таких мембран возможно настраивать морфологию, свойства и состав. Эти, подобные клеткам, структуры обладают хиральностью, избирательной проницаемостью для малых молекул и способны на окислительно-восстановительную деятельность (а это потенциальный двигатель для «безуглеродной» жизни). Неорганические аналоги клеток были созданы путём добавления ряда катионов к анионам полиоксометаллатов.

Учёные также утверждают, что вкладывая несколько неорганических мембран друг в друга, можно создавать системы, в которых несколько химических реакций будут идти в строго заданной последовательности.

«Цель проекта – построение сложных химических клеток со свойствами, подобными живым, которые могут помочь нам понять, как возникла жизнь. Ещё этот подход можно использовать для создания технологии, основанной на эволюции в материальном мире, своего рода неорганической биотехнологии», – поясняет Кронин. Его успех также стал бы дополнительным подкреплением теории о возможности существования где-нибудь во Вселенной жизни не на основе углерода.

Работы такого направления – создание живых систем из небιοгенных компонентов – служат в основном для теоретических целей, помогают

понять нам, что же такое жизнь и возможна ли жизнь на основе чего-то иного, нежели обычные аминокислоты и нуклеотиды. Практическое же применение обещает нам второе направление синтетической биологии – создание организмов с заданными свойствами.

Практических приложений новой науки видится масса. Более 100 лабораторий по всему миру занимаются синтетической биологией. Однако работы в этой области разобщены. Над их систематизацией работает биолог Дрю Энди из Массачусетского технологического института [24]. Сейчас в Массачусетском технологическом институте создали и систематизировали уже более 140 так называемых биокирпичей (BioBrick) – фрагментов ДНК, чья функция строго определена и которые можно внедрить в геном клетки для синтеза заранее известного белка. И их количество возрастает каждый месяц. Дрю Энди охотно показывает посетителям своей лаборатории ящичек с колбами, заполненными густыми жидкостями. В каждой колбе – строго определенный фрагмент ДНК, функция которого определена. Его можно внедрить в геном клетки, и та начнёт синтезировать заранее известный белок.

Любопытно, что один из созданных Энди кирпичиков – это генетический аналог компьютерного оператора «НЕ». Когда на его входе высокий сигнал (определённые молекулы), то на выходе – низкий уровень синтеза определённого белка. И наоборот: химический сигнал на входе низкий – высокий сигнал (то есть синтез белка) – на выходе. Другой биокирпичик спроектирован так, что является биохимическим оператором «И». То есть он имеет два химических входа и синтезирует белок, только когда сигнал есть на каждом из них одновременно. Комбинируя эти фрагменты ДНК, можно сделать живой оператор «НЕ-И», а из Булевой алгебры известно, что из должного числа таких операторов можно организовать любую логическую схему, реализующую любые двоичные вычисления. Учёные стремятся создать обширный генетический банк, позволяющий конструировать любой нужный организм (по аналогии с созданием электронной схемы из промышленных транзисторов и диодов). Возможным стало бы, к примеру, создание генно-инженерных бактерий, которые дёшево производили бы дефицитные сложнейшие лекарства в промышленных объемах. При этом, что важно, adeпты синтетической биологии намерены прийти к такому положению дел, когда любой необходимый организм биологии-синтетики создавали бы, пользуясь набором генетических последовательностей из обширного банка генов. Это должно напоминать создание электронной схемы из промышленных транзисторов и диодов. Человек, собирающий новую схему, даже не обязан знать, что у этих деталей внутри и принцип, по которому они действуют.

Ему важно только знать характеристики используемой детали – что имеем на входе, и что – на выходе. Можно будет проектировать живые системы, которые ведут себя предсказуемым (и заказанным по желанию) образом и используют взаимозаменяемые детали из стандартного набора кирпичиков жизни [25].

Дальнейшее продвижение идеи тормозится одной сложностью. Поместив сконструированную ДНК в некую клетку, мы, невольно, заставляем взаимодействовать новые последовательности с теми, что имеются у исходной клетки, точнее – со всеми их метаболитами и генопродуктами. Сложность заключается и в том, что очень многие сконструированные фрагменты ДНК при внедрении в генетический код клетки-реципиента уничтожают её. Трудность возникает и с системой рестрикции клетки реципиента, но это можно решить определённым образом метилировав сконструированную ДНК.

Кроме создания банков с уже существующими генами, ведутся и исследования по созданию новых генов. Так, учёные из Принстона сконструировали несколько несуществующих в природе генов, которые кодируют белки, не встречающиеся в живых организмах [26]. Эти гены удалось заставить заработать в живых бактериях, причём, взамен удалённых из микроорганизмов критически важных генетических фрагментов. В своей работе исследователи воспользовались компьютером, чтобы сконструировать более миллиона ранее не существовавших, но при этом стабильных белков. Далее для них спроектировали искусственные гены, которые успешно были синтезированы в пробирке.

Следующим шагом стала проверка функциональности протеинов. Для этого учёные создали несколько штаммов бактерий, у которых удалили по одному жизненно важному гену, в том числе те, что отвечали за выживание в тяжёлых условиях (при нехватке пищи). На место удалённых фрагментов кода бактериям пересадили гены из синтетической библиотеки. В колониях бактерий, которые с частично искусственным кодом не просто выжили, а стали расти и размножаться, сконструированные с нуля гены обеспечили нормальные биологические функции.

Итак, некоторые синтезируемые микробами «по новым чертежам» белки оказались вполне работоспособными. Впоследствии в одном из штаммов учёные удалили и вовсе сразу четыре гена, которые удалось успешно заменить четырьмя генами из новой библиотеки. Эта замена составила 0,1 % от всего генома кишечной палочки.

Еще одну интересную работу в области синтетической биологии осуществил в 2004 году Альберт Либчейбер с коллегами из университета Рокфеллера (Rockefeller University). Они создали синтетическую «клетку», способную к работе с настоящими генами. Отдельные элементы этих

«клеток», названных «биореакторами-пузырьками», взяты от живых организмов, однако целое – это все же синтетическое, сконструированное образование [27 – 29]. Стенки клетки были собраны из фосфолипидов куриного яйца. Факторы инициации, элонгации и терминации трансляции, 70S РНК и тРНК были взяты у *E. coli*. РНК-полимераза была взята у фага Т7. Понадобились, естественно, 20 аминокислот и 4 азотистых основания. Наконец, сам ген внедрили в «биореактор», позаимствовав его от медузы *Aequorea victoria*. Это был ген зелёного флуоресцентного белка – GFP.

Ген экспрессировался, белок начал синтезироваться (при этом, флуоресцируя зелёным цветом), показав, что искусственная клетка заработала, как живая. Другой внедрённый ген (ген  $\alpha$ -гемолизина порообразующего белка *Staphylococcus aureus*) заставил синтетические клетки формировать поры в своей оболочке.

Либчейбер подчеркивает, что эти клетки – всё же ещё не живые. Они не могут самостоятельно поддерживать своё существование и размножаться. Потому для них и придумали обозначение «биореактор». Однако эта работа – очень важный шаг в развитии синтетической биологии, цель которой – создание полноценной искусственной жизни.

Приоритетной сферой применения искусственных живых систем станут работы, где придётся иметь дело с опасными для жизни химическими веществами. Недавно, Хомм Хеллинга из Университета Дьюка сумел перенастроить природные сенсорные белки *E. coli* на связывание ТНТ или другого вещества вместо привычных для этой бактерии соединений [30]. Теперь Хеллинга намеревается создать биологический миноискатель.

Джей Каслинг, возглавляющий в Национальной лаборатории Лоуренса в Беркли отдел синтетической биологии, сообщил, что он встроил в *E. coli* сложную цепь из генов полыни и дрожжей. Эта конструкция инициировала синтез аморфа-4,11-деина – предшественника артемизинина, нового противомаларийного лекарственного вещества [31]. По словам Каслинга, за три года работы выход продукта удалось увеличить в миллион раз. «Ещё немного – и мы сможем производить «коктейль» на основе двух производных артемизинина по цене в 10 раз меньшей, чем нынешняя» – полагает Каслинг. Слегка модифицировав бактерию, можно будет получать дорогостоящие химические соединения, используемые в косметической промышленности, а самое главное – противораковый препарат таксол.

Исследователи пытаются использовать *E. coli* в работах по уничтожению ядерных отходов, биологического и химического оружия (биоремедиация). «Мы сконструировали *E. coli* и *Pseudomonas aeruginosa*, способные адсорбировать на клеточной стенке тяжёлые металлы, уран и плутоний, – сообщает Каслинг. – Насытившись опасными металлами, они выпадают в осадок, и в итоге мы получаем чистую воду» [32].



Учёные из Лаборатории микробиологической инженерии японского университета Китасато взяли уже существующие бактерии и просто удалили из их генома все «лишние» части, превратив живой организм в микроскопическую химическую фабрику. Такой способ выглядит более перспективным; возможно, он будет гарантировать, что получившаяся бактерия-фабрика будет выполнять все операции правильно [33].

Для опытов учёные взяли бактерии вида *Streptomyces*, которые уже давно используются в индустриальном производстве. В природных условиях эти бактерии обитают в почве, различные химические соединения которой воздействуют на разные функции *Streptomyces*. Так, при определенных обстоятельствах эти микроорганизмы могут выделять вещества, которые используются при лечении вирусных инфекций, раковых опухолей и грибковых заболеваний. Эти вспомогательные функции бактерий носят название «вторичный метаболизм». Исследования японских биологов позволили выделять участки отвечающего за него генома и удалять их. Кроме того, был удалён и ряд других генов, ответственных за побочные процессы в организме *Streptomyces*. В результате получилась «чистая» бактерия, в которой протекает лишь единственный «базовый» метаболический процесс. При этом размер генома бактерии сократился на 20 %.

Дальнейшие опыты японских учёных показали, что в такую «голую» бактерию можно встраивать только одну отдельную «функцию». При этом расход энергии, направленной на неё, возрастает, а значит, растёт и эффективность выработки того или иного лекарственного препарата.

Эта работа отнюдь не единственная по уменьшению генома бактерий. Так, большая группа учёных из США, Германии и Венгрии в течение многих лет занималась искусственной оптимизацией генома *Escherichia coli* K-12, удаляя из него «всё лишнее». Работа увенчалась успехом, о чём исследователи сообщили в номере журнала «Science» [34]. «Лишние» гены удалялись разными способами. Во-первых, удалению подлежали гены, имеющиеся только у некоторых, но не у всех известных штаммов. Во-вторых, удалялись все мобильные генетические элементы (МГЭ) и повторяющиеся последовательности (повторы в нуклеотидных последовательностях ДНК опасны тем, что могут слипаться друг с другом, образуя петли, что провоцирует спонтанные геномные перестройки). Удалялись также все гены, необходимые для контролируемых геномных перестроек – например, для обмена генетическим материалом с другими бактериями. На выброс шли и гены, участвующие в образовании всяких внешних придатков, таких как жгутики – органы передвижения (промышленным штаммам *E. coli* двигаться не обязательно). После каждой очередной «ампутации» бактерий тестировали на стандартных лабораторных средах, следя за тем, чтобы не снижалась их жизнеспособность.

В итоге удалось получить несколько линий с радикально сокращённым геномом (в общей сложности удалили 14 – 15 % генома – около 700 генов из 4 434 – около 700 тыс. п. о. из 4,6 млн.). Некоторые МГЭ успели за время экспериментальной работы размножиться и перепрыгнуть на новые места, так что их пришлось удалять повторно, но в конечном счёте результат превзошёл все ожидания. Удалось полностью очистить геном кишечной палочки от МГЭ, что привело к радикальному снижению мутагенеза и повышению стабильности генома. В оптимизированную кишечную палочку стали последовательно внедрять различные используемые в промышленности генные конструкции, и оказалось, что стабильность «трансплантантов» резко возросла.

Можно ожидать, что широкое использование в биотехнологическом производстве новых штаммов бактерий, избавленных от «всего лишнего», даст заметный экономический эффект. Не исключено, что данное достижение – лишь один из первых шагов на пути создания искусственных живых существ (или биороботов), геномы которых будут полностью проектироваться человеком.

#### **Химический синтез полных геномов**

Кроме синтеза отдельных генов и сокращения геномов в последнее десятилетие стало развиваться ещё одно направление синтетической биологии – химический синтез полных геномов организмов из синтетических нуклеозидтрифосфатов. Началом этого направления послужила работа группы учёных из университета Стони Брук. В 2002 году в Нью-Йорке группой учёных под руководством профессора Экхарда Виммера был синтезирован геном вируса полиомиелита (*Poliovirus*), длиной около 7 500 нуклеотидов [35]. Структура генома вируса полиомиелита уже давно установлена. По известной последовательности нуклеотидов в молекуле РНК легко выстраивается комплементарная ей молекула ДНК (сDNA). Это было целесообразно сделать, поскольку синтезаторы, в основном, настроены на синтез именно ДНК. Правда, обычно такие приборы синтезируют цепочки длиной в 50 – 100 нуклеотидов, но учёные университета Стони Брук заказали коммерческим лабораториям, которые занимаются таким синтезом, множество цепочек, состоящих из 60 нуклеотидов. Затем они сшивались между собой. РНК-копия этой молекулы была получена по стандартной методике с помощью фермента «обратная транскриптаза». Синтезированную молекулу РНК вводили в экстракт белков, полученных из разрушенных клеток. Методика получения такого экстракта разработана доктором Виммером ещё в 1991-м году и в данном случае была применена для того, чтобы доказать возможность решить проблему биосинтеза вируса, не используя полноценных клеток. В этом белковом экстракте под влиянием

искусственно полученной РНК был зарегистрирован биосинтез новых полноценных частиц вируса полиомиелита. Тесты со специфическими антителами (CD155-специфические антитела) показали, что синтетический вирус имеет биохимические характеристики полиовируса. Более того, «новый» вирус оказался способным вызывать при введении в мозг мышей паралитические заболевания, сходные с полиомиелитом человека, т. е. обладал вирулентностью. И, хотя вирус не является в полной мере живым объектом, эта работа навела исследователей на мысль о принципиальной возможности функционирования и более сложных организмов с полностью синтетическим геномом.

Предпринятая в 2007 году первая попытка создания искусственного генома бактерии заключалась в синтезе хромосомы *Mycoplasma genitalium* длиной 582 970 п. о. По разработанной Крейгом Вентером и его командой методике перекрывающиеся кассеты, размером 5 – 7 тыс. п. о., собранные из химически синтезированных полинуклеотидов, последовательно объединялись при помощи ферментов (лигаз) во фрагменты размером 24, 72 и 144 тыс. п. о. (1/24, 1/8 и 1/4 генома, соответственно). Полная сборка генома из четырёх составляющих осуществлена рекомбинацией в клетке *Saccharomyces cerevisiae*. Секвенирование полученной хромосомы подтвердило точность синтеза. В качестве прототипа использовалась бактерия *M. genitalium* подвида G37 (образец MG408), патогенная активность которой была блокирована специальным маркером. Для идентификации искусственного генома в ДНК были внедрены нуклеотидные последовательности, называемые «водяными знаками» (англ. *watermark*) [36].

В дальнейших экспериментах от бактерий *M. genitalium* в качестве генетического прототипа пришлось отказаться из-за характерной для них чрезвычайно низкой скорости роста. В исследованиях, проведенных в 2010 году, в качестве прототипа использовался геном *Mycoplasma mycoides* подвида *capri* (GM12), а в качестве реципиента – *Mycoplasma capricolum* подвида *capricolum* (СК).

В целях отработки технологии переноса хромосом из клетки дрожжей в клетку-реципиент были разработаны методы клонирования целых хромосом в виде дрожжевых центромерных плазмид [37]. В качестве объекта экспериментов использовалась естественная хромосома *M. mycoides*. Однако первые попытки переноса хромосомы *M. mycoides* в клетку *M. capricolum* окончились неудачей. Как выяснилось, проблема состояла в системе рестрикции бактериальных клеток. Системы рестрикции *M. mycoides* и *M. capricolum* одинаковы, в них ДНК метилирована, и при непосредственном переносе хромосомы из одной клетки в другую проблем не возникает. ДНК, клонированная в дрожжах, не метилирована

и при переносе в *M. capricolum* подвергается уничтожению со стороны системы рестрикции. Во избежание этого донорская ДНК метилировалась очищенной метилазой или экстрактом из *M. mycoides* или *M. capricolum*, либо система рестрикции клетки-реципиента просто разрушалась. Геном был добавлен в культуру бактерий *M. capricolum*. В геном *M. mycoides* были внесены особые метки, в том числе гены устойчивости к антибиотикам, чтобы легче было потом определить, успешно ли прошла трансплантация. Спустя недолгое время среди клеток *M. capricolum* появились бактерии с признаками *M. mycoides*. Обработав культуру бактерий антибиотиком, учёные уничтожили тех микробов, которые не вобрали в себя чужую ДНК, а оставшихся подвергли тщательному изучению. По всем признакам это были самые настоящие *M. mycoides*. Ни генов, ни белков, характерных для исходного вида *M. capricolum*, у них обнаружить не удалось. Антитела, избирательно реагирующие на поверхностные белки *M. capricolum*, не прикреплялись к этим микробам, в отличие от антител, распознающих поверхностные белки *M. mycoides* [38].

Все это свидетельствует о том, что пересадка генома полностью удалась. Авторы предполагают, что бактерии «проглатывали» чужую молекулу ДНК (трансформация), и в первый момент в них, вероятно, содержались оба генома вместе. Когда такая клетка делилась, одна из дочерних клеток получала геном *Mycoplasma capricolum*, а другая – геном *Mycoplasma mycoides*. Последующая обработка антибиотиком уничтожила клетки первого типа.

Вторая попытка синтезировать бактериальный геном была предпринята в 2010 году. В качестве прототипа была выбрана хромосома бактерии *Mycoplasma mycoides* (подвид *capri* GM12) объёмом 1,08 млн. нуклеотидных пар. Этот искусственный геном получил кодовое обозначение JCVI-syn1.0. Для работы были использованы два генома: CP001621 (база данных GenBank), секвенированный группой Дж. Гласса из Института Крейга Вентера в 2007 году, и трансгенный геном CP001668, секвенированный группой Кэрл Лартик в 2009 году. На базе образца CP001621 были синтезированы кассеты, использованные для дальнейшего синтеза. По окончании секвенирования образца CP001668 была произведена сверка, обнаружившая различия в 95 фрагментах. Различия, признанные биологически значимыми, были скорректированы в уже синтезированных кассетах. 19 различий, не влияющих на жизнедеятельность бактерии, были оставлены без изменений. В четырёх областях генома, которые не являются жизненно важными, сформированы 4 метки WM1 – WM4 длиной 1 246, 1 081, 1 109 и 1 222 п. о., соответственно. Полученная геновая последовательность *M. mycoides* JCVI syn1.0 была занесена в базу GenBank под кодом CP002027.

После этого была произведена пересадка синтетического генома *M. mycoides* в *M. capricolum* по отработанной на естественных геномах методике. Таким образом, была получена бактерия, которая полностью управляется химически синтезированным геномом [39].

Синтетический геном обошёлся в 40 000 000 \$, над ним работали 20 человек в течение 10 лет.

В настоящее время команда Крейга Вентера работает над созданием *Mycoplasma laboratorium* – организма с минимальным геномом [40]. Команда намеревается синтезировать последовательность ДНК хромосомы, состоящую из 382 генов (у *Mycoplasma genitalium* 482 гена и 583 000 п. о.). Как только версия минимальной хромосомы с 382 генами будет синтезирована, её пересадят в клетку *Mycoplasma genitalium*, чтобы создать *Mycoplasma laboratorium*. Предлагаемый гипотетический минимальный набор генов должен включать следующие жизненно важные генетические системы микроорганизмов: гены трансляции, репликации, репарации, транскрипции; гены, контролирующие анаэробный метаболизм; гены биосинтеза липидов; гены системы транспорта белков; набор генов, обеспечивающих транспорт метаболитов; полный набор генов утилизации нуклеотидов и гены их биосинтеза. Гены биосинтеза аминокислот микроорганизмам-паразитам не нужны.

Предполагаемая бактерия *Mycoplasma laboratorium*, как ожидают, будет в состоянии копировать себя со своей искусственной ДНК, хотя молекулярная «машина» и химическая окружающая среда, которая позволила бы это делать, не являются синтетическими.

ЕщёодноважноедостижениеинститутаКрейгаВентера–метагеномный анализ океанической воды [41]. Сотрудники института Крейга Вентера методом метагеномного анализа открыли в рамках программы «Global Ocean Sampling» 40 млн. (!) новых генов. Крейг говорит: «Я описал их как строительный материал для будущего. Когда мы проектируем организмы для нужд производства пищи, топлива или каких-то химпрепаратов, то есть для всего, что может потребоваться в повседневной жизни, эти «строительные материалы» обретают все большее значение. Сейчас мы пока ещё остаёмся на первобытном уровне. Прямой связи между тем, что мы открываем в океане, и чем-то, что мы делаем в лаборатории, пока ещё нет, но все эти вещи имеют непосредственную связь с будущим».

Вентер надеется, в конечном счёте, синтезировать бактерии, чтобы производить водород и биотопливо, а также поглощать углекислый газ и другие парниковые газы. Он говорит по поводу своих научных планов: «Вместе с компанией «Еххон Mobil» мы работаем над проектом, в котором клетки водорослей должны питаться двуокисью углерода и преобразовывать её в длинные углеводородные цепочки. По сути, эти водоросли должны

давать «сырую бионефть», из которой на нефтеперегонных заводах можно будет получать бензин, дизтопливо или авиационный керосин. Для того, чтобы добиться экономического эффекта, на такой основе нужно строить огромные фермы, простирающиеся на многие километры и выдающие тысячи тонн горючего в год. Это требует серьёзного размаха. Наша исследовательская программа должна подтолкнуть работы в научной и инженерной областях» [42].

### **Синтетическая биология и вопросы биологической этики**

Группа учёных из JCVI уже успела оформить американский патент на «минимальный бактериальный геном», которого достаточно для поддержания жизни одноклеточного организма, и подала заявку на аналогичный международный патент, где перечислены более 100 стран, в которых он должен защищать права института на данный код.

Пэт Муни, директор канадской организации «ETC Group», занимающейся вопросами биоэтики и опасности некоторых научных достижений для природы и общества смотрит на эти события с тревогой. Пэт говорит: «Крейг Вентер и его коллеги нарушили социальные границы, и общественность даже не имела возможности обсудить далеко идущие социальные, этические и экологические последствия появления синтетической жизни». Подразумевается и «соперничество с Богом», и банальное попадание новых организмов в окружающую среду с неясными последствиями для планеты. Муни считает, что Вентер должен отозвать патент, а патентные ведомства закрыть данные по этому геному – от греха подальше.

Эта позиция, к слову, входит в противоречие с взглядами некоторых сторонников синтетической биологии, полагающих, что все новые геномы, придуманные учёными, должны становиться достоянием всего человечества и использоваться совершенно свободно, без прав какой-то отдельной группы на данные «коды жизни».

«Мы пробуем создать новую систему ценностей для жизни. Ведя дело в таком масштабе, вы не можете ожидать, что каждый будет счастливым», – заочно парирует и те и другие выпады Вентер. Ну что ж, время рассудит, кто прав, а кто – нет... А нам остаётся только ждать результатов будущих исследований.

### **Благодарности**

Автор выражает искреннюю благодарность Екатерине Владимировне Гончаренко за оказанную помощь в оформлении и редактировании статьи, а также за вдохновение при её подготовке.

## Литература

1. *Synthetic biology: applying engineering to biology*. Report of a NEST high-level expert group. – Luxembourg: European Communities. – 2005. – 44 p.
2. *Benner S. A., Sismour A. M.* Synthetic biology // *Nature*. – 2005. – V. 6. – P. 533 – 543.
3. *Piccirilli J. A., Krauch T., Moroney S. E., Benner S. A.* Enzymatic incorporation of a new base pair into DNA and RNA extends the genetic alphabet // *Nature*. – 1999. – V. 4. – P. 8322 – 8323.
4. *Chaput J. C., Szostak J. W.* TNA synthesis by DNA polymerases // *J. Am. Chem. Soc.* – 2003. – P. 9274 – 9275.
5. *Chaput J. C., Ichida J. K., Szostak J. W.* DNA polymerase-mediated DNA synthesis on a TNA template // *J. Am. Chem. Soc.* – 2003. – P. 856 – 857.
6. *Gao J., Liu H., Kool E. T.* Assembly of the complete eight-base artificial genetic helix, xDNA, and its interaction with the natural genetic system // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2005. – V. 44. – P. 3118 – 3122.
7. *Rasmussen S., Chen L., Deamer D., Krakauer D. C., Packard N. H., Stadler P. F., Bedau M. A.* Transitions from nonliving to living matter // *Science*. – 2004. – V. 303 – P. 963 – 965.
8. *Griffiths A. D., Potter B. V., Eperon I. C.* Stereospecificity of nucleases towards phosphorothioate substituted RNA: stereochemistry of transcription by T7 RNA polymerase // *Nucleic Acids Res.* – 1987. – P. 4145 – 4162.
9. *Petersen M., Bondensgaard K., Wengel J., Jacobsen J. P.* Locked nucleic acid (LNA) recognition of RNA: NMR solution structures of LNA: RNA hybrids // *J. Am. Chem. Soc.* – 2002. – V. 124. – P. 5974 – 5982.
10. *Abramov M., Schepers G., Van Aerschot A., Van Hummelen P., Herdewijn P.* HNA and ANA high-affinity arrays for detections of DNA and RNA single-base mismatches // *Biosens. Bioelectron.* – 2008. – V. 23. – P. 1728 – 1732.
11. *Joyce G. F., Schwartz A. W., Miller S. L., Orgel L. E.* The case for an ancestral genetic system involving simple analogues of the nucleotides // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1987. – V. 84. – P. 4398 – 4402.
12. *Orgel L. E.* Some consequences of the RNA world hypothesis // *Orig. Life Evol. Biosph.* – 2003. – V. 33. – P. 211 – 218.
13. *Moran S, Ren R. X-F, Kool E. T.* A thymidine triphosphate shape analog lacking Watson-Crick pairing ability is replicated with sequence selectivity // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1997. – V. 94. – P. 10506 – 10511.
14. *Forster A. C., Church G. M.* Synthetic biology projects in vitro // Cold Spring Harbor Laboratory Press. – 2007. – V. 17. – P. 1 – 6.
15. *Henry A. A., Romesberg F. E.* Beyond A, C, G and T: augmenting nature's alphabet // *Curr. Opin. Chem. Biol.* – 2003. – V. 7. – P. 727 – 733.

16. Appella D. H. Non-natural nucleic acids for synthetic biology // *Curr. Opin. Chem. Biol.* – 2009. – V. 13. – P. 687 – 696.
17. Wang L., Brock A., Herberich B., Schultz P.G. Expanding the genetic code of *Escherichia coli* // *Science*. – 2001. – V. 292. – P. 498 – 500.
18. Chin J. W., Cropp T. A., Anderson J. C., Mukherji M., Zhang Z., Schultz P. G. An expanded eukaryotic genetic code // *Science*. – 2003. – V. 301. – P. 964 – 967.
19. Yang P. L., Schultz P. G. Mutational analysis of the affinity maturation of antibody 48G7 // *J. Mol. Bio.* – 1999. – V. 294. – P. 1191 – 1201.
20. Neumannl H., Wang K., Davis L., Garcia-Alai M., Chin J. W. Encoding multiple unnatural amino acids via evolution of a quadruplet-decoding ribosome // *Nature*. – 2010. – V. 464. – P. 441 – 444.
21. Anderson J. C., Wu N., Santoro S. W., Lakshman V., King D. S., Schultz P. G. An expanded genetic code with a functional quadruplet codon // *PNAS*. – 2004. – V. 101. – P. 7566 – 7571.
22. Greiss S., Chin J. W. Expanding the genetic code of an animal // *J. Am. Chem. Soc.* – 2011. – V. 133. – P. 14196 – 14199.
23. Cooper G. J. T., Kitson P. J., Winter R., Zagnoni M., Long D.-L., Cronin L. Modular redox-active inorganic chemical cells: iCHELLs // *Angew. Chem.* – 2011. – V. 123. – P. 10557 – 10560.
24. Endy D. Foundations for engineering biology // *Nature*. – 2005. – V. 438. – P. 449 – 453.
25. Canton B., Labno A., Endy D. Refinement and standardization of synthetic biological parts and devices // *Nature biotechnology*. – 2008. – V. 26. – P. 787 – 793.
26. Fisher M.A., McKinley K. L., Bradley L. H., Viola S. R., Hecht M. H. De novo designed proteins from a library of artificial sequences function in *Escherichia coli* and enable cell growth // *PLoS ONE*. – 2011. – V. 6. – P. 1 – 9.
27. Noireaux V., Maeda Y. T., Libchaber A. Development of an artificial cell, from self-organization to computation and self-reproduction // *PNAS*. – 2011. – V. 108. – N. 9. – P. 3473 – 3480.
28. Noireaux V. and Libchaber A. A vesicle bioreactor as a step toward an artificial cell assembly // *PNAS*. – 2004. – V. 101. – N. 51. – P. 17669 – 17674.
29. Dubertret B., Skourides P., Norris D. J., Noireaux V., Brivanlou A. H., Libchaber A. In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles // *Science*. – 2002. – V. 298. – P. 1759 – 1762.
30. Looger L. L., Dwyer M. A., Smith J. J., Hellinga H. W. Computational design of receptor and sensor proteins with novel functions // *Nature*. – 2003. – V. 423. – P. 185 – 190.
31. Tsuruta H., Paddon C. J., Eng D., Lenihan J. R., Horning T., Anthony L. C., Regentin R., Keasling J. D., Renninger N. S., Newman J. D. // *High-*



level production of amorpha-4,11-diene, a precursor of the antimalarial agent artemisinin, in *Escherichia coli* // PLoS ONE. – 2009. – V. 4. – P. 1 – 12.

32. Renninger N., Knopp R., Nitsche H., Clark D. S., Keasling J. D. Uranyl precipitation by *Pseudomonas aeruginosa* via controlled polyphosphate metabolism // Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – V. 70. – N 12. – P. 7404 – 7412.

33. Komatsu M., Uchiyama T., Omura S., Cane D. E., Ikeda H. Genome-minimized *Streptomyces* host for the heterologous expression of secondary metabolism // PNAS. – 2010. – V. 107. – N 6. – P. 2646 – 2651.

34. Posfai G., Plunkett G., Feher T., Frisch D., Keil G. M., Umenhoffer K., Kolisnychenko V., Stahl B., Sharma S. S., Arruda M., Burland V., Harcum S. W., Blattner F. R. Emergent properties of reduced-genome *Escherichia coli* // Science. – 2006. – V. 312. – P. 1044 – 1046.

35. Cello J., Paul A. V., Wimmer E. Chemical synthesis of poliovirus cDNA: generation of infectious virus in the absence of natural template // Science. – 2002 – V. 297. – P. 1016 – 1018.

36. Gibson D. G., Benders G. A., Pfannkoch C. A., Denisova E. A., Tillson H. B., Zaveri J., Stockwell T. B., Brownley A., et al. Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome // Science. – 2008. – V.319. – P. 1215 – 1220.

37. Benders G. A., Noskov V. N., Denisova E. A., Lartigue C., Gibson D. G., Garcia N. A., et al. Cloning whole bacterial genomes in yeast // Nucleic Acids Research. – 2010. – V. 38. – N 8. – P. 2558 – 2569.

38. Lartigue C., Glass J. I., Alperovich N., Pieper N., Parmar P. P., Hutchison C. A., Smith H. O., Venter J. Genome transplantation in bacteria: changing one species to another // Science. – 2007. – V. 317. – P. 632 – 638.

39. Gibson D. G., Glass J. I., Lartigue C., Noskov V. N., Chuang R.-Y., Algire M. A., Benders G. A., Montague M. G., Ma L., Moodie M. M., Merryman, et al. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome // Scienceexpress. – 2010. – P. 1 – 7.

40. Glass J. I., Assad-Garcia N., Alperovich N., Yooseph S., Lewis M. R., Maruf M., et al. Essential genes of a minimal bacterium // PNAS. – 2006. – V. 103. – N 2. – P. 425 – 430.

41. Nealson K. H., Venter J. C. Metagenomics and the global ocean survey: what's in it for us, and why should we care? // ISME Journal. – 2007. – V. 1. – P. 185 – 190.

42. Garfinkel M. S., Endy D., Epstein G. L., Friedman R. M. Synthetic genomics. Options for governance. – Rockville: CSIS. – 2007. – 59 p.