

# Основы генной инженерии и биотехнологии

## Лекция 1 Вводная



# Патрушев Лев Иванович

*д.б.н., в.н.с., профессор*

Экспериментальные и теоретические исследования, проводимые в нашей Группе анализа и коррекции генома лаборатории биотехнологии ИБХ РАН:

- ❖ Проблемы мутагенеза
- ❖ ДНК-диагностика на основе ПЦР

# Курс лекций по основам генной инженерии и биотехнологии

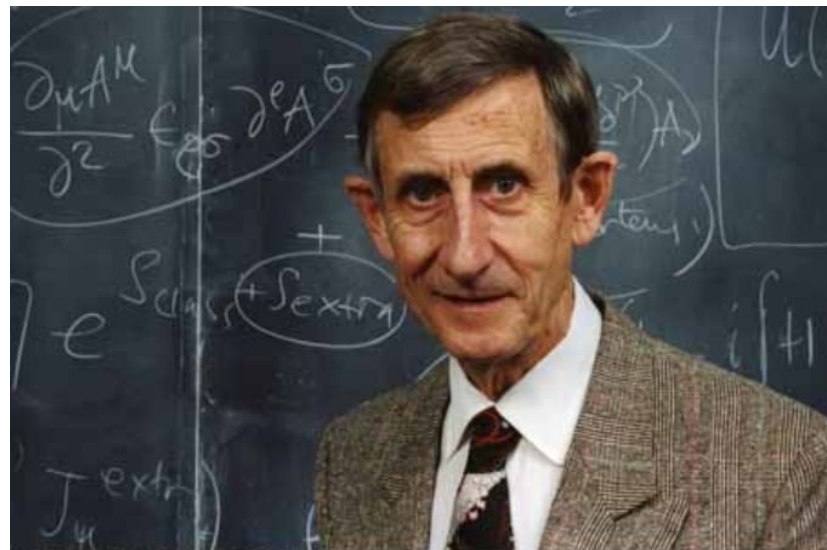
1. Введение в молекулярную биологию и генетику
2. Классическая генная инженерия
3. Полимеразная цепная реакция
4. Исследования генома и транскрипции генов
5. Антисмысловые технологии, аптамеры, рибозимы
6. Генная инженерия в конструировании белков
7. Трансгенные животные
8. Трансгенные растения
9. Рекомбинантные флуоресцирующие белки

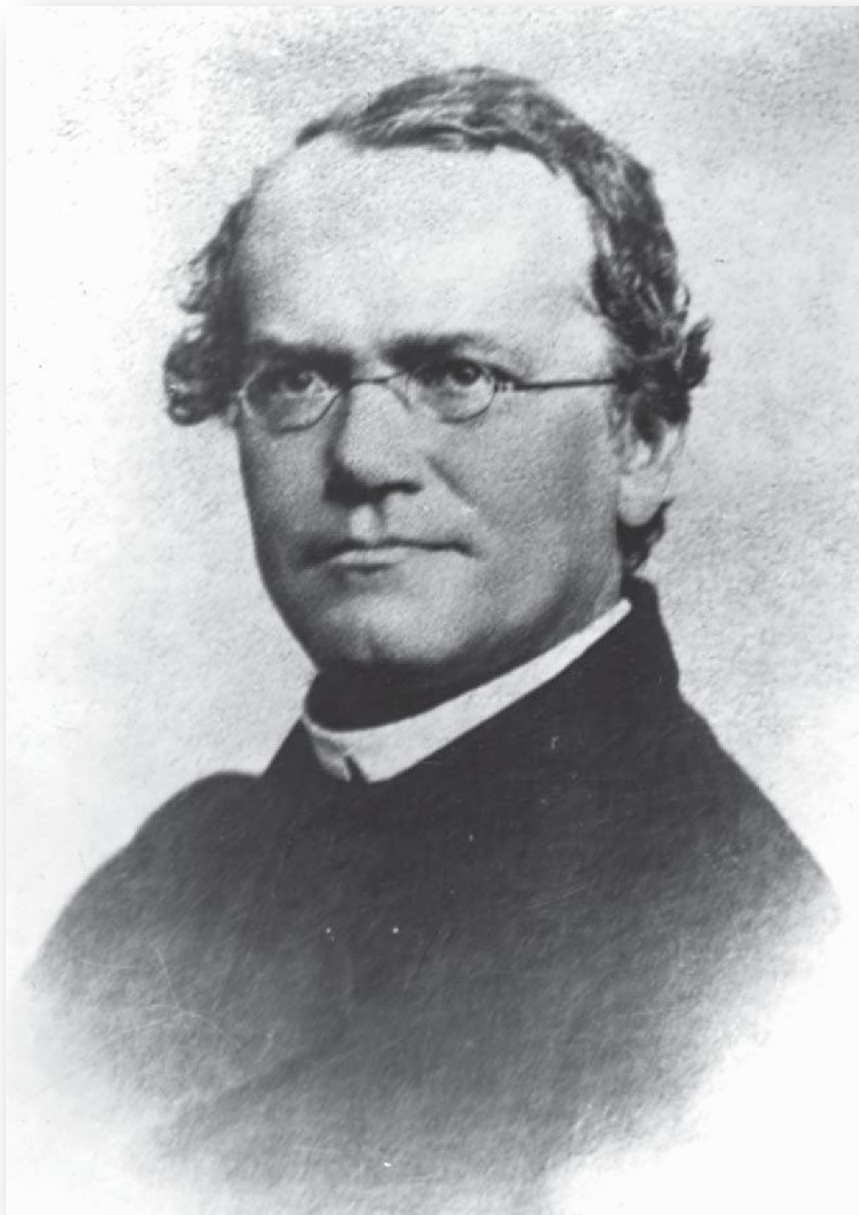
**«Новые направления в науке гораздо чаще создаются с помощью новых методов, а не новых концепций.**

**Новые концепции объясняют известные явления по-новому.**

**Новые методы открывают новые явления, которые необходимо объяснить.»**

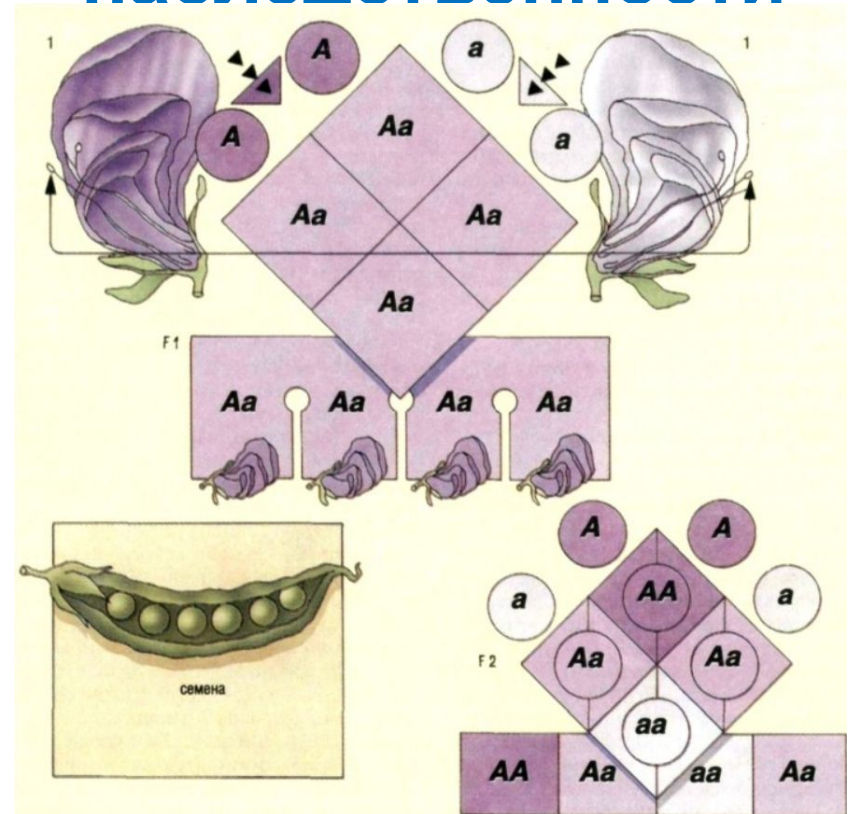
**Freeman J. Dyson**





Грегор Мендель (1822-1884)  
Австрийский священник и  
ботаник

# Генетика – наука о наследственности



Природа с красоты своей  
Покровов снять не позволяет,  
И ты машинами не вынудишь у  
ней, Чего твой Дух не угадает...  
*Владимир Соловьев*

# Три основных направления генетических исследований

## ❖ Классическая генетика

Менделевские принципы наследования, митоз и мейоз, картирование хромосом, механизмы определения пола, цитогенетика

## ❖ Молекулярная генетика

Структура и химия нуклеиновых кислот, клонирование ДНК и геномика, молекулярные механизмы хранения, реализации и воспроизведения генетической информации, мутагенез и репарация ДНК, рекомбинация

## ❖ Эволюционная генетика

Генетика количественных признаков, распределение генов в популяциях, механизмы видообразования



# Что такое «генная инженерия»?

Раздел молекулярной генетики, занимающийся разработкой искусственных генетических систем с использованием манипуляций генами **на молекулярном уровне** путем конструирования **рекомбинантных** ДНК или РНК

*Программа-максимум* генной инженерии – создание жизнеспособного организма *de novo* по чертежам, разработанным в лаборатории - **«синтетическая биология»**

# **Генная инженерия облегчает обмен генами между природными генетическими системами**

- ❖ В классической генетике и селекции – отбор среди потомства по определенным признакам ограничен репродуктивной изоляцией**
- ❖ В генной инженерии при получении трансгенных организмов такие ограничения действуют слабее**



# Клонированная самка муфлона, родившаяся у овцы, использованной в качестве приемной матери



Перенос ядра  
соматической  
клетки погибшего  
муфлона в  
энуклеированную  
яйцеклетку  
овцы

Нормальные  
роды после 155  
дней



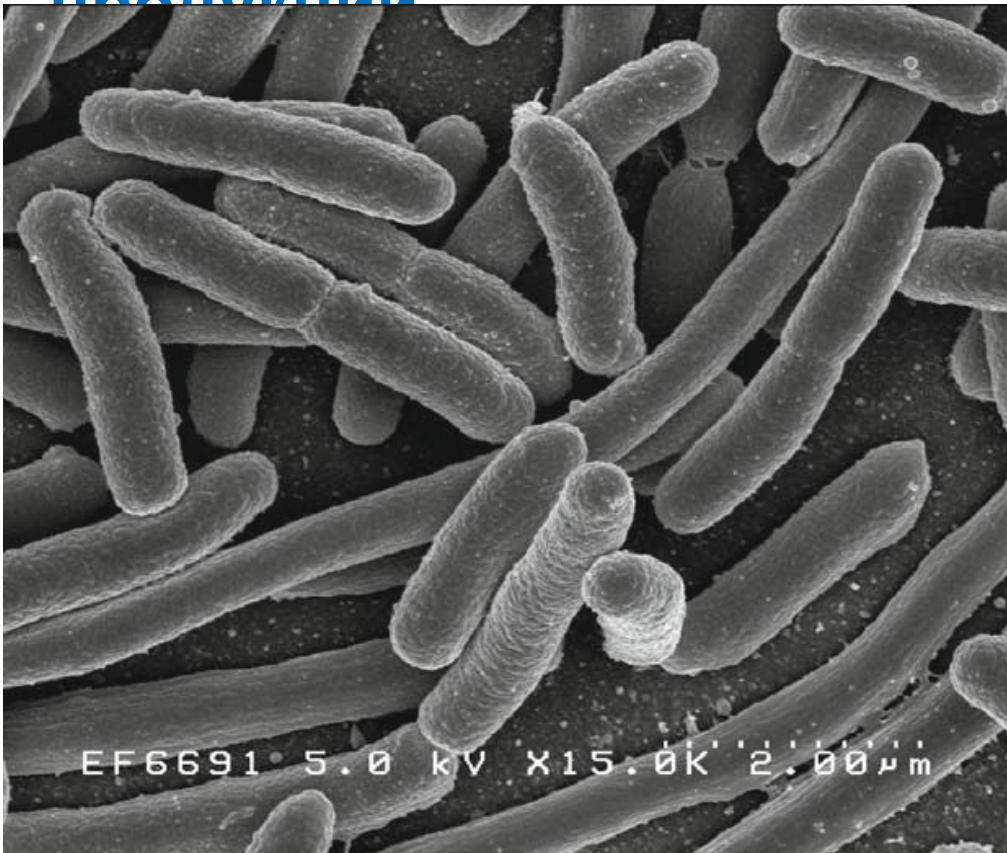
Самец  
муфлона

# Влияние генной инженерии на современную биологию

- ❖ Исследование структуры геномов и индивидуальных генов, выяснение их функций (функциональная геномика)
- ❖ Получение экспрессии рекомбинантных генов в новом генетическом окружении - трансгенез
- ❖ Белковая инженерия
- ❖ Появление технологий, основанных на антисмысловых последовательностях
- ❖ Создание аптамеров, рибозимов и дезоксирибозимов
- ❖ Синтетическая биология

# Биотехнология

Область прикладной биологии, занимающаяся использованием живых организмов и биопроцессов для получения необходимой продукции



1980 – Верховный суд США подтвердил патентоспособность микроорганизмов, изготовленных человеком

Клетки *E.coli* под сканирующим электронным микроскопом

# Промышленная (белая) биотехнология



Производство  
продуктов питания,  
микроорганизмов,  
белков и ферментов,  
ферментативный  
синтез  
низкомолекулярных  
соединений,  
животные- и растения-  
биореакторы, добыча  
редких химических  
элементов,  
сохранение



# Сельскохозяйственная (зеленая) биотехнология Green gene technology (GGT)



Теосинте (*Euchlaena mexicana*)  
и початок GM-кукурузы

- Улучшение потребительских свойств растений
- Устойчивость к патогенам, гербицидам и пестицидам
- Одновременное созревание плодов
- Повышение их стабильности
- 100 млн. га засеяно генетически модифицированными (GM) растениями

# Мочить генных инженеров!



# **Фармацевтическая (красная) биотехнология – Red Biotech**

**Биотехнологическое производство препаратов  
медицинского назначения (витамины, белки и  
пептиды, ДНК-вакцины и т.п.)**

# **Водная (голубая) биотехнология – Blue Biotech**

**Биотехнологическое производство веществ и  
пищевых продуктов из морских и пресноводных  
организмов, контроль их размножения**



# Влияние генной инженерии на современную медицину

- ◆ **Терапевтические нуклеиновые кислоты:**
  - Генотерапия
  - Репарация генов
  - Антисмысловые РНК и олигонуклеотиды
  - Олигонуклеотидные аптамеры
  - ДНК-вакцины
- ◆ **Терапевтические белки (биофарминг):**
  - Инсулин, гормон роста человека, факторы свертывания крови
- ◆ **Терапевтические небольшие молекулы**
  - Антибиотики, хиральные метаболиты, витамины, аминокислоты (метаболическая инженерия)
- ◆ **Фармакогеномика**
  - Предсказание побочного действия лекарств (цитохром P450) и исследование механизма их действия на

# Влияние генной инженерии на современную медицину

## ◆ ДНК-диагностика:

- Наследственные заболевания,
- Инфекционные заболевания,
- Приобретенные заболевания (в том числе рак),
- **Диагностические белки:**
- Маркеры заболеваний человека и животных

## ◆ Животные, моделирующие заболевания человека

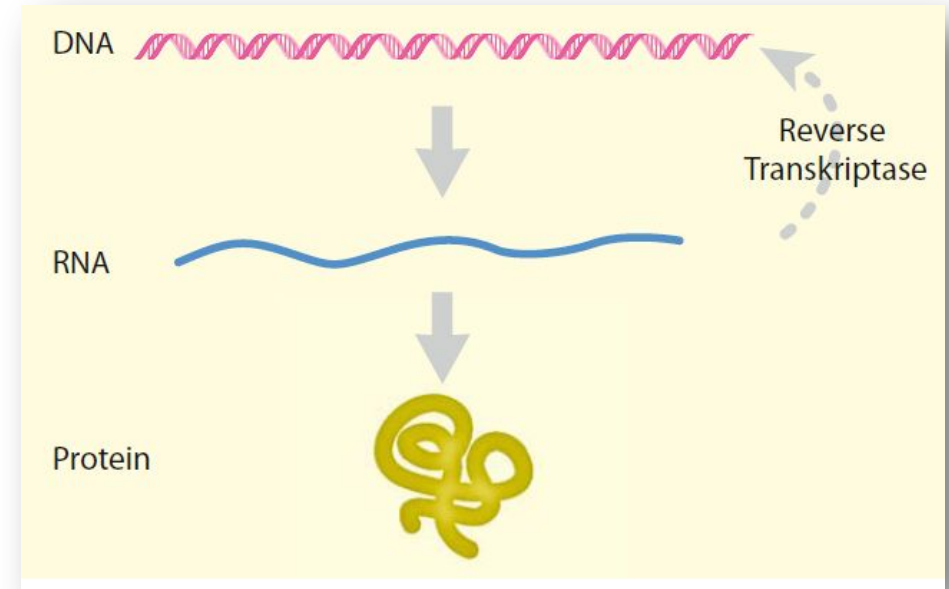
- Рак, атеросклероз, ожирение, аутоиммунные заболевания и т.п.

## ◆ Рекомбинантные вакцины, ДНК-вакцины

- Гепатит В – экспрессия антигена на поверхности клеток дрожжей

# Центральная догма молекулярной биологии

- В живом организме генетическая информация передается от ДНК через РНК к белку
- В специальных случаях (*обратной транскрипции*) имеет место передача информации от РНК к ДНК
- Одноцепочечную ДНК можно транслировать рибосомами *in vitro* в присутствии аминокликозидных

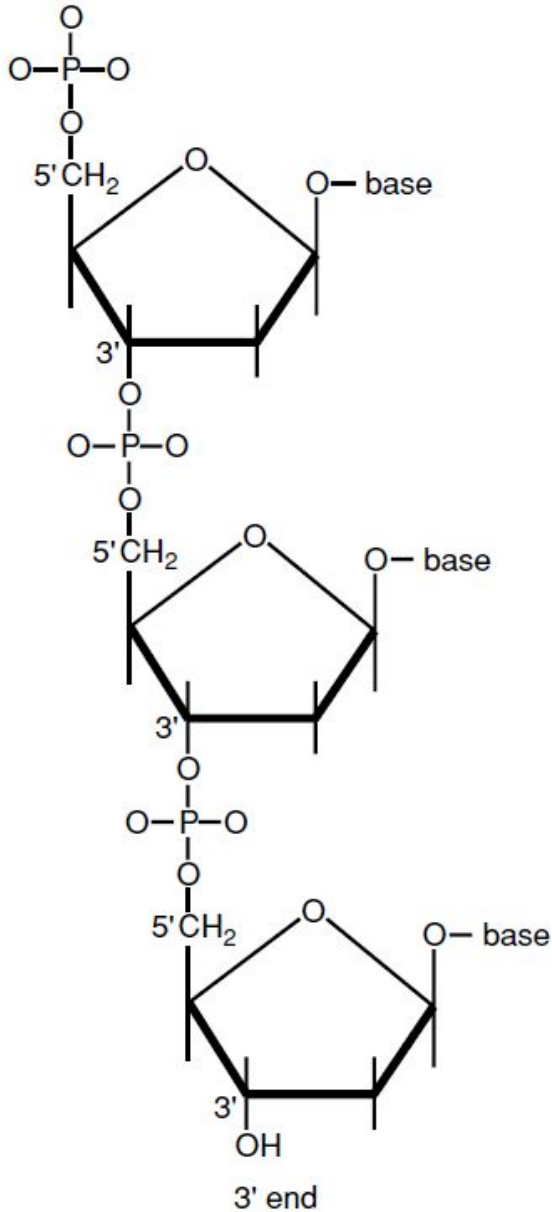


<b>General</b>	<b>Special</b>	<b>Unknown</b>
DNA → DNA	RNA → DNA	protein → DNA
DNA → RNA	RNA → RNA	protein → RNA
RNA → protein	DNA → protein	protein → protein

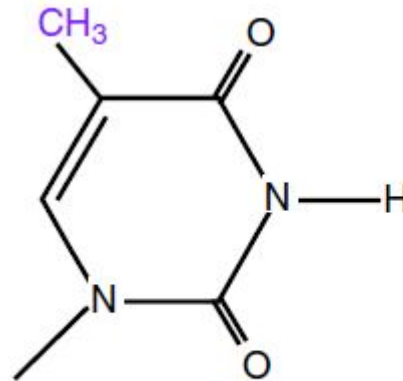
Три способа передачи генетической информации в живых организмах, предполагаемых ЦДМБ

# ДНК и РНК

5' end

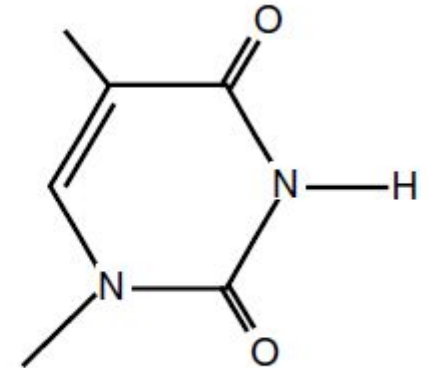


Сахаро-фосфатный остов  
ДНК

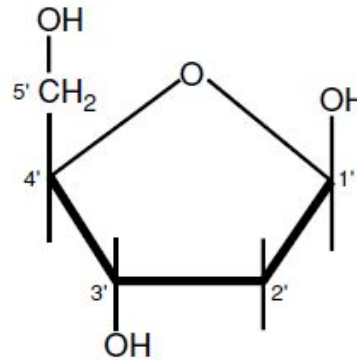


Thymine

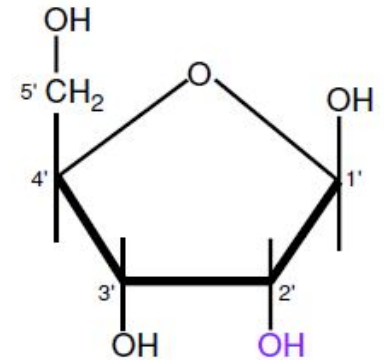
(5-метилурацил)



Uracil



Рибоз  
а



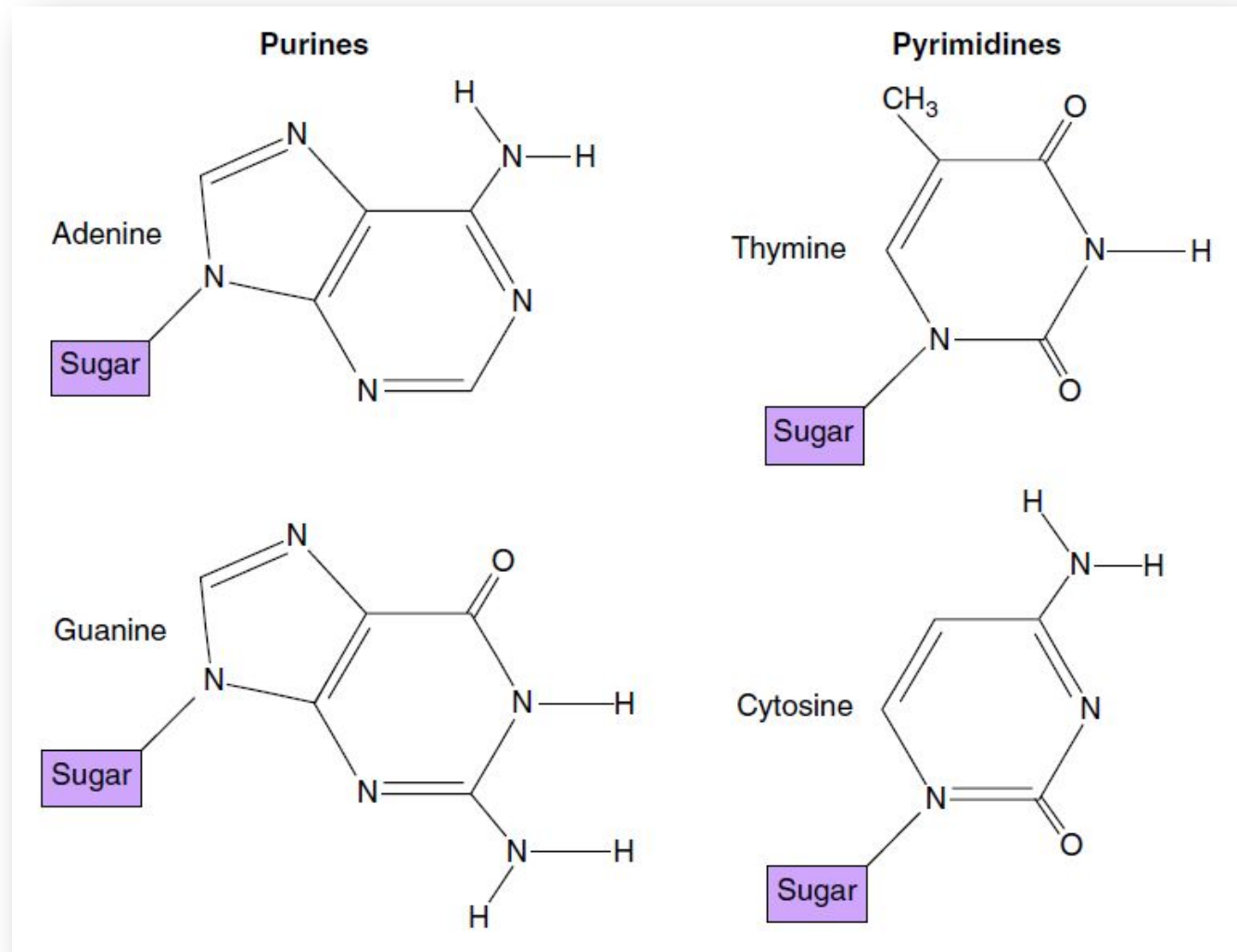
Дезоксирибо  
за

# Пуриновые и пиримидиновые основания ДНК

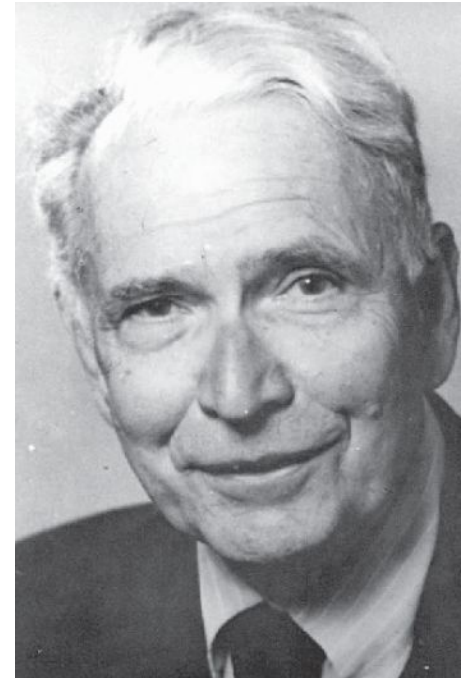
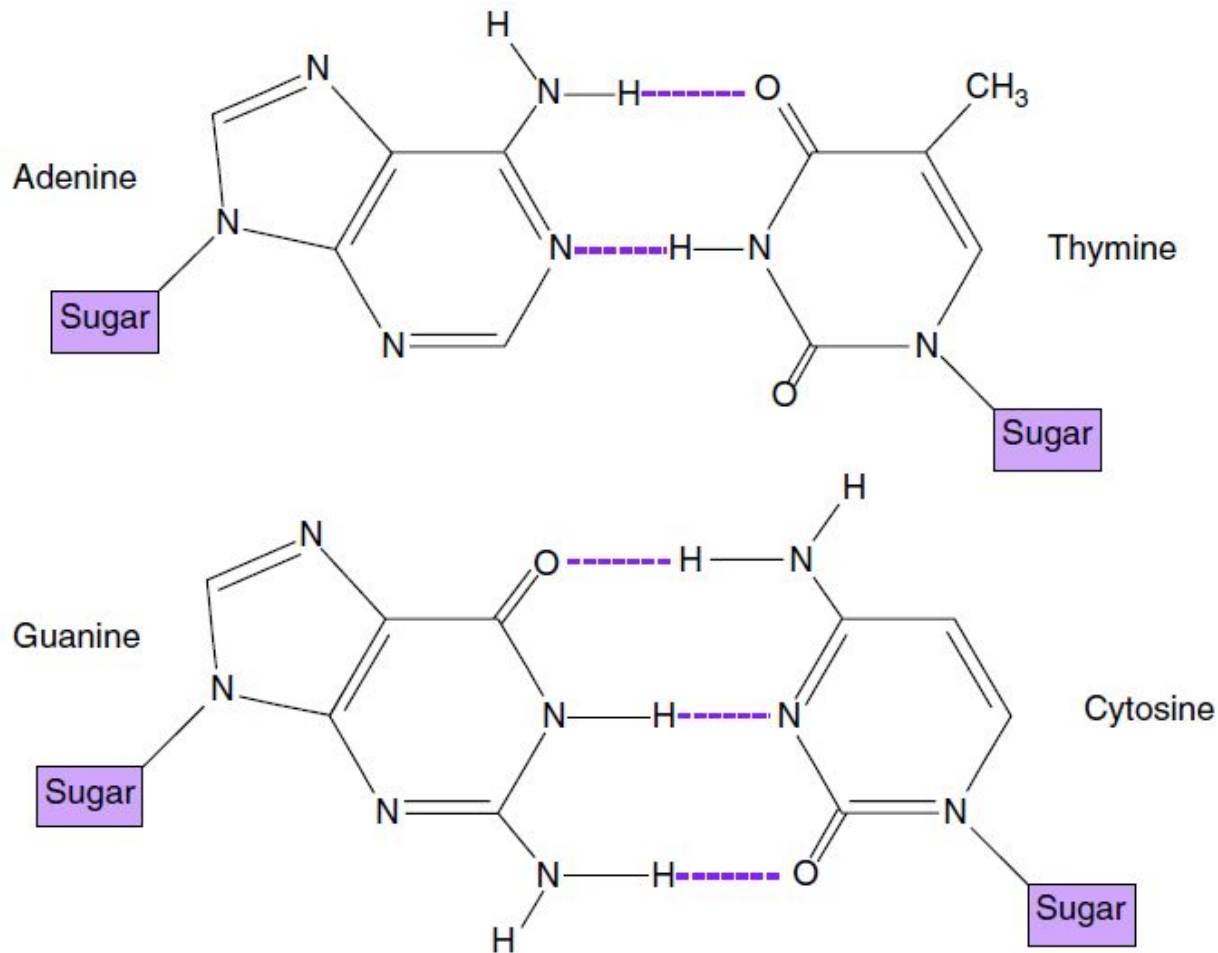
Азотистые основания

Гетероциклические ароматические химические соединения

У пуринов молекула пиримидина объединена с кольцом имидазола



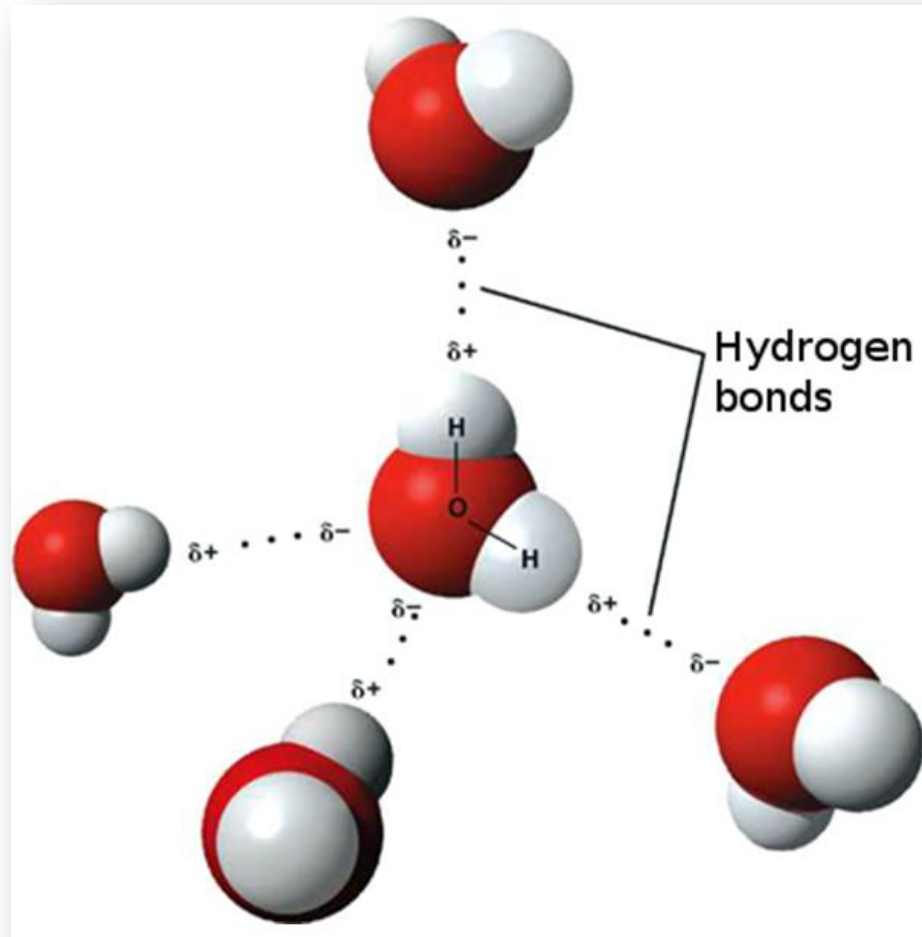
# Комплементарные взаимодействия



**Erwin Chargaff**

**Азотистые основания, соединяясь ковалентной связью с 1'-атомом рибозы или дезоксирибозы, образуют N-гликозиды, которые называют нуклеозидами**

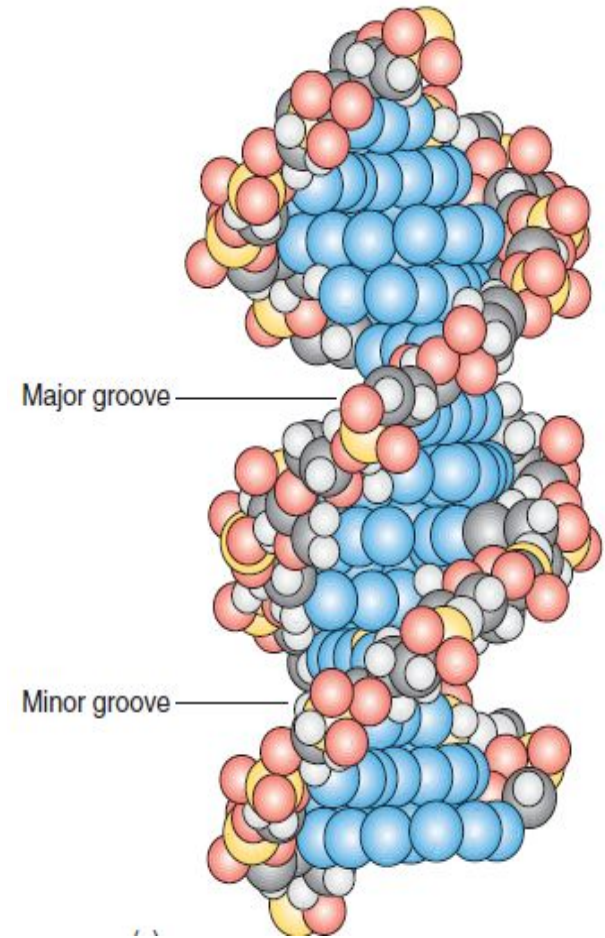
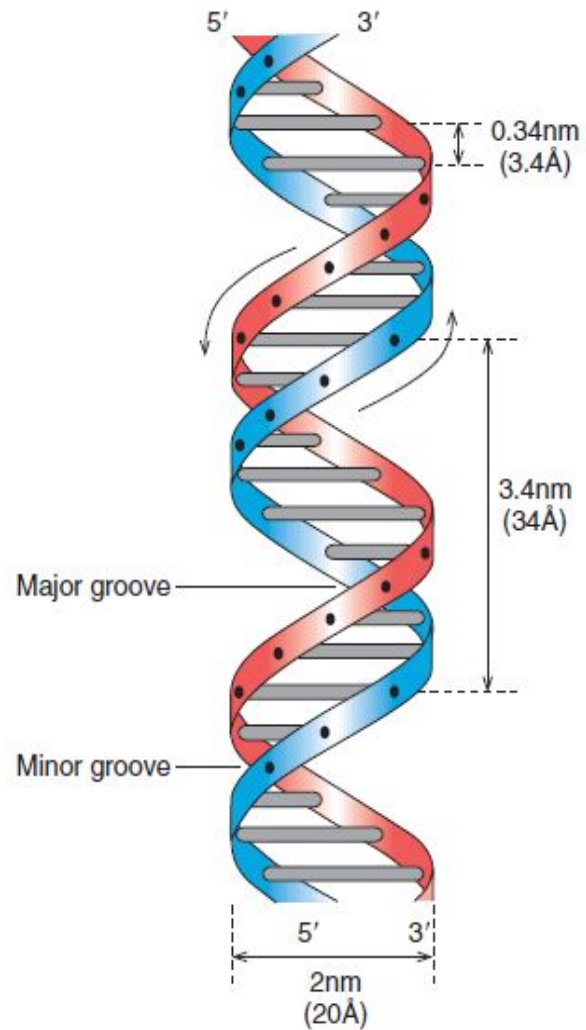
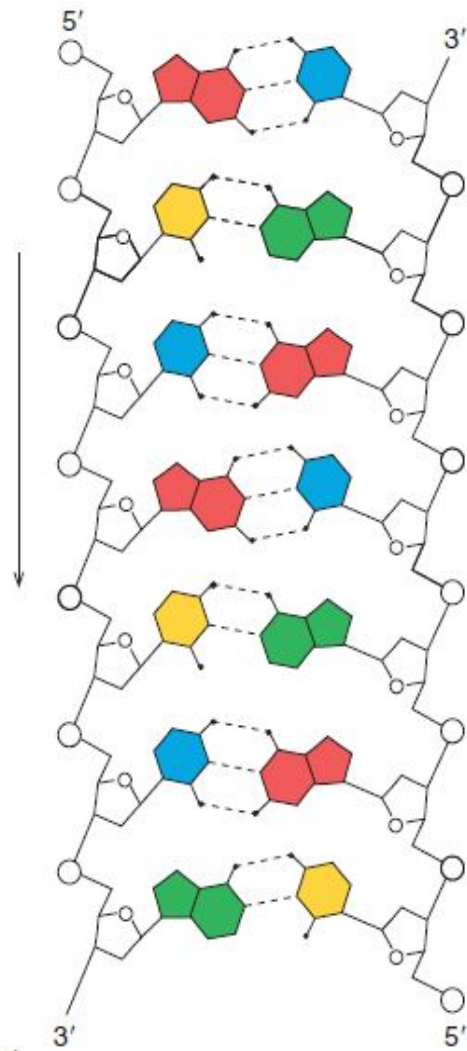
# Водородные связи между молекулами ВОДЫ



Слабое электростатическое взаимодействие между положительно заряженными атомами водорода и отрицательно заряженными электроотрицательными атомами

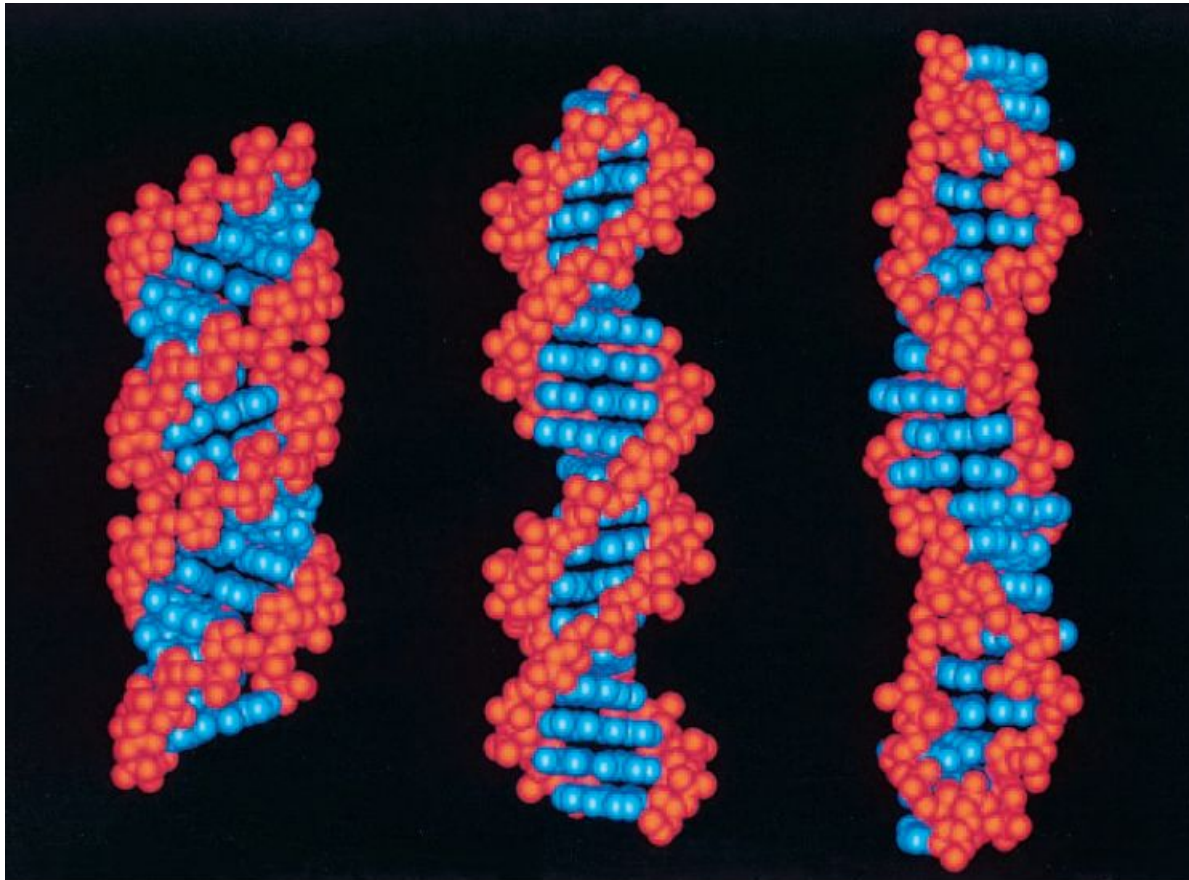


# Три модели молекулы ДНК



Цепи ДНК антипараллельны, 3'- и 5'-концы молекулы ДНК, правозакрученная спираль

# Компьютерные модели А-, В- и Z-форм ДНК



A

B

Z

**A-форма:** ДНК-РНК-гибриды, 11 пар нуклеотидов/виток спирали

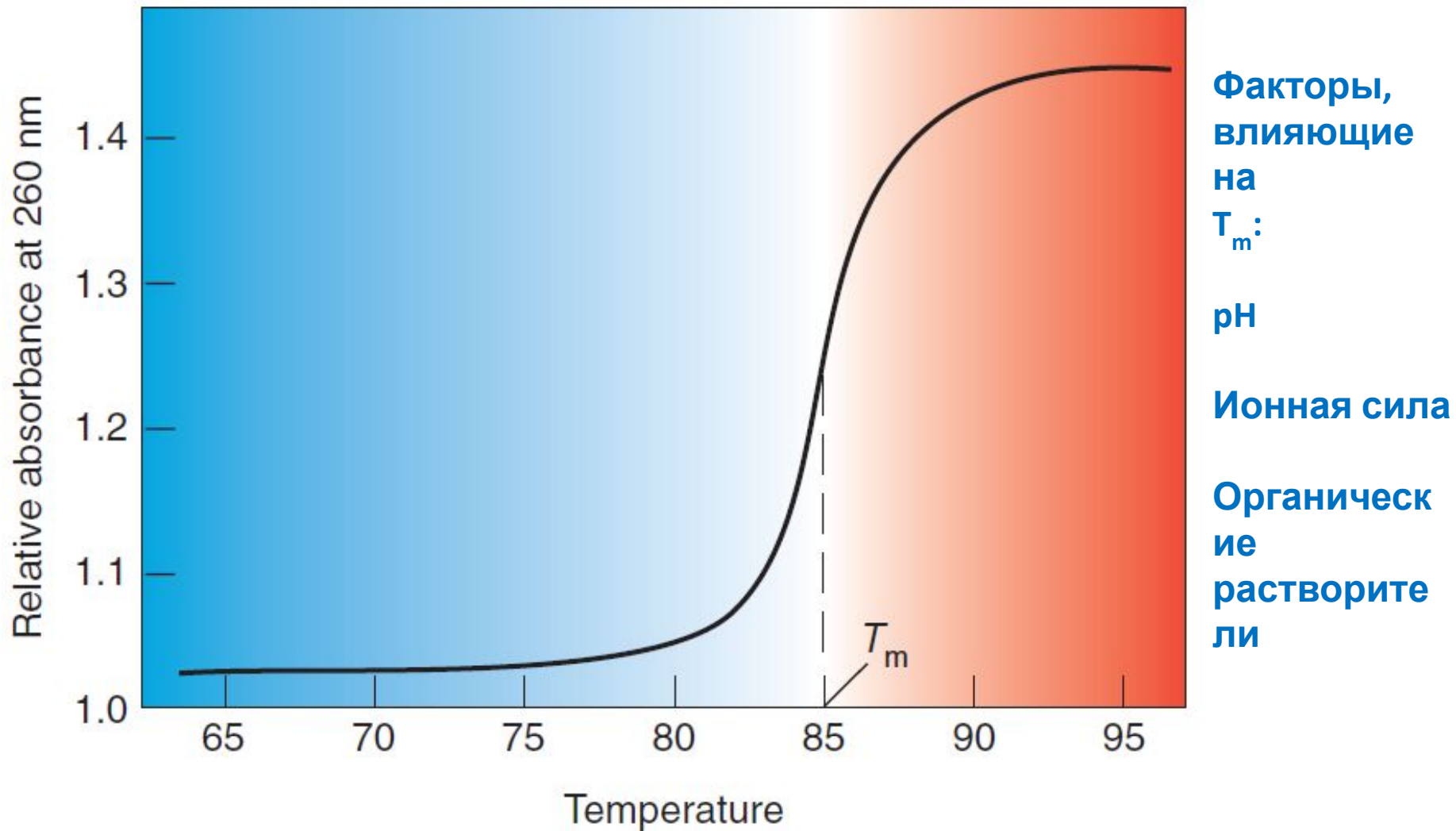
**B-форма:** обычная конформация ДНК в клетке

**Z-форма:** Левозакрученная спираль  
 $\text{poly}[\text{dG-dC}] \cdot \text{poly}[\text{dG-dC}]$

Отрезки ДНК одинаковой длины

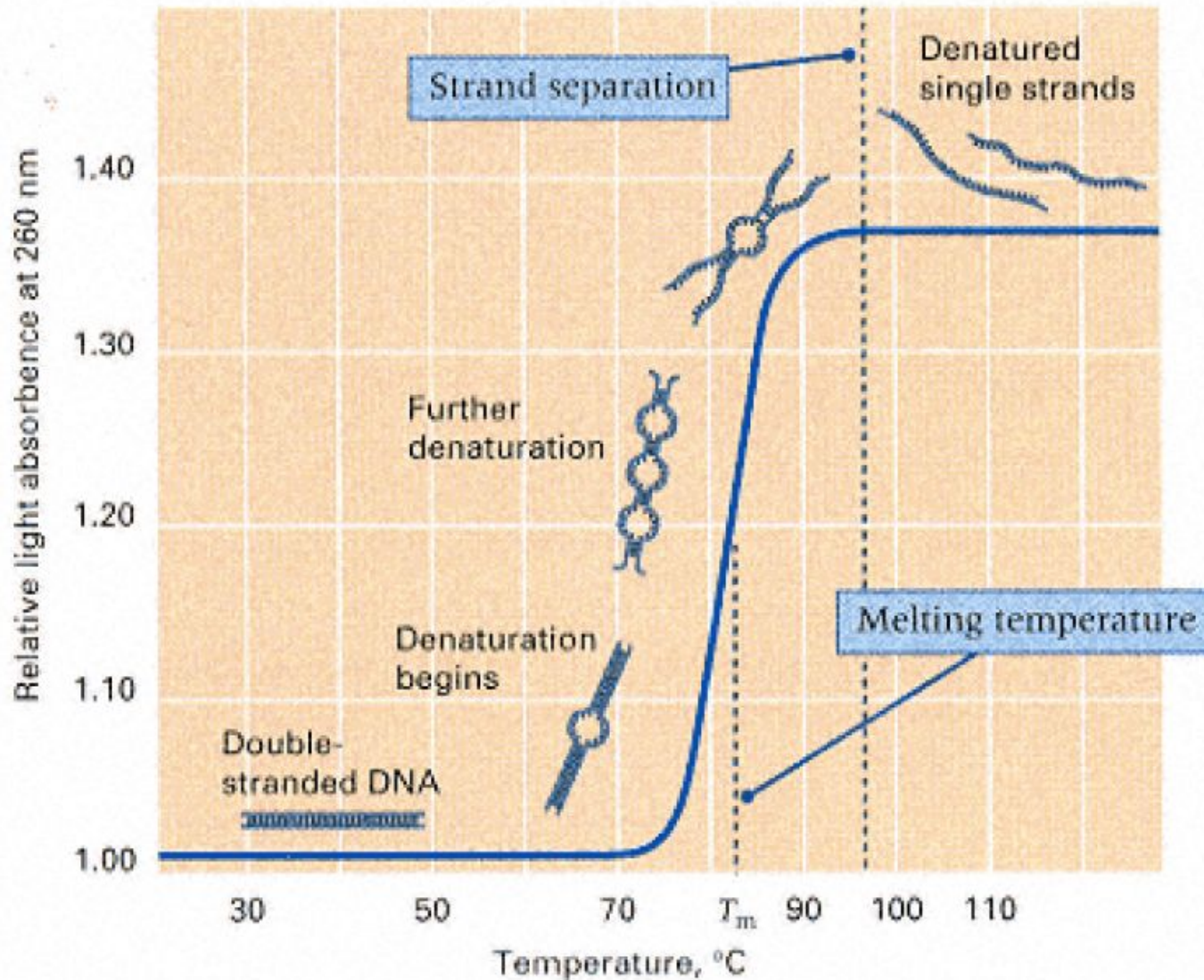
# Плавление (денатурация) ДНК

*Streptococcus pneumoniae*



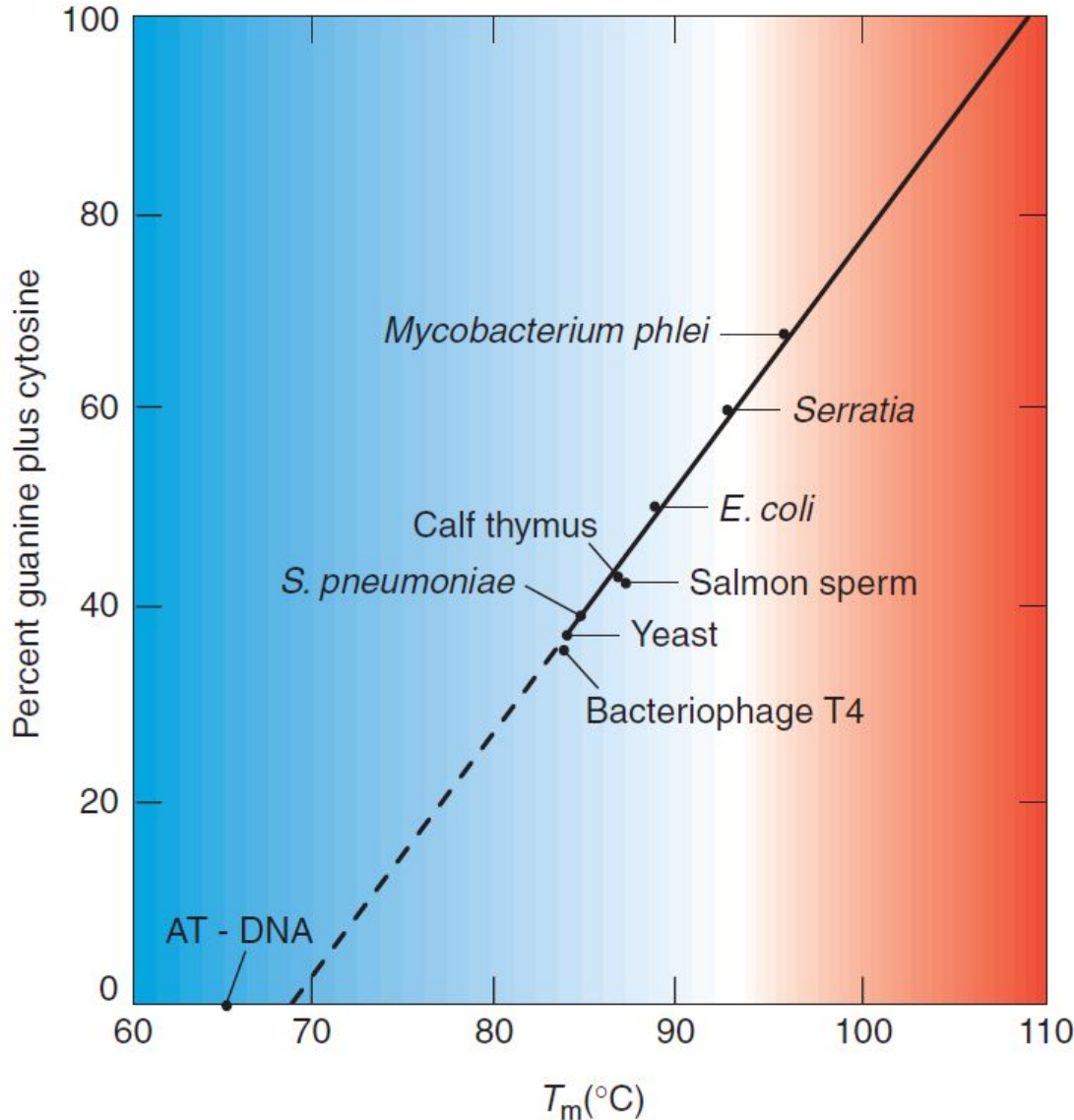


# Плавление (денатурация) ДНК



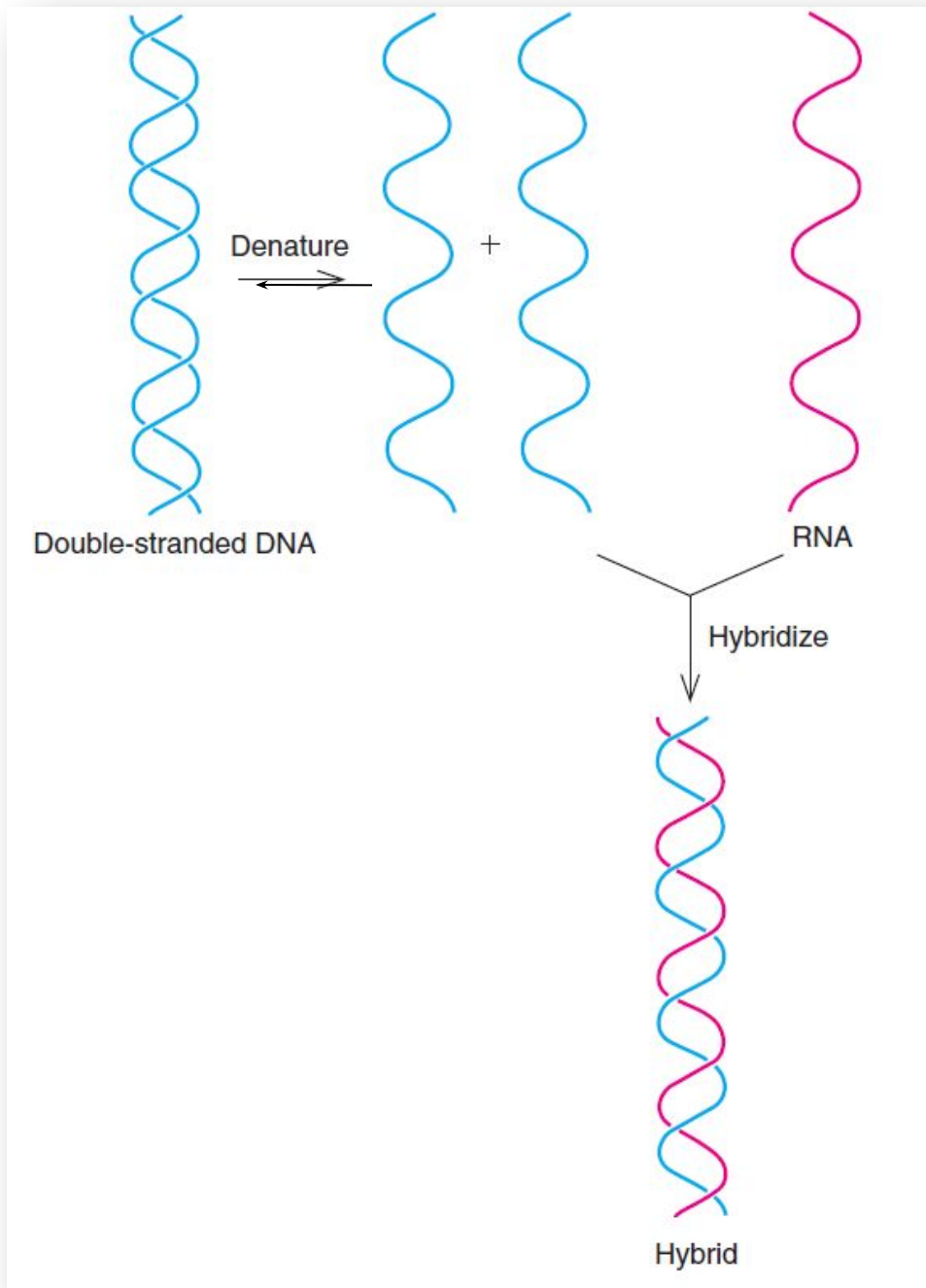
**Температура плавления ДНК  
( $T_m$ ) – это температура, при  
которой цепи ДНК  
диссоциированы наполовину**

# Зависимость температуры плавления геномной ДНК от ее GC-состава



В природных ДНК содержание GC в пределах 22%-73%

В АТ-ДНК содержание GC = 0



# Ренатурация (гибридизация, отжиг) ДНК и РНК

**Гибридизация** – ренатурация различных цепей ДНК (ДНК-ДНК-гибриды) или ДНК и РНК (ДНК-РНК-гибриды)

Температура гибридации ниже температуры плавления ДНК

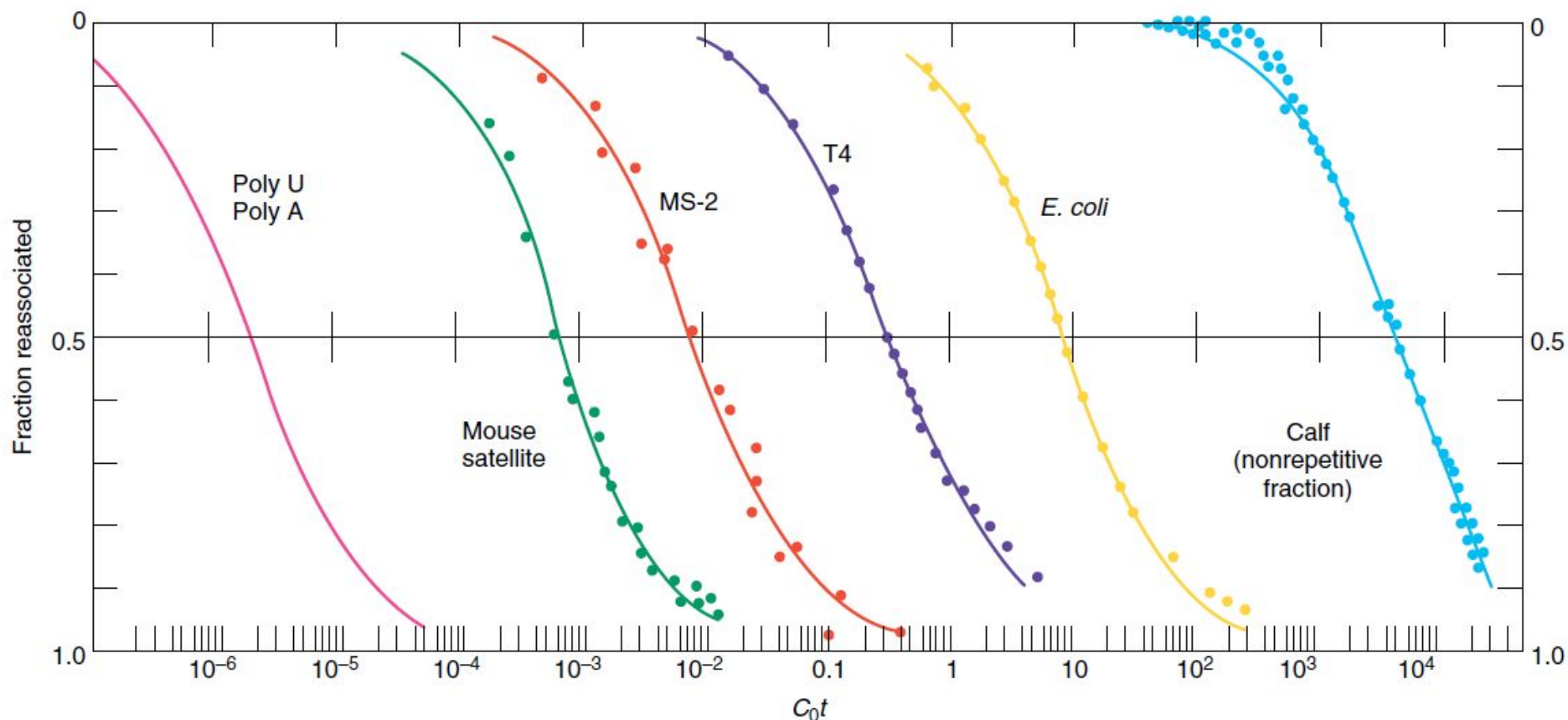


# Кинетика ренатурации разных ДНК

Сложность  
ДНК<sub>1</sub> ↓

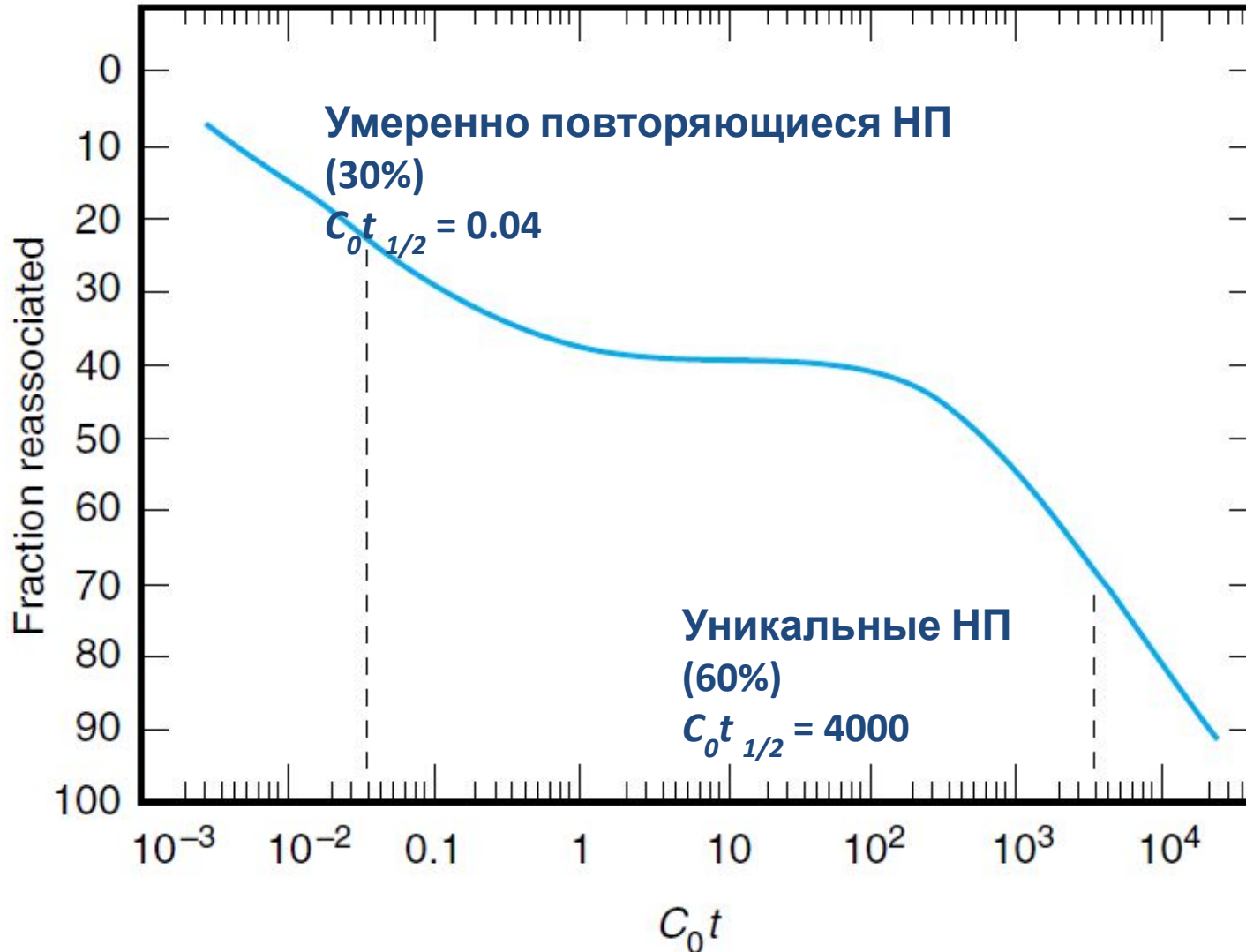
Nucleotide pairs

10 10<sup>2</sup> 10<sup>3</sup> 10<sup>4</sup> 10<sup>5</sup> 10<sup>6</sup> 10<sup>7</sup> 10<sup>8</sup> 10<sup>9</sup> 10<sup>10</sup>



$C_0$  - начальная концентрация ДНК (нуклеотиды моль/л),  $t$  - время ренатурации (сек)

# $C_0t$ -кривая для ДНК тимуса теленка



Высоко повторяющиеся НП (10%) ренатурируют до начала эксперимента

Умеренно повторяющиеся НП (30%)

$C_0t_{1/2} = 0.04$

Уникальные НП (60%)

$C_0t_{1/2} = 4000$

# Комплементарные последовательности

5'–AGGCTG–3'  
3'–TCCGAC–5'

AGGCTG

Последовательности ДНК  
представляют в виде одной  
цепи, в которой 5'-конец  
слева, а 3'-конец справа

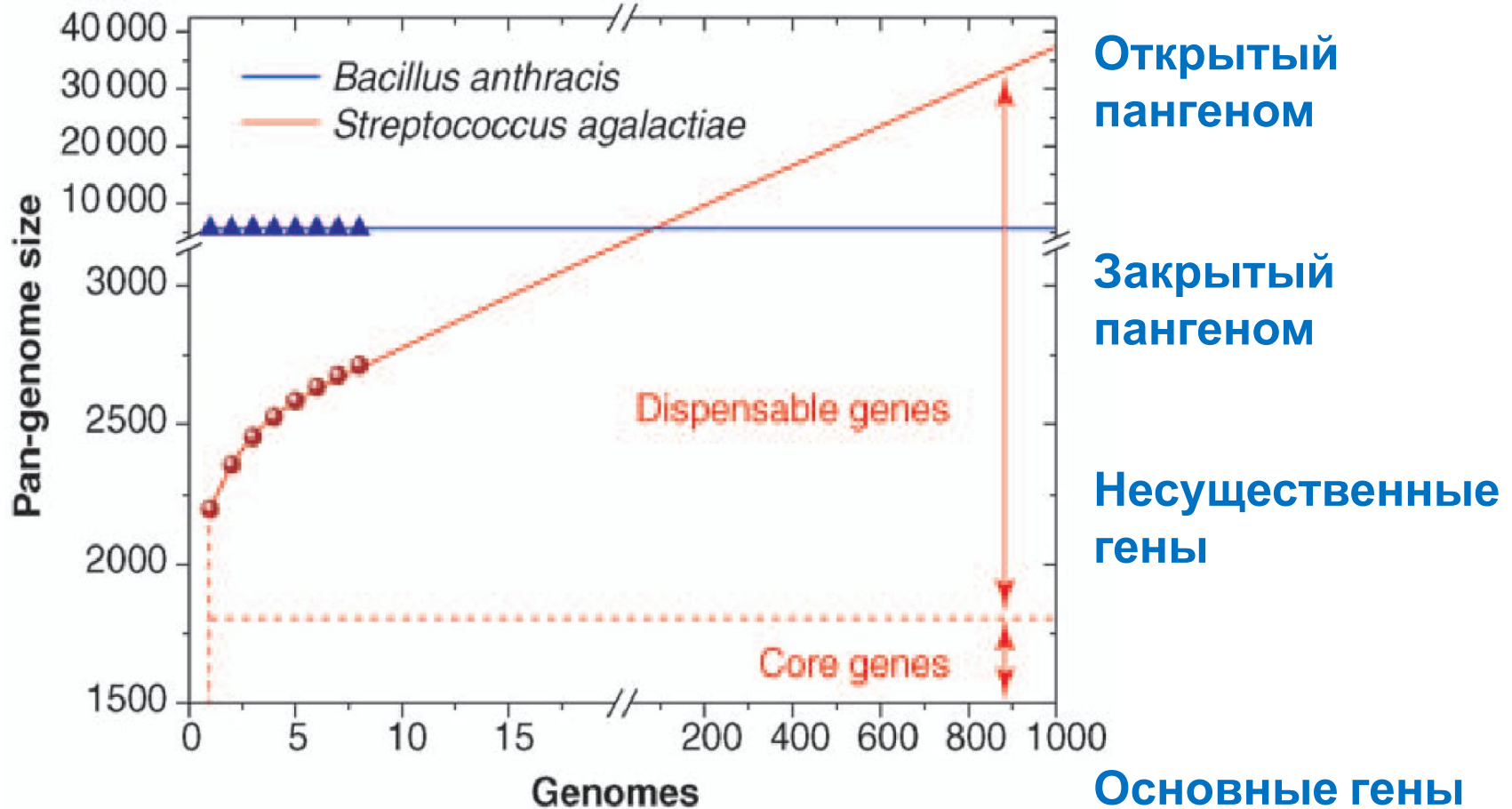
CAGCCT

Комплементарная  
инвертированная  
последовательность

# Определение терминов: «Геном»

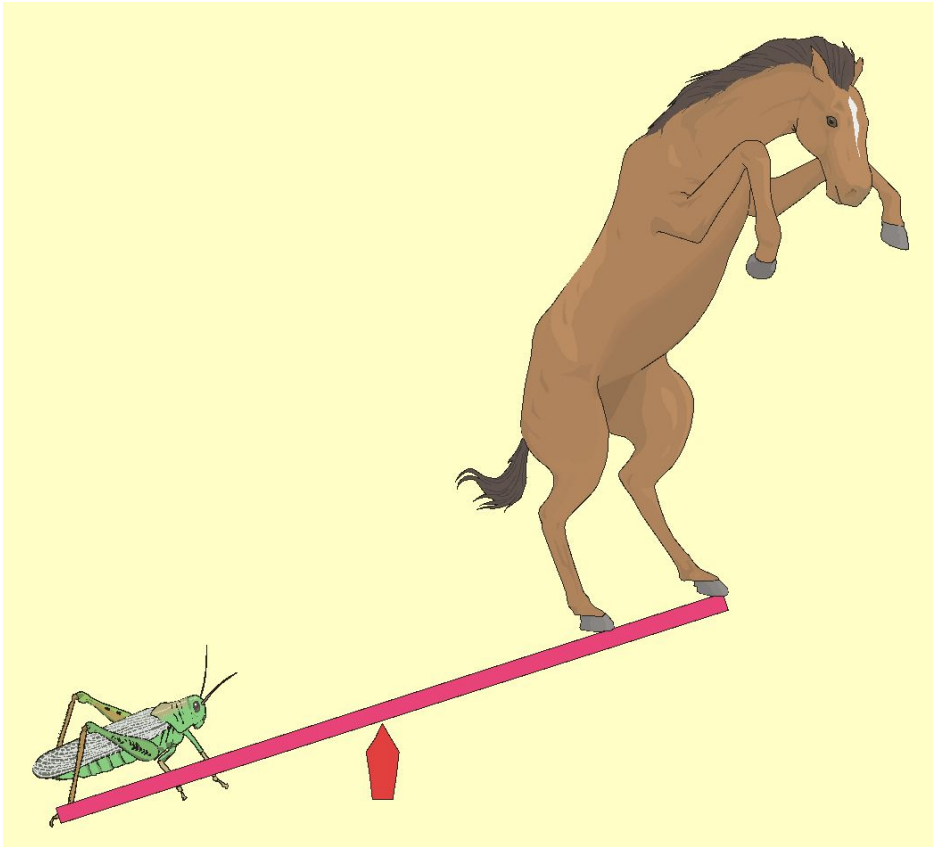
- ◆ Геном – совокупность всей ДНК гаплоидного набора хромосом, внехромосомных генетических элементов и органелл клетки зародышевой линии биологического вида
  - ◆ Введен Г. Винклером в 1922 г.
  - ◆ В отличие от термина «генотип» является биологической характеристикой вида в целом, а не отдельной особи
  - ◆ Из-за большого числа аллельных вариантов генов и некодирующих последовательностей можно говорить лишь об усредненном геноме биологического вида (у человека обнаружено >50, 000,000 SNP)
  - ◆ Геном митохондрий и хлоропластов

# Концепция бактериального пангенома (pan-genome)



**Метагеном** – совокупность генов, циркулирующих в биосфере  
**Метагеномика**

# Парадокс C (C-value paradox)



• *C.A. Thomas, 1971 г.*

Размеры генома:

Кузнечик – 17 pg

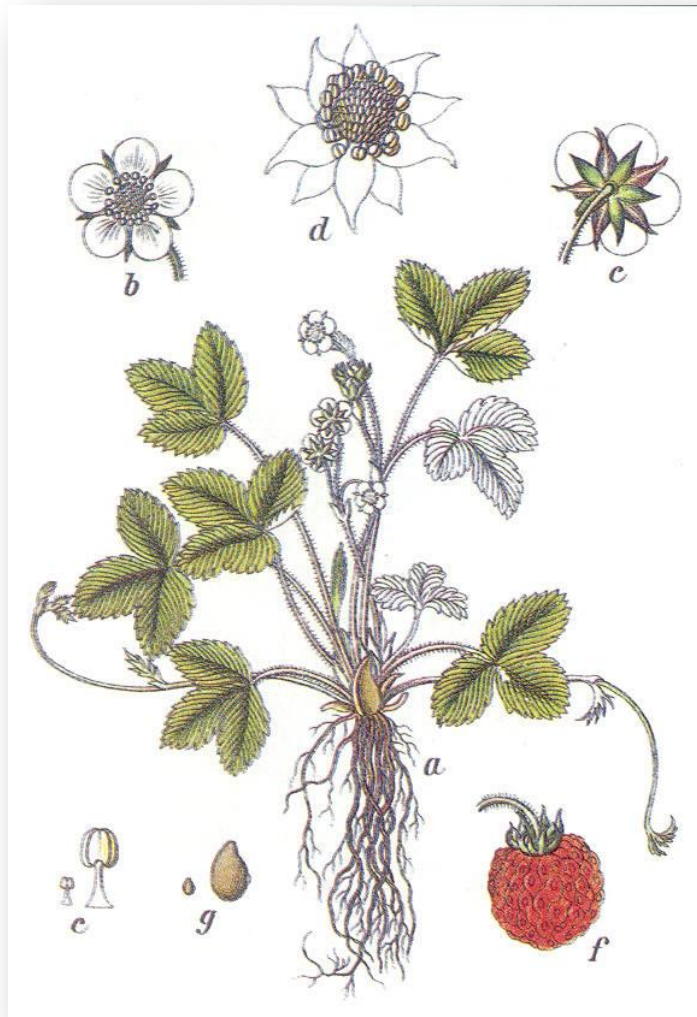
Лошадь – 3,2 pg

1 pg ДНК = 1000 млн.п.  
Н.

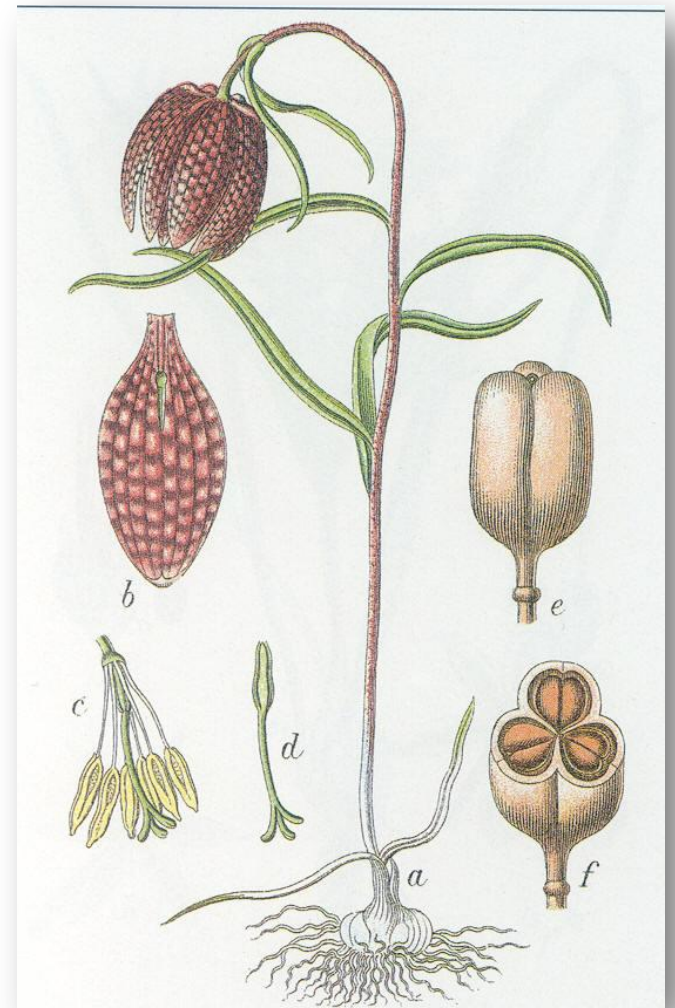
Размер генома *не коррелирует* с биологической сложностью видов (их положением в эволюционной иерархии)



# Растения с экстремальными размерами генома



Земляника *Fragaria viridis* – 0,11 пг



Рябчик *Fritillaria assyriaca* – 127,4 пг



# Южноамериканская двоякодышащая рыба

*Lepidosiren paradoxa*



- ◆ Размер генома – 120 pg, число хромосом (2n) – 38
- ◆ 1 pg ДНК = 1000 млн.п.н.

# Животные–лидеры по размерам генома

❖ Двоякодышащие рыбы	133 pg
❖ Хвостатые амфибии	
Саламандры ( <i>Американский протей</i> )	121 pg
❖ Ракообразные	
( <i>Атлантическая глубоководная креветка</i> )	38 pg
❖ Плоские черви	20 pg
( <i>Otomesostoma auditivum</i> )	
❖ Насекомые	17 pg
Кузнечики ( <i>Podisma pedestris</i> )	
❖ Млекопитающие	1,7 pg
Летучая мышь	3,5 pg
Человек	8,4 pg
Красная крыса ( <i>Tyrranoctomys barrerae</i> )	

---

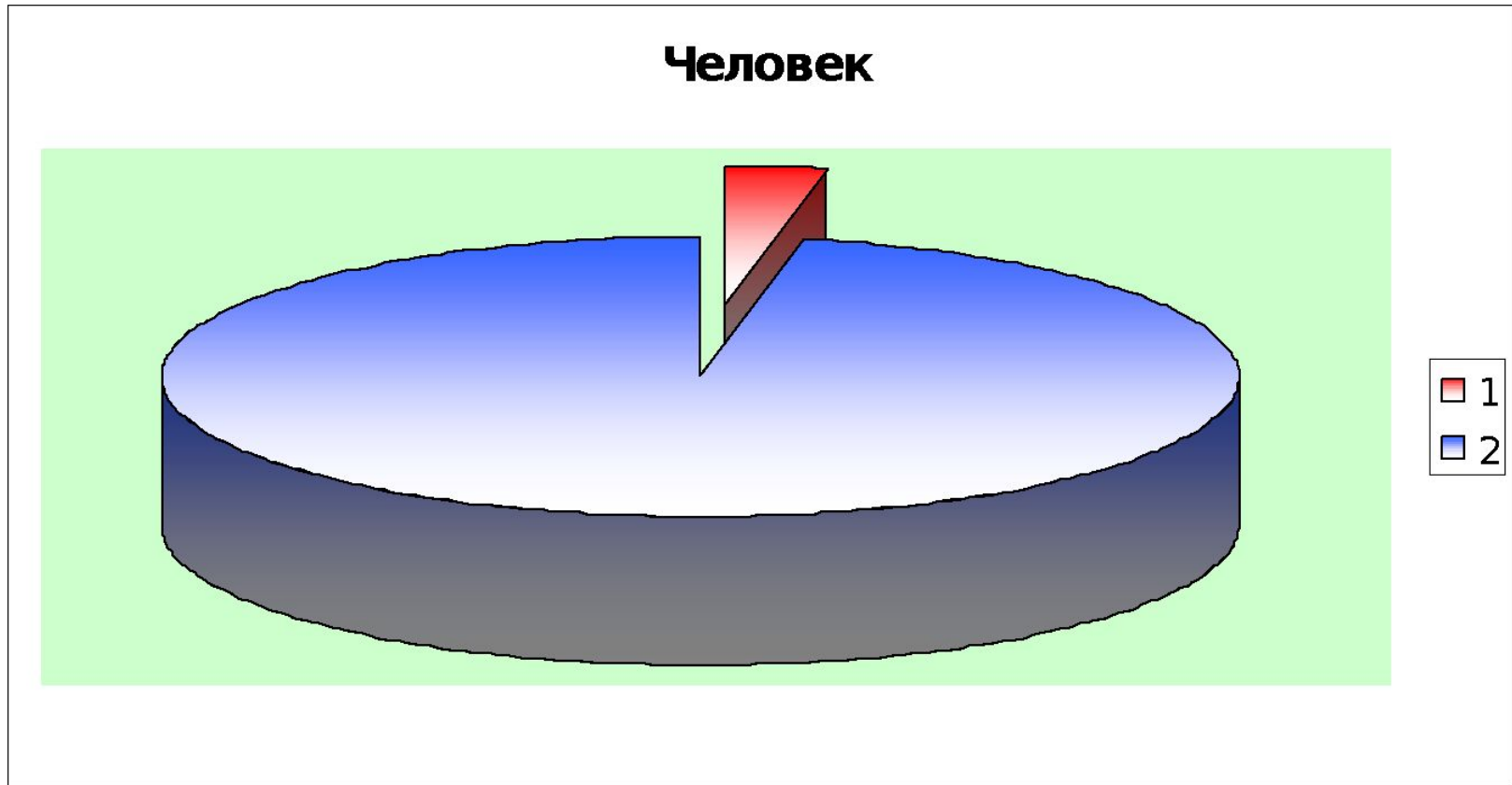
1 pg ДНК = 1000 млн.п.

Н

# Парадокс исчезает, загадка

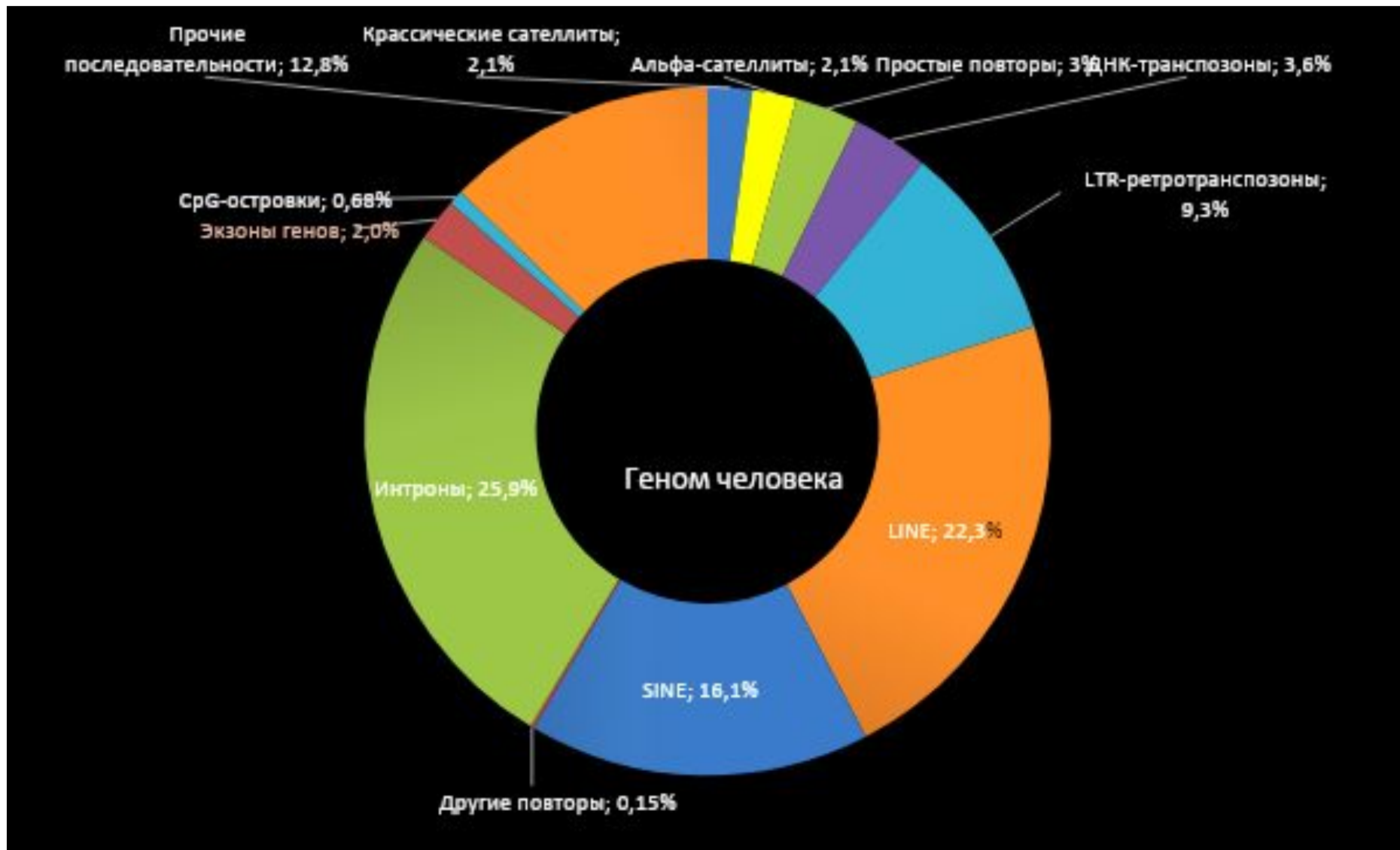
остается

- ◆ Большие различия в размерах геномов определяются последовательностями, не кодирующими белки и нуклеиновые кислоты

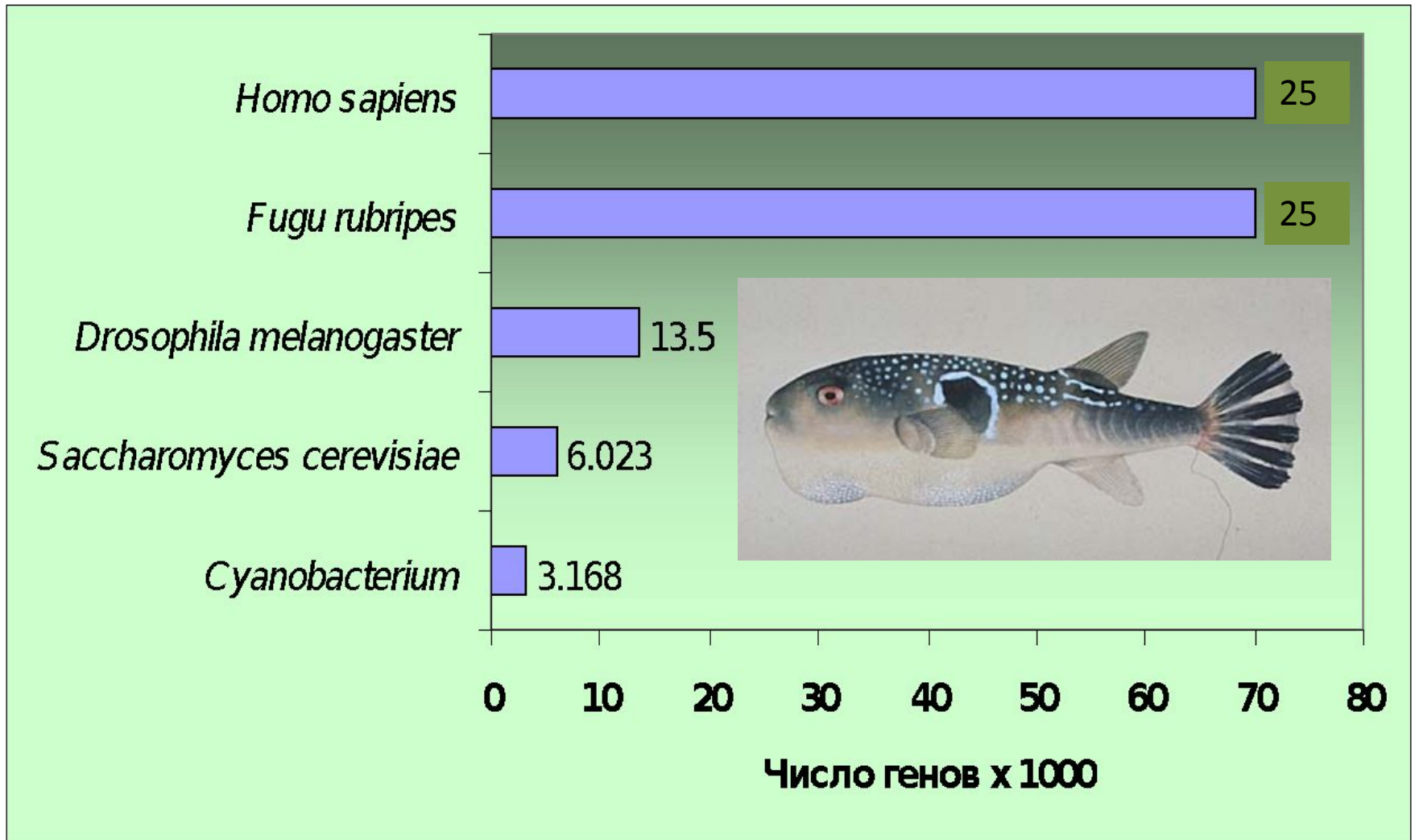


Кодирующие последовательности (1) ~ 2% от всего генома

# Последовательности нуклеотидов генома человека



# Количество генов у организмов разных таксономических групп



# Сложность фенома быстро возрастает при небольшом увеличении количества генов

❖ Число генов, кодирующих белки:

Человек, мышь – ~28 000

Дрозофила – ~14 000

❖ Число **потенциальных**  
биохимических признаков,  
определяемых комбинаторным  
взаимодействием белков 10 разных  
генов:

Человек, мышь –  $8,15 \times 10^{37}$  или  $10^{38}$  (с учетом поправки на 28000 или

14000)

Дрозофила –  $1,03 \times 10^{34}$



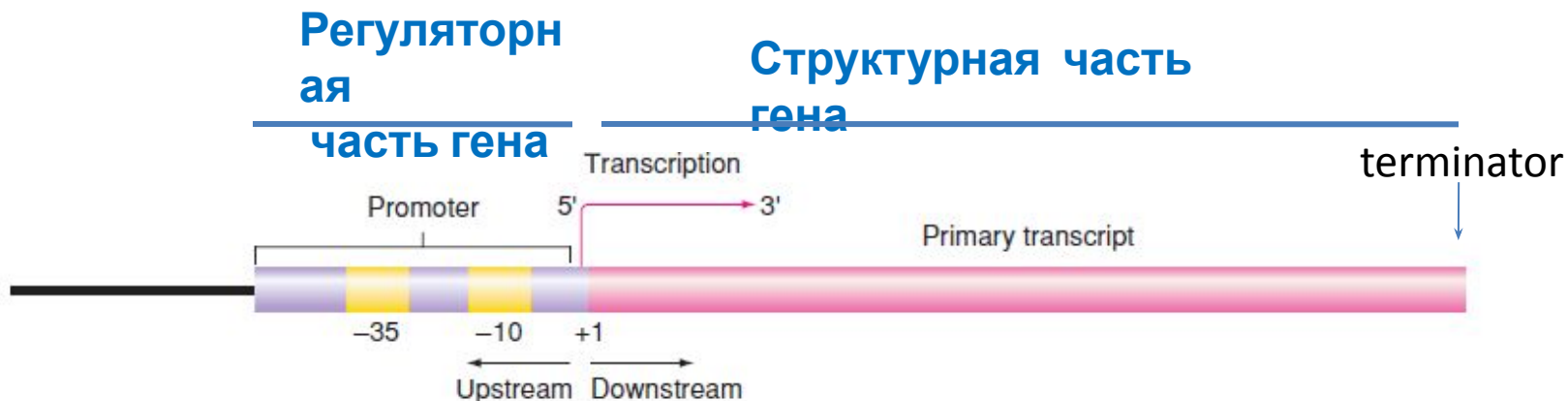
# Резюме по геному

- ❖ **Генно-инженерная работа с генами высших эукариот – их выделение и изучение функций – сильно затруднена из-за большой структурной сложности геномов (и самих генов)**
- ❖ **Секвенирование целых геномов облегчает эту задачу. Методы секвенирования ДНК нового поколения (NGS)**
- ❖ **Наступление «постгеномной эры».**

# Универсальный цикл транскрипции и последующая экспрессия синтезированной мРНК



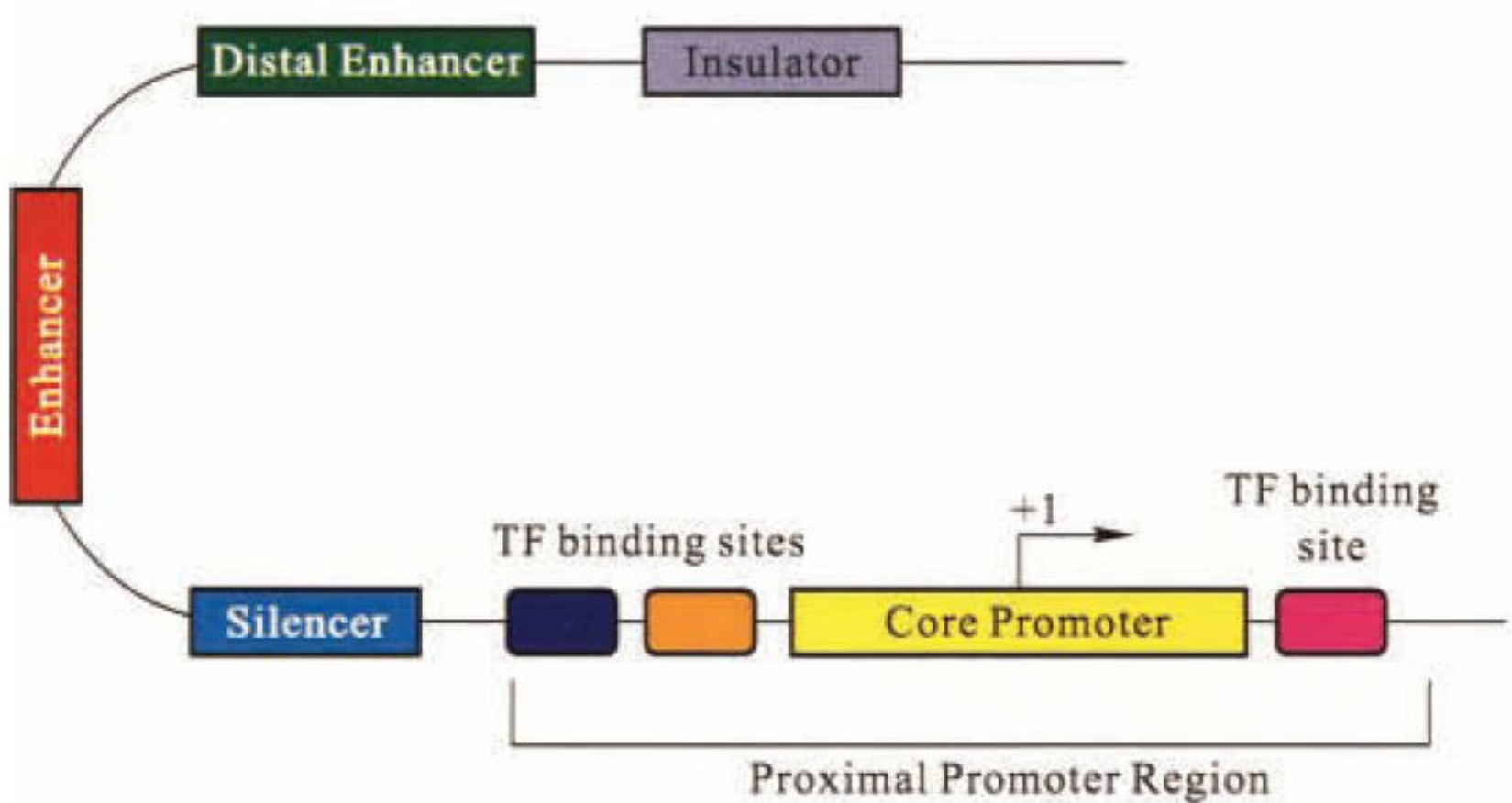
# Структура бактериального гена и его некоторых сильных промоторов



## (b) Strong *E. coli* promoters

rrn X1	ATGCATTTTTCCGCTTGTCTTCCTGA	• • GCGACTCCCTATAAT	GCGCCTCCATCGACACGGCGGAT
rrn (DXE) <sub>2</sub>	CCTGAAATTCAGGGTTGACTCTGAAA	• • GAGGAAAGCGTAATATAC	GCCACCTCGCGACAGTGAGC
rrn A1	TTTTAAATTTCTCTTGTTCAGGCCGG	• • AATAACTCCCTATAAT	GCGCCACCACTGACACGGAACAA
rrn A2	GCAAAAATAAATGCTTGACTCTGTAG	• • CGGGAAGGCGTATTATGC	ACACCCCGCGCCGCTGAGAA
λ P <sub>R</sub>	TAACACCGTGCCTGTTGACTATTTTA	CCTCTGGCGGTGATAATGG	• • TTGCATGTACTAAGGAGGT
λ P <sub>L</sub>	TATCTCTGGCGGTGTTGACATAAATA	CCTACTGGCGGTGATACTGA	• • GCACATCAGCAGGACGCAC
T7 A3	GTGAAACAACCGTTGACAACATGA	A GTAAACACGGTACGATGT	ACCACATGAAACGACAGTGA
T7 A1	TATCAAAAAGAGTATTGACTTAAAGT	C T AACCTATAGGATACTT A	CAGCCATCGAGAGGGACACG
T7 A2	ACGAAAAACAGGTATTGACAACATGA	AG T AACATGCAGTAAGATAC	AAATCGCTAGGTAACTACTAG
fd VIII	GATACAAATCTCCGTTGTACTTTGTT	• TCGCGCTTGGTATAATCG	CTGGGCGTCAAAGATGAGTG
Consensus	TTGACAT	15 – 17 bp	TATAAT
			5' → 3' Primary transcript

# Модули, контролирующие транскрипцию, в эукариотических генах, кодирующих белки



TF - transcription factor – фактор транскрипции

## **Коровый промотор:**

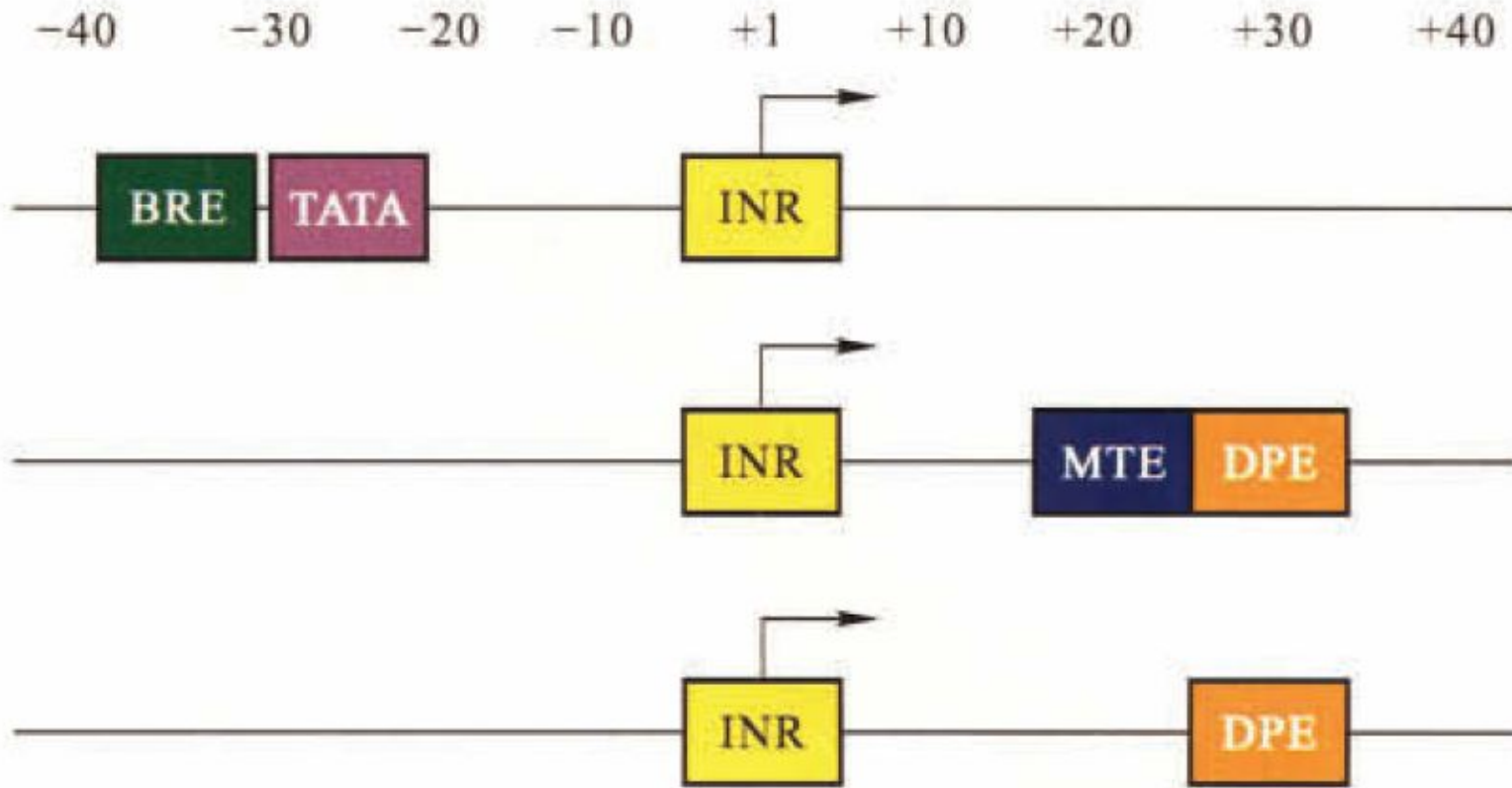
минимальная последовательность нуклеотидов, обеспечивающая правильную инициацию транскрипции в отсутствие других цис-действующих элементов

**Энхансеры и сайленсеры** обеспечивают (ткане) специфическую транскрипцию конкретных генов, стимулируя или подавляя их экспрессию, соответственно

**Инсуляторы** ограничивают действие энхансеров и сайленсеров на соседние гены

**Проксимальная промоторная область** включает коровый промотор и сайты связывания факторов транскрипции, влияющих на его активность

# Элементы корового (базового) промотора эукариотической РНК-полимеразы II



**INR** – инициатор, **TATA** – TATA-бокс, **DPE** - downstream promoter element

(нижний промоторный элемент), **MTE** - motif ten element – все являются сайтами связывания субъединиц TFIID **BRE** – сайт TFIIB

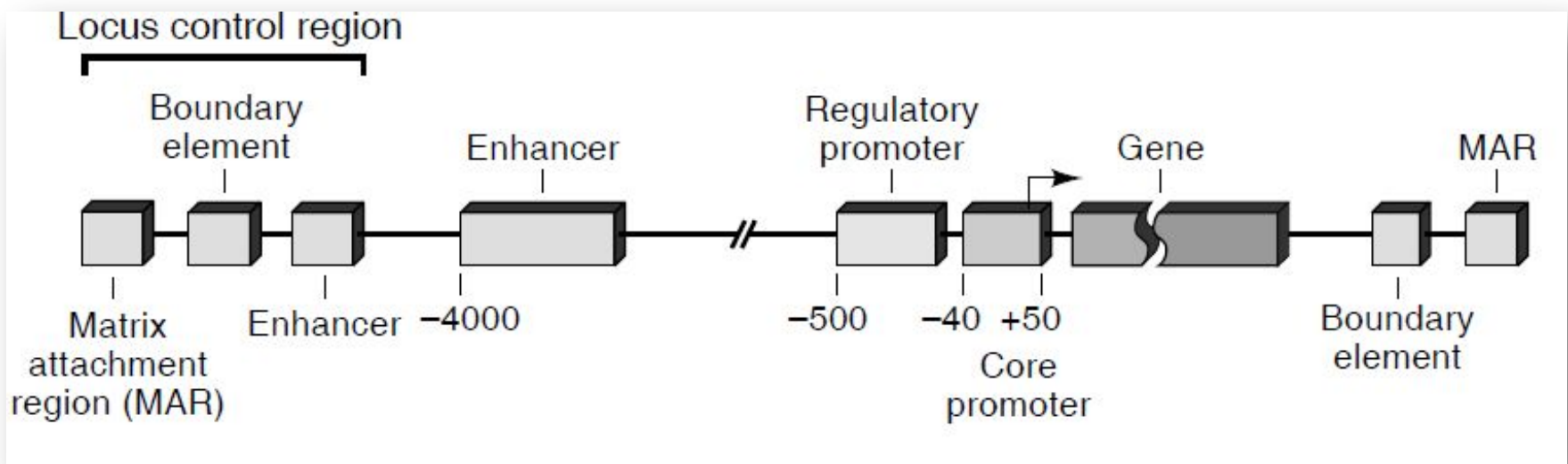


# Межмолекулярные взаимодействия на промоторе РНК-полимеразы II

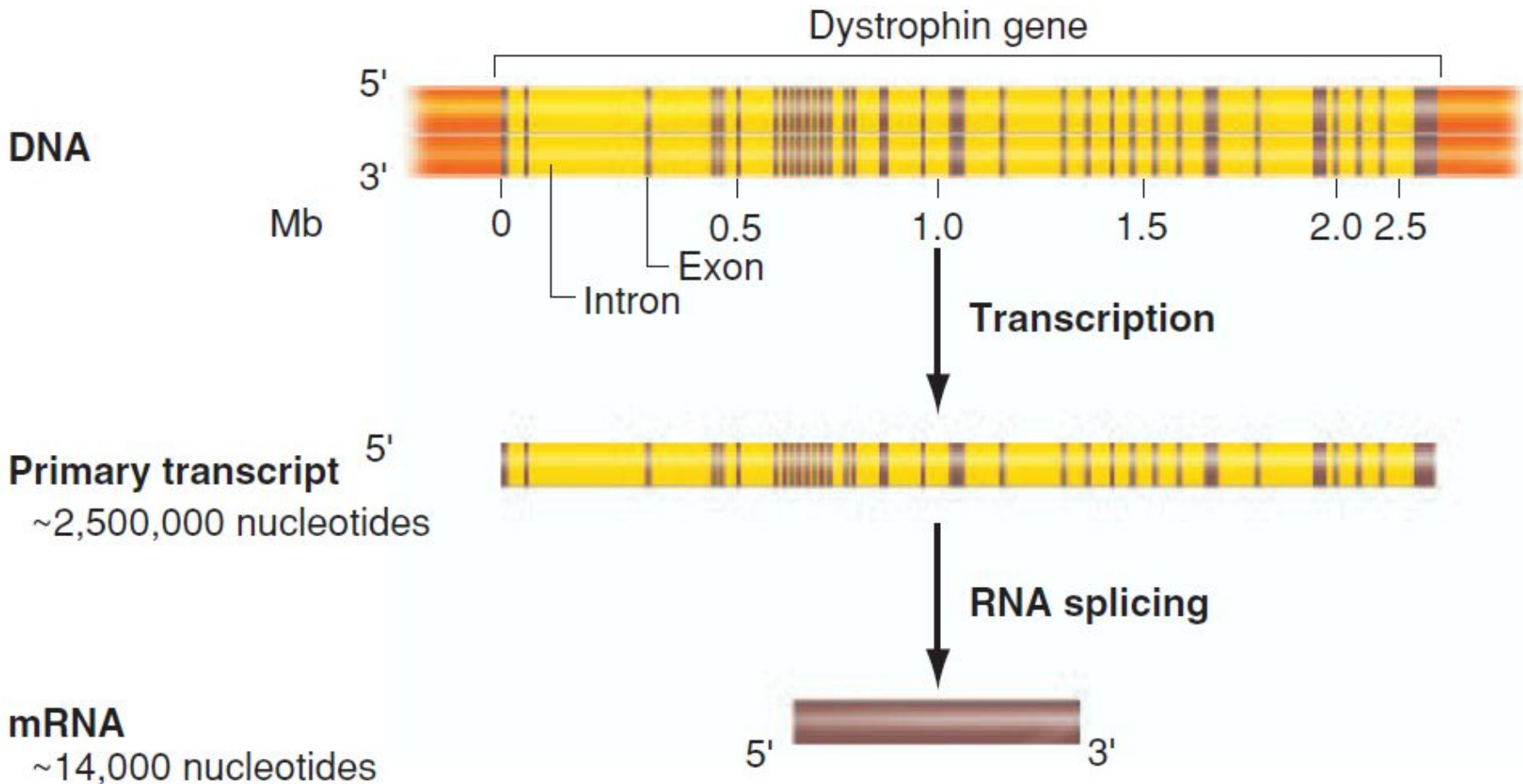


- ФТ** – факторы транскрипции; **ОФТ** – основные факторы транскрипции;
- РЭ** – регуляторные элементы (последовательности) ДНК,
- КТ** – коактиваторы транскрипции

# Обобщенная структура эукариотического гена

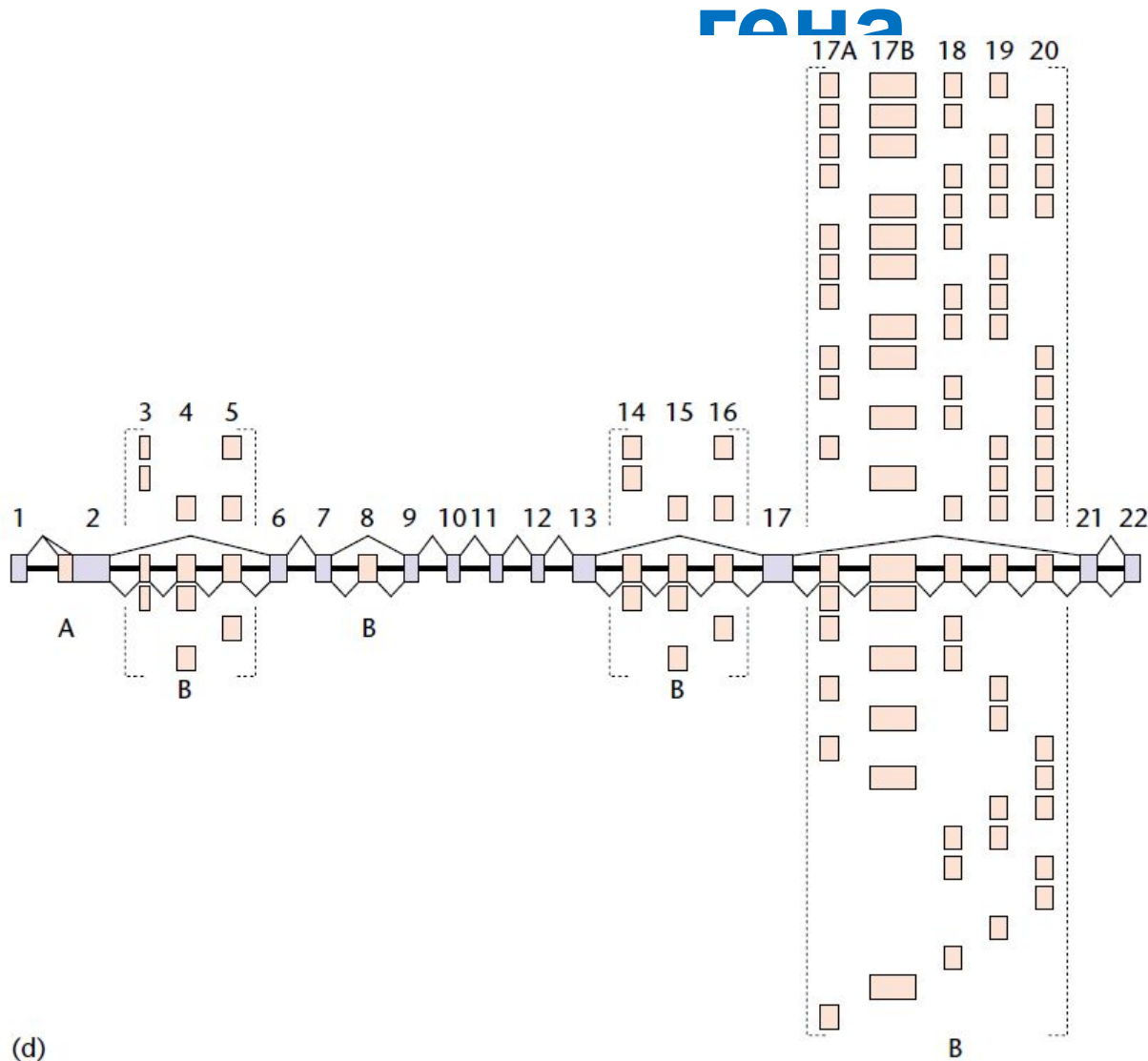


# Ген дистрофина человека и продукты его транскрипции

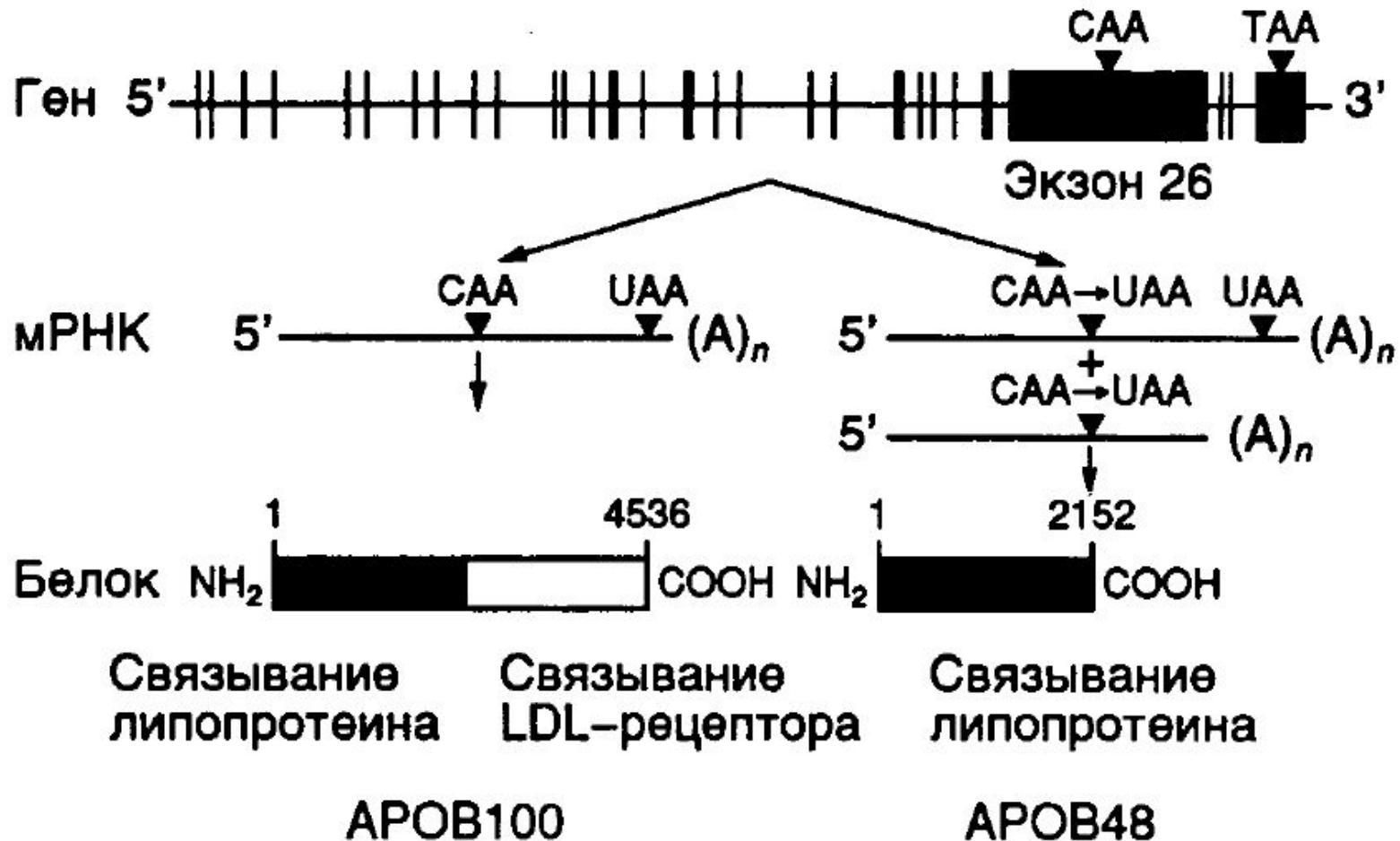


Каждая молекула РНК-полимеразы II транскрибирует ген в течение нескольких дней

# 33 продукта альтернативного сплайсинга транскрипта одного гена



# Редактирование мРНК путем дезаминирования ЦИТОЗИНА



# Разнообразие механизмов редактирования мРНК (RNA editing)

## Изменение кодирующего потенциала мРНК путем:

- ❖ **Вставок/делеций нуклеотидов U (реже C, A, G)**  
митохондриальная мРНК простейших, (слизневиков)  
(нуклеазы, РНК-лигазы, gRNA)
- ❖ **Дезаминирования азотистых оснований**  
C → U (мРНК аполипопротеина B), A → I (вирусные, клеточные мРНК)
- ❖ **Замены оснований в мРНК**  
U → C (реже U → A или G, C → A или A → G) (митохондрии растений, миксомицеты, одноклеточные простейшие) (делеции + вставки, трансгликозилирование)



# Один ген – один фермент



**George Beadle**



**E.L. Tatum**

**Работы с мутантами *Neurospora crassa* – добавление недостающих метаболитов**

# Концепция гена 1960-х годов

**Ген – последовательность ДНК или РНК, которая**

- ❖ **Непрерывна**  
Интроны
- ❖ **Одна последовательность кодирует один белок (РНК)**  
Могут использоваться все три ОРС, альтернативный сплайсинг
- ❖ **Колинеарна кодируемому белку**  
Сплайсинг белков, редактирование РНК
- ❖ **Регуляторная часть предшествует структурной**  
Энхансеры перед, внутри и за геном
- ❖ **Имеет четкие границы**  
Альтернативные сайты инициации и терминации транскрипции и трансляции
- ❖ **Постоянную локализацию на хромосоме**  
Мобильные генетические элементы
- ❖ **Перемещения и изменения происходят только вследствие случайных мутаций**  
Запрограммированные перестройки генов Ig, соматический мутагенез, адаптивные мутации

# Основные свойства гена остались незыблемыми

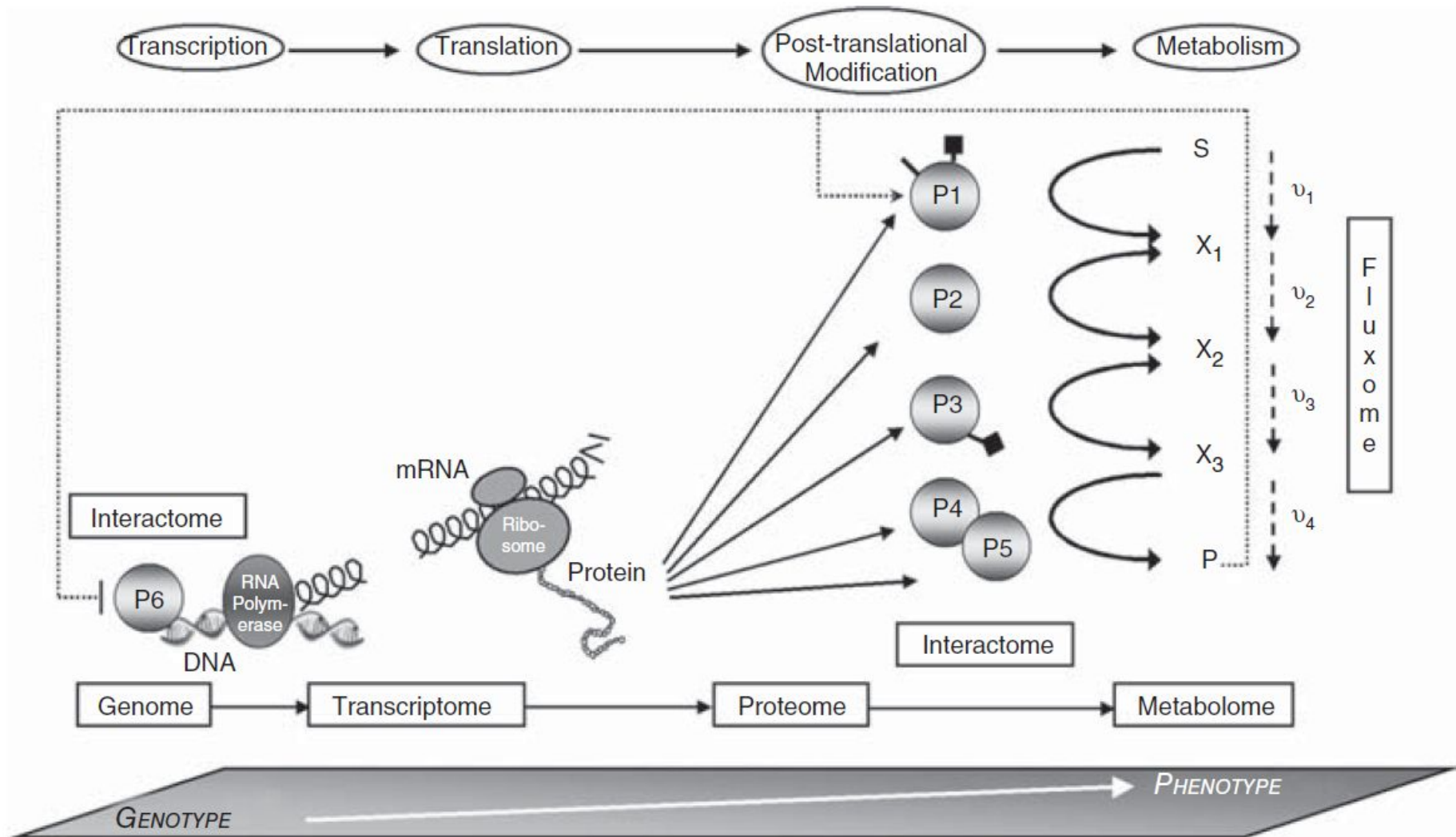
- ◆ Ген – фрагмент нуклеиновой кислоты, в последовательности которой закодирована информация о последовательностях других НК или белков
- ◆ Изменения фенотипа организма однозначно (?) связаны с мутационными изменениями его генотипа (т.е. изменениями последовательностей генов)
- ◆ Генотипические изменения являются наследуемыми

# Хорошо забытое старое

**Ген – это часть генома, оказывающая влияние на какой-либо фенотипический признак организма**

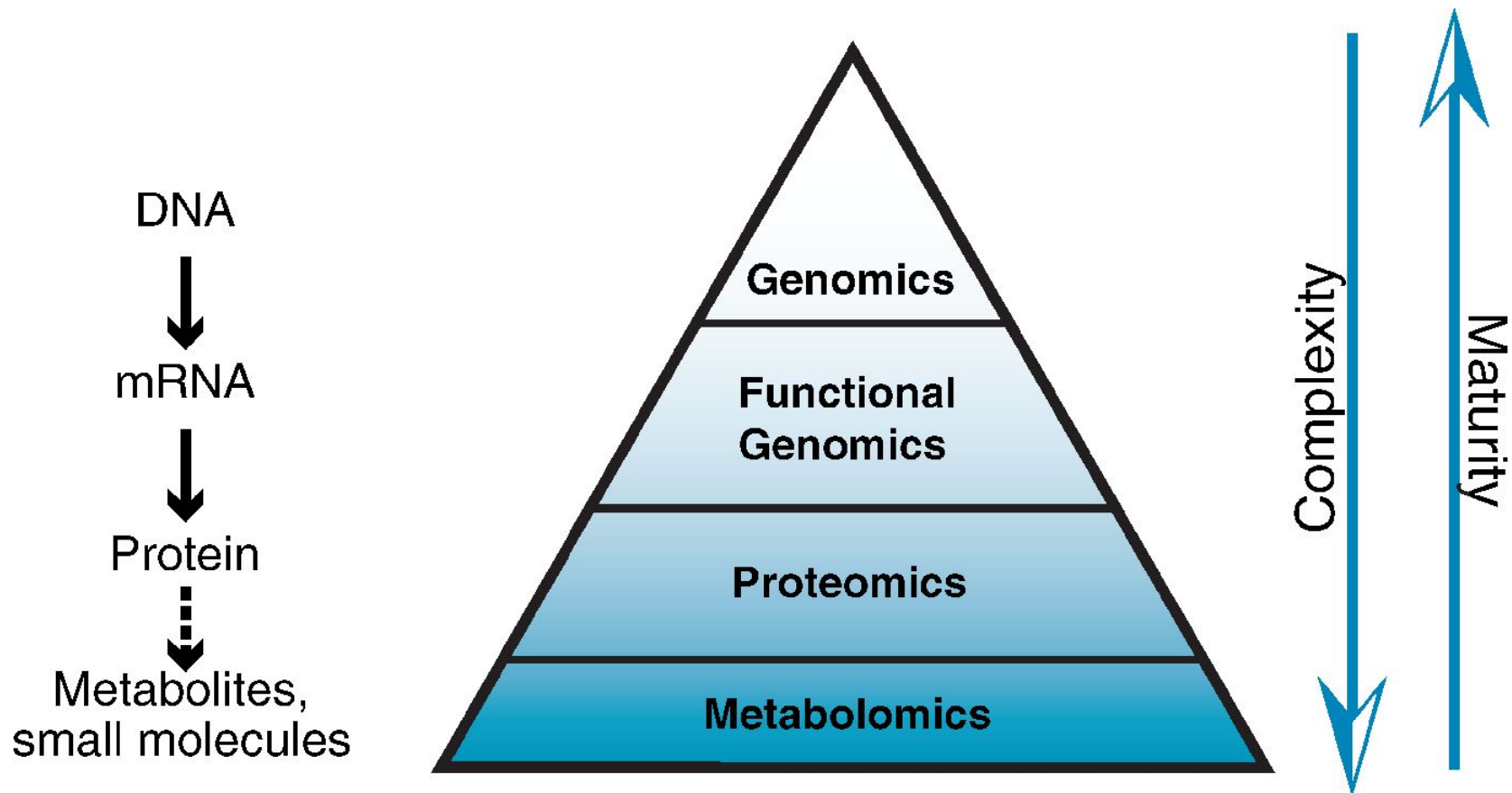
**Один ген – один признак**

# Центральная догма молекулярной биологии



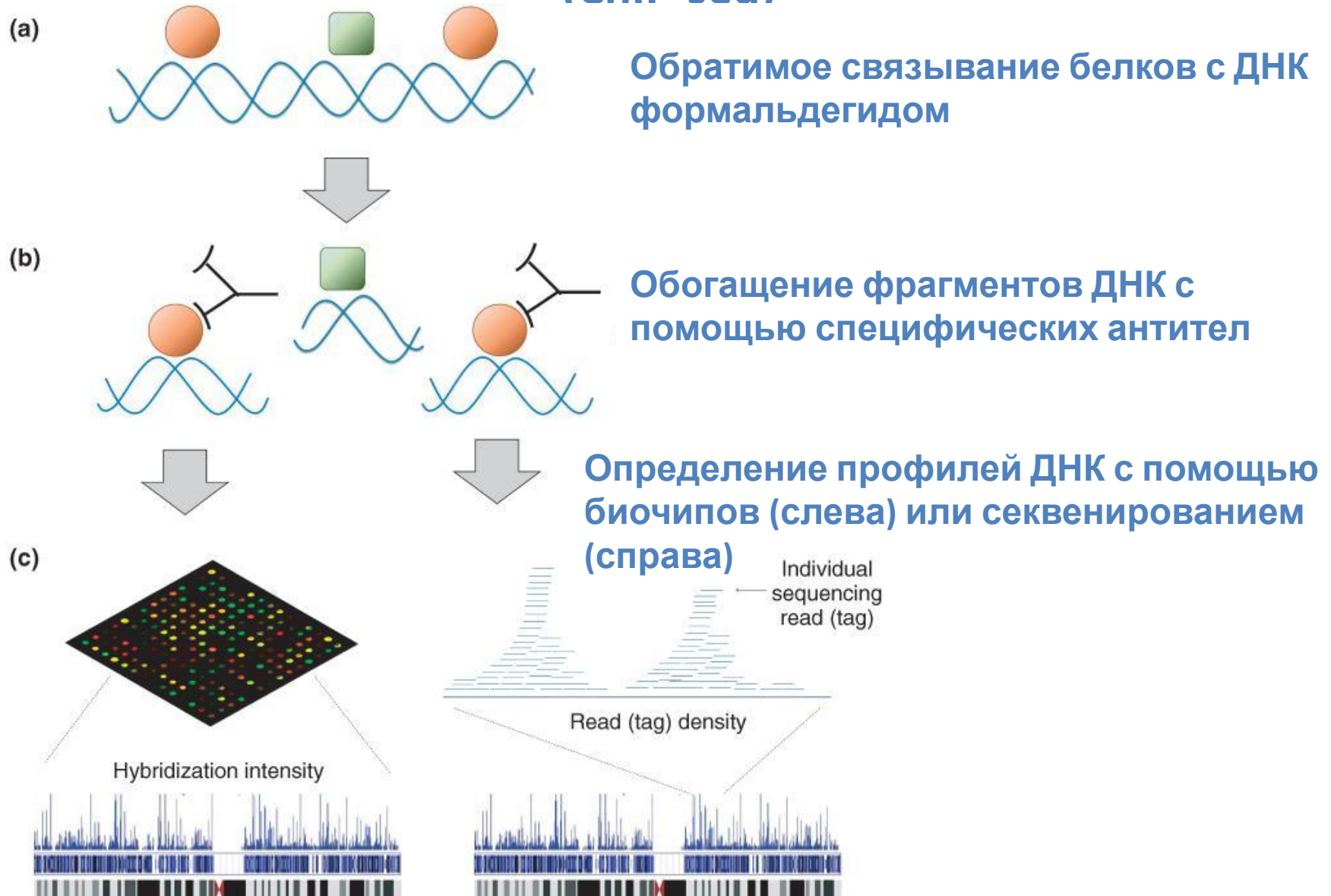
Формирование фенотипа под действием генотипа в соответствии с центральной догмой

# Системные подходы в молекулярной биологии и генетике





# Иммунопреципитация хроматина: исследование на биочипах (ChIP-chip) и секвенированием ДНК (ChIP-seq)



# Хромосомные территории в интерфазном ядре фибробластов человека

Многоцветная FISH (

