

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

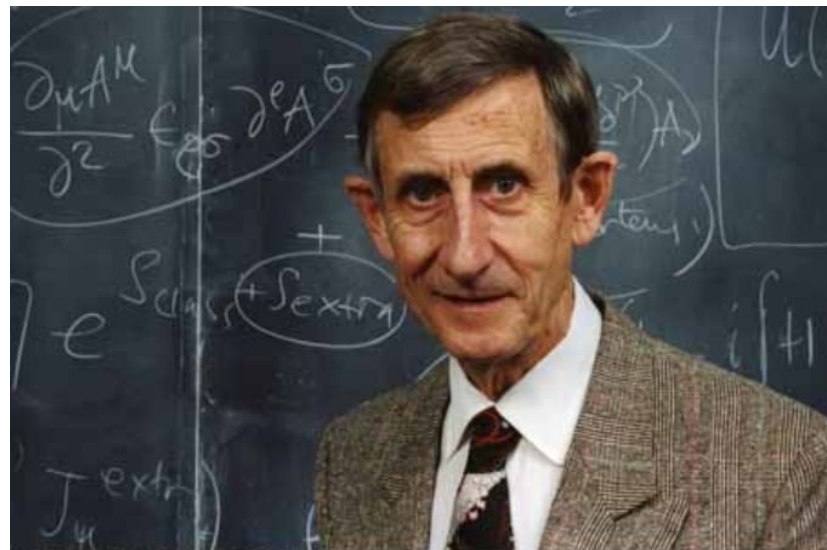
1. Введение в молекулярную биологию и генетику
2. Классическая генная инженерия
3. Полимеразная цепная реакция
4. Исследования генома и транскрипции генов
5. Антисмысловые технологии, аптамеры, рибозимы
6. Генная инженерия в конструировании белков
7. Трансгенные животные
8. Трансгенные растения
9. Рекомбинантные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

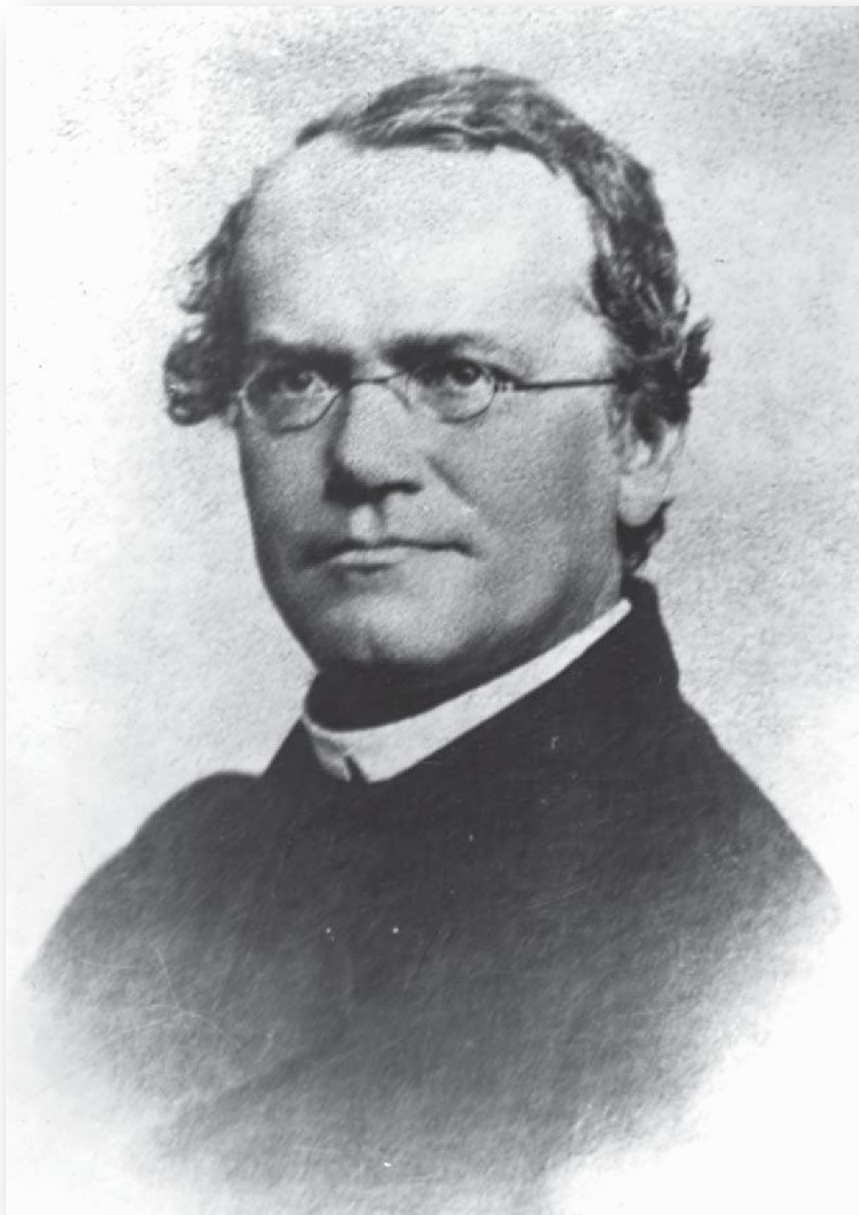
«Новые направления в науке гораздо чаще создаются с помощью новых методов, а не новых концепций.

Новые концепции объясняют известные явления по-новому.

Новые методы открывают новые явления, которые необходимо объяснить.»

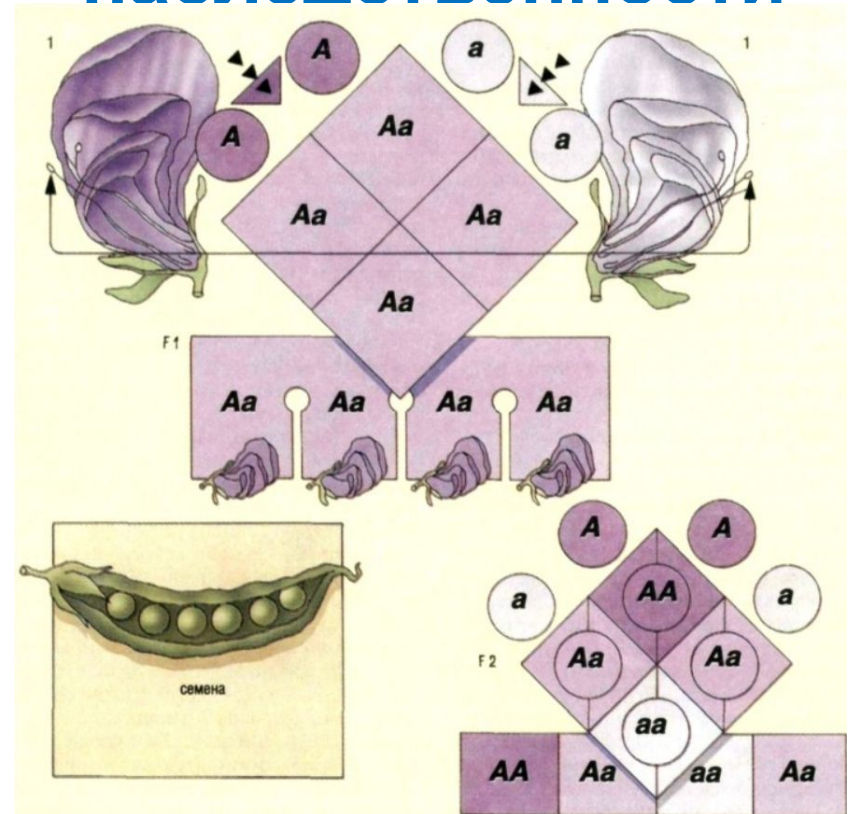
Freeman J. Dyson





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



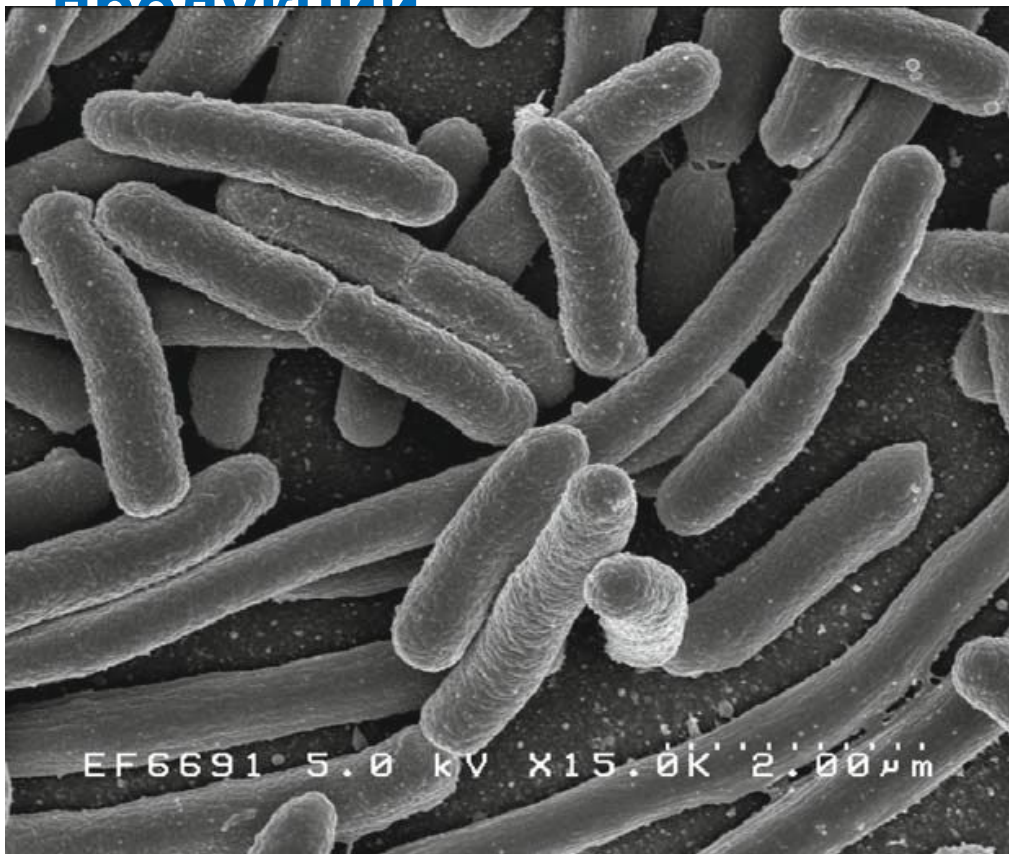
Самец
муфлона

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

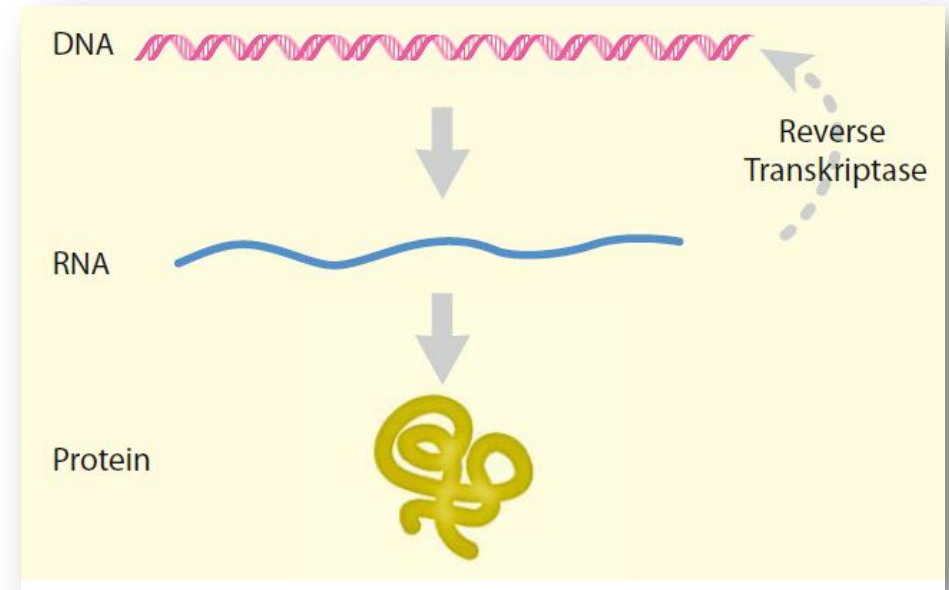
- Рак, атеросклероз, ожирение, аутоиммунные заболевания и т.п.

◆ 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



антибиотиков
General

Special

Unknown

DNA → DNA

RNA → DNA

protein → DNA

DNA → RNA

RNA → RNA

protein → RNA

RNA → protein

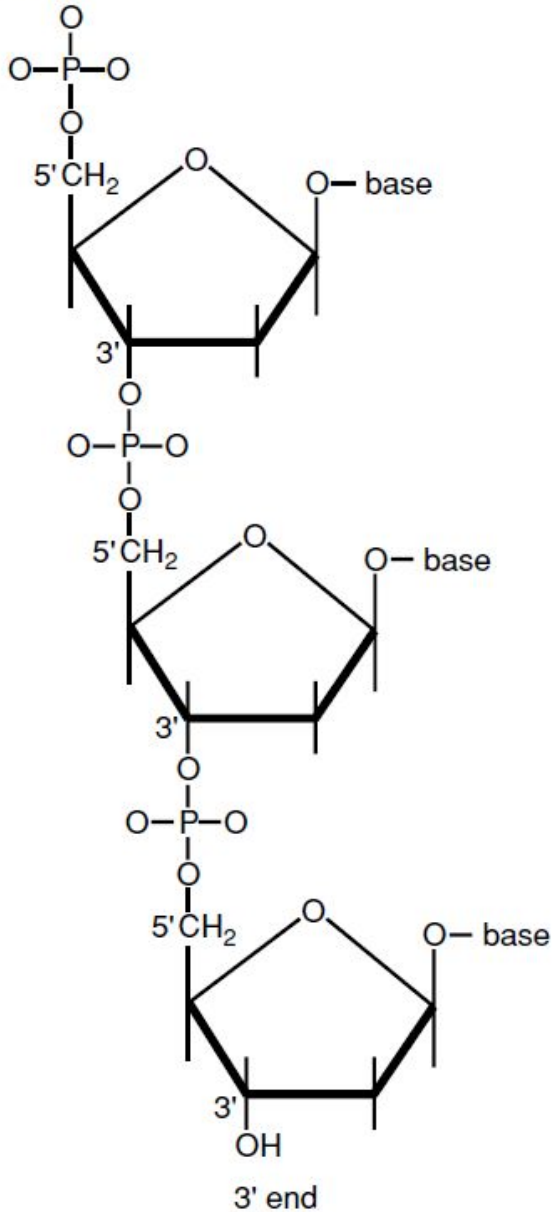
DNA → protein

protein → protein

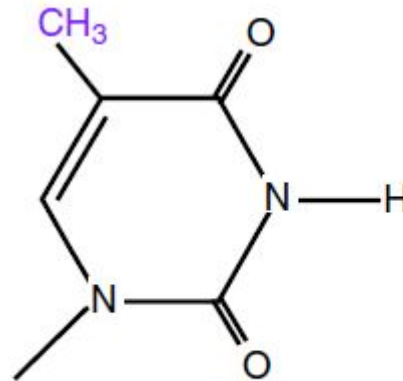
Три способа передачи генетической информации в живых организмах, предполагаемых ЦДМБ

ДНК и РНК

5' end

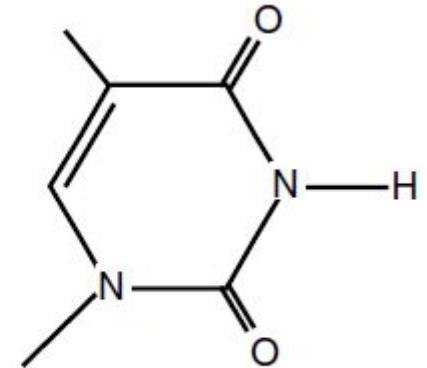


Сахаро-фосфатный остов
ДНК

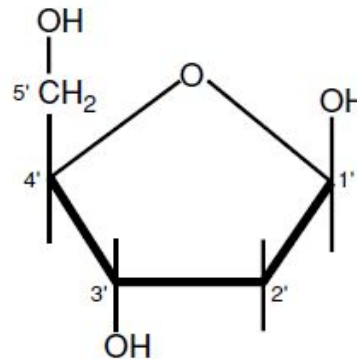


Thymine

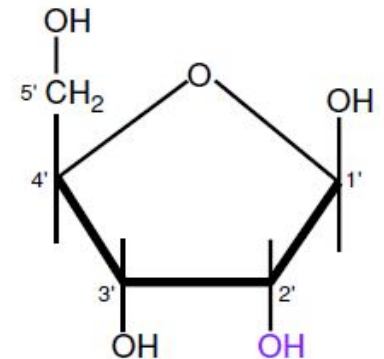
(5-метилурацил)



Uracil



Рибоз
а



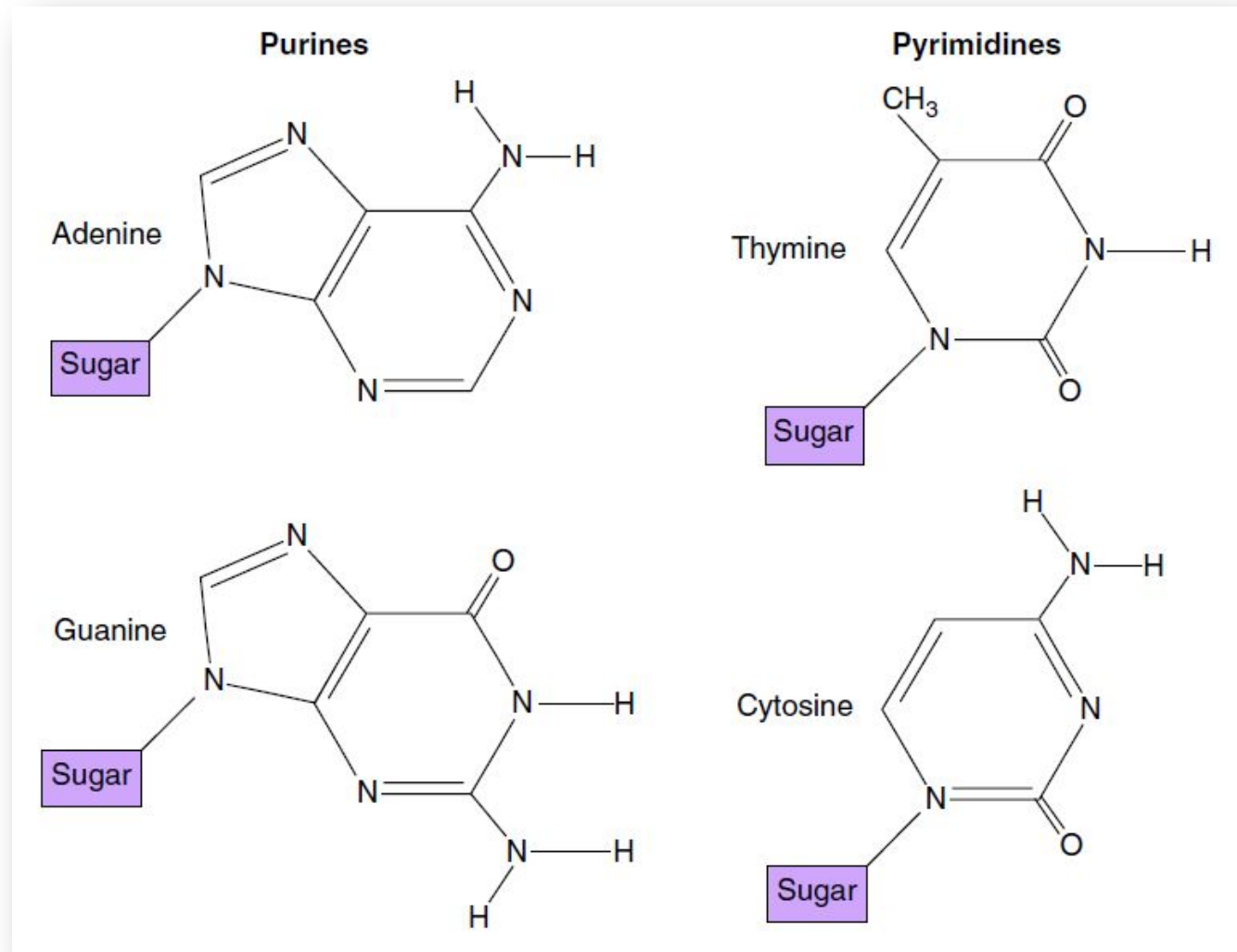
Дезоксирибо
за

Пуриновые и пиримидиновые основания ДНК

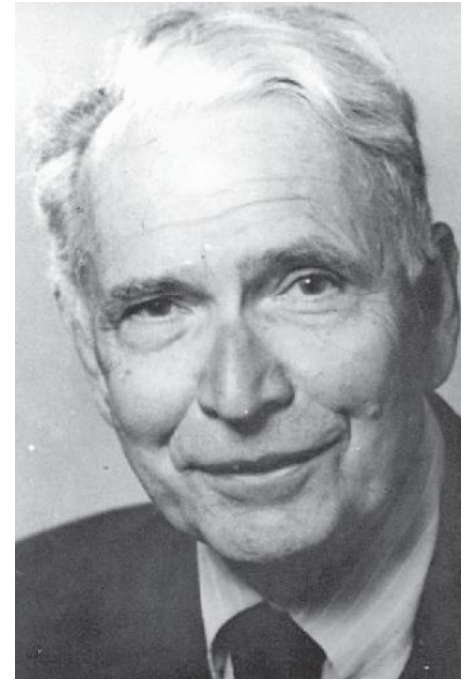
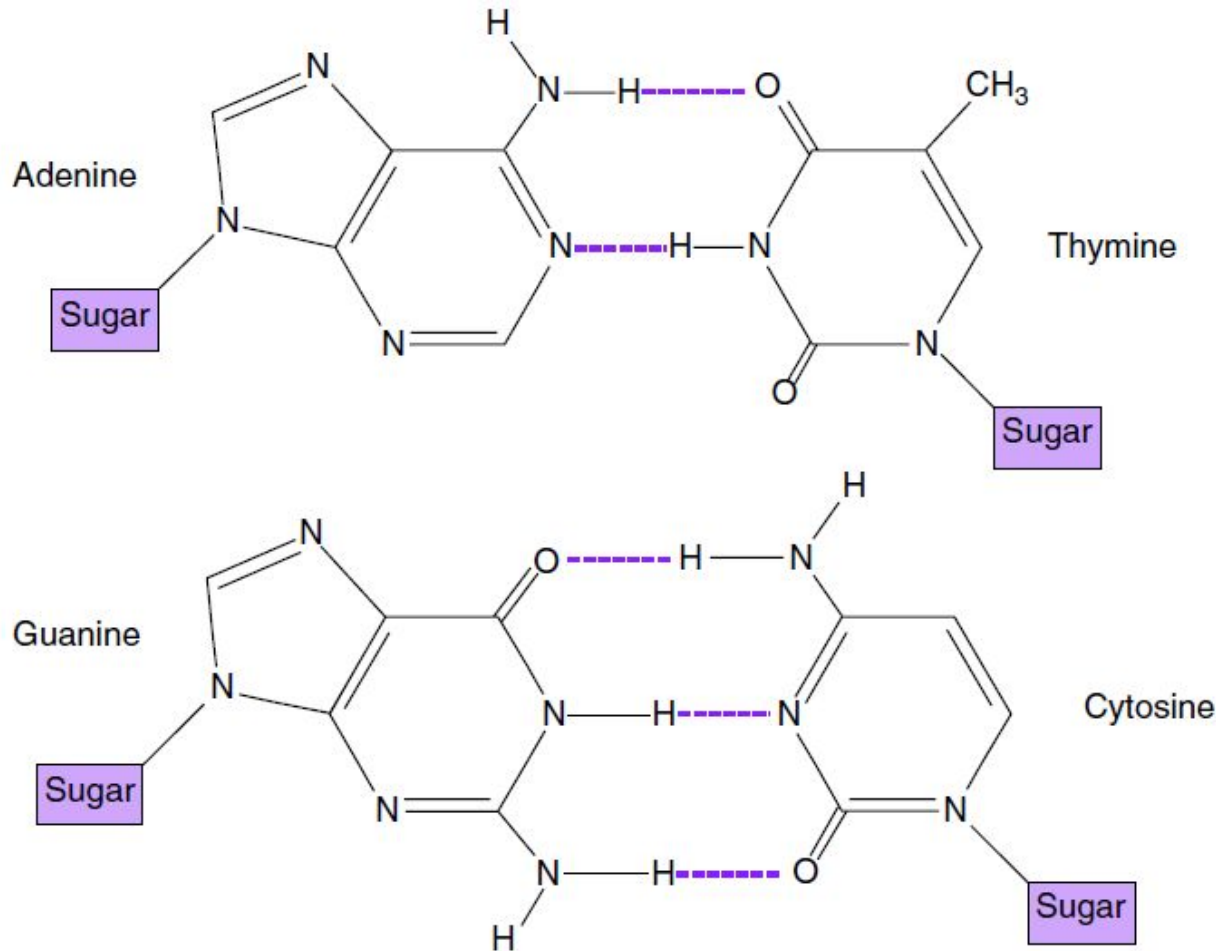
Азотистые основания

Гетероциклические ароматические химические соединения

У пуринов молекула пиримидина объединена с кольцом имидазола



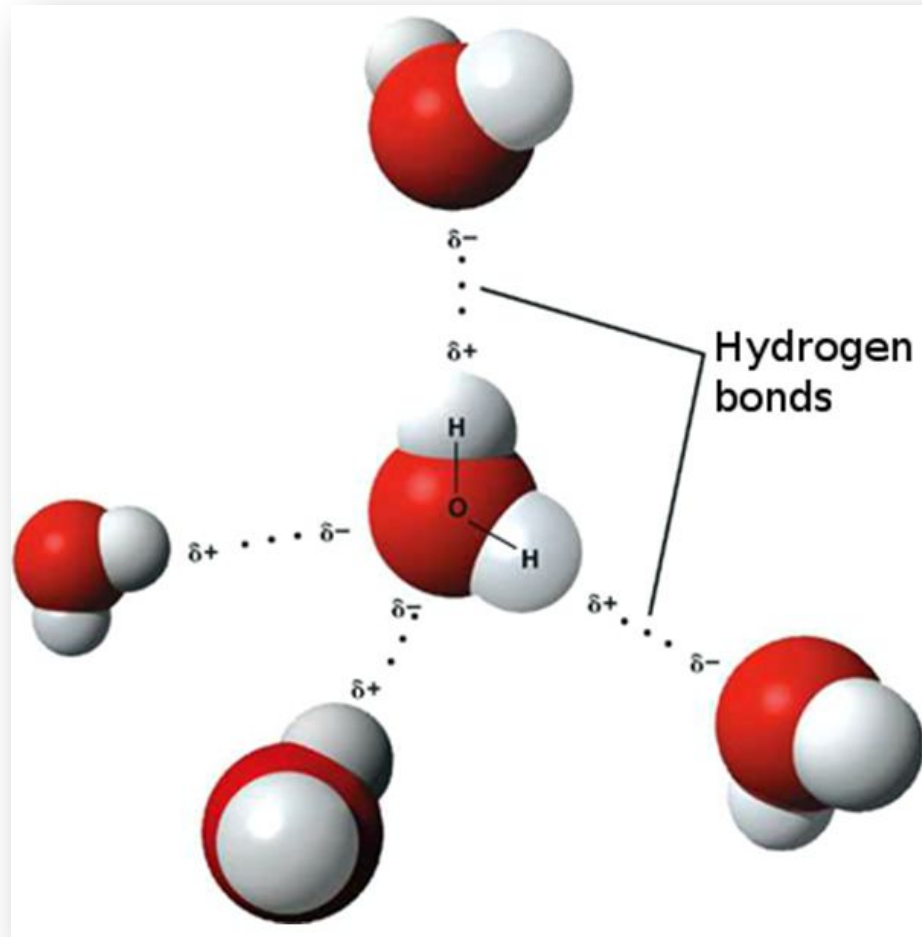
Комплементарные взаимодействия



Erwin Chargaff

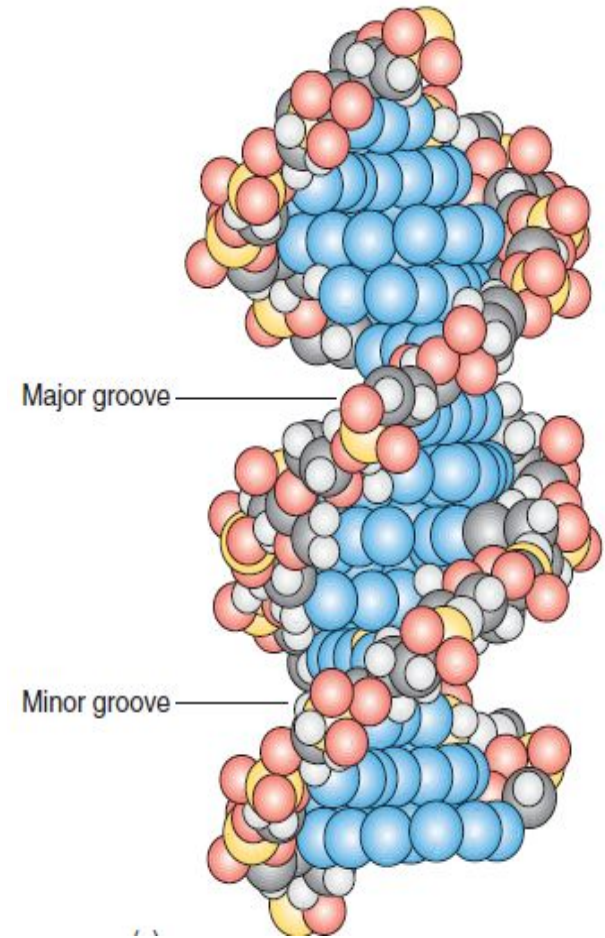
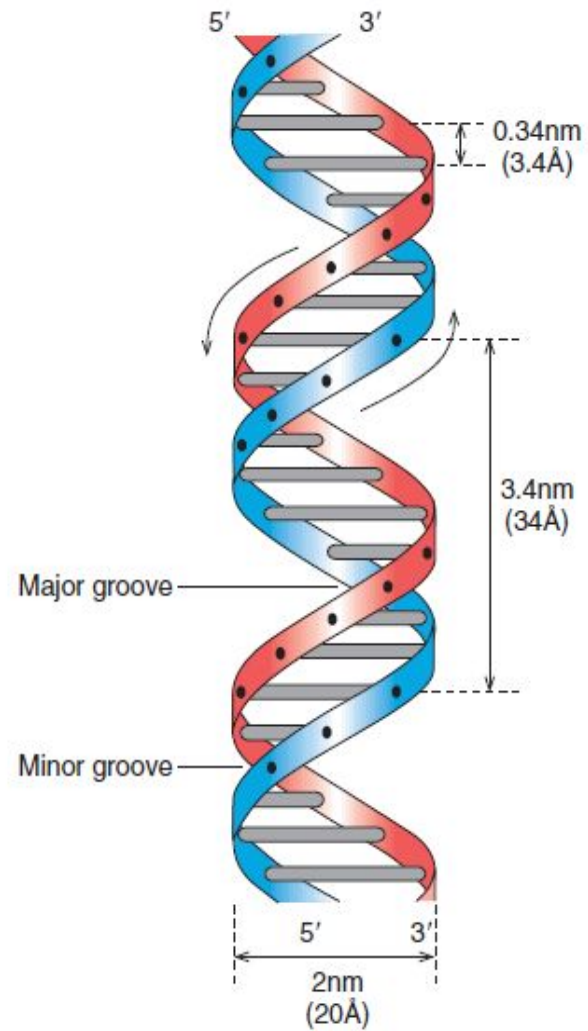
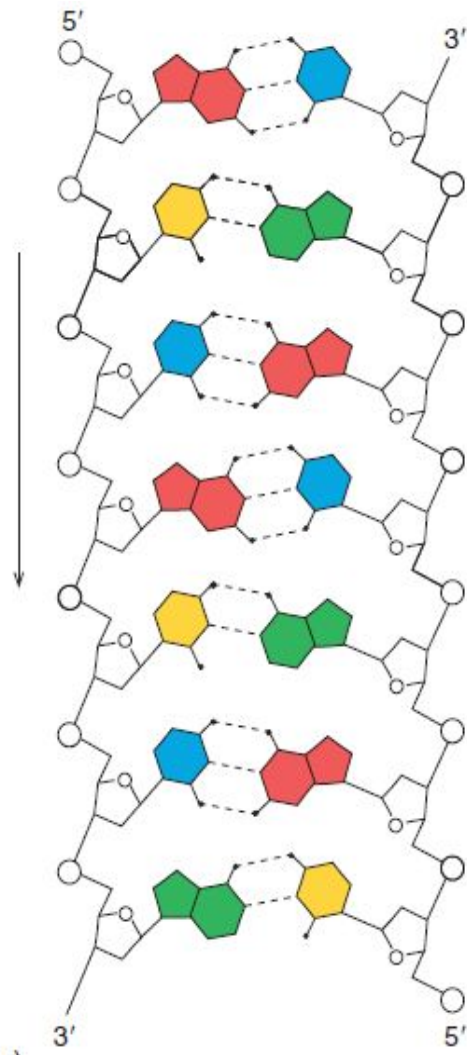
Азотистые основания, соединяясь ковалентной связью с 1'-атомом рибозы или дезоксирибозы, образуют N-гликозиды, которые называют нуклеозидами

Водородные связи между молекулами ВОДЫ



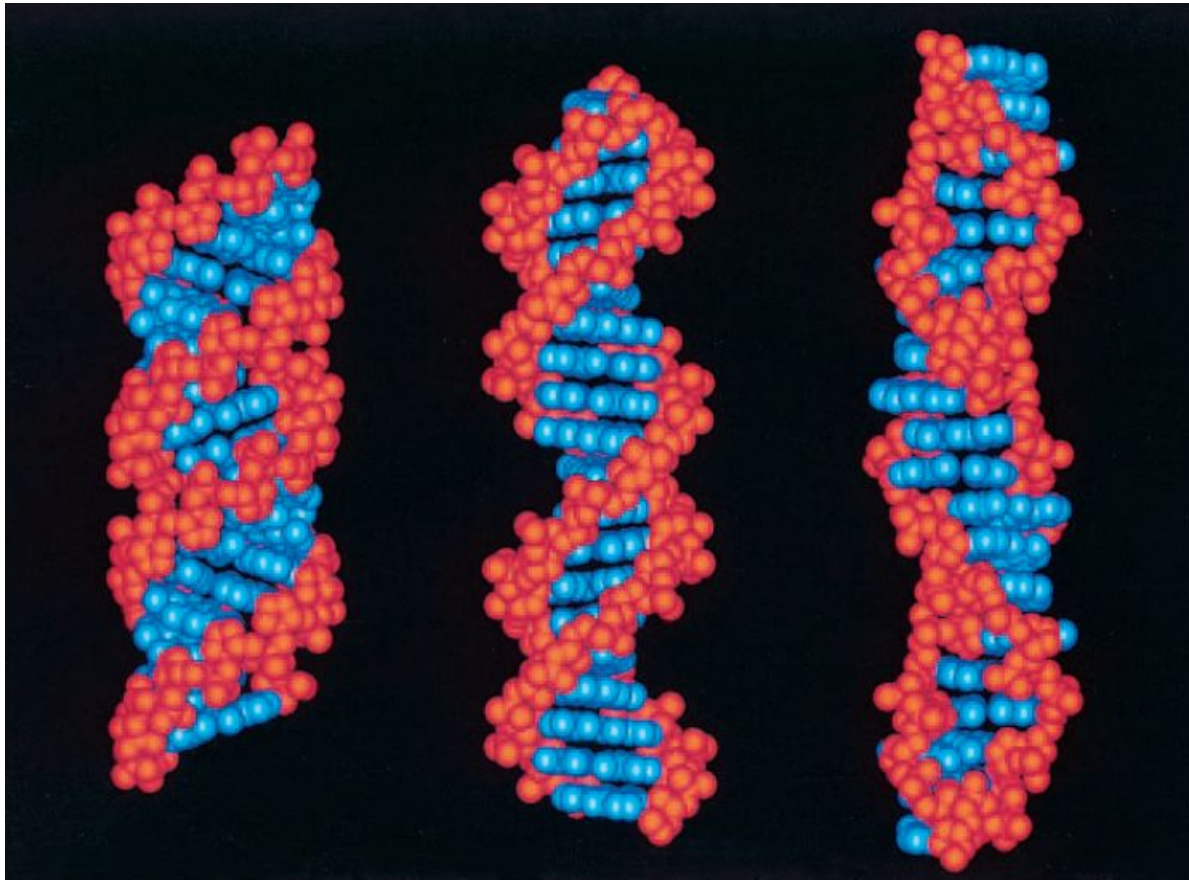
Слабое электростатическое взаимодействие между положительно заряженными атомами водорода и отрицательно заряженными электроотрицательными атомами

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

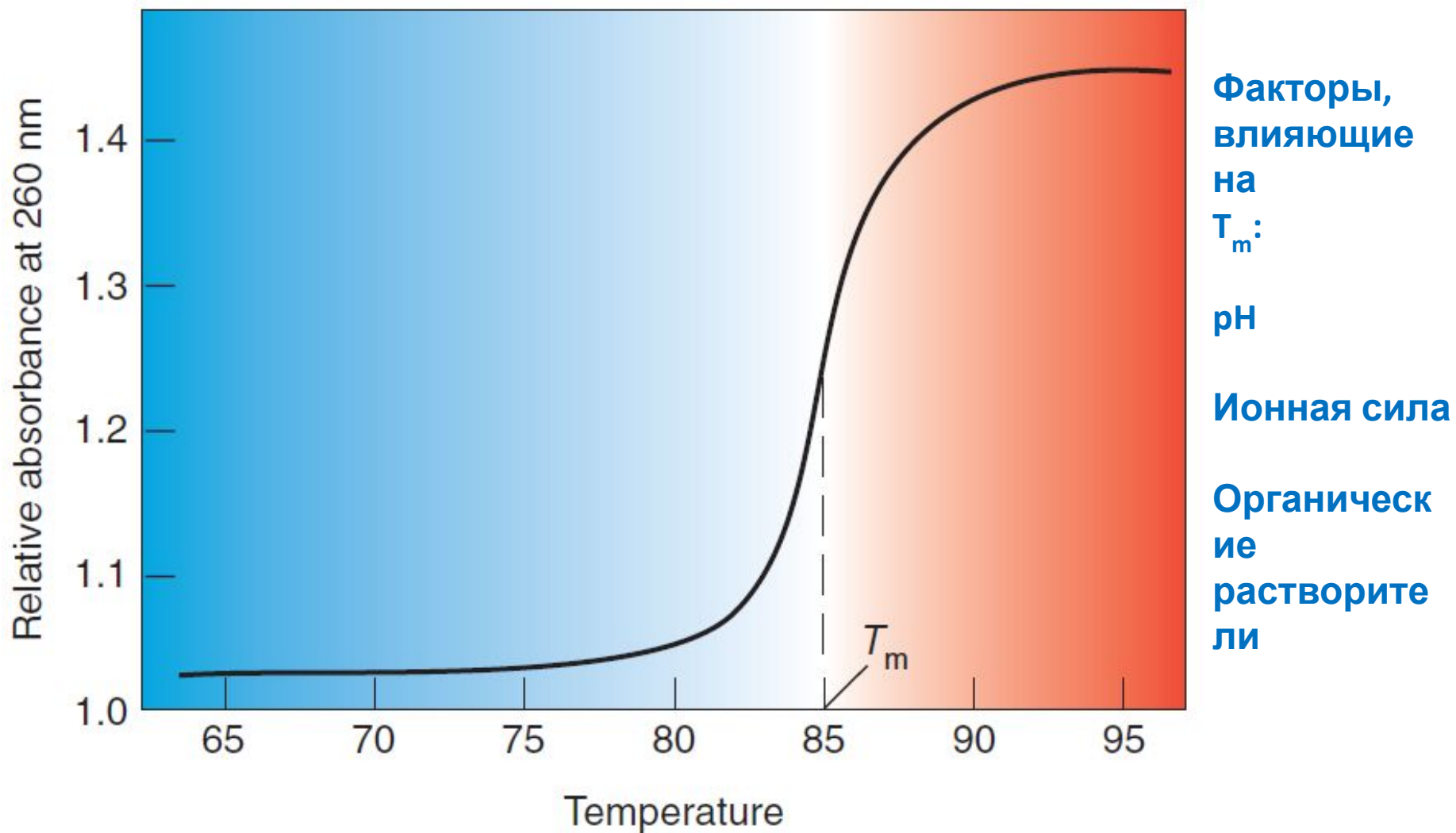
B-форма: обычная конформация ДНК в клетке

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

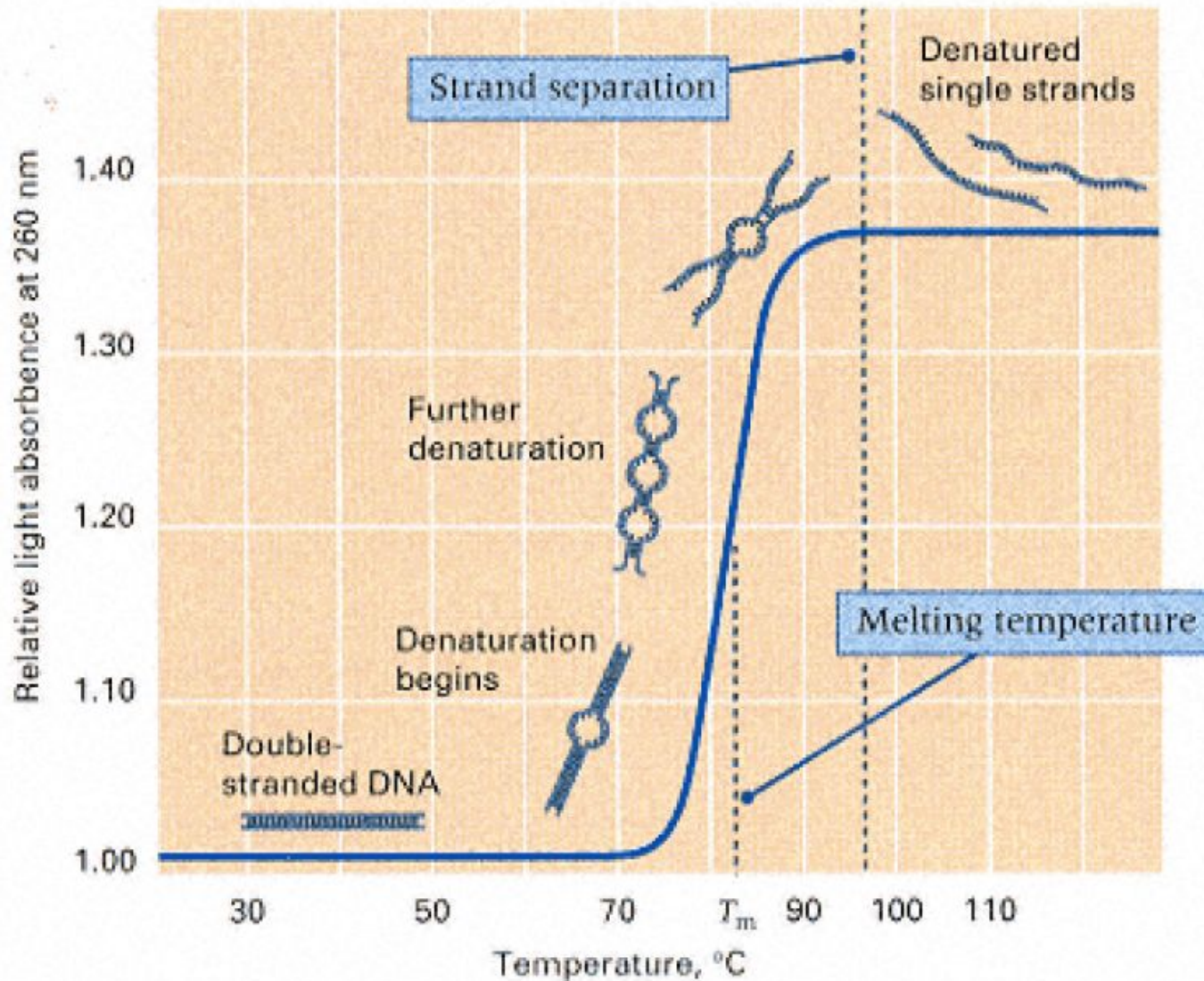
Отрезки ДНК одинаковой длины

Плавление (денатурация) ДНК

Streptococcus pneumoniae

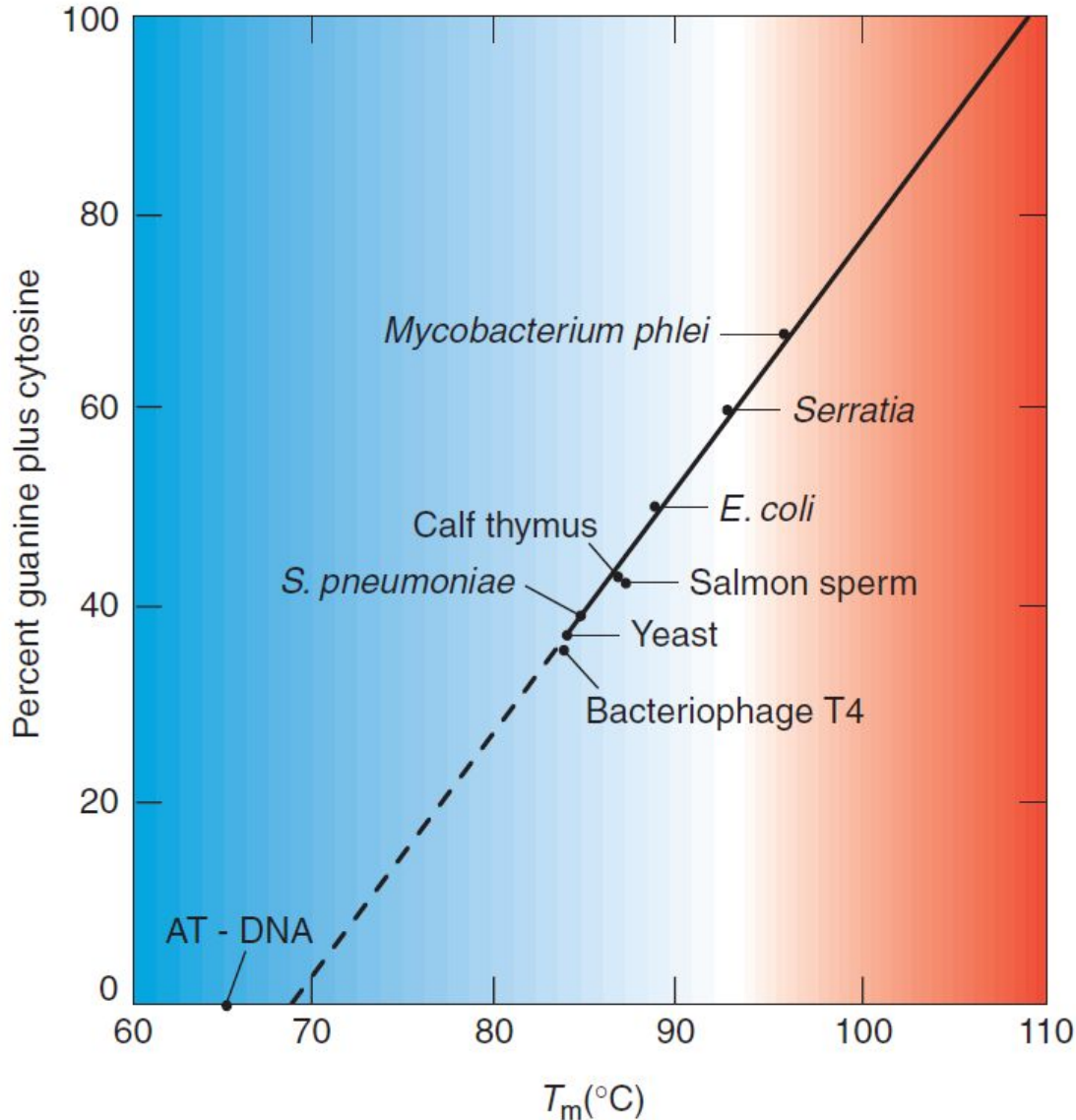


Плавление (денатурация) ДНК



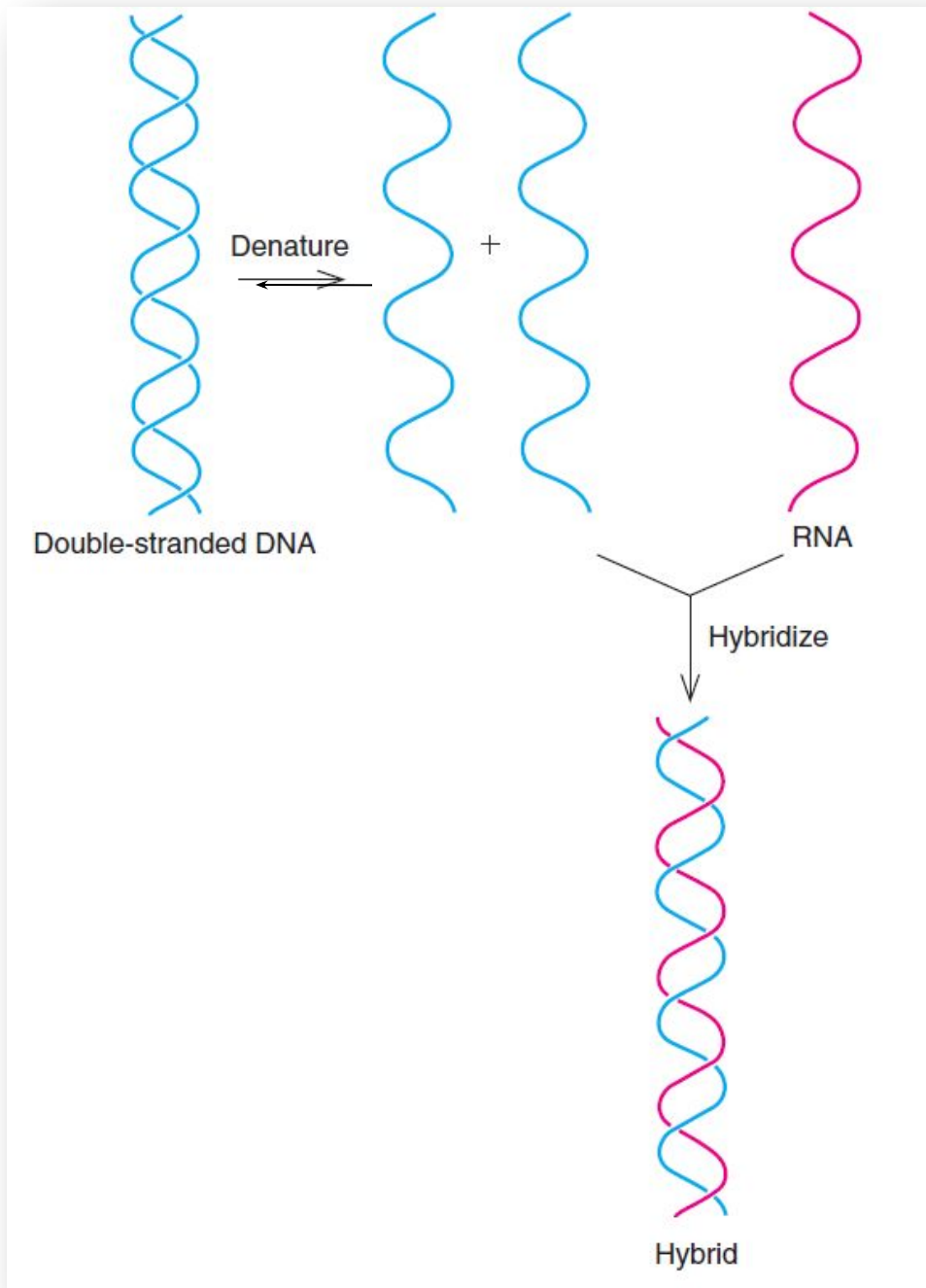
**Температура плавления ДНК
(T_m) – это температура, при
которой цепи ДНК
диссоциированы наполовину**

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

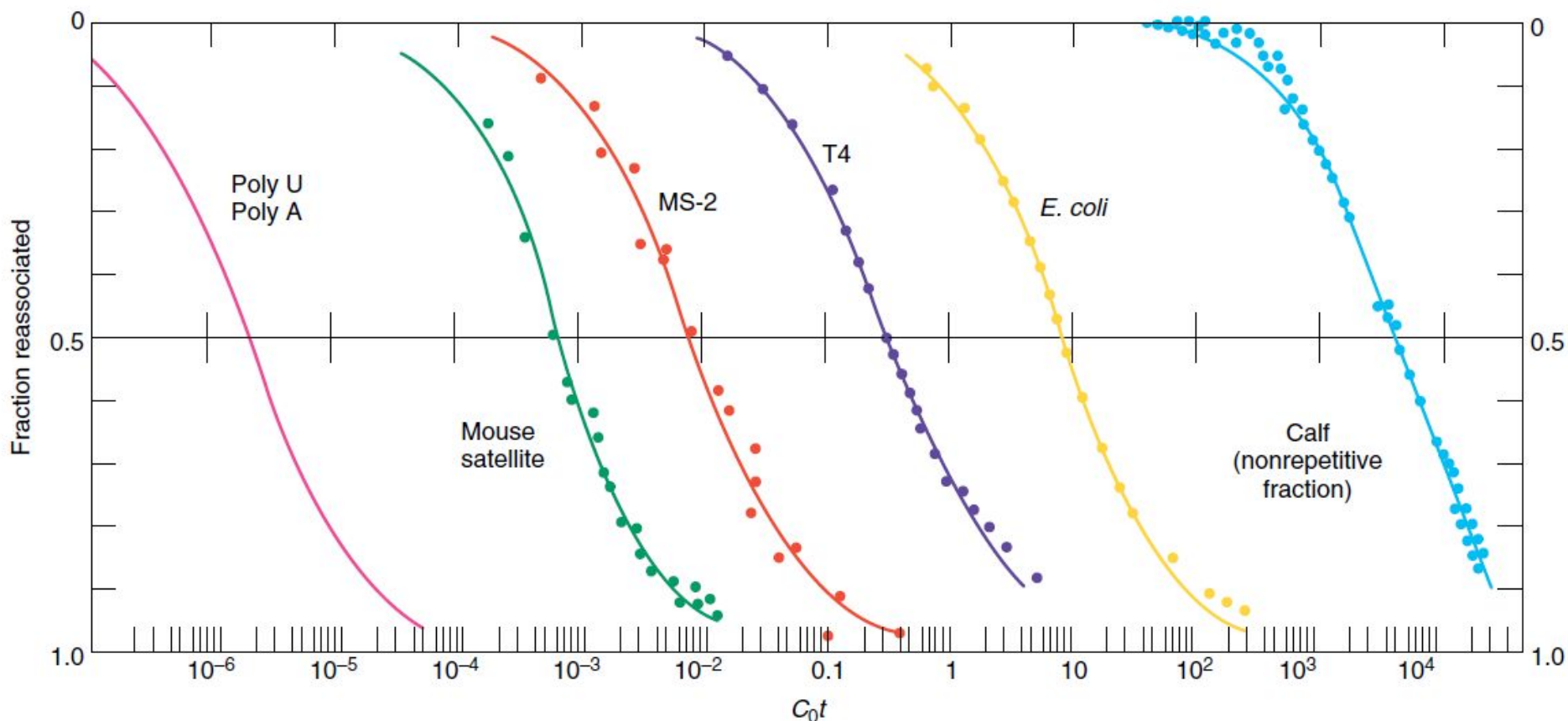
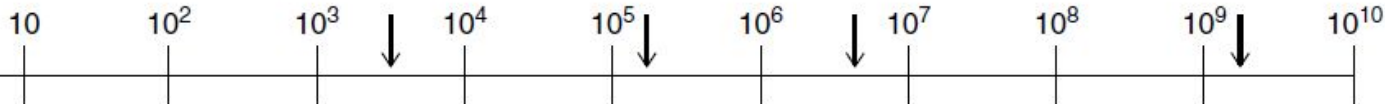
Гибридизация – ренатурация различных цепей ДНК (ДНК-ДНК-гибриды) или ДНК и РНК (ДНК-РНК-гибриды)

Температура гибридации ниже температуры плавления ДНК

Кинетика ренатурации разных ДНК

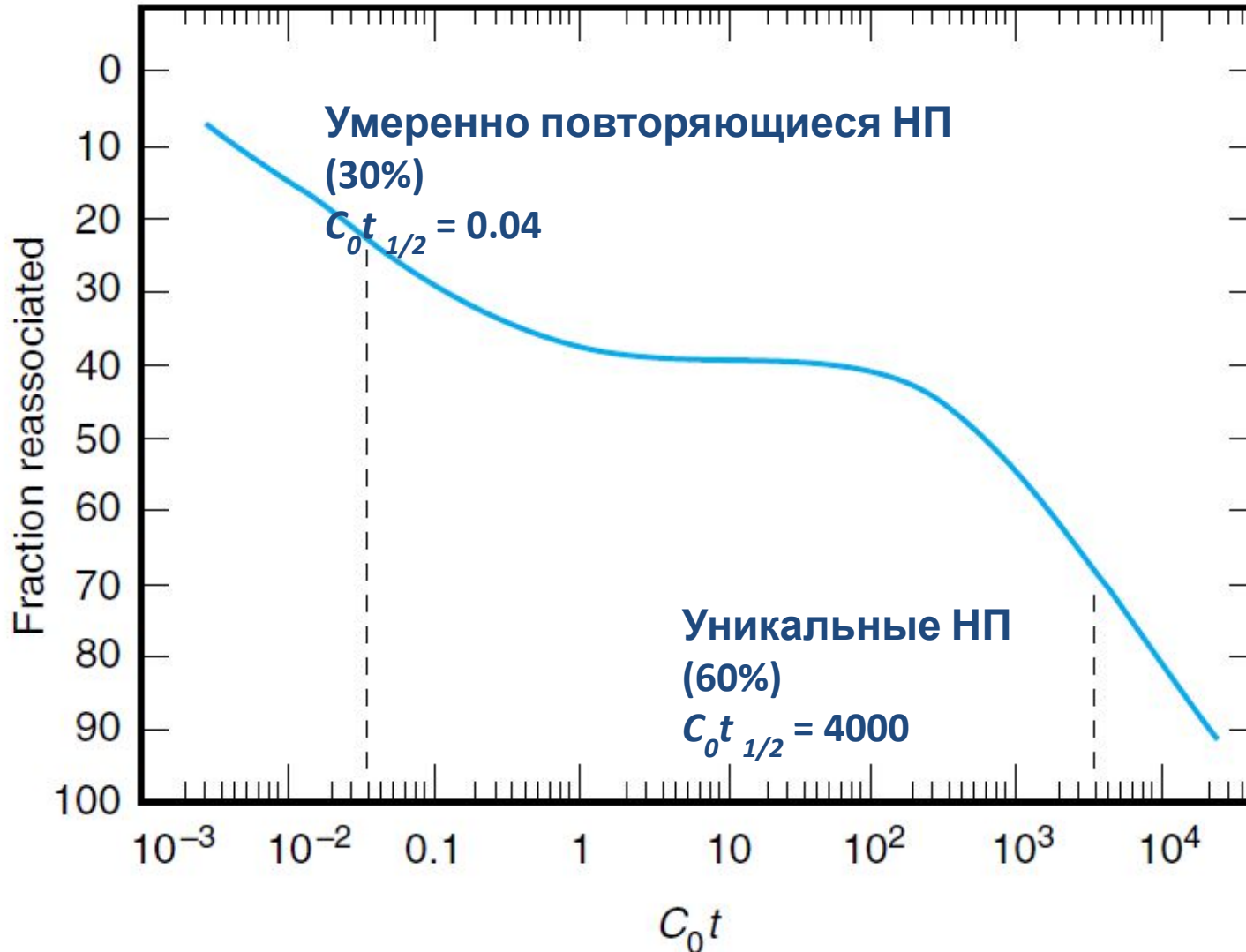
Сложность ДНК₁ ↓

Nucleotide pairs



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

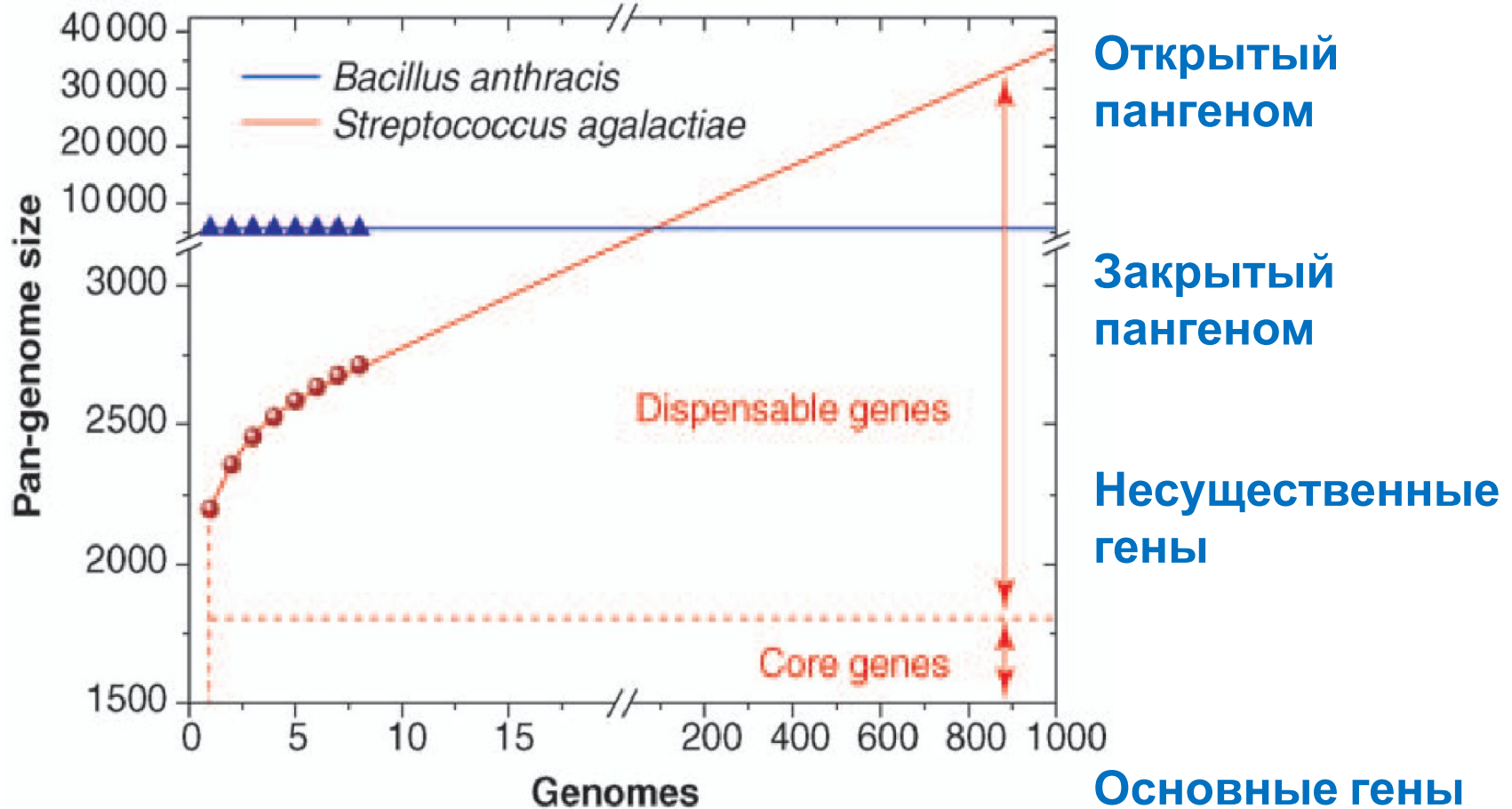
CAGCCT

Комплементарная
инвертированная
последовательность

Определение терминов: «Геном»

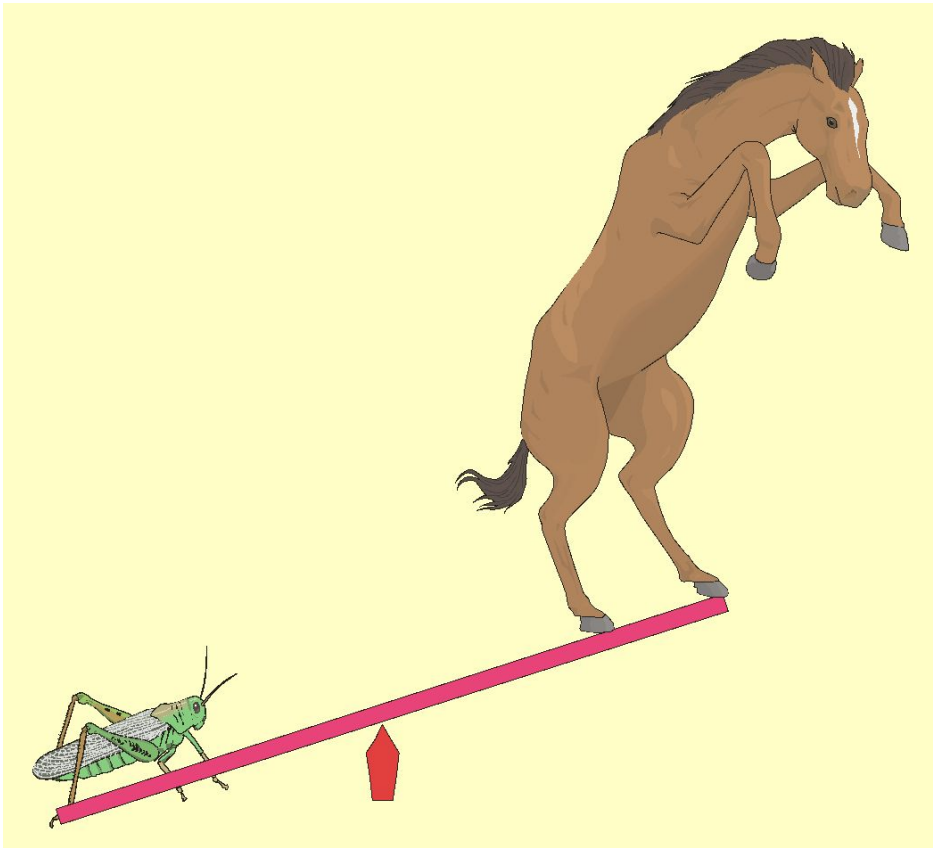
- ◆ Геном – совокупность всей ДНК гаплоидного набора хромосом, внехромосомных генетических элементов и органелл клетки зародышевой линии биологического вида
 - ◆ Введен Г. Винклером в 1922 г.
 - ◆ В отличие от термина «генотип» является биологической характеристикой вида в целом, а не отдельной особи
 - ◆ 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:

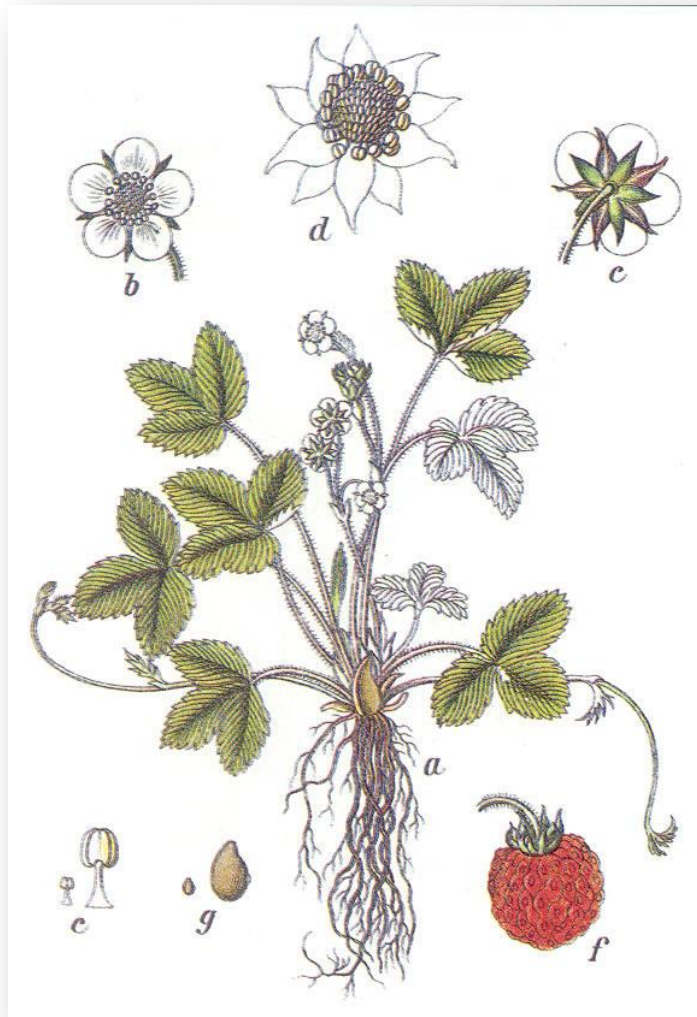
Кузнечик – 17 pg

Лошадь – 3,2 pg

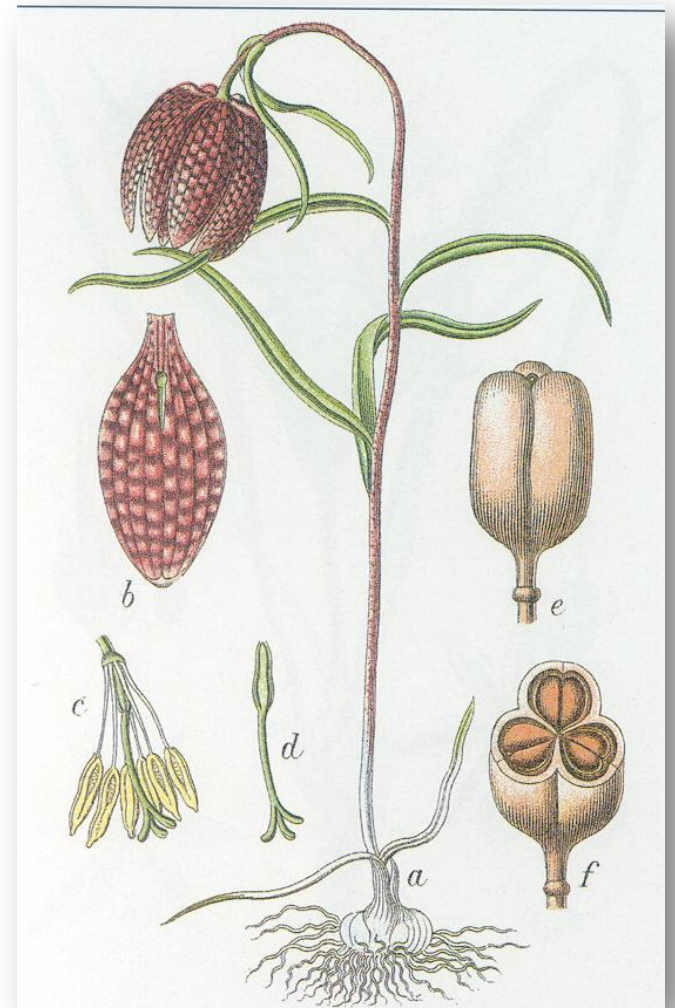
1 pg ДНК = 1000 млн.п.
Н.

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>)	

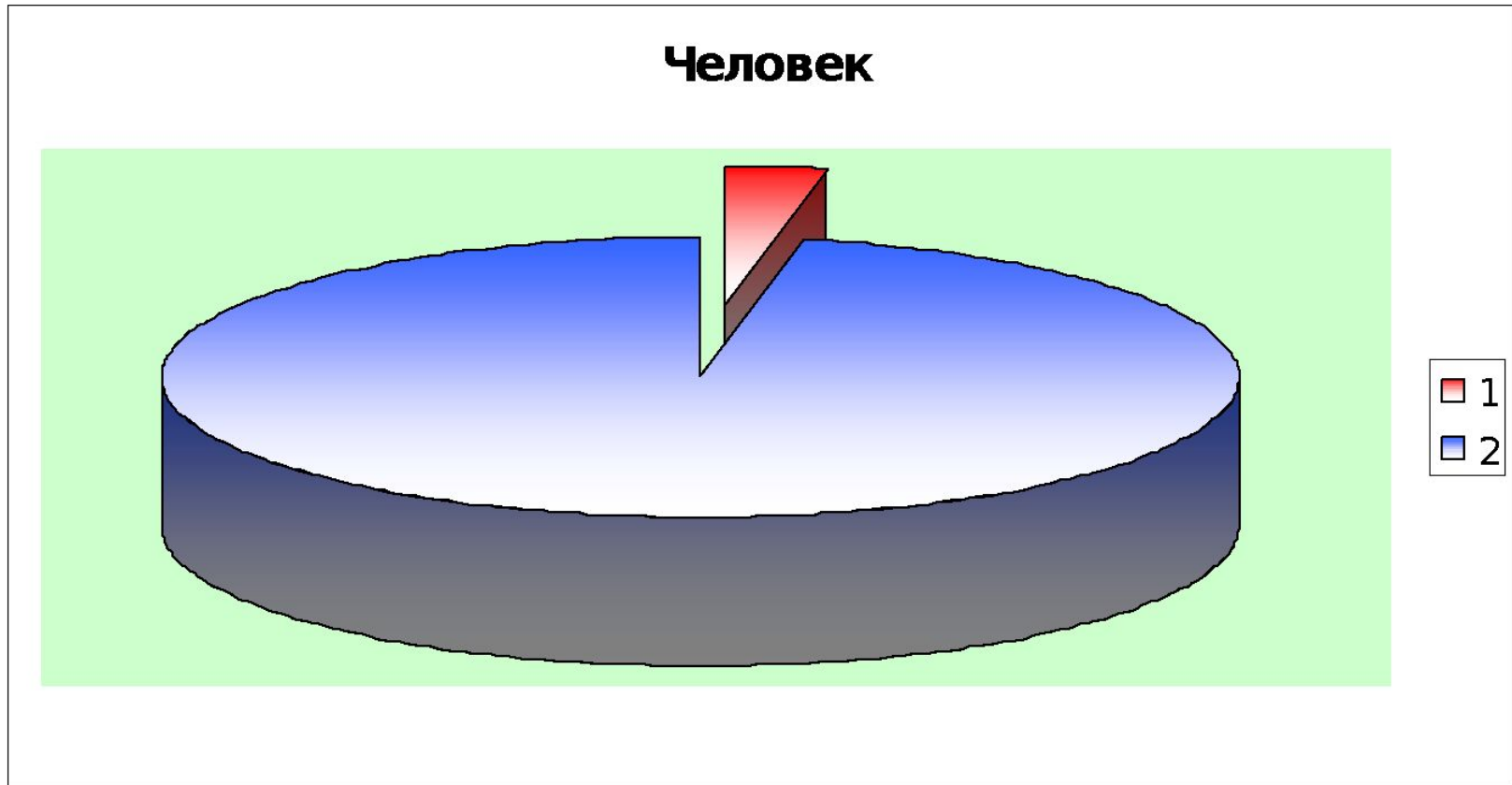
1 pg ДНК = 1000 млн.п.

Н

Парадокс исчезает, **загадка**

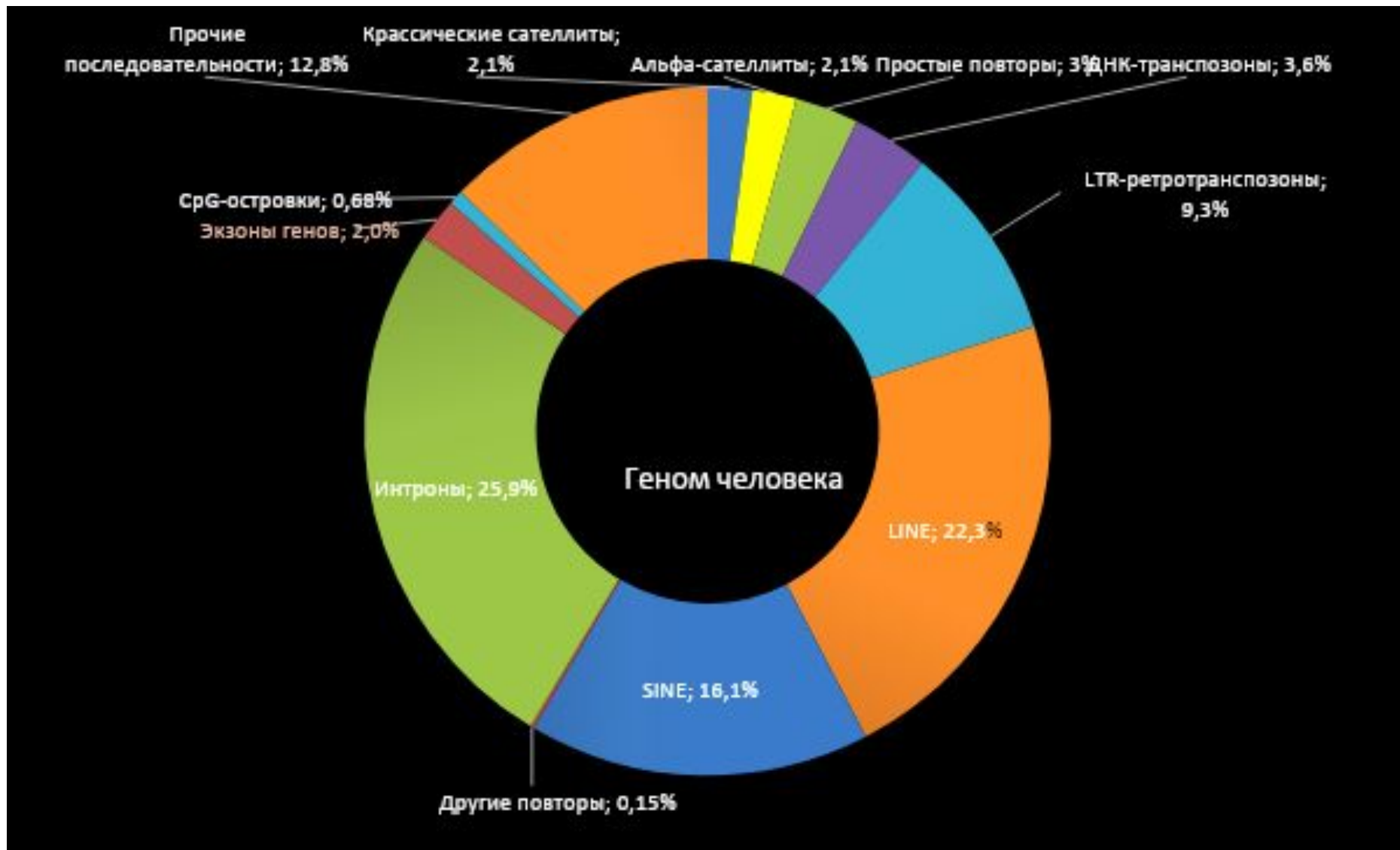
остаётся

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

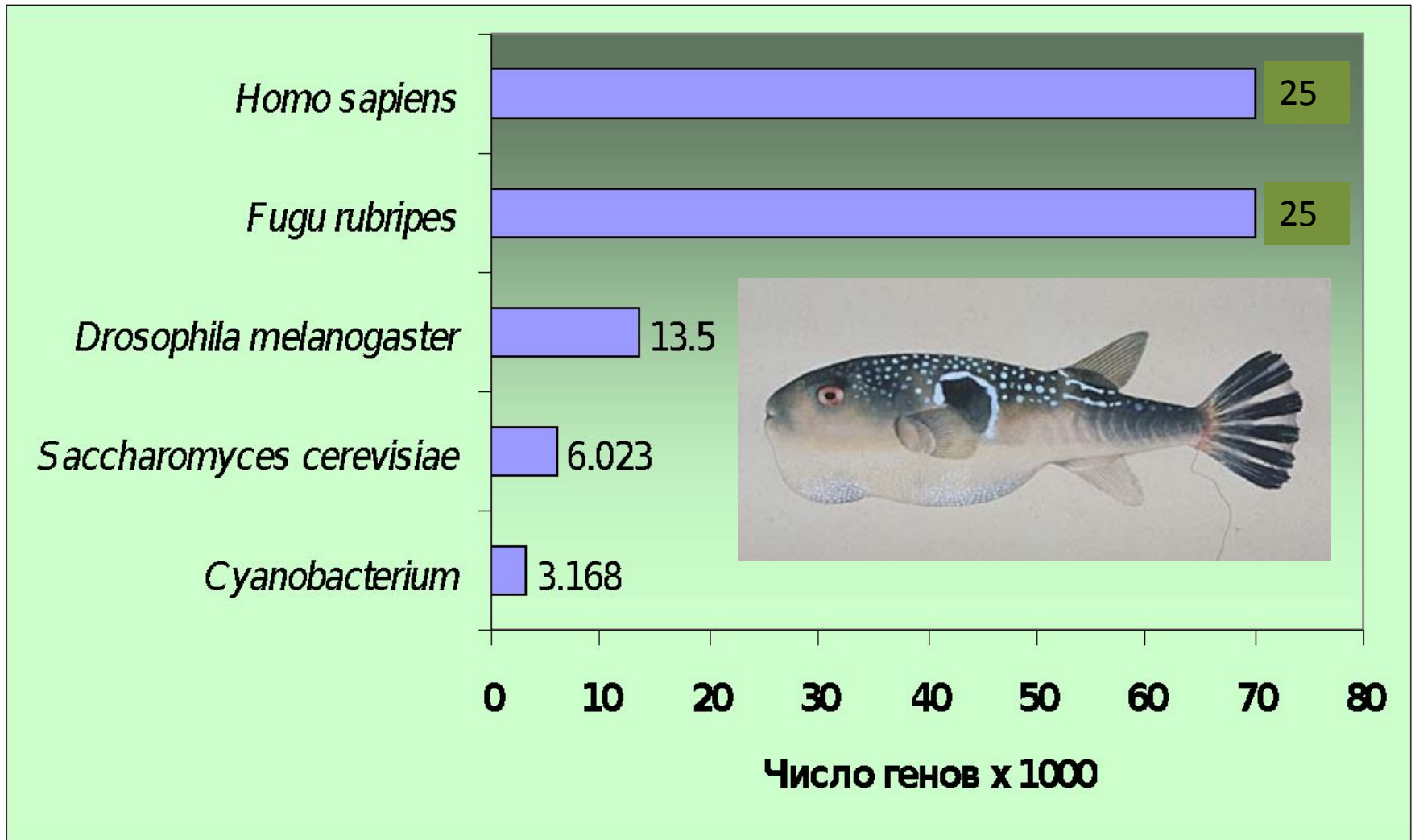


Кодирующие последовательности (1) ~ 2% от всего генома

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

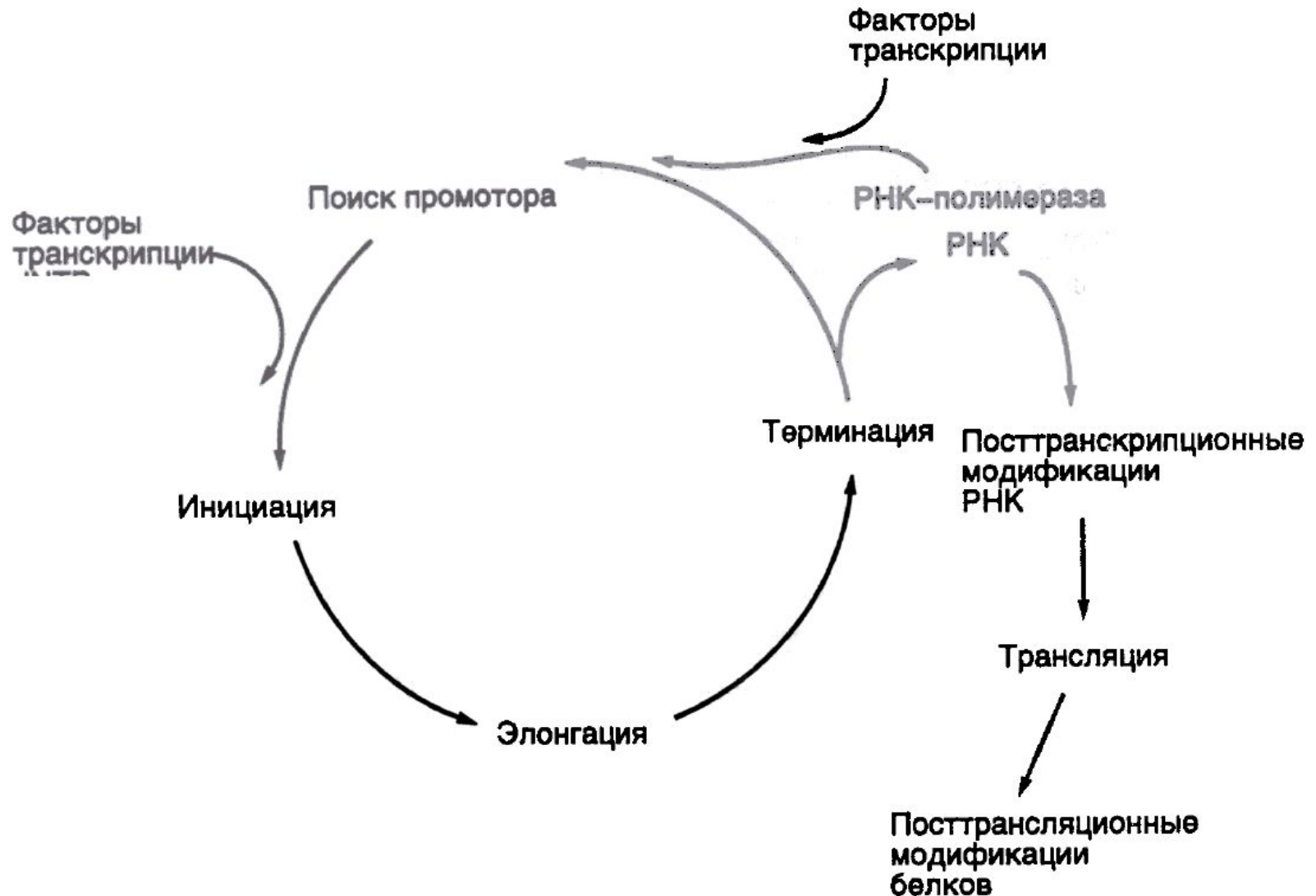
❖ Число **потенциальных** биохимических признаков, определяемых комбинаторным взаимодействием белков 10 разных генов:

Человек, мышь – $8,15 \times 10^{37}$ или 10^{38}
Дрозофила – $1,4 \times 10^{34}$

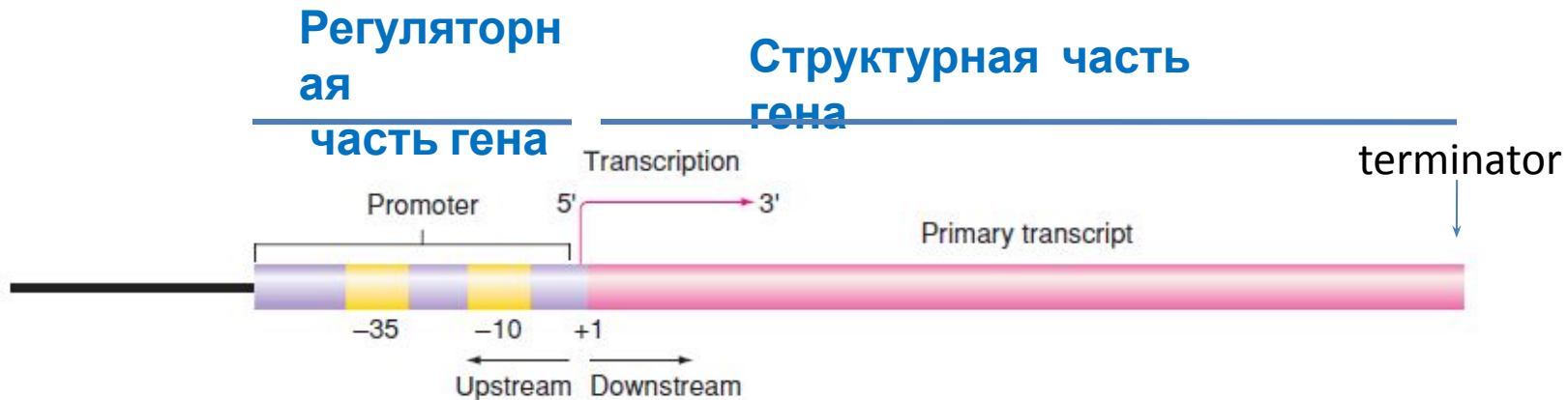
Резюме по геному

- ❖ **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



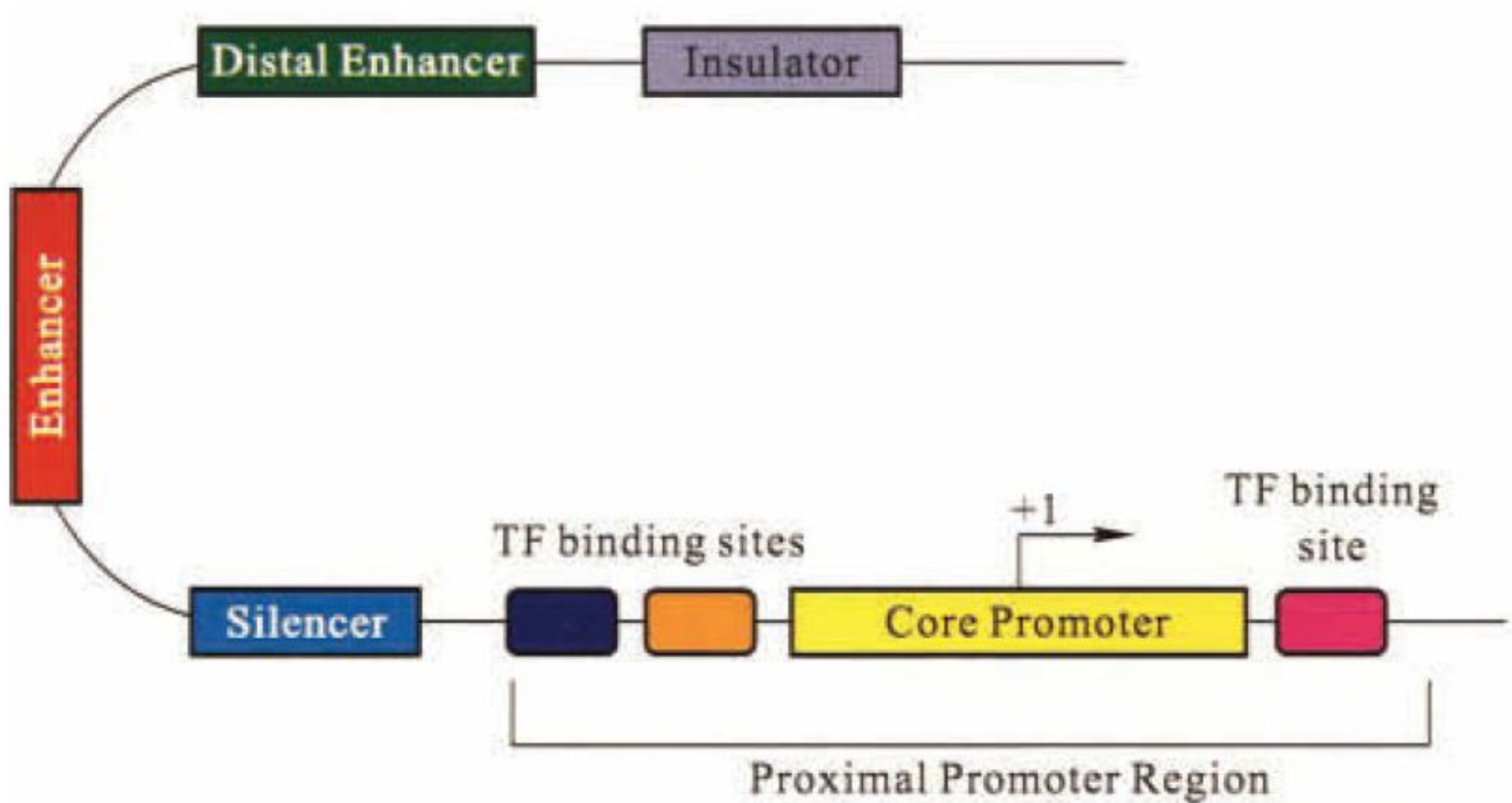
Структура бактериального гена и его некоторых сильных промоторов



(b) Strong *E. coli* promoters

rrn X1	ATGCATTTTTCCGCTTGTCTTCCTGA	• • GCGACTCCCTATAAT	GCGCCTCCATCGACACGGCGGAT
rrn (DXE) ₂	CCTGAAATTCAGGGTTGACTCTGAAA	• • GAGGAAAGCGTAATATAC	GCCACCTCGCGACAGTGAGC
rrn A1	TTTTAAATTTCTCTTGTTCAGGCCGG	• • AATAACTCCCTATAAT	GCGCCACCACTGACACGGAACAA
rrn A2	GCAAAAATAAA TGCTTGACTCTGTAG	• • CGGGAAGGCGTATTATGC	ACACCCCGCGCCGCTGAGAA
λ P _R	TAACACCGTGCCTGTTGACTATTTTA	CCTCTGGCGGTGATAATGG	• • TTGCATGTACTAAGGAGGT
λ P _L	TATCTCTGGCGGTGTTGACATAAATA	C CACTGGCGGTGATACTGA	• • GCACATCAGCAGGACGCAC
T7 A3	GTGAAACAACCGTTGACAACATGA	• A GTAAACACGGTACGATGT	ACCACATGAAACGACAGTGA
T7 A1	TATCAAAAAGAGTATTGACTTAAAGT	• C T AACCTATAGGATACTT A	CAGCCATCGAGAGGGACACG
T7 A2	ACGAAAAACAGGTATTGACAACATGA	A G T AACATGCAGTAAGATAC	• AAATCGCTAGGTAACTACTAG
fd VIII	GATACAAATCTCCGTTGTACTTTGTT	• TCGCGCTTGGTATAATCG	• CTGGGCGTCAAAGATGAGTG
Consensus	TTGACAT	15 – 17 bp	TATAAT
			5' Primary transcript 3'

Модули, контролирующие транскрипцию, в эукариотических генах, кодирующих белки



TF - transcription factor – фактор транскрипции

Коровый промотор:

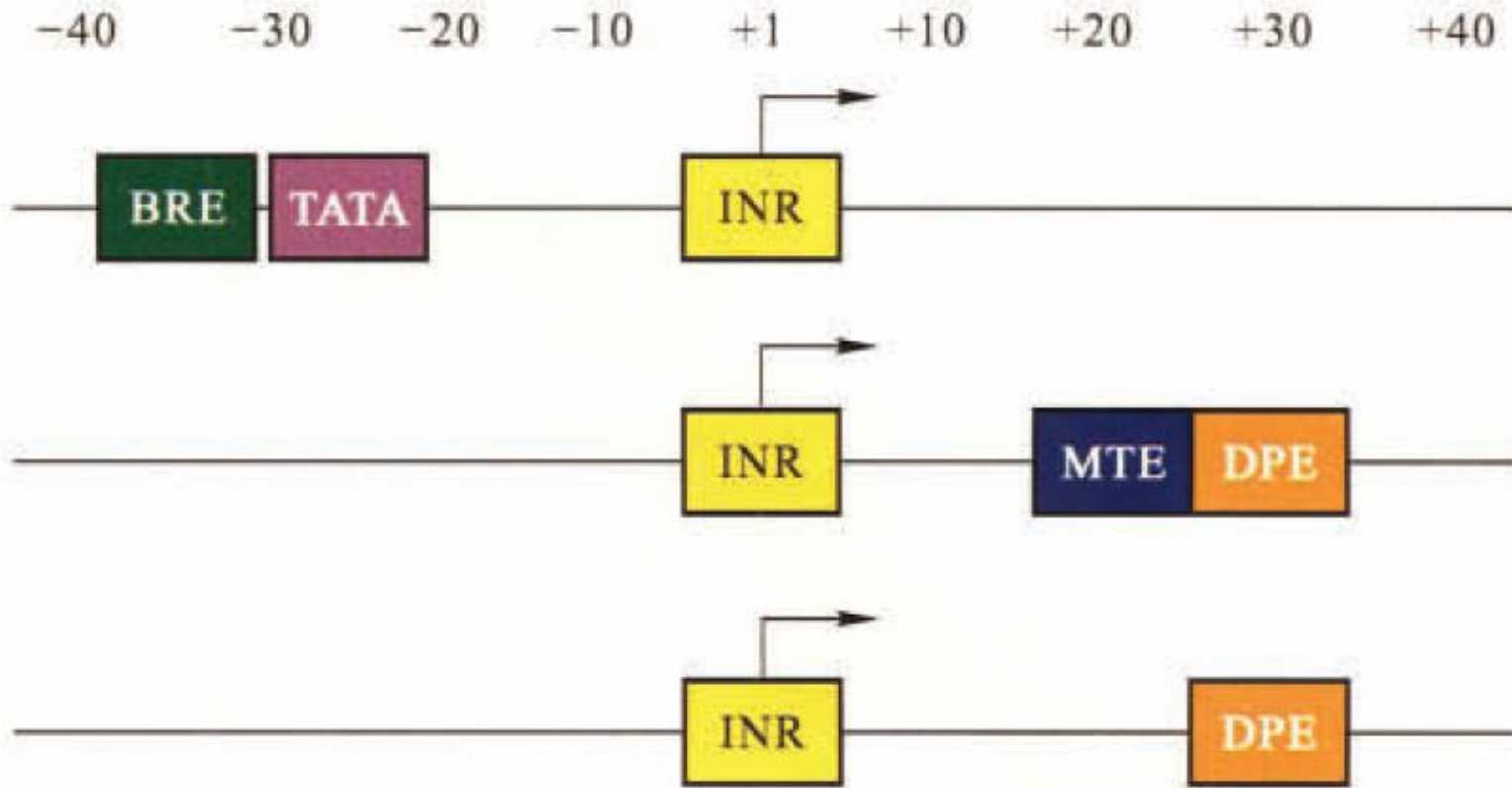
минимальная последовательность нуклеотидов, обеспечивающая правильную инициацию транскрипции в отсутствие других цис-действующих элементов

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

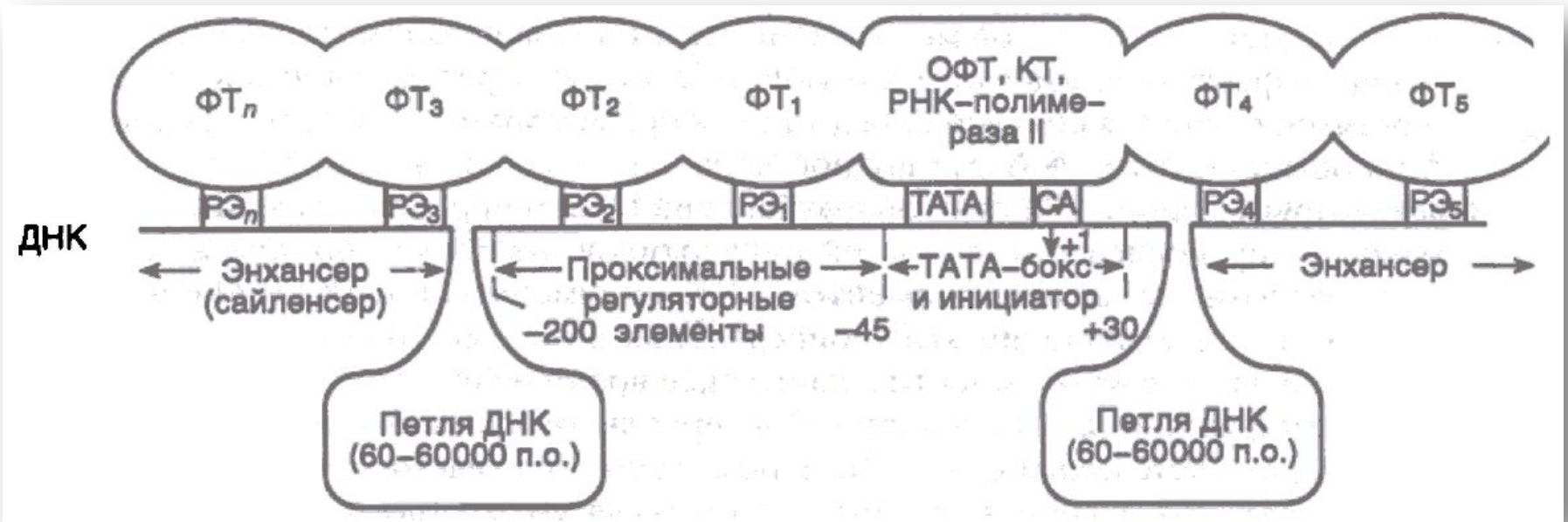
Элементы корового (базового) промотора эукариотической РНК-полимеразы II



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

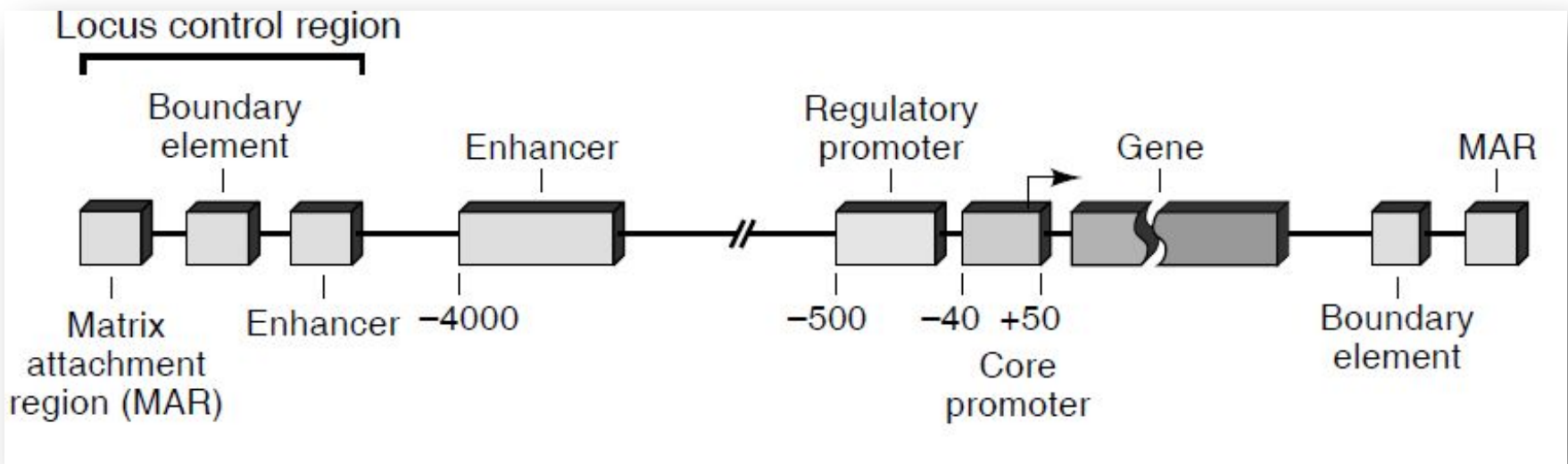
(нижний промоторный элемент), **MTE** - motif ten element – все являются сайтами связывания субъединиц TFIID **BRE** – сайт TFIIB

Межмолекулярные взаимодействия на промоторе РНК-полимеразы II

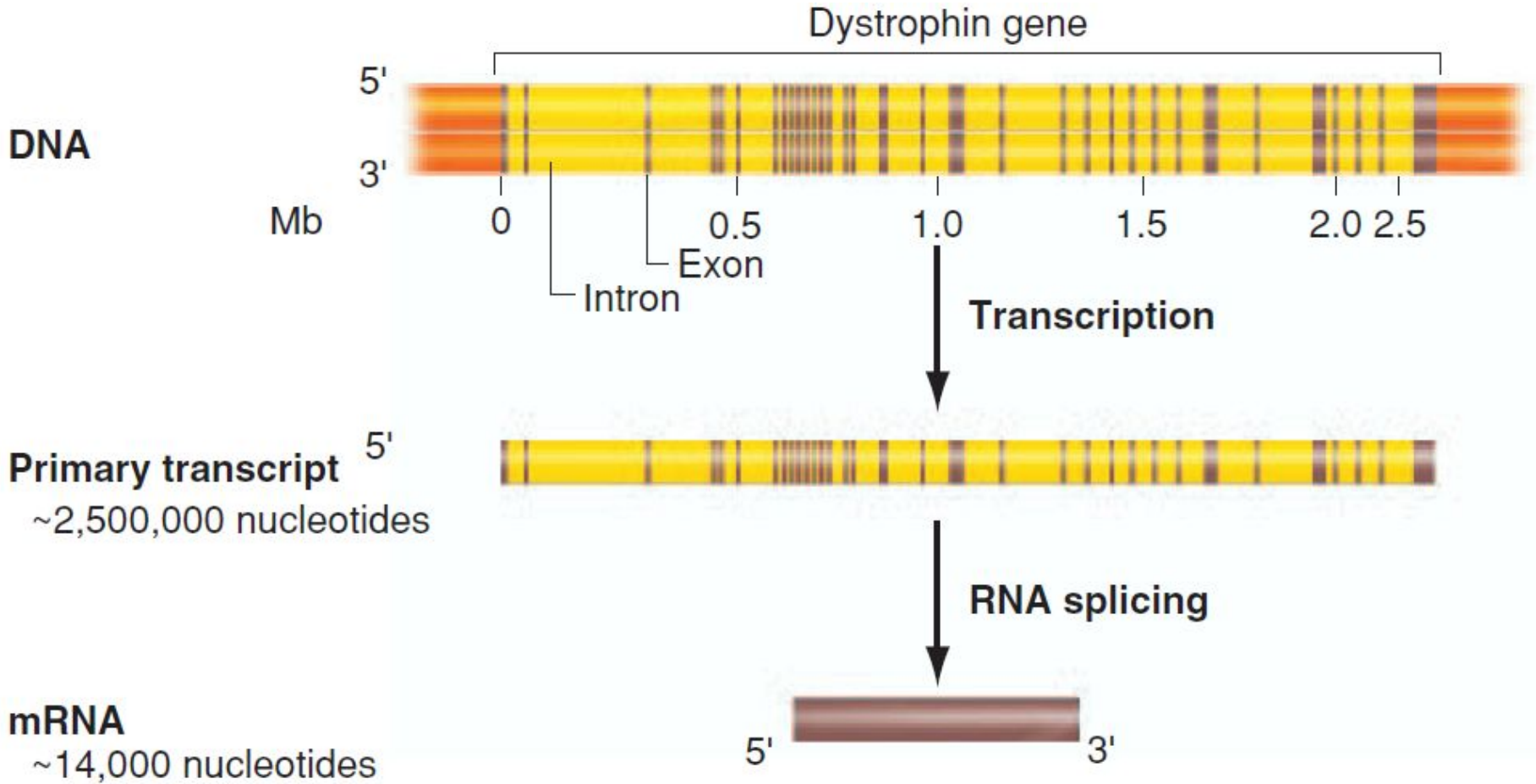


- ФТ** – факторы транскрипции; **ОФТ** – основные факторы транскрипции;
- РЭ** – регуляторные элементы (последовательности) ДНК,
- КТ** – коактиваторы транскрипции

Обобщенная структура эукариотического гена



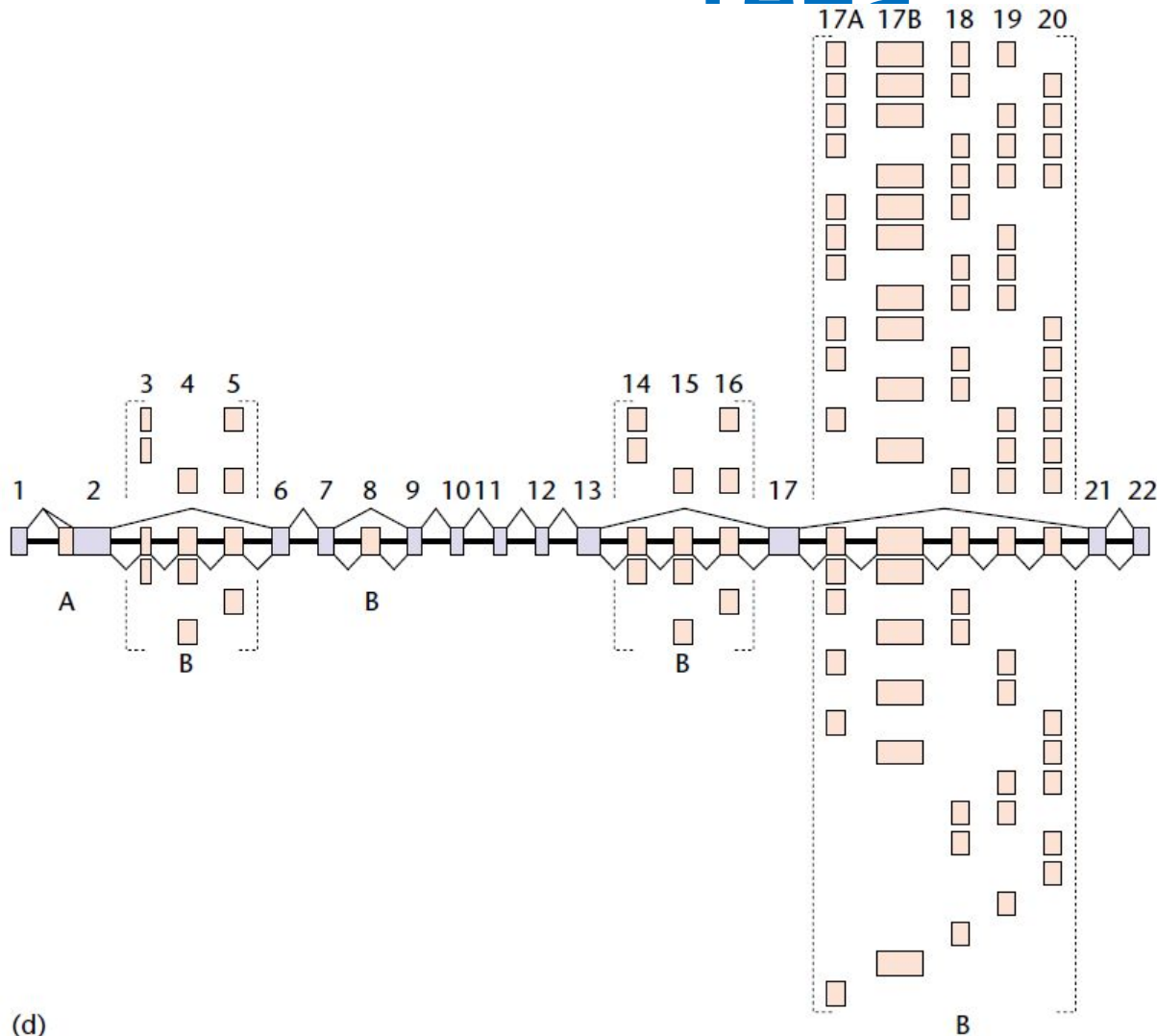
Ген дистрофина человека и продукты его транскрипции



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

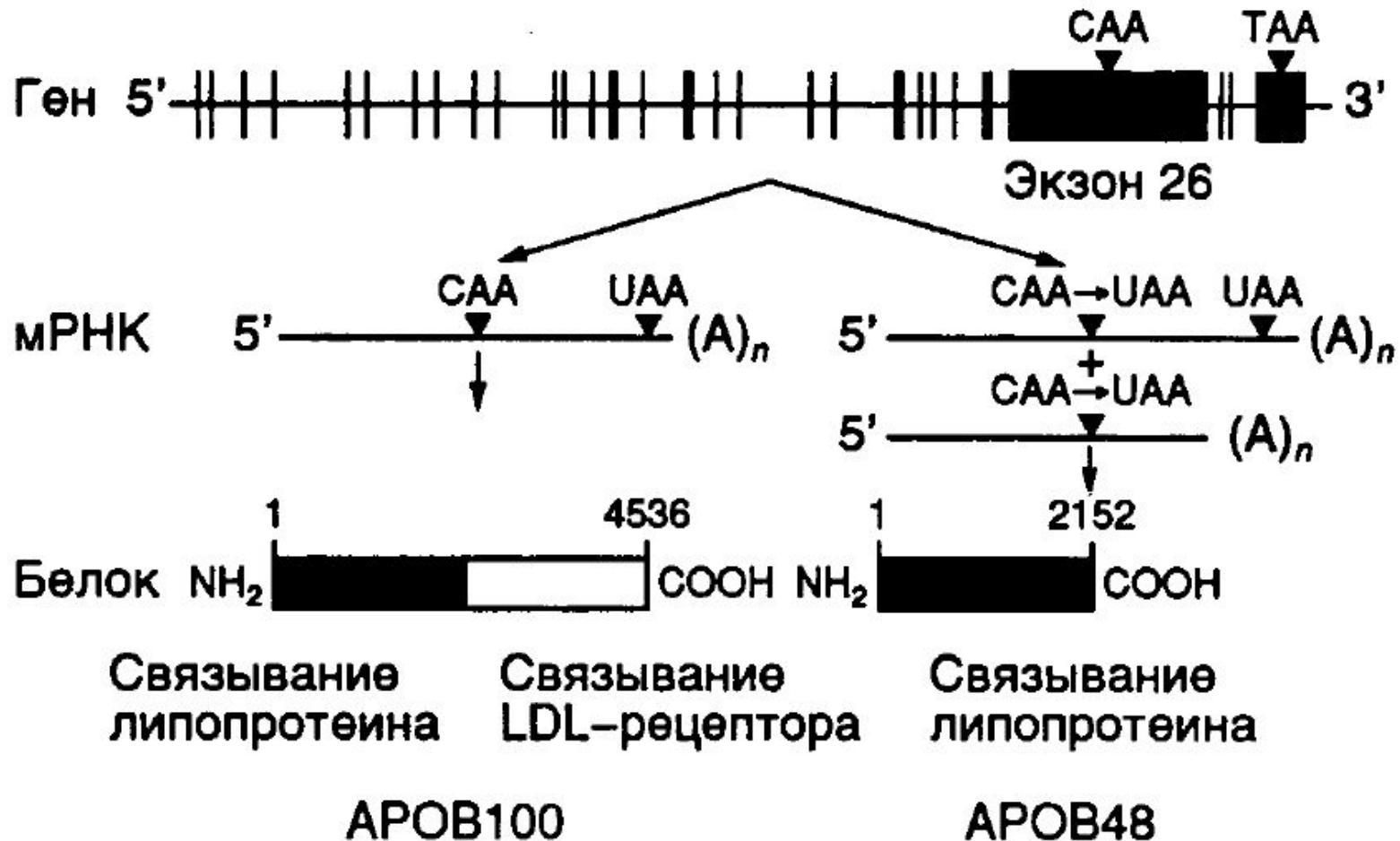
33 продукта альтернативного сплайсинга транскрипта одного гена

ген



(d)

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

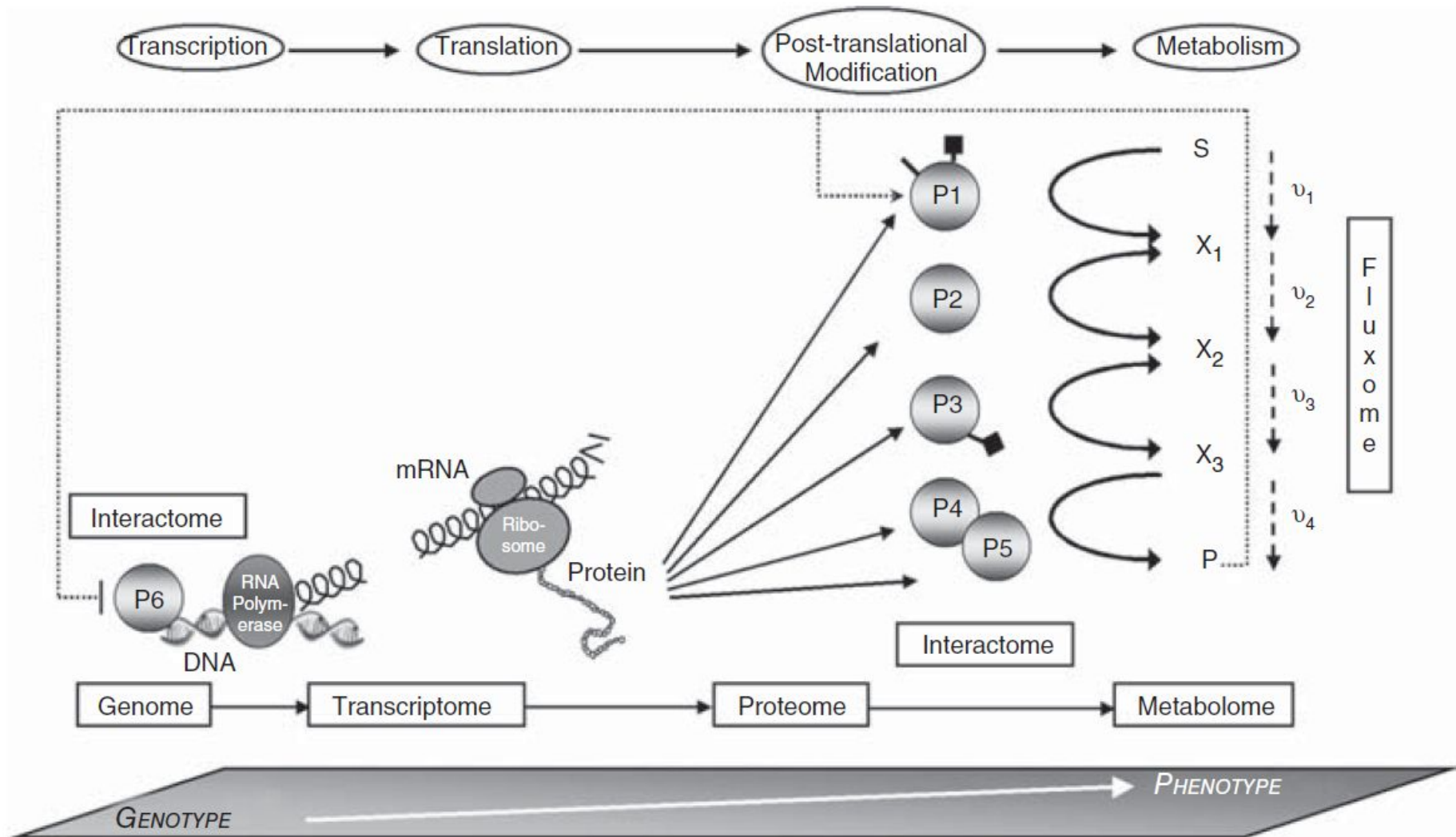
- ◆ Ген – фрагмент нуклеиновой кислоты, в последовательности которой закодирована информация о последовательностях других НК или белков
- ◆ Изменения фенотипа организма однозначно (?) связаны с мутационными изменениями его генотипа (т.е. изменениями последовательностей генов)
- ◆ Генотипические изменения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

Хорошо забытое старое

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

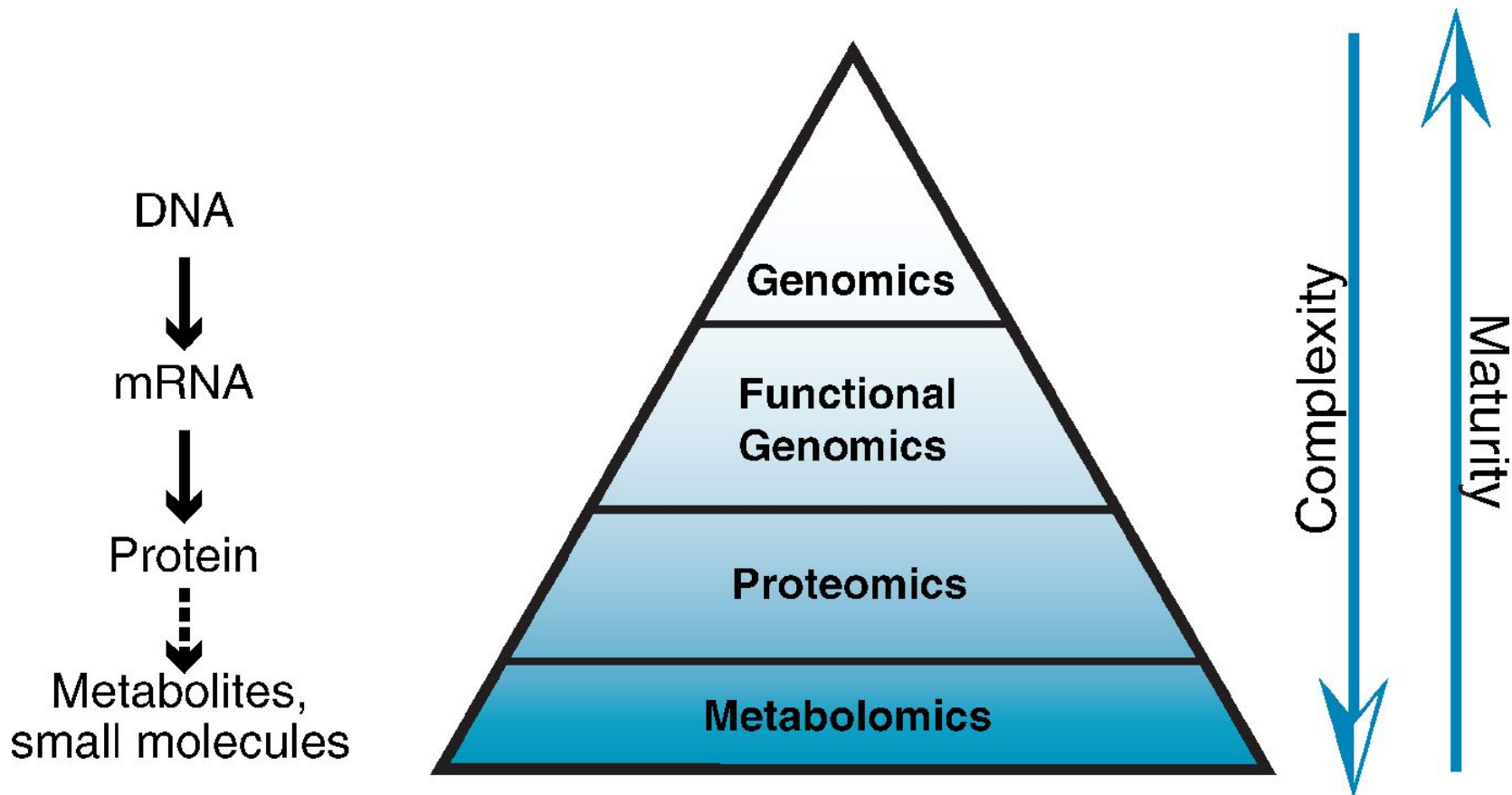
Один ген – один признак

Центральная догма молекулярной биологии

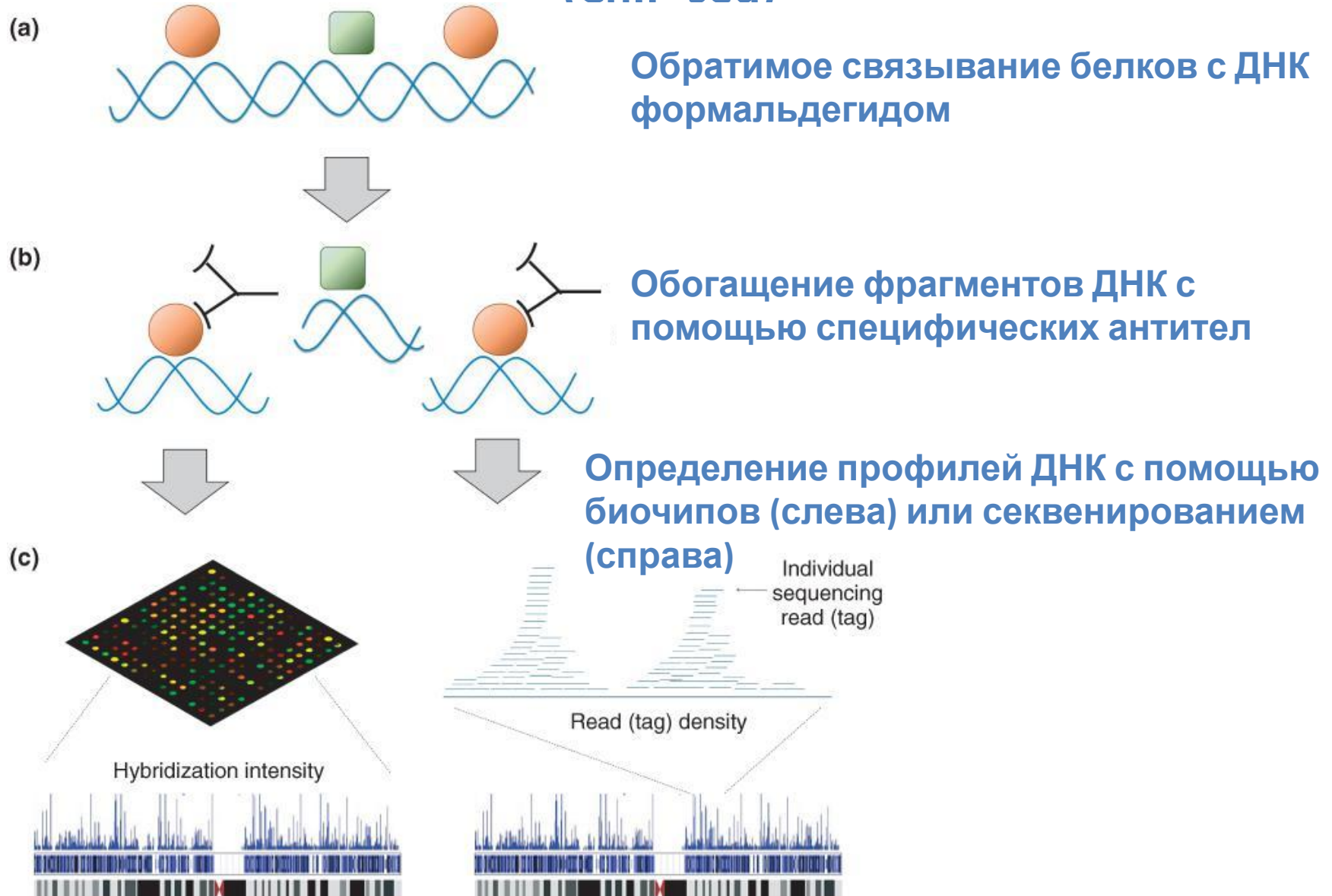


Формирование фенотипа под действием генотипа в соответствии с центральной догмой

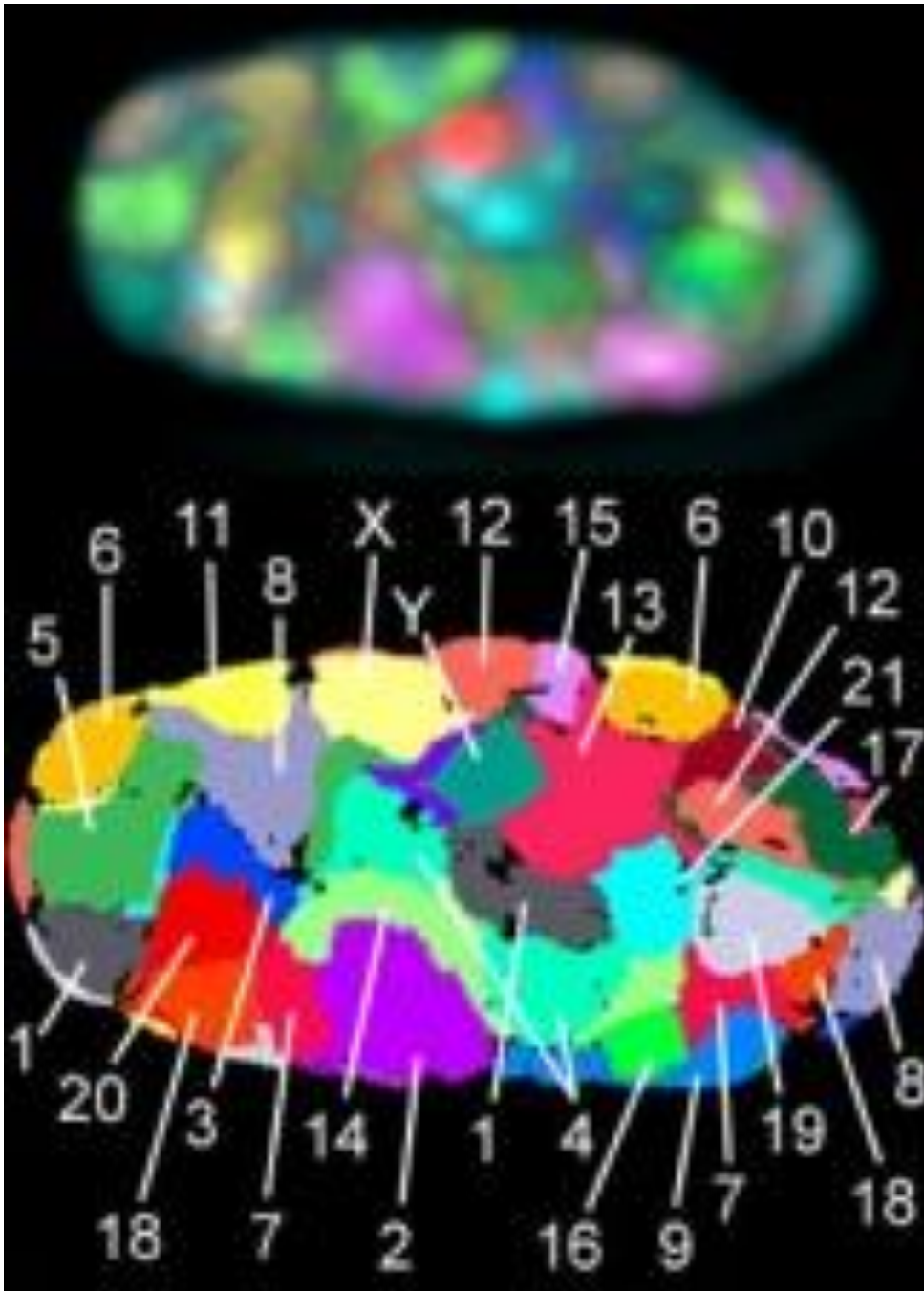
Системные подходы в молекулярной биологии и генетике



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



Хромосомные территории в интерфазном ядре фибробластов человека



Многоцветная FISH (