

# 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

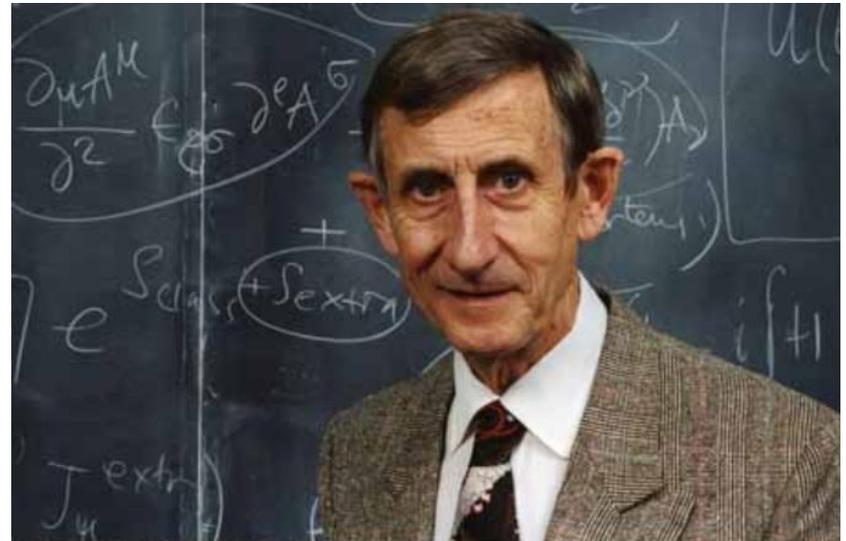
1. Введение в молекулярную биологию и генетику
2. Классическая генная инженерия
3. Полимеразная цепная реакция
4. Исследования генома и транскрипции генов
5. Антисмысловые технологии, аптамеры, рибозимы
6. Генная инженерия в конструировании белков
7. Трансгенные животные
8. Трансгенные растения
9. Рекомбинантные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

**«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**

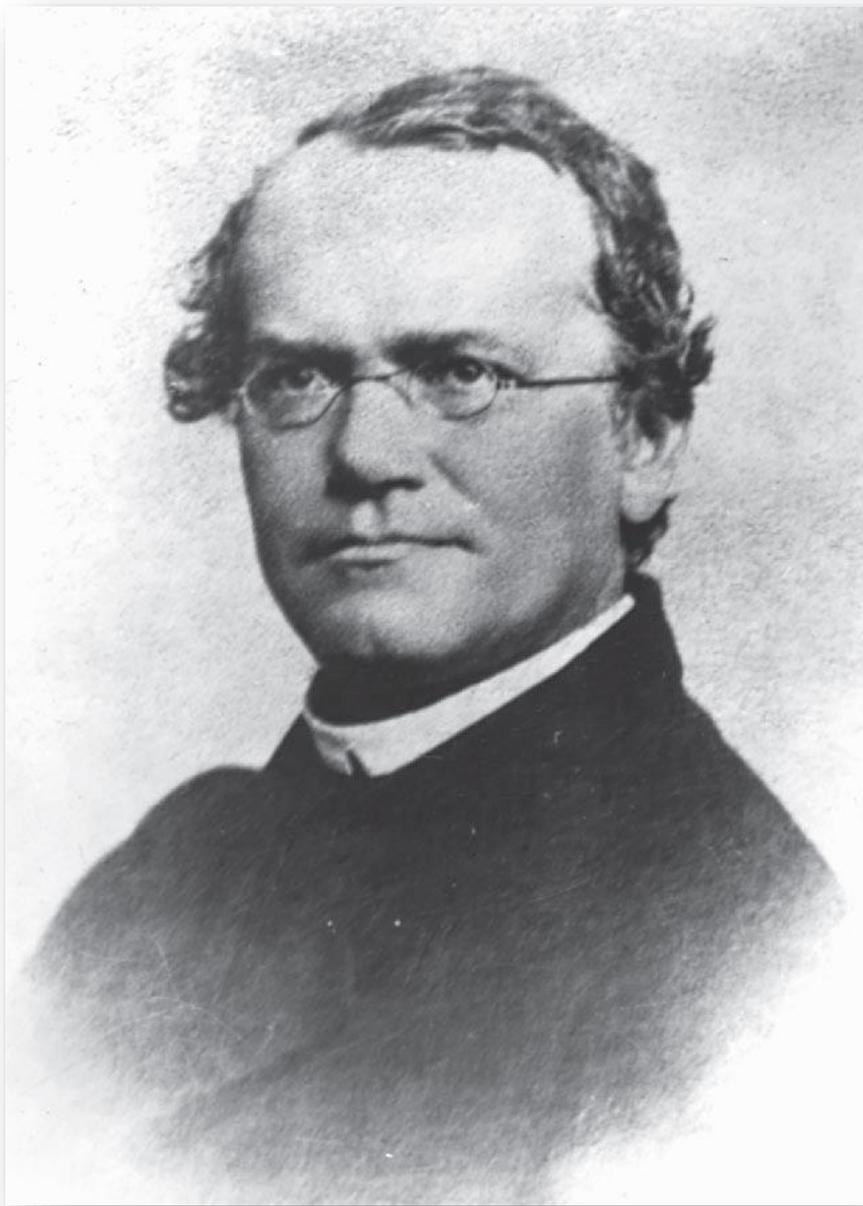


**В. Гейзенберг:**

**“Профессионал -  
это тот, кто знает  
основные ошибки в  
своей области и  
умеет их избегать.”**

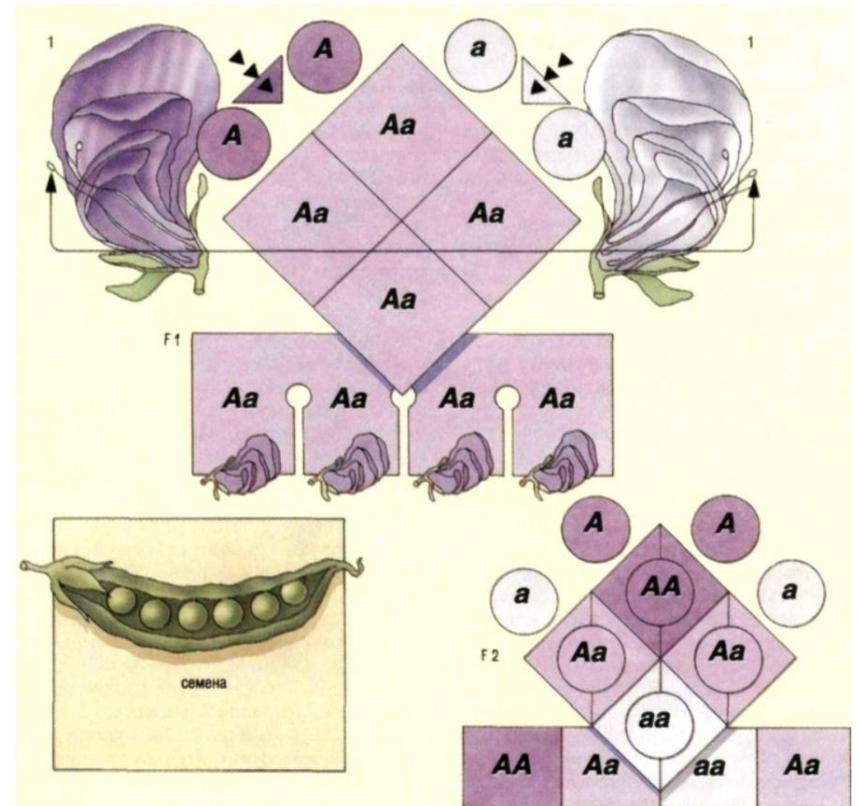


**В 32 года (1933)**



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 беременности



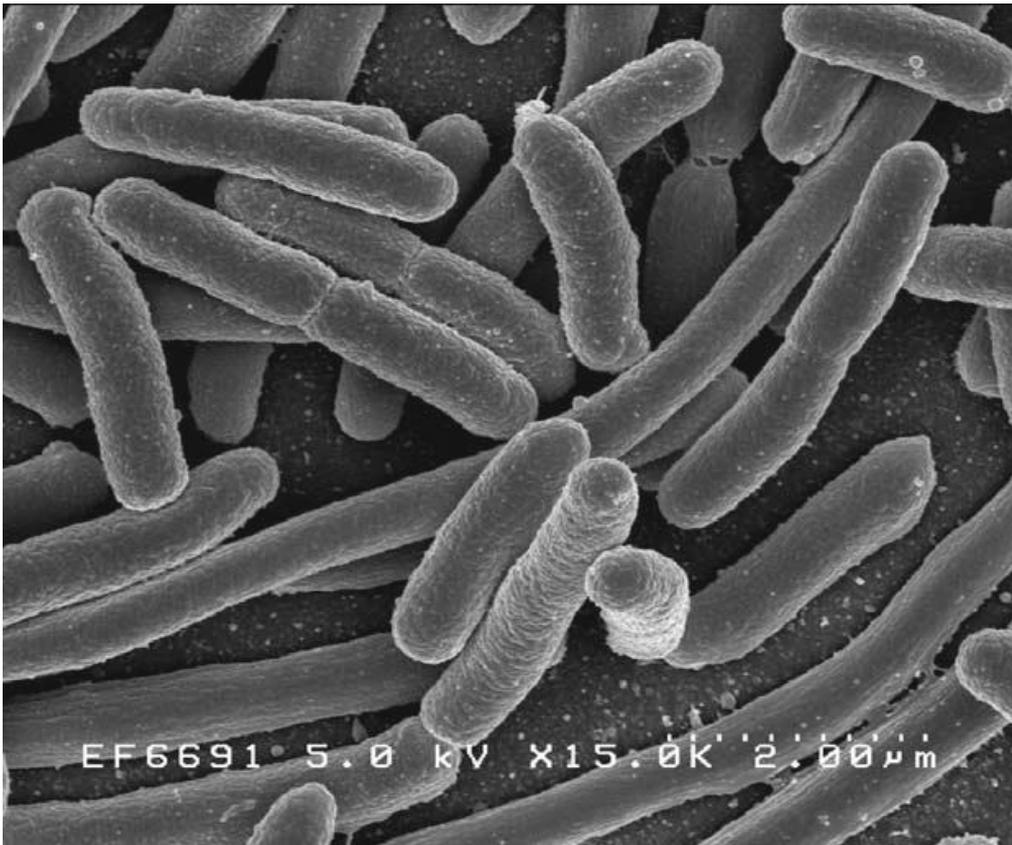
Самец муфлона

# 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 окружающей среды, биотопливо

# 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
- 175 млн. га засеяно генетически модифицированными (GM) растениями (2013 г.)

# 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 экспрессию генов

# 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

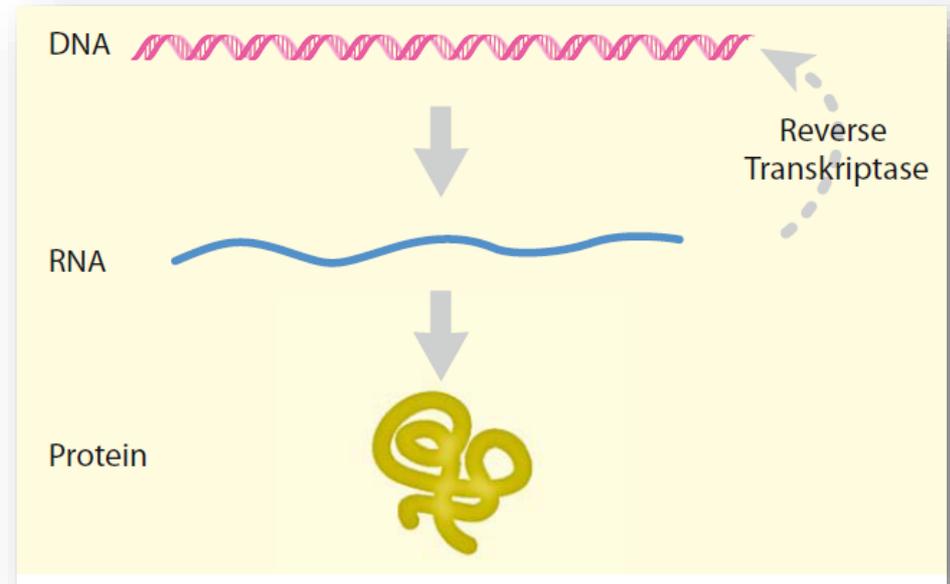
- Рак, атеросклероз, ожирение, аутоиммунные заболевания и т.п.

## ❖ Рекомбинантные вакцины, ДНК-вакцины

- Гепатит В – экспрессия антигена на поверхности клеток дрожжей
- Антирабические вакцины (бешенство у животных)

# 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

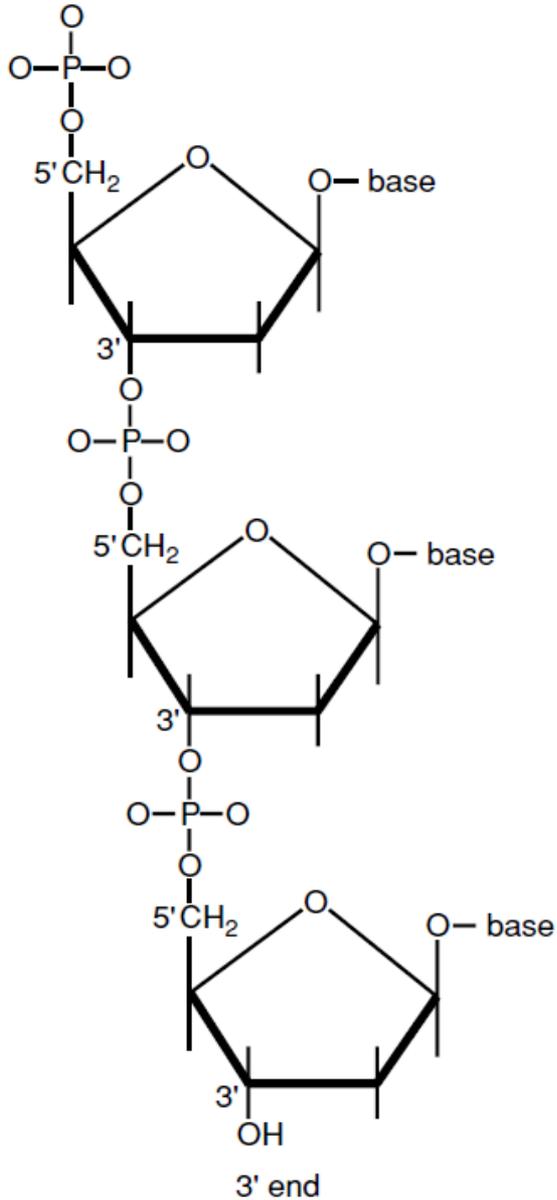


General	Special	Unknown
DNA → DNA	RNA → DNA	protein → DNA
DNA → RNA	RNA → RNA	protein → RNA
RNA → protein	DNA → protein	protein → protein

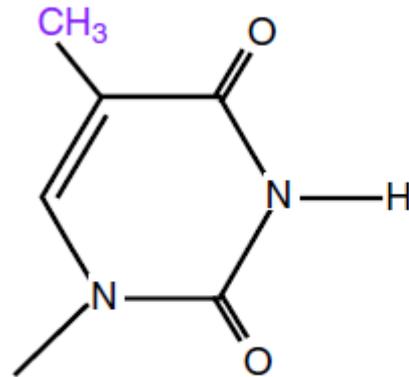
Три способа передачи генетической информации в живых организмах, предполагаемых ЦДМБ

# ДНК и РНК

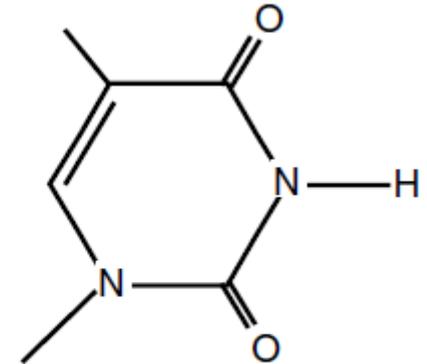
5' end



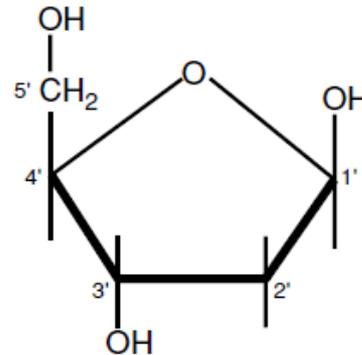
Сахаро-фосфатный остов ДНК



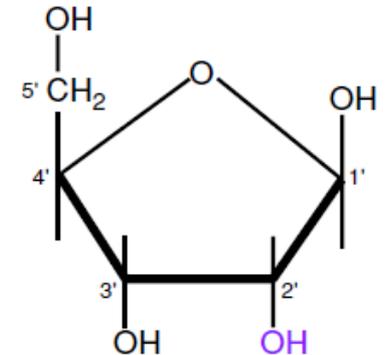
Thymine  
(5-метилурацил)



Uracil



Дезоксирибоза



Рибоза

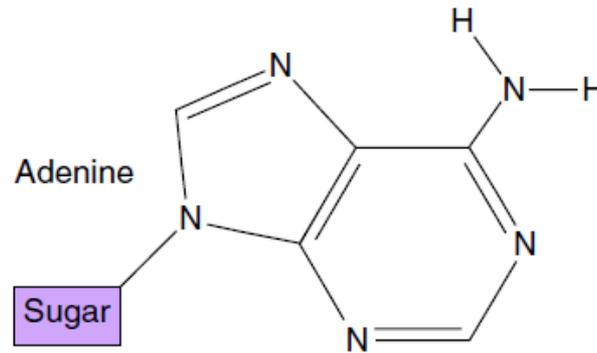
# Пуриновые и пиримидиновые основания ДНК

Азотистые основания

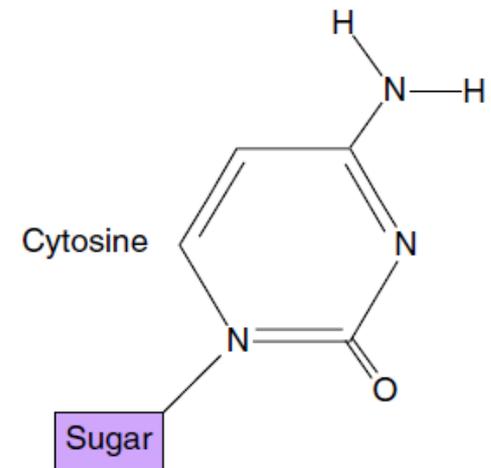
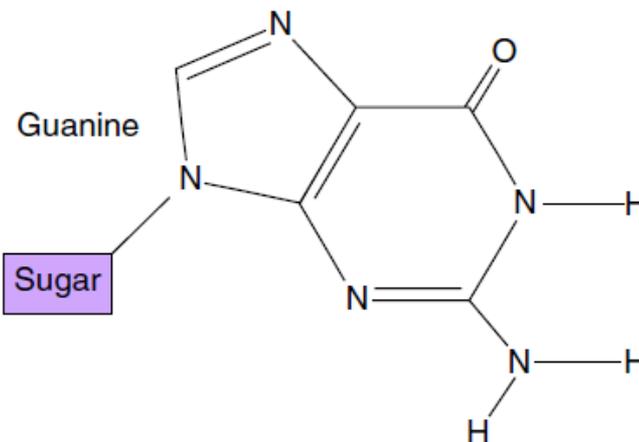
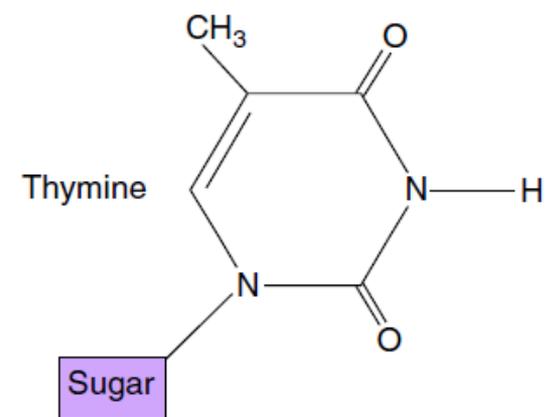
Гетероциклические ароматические химические соединения

У пуринов молекула пиримидина объединена с кольцом имидазола

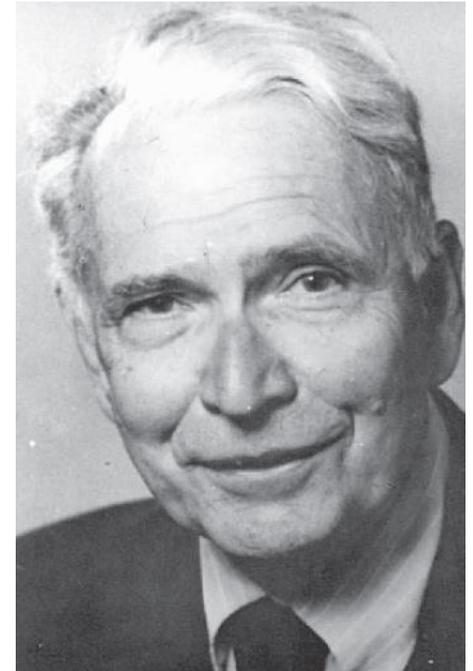
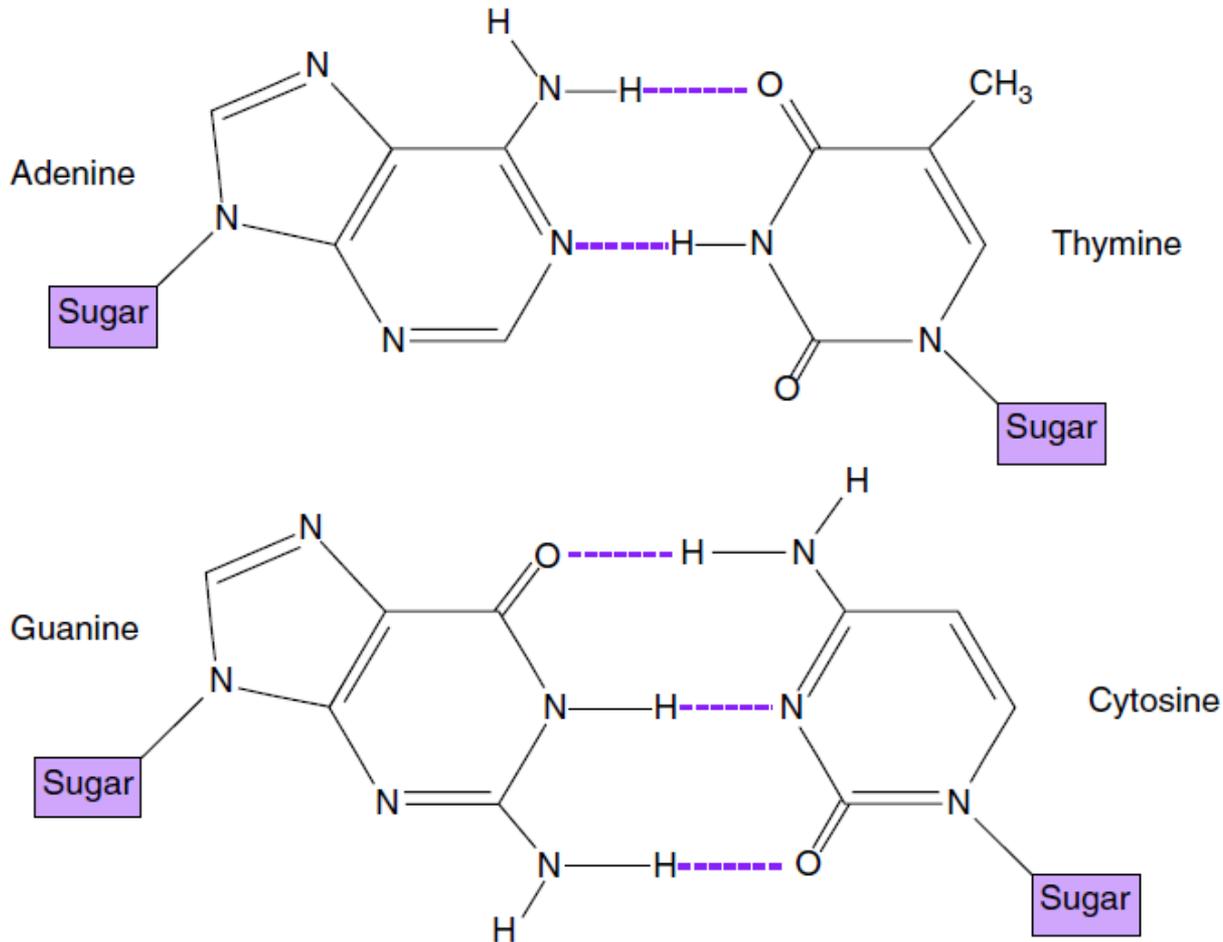
Purines



Pyrimidines



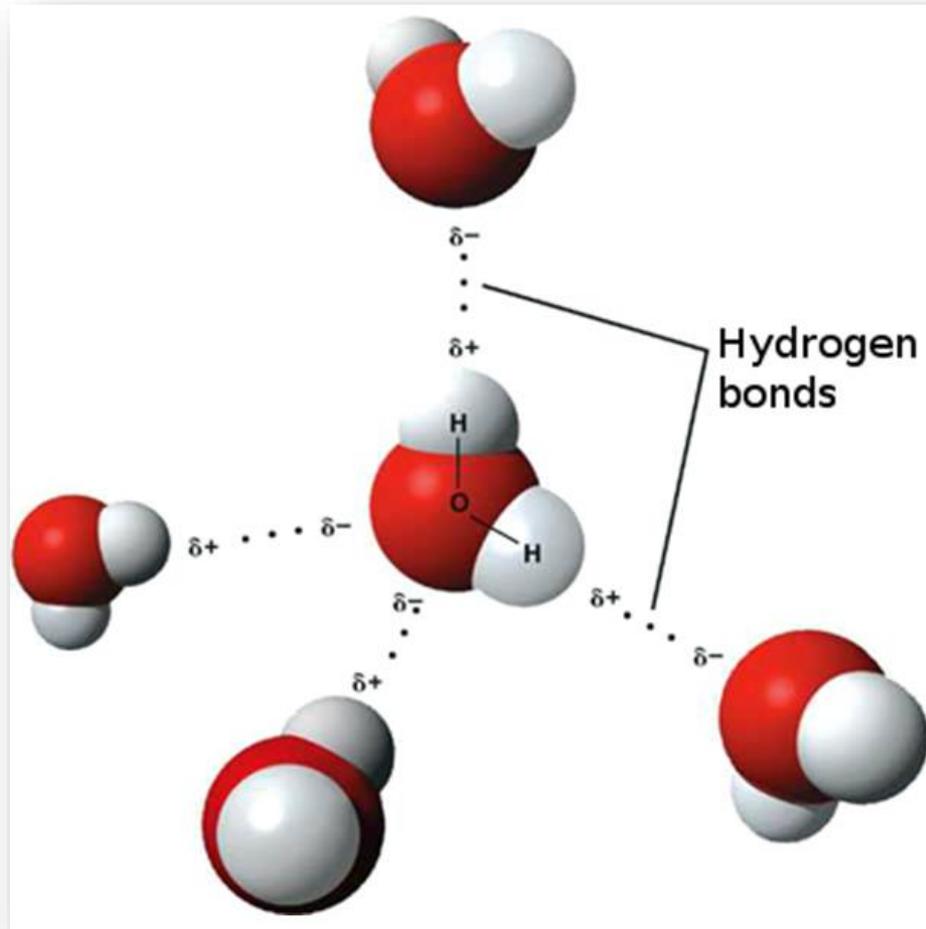
# Комплементарные взаимодействия



**Erwin Chargaff**

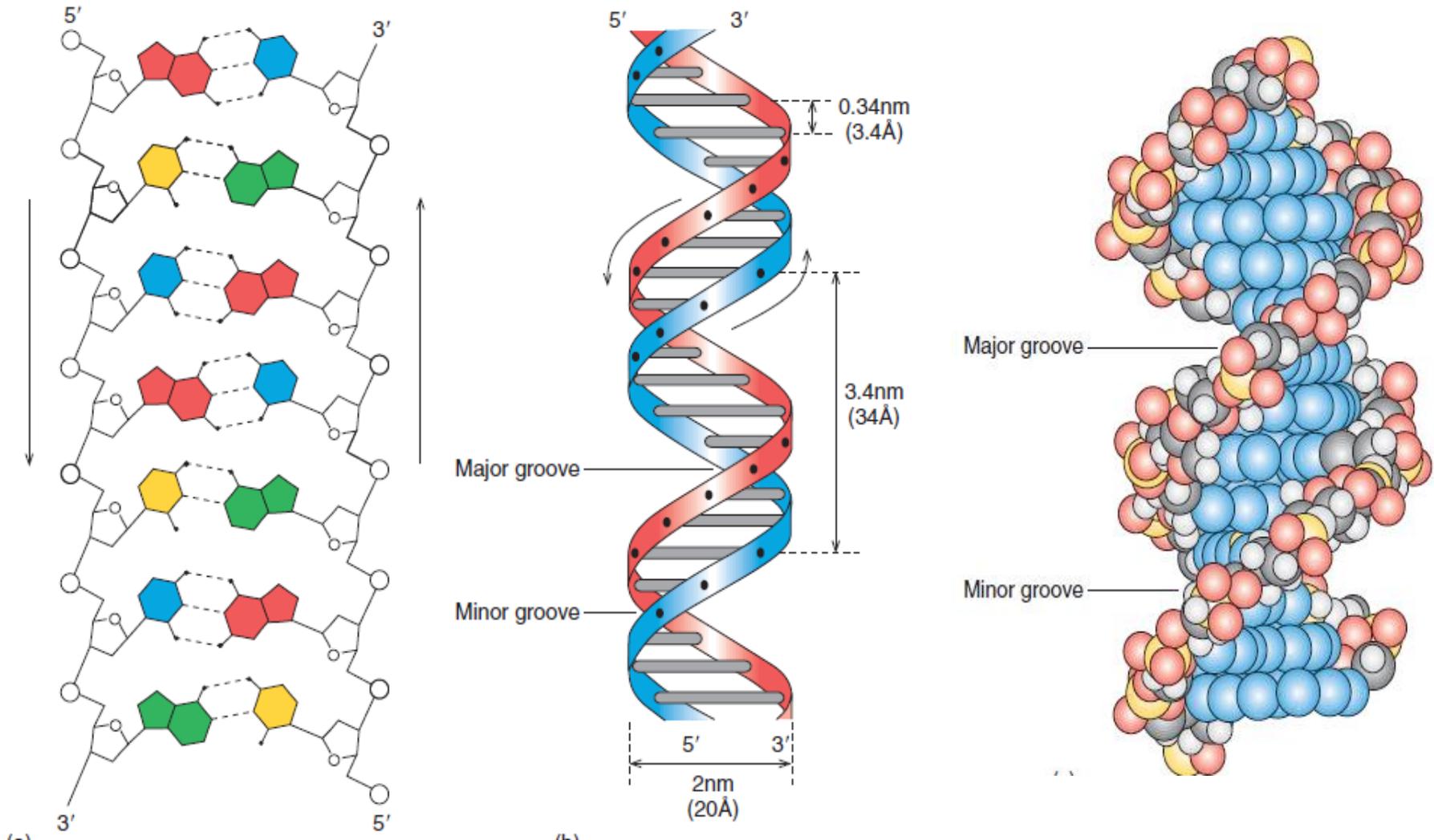
Азотистые основания, соединяясь ковалентной связью с 1'-атомом рибозы или дезоксирибозы, образуют N-гликозиды, которые называют нуклеозидами

# Водородные связи между молекулами воды



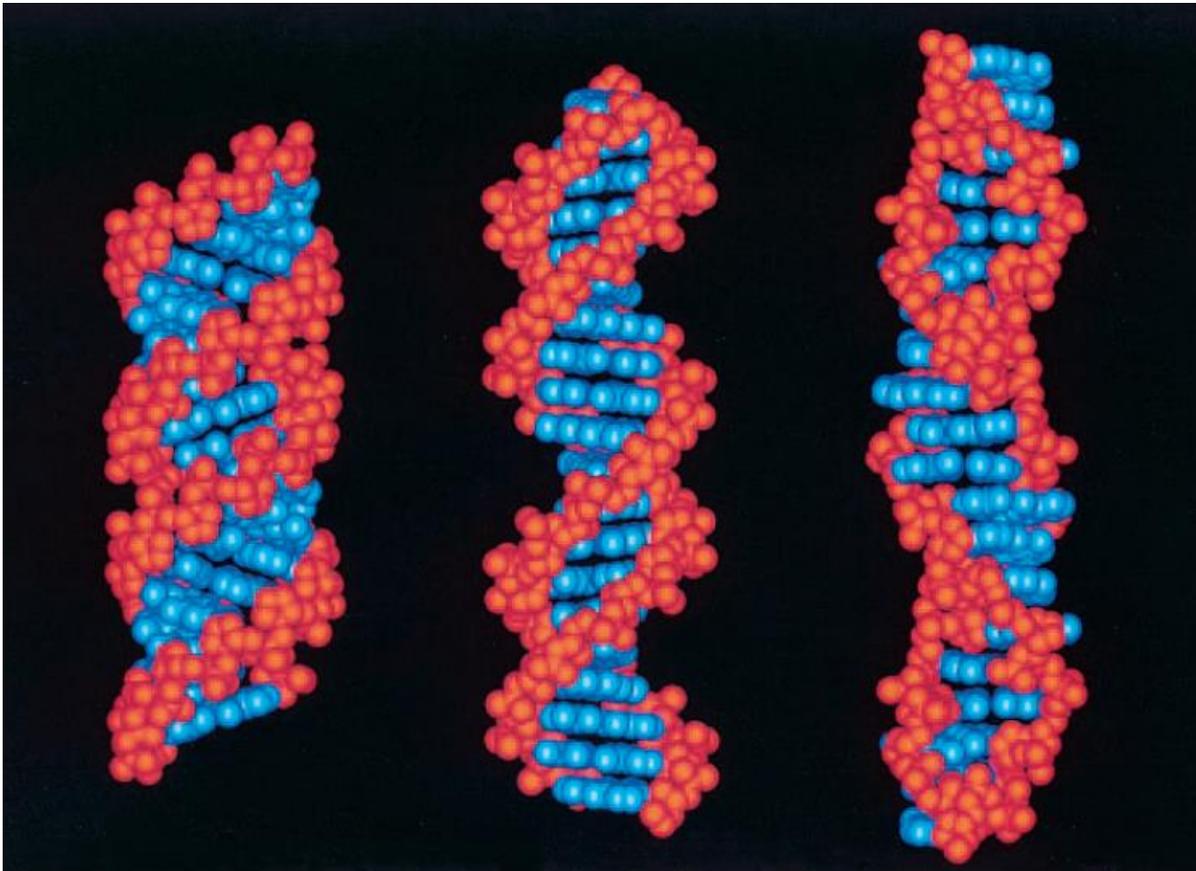
Слабое электростатическое взаимодействие между положительно заряженными атомами водорода и отрицательно заряженными электроотрицательными атомами N, O или F

# 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**

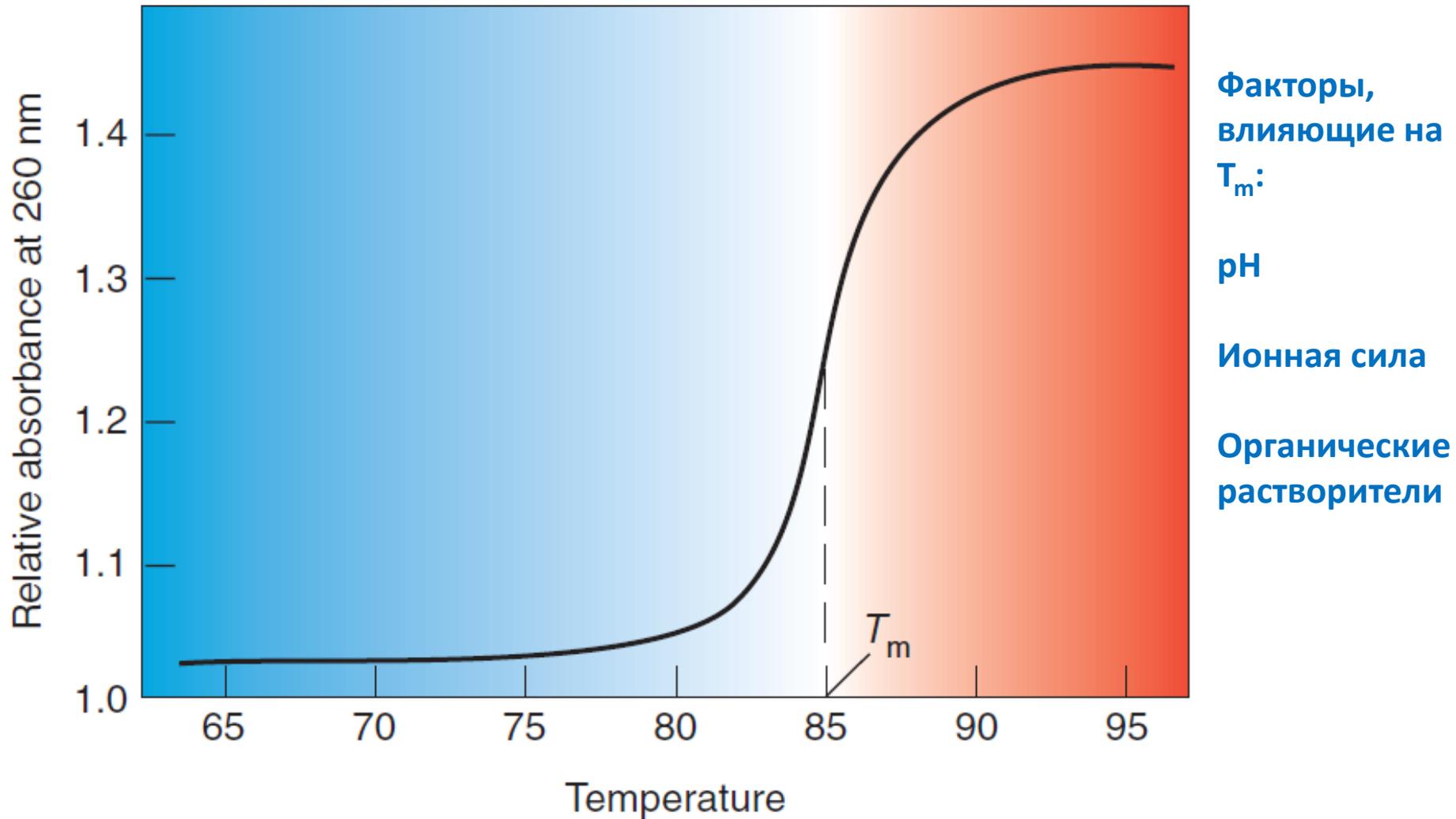
**A-форма:** ДНК-РНК-гибриды, 11 пар нуклеотидов/виток спирали

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

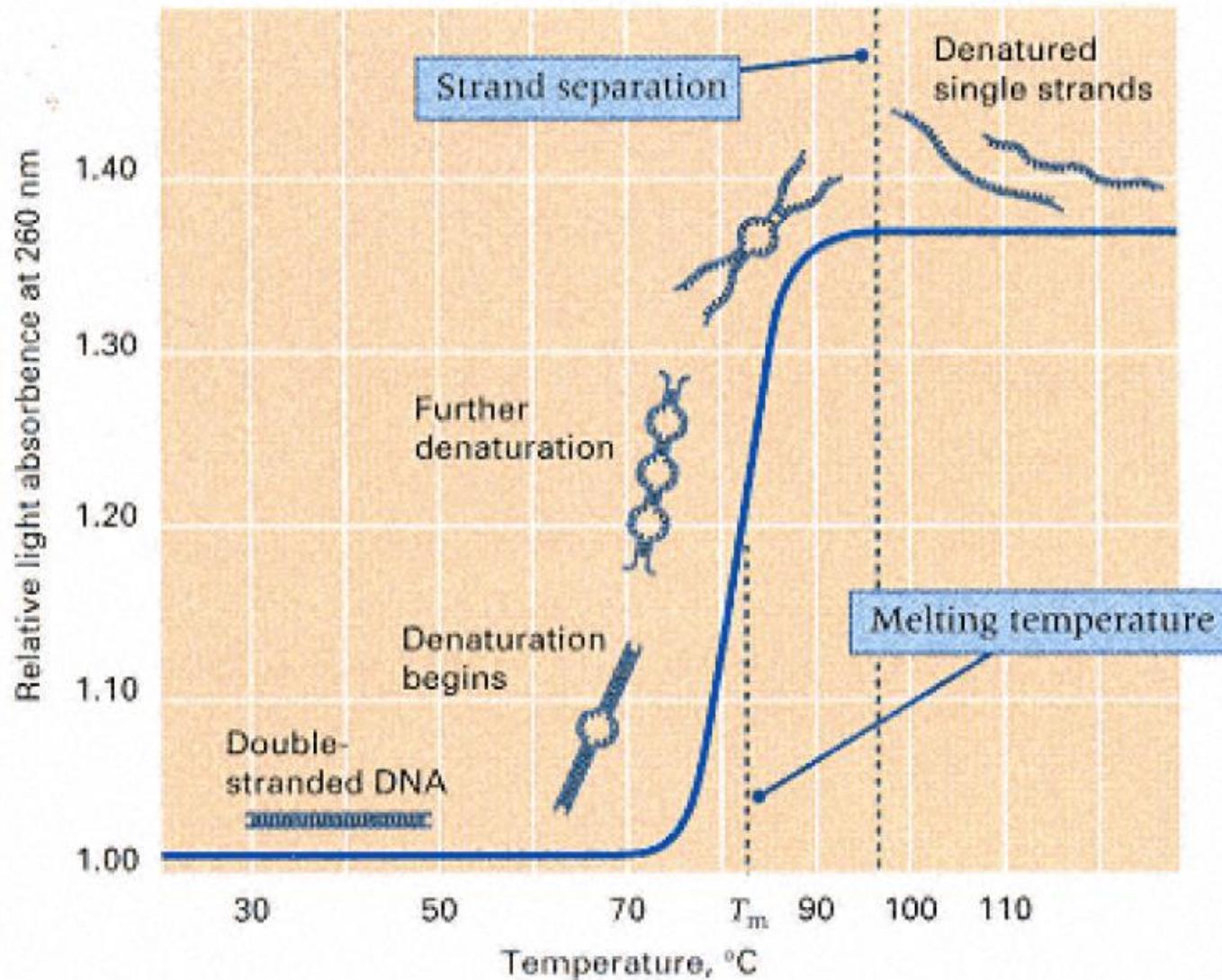
**Z-форма:** Левозакрученная спираль poly[dG-dC] · poly[dG-dC]

Отрезки ДНК одинаковой длины

# Плавление (денатурация) ДНК *Streptococcus pneumoniae*

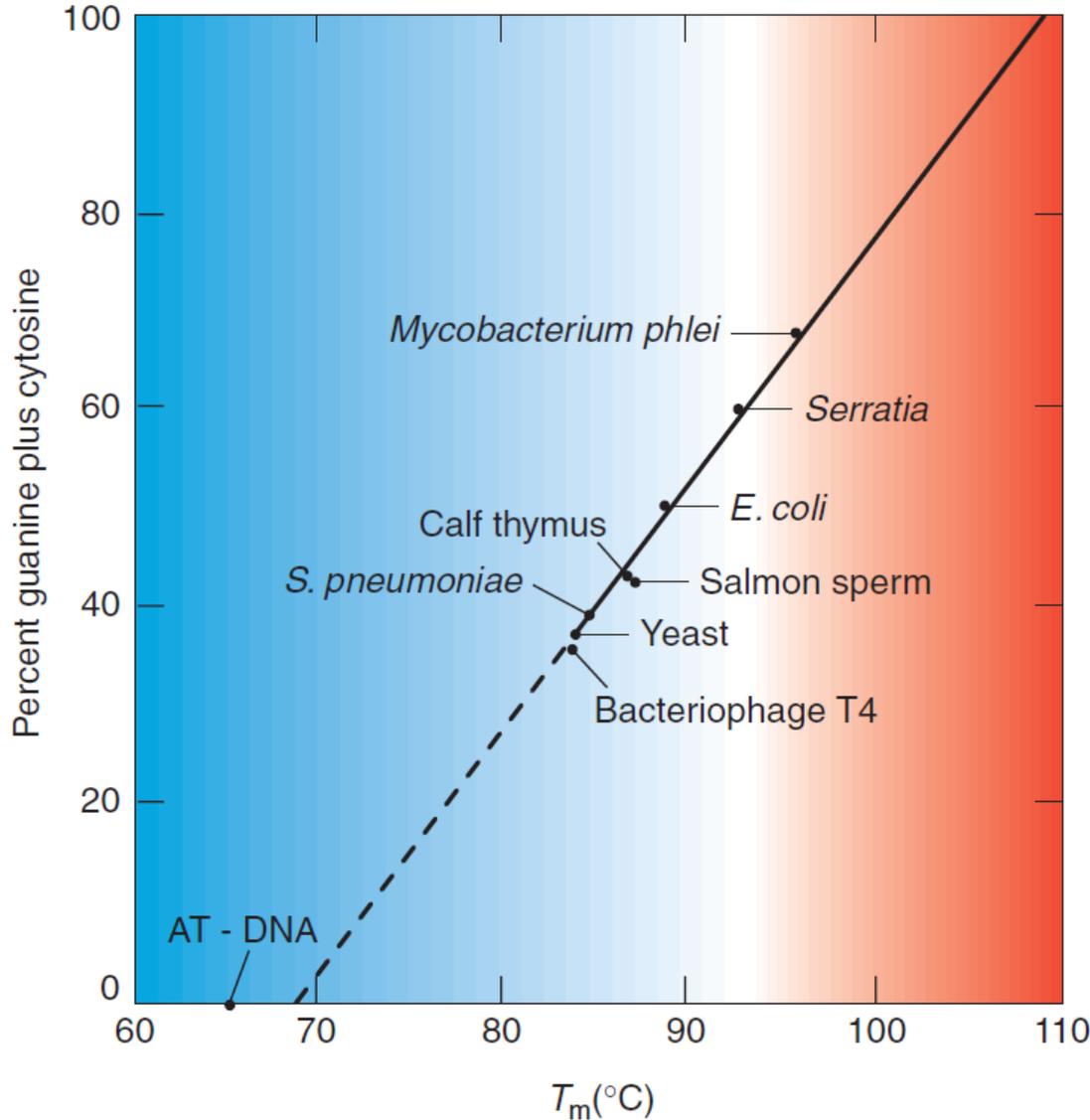


# Плавение (денатурация) ДНК



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

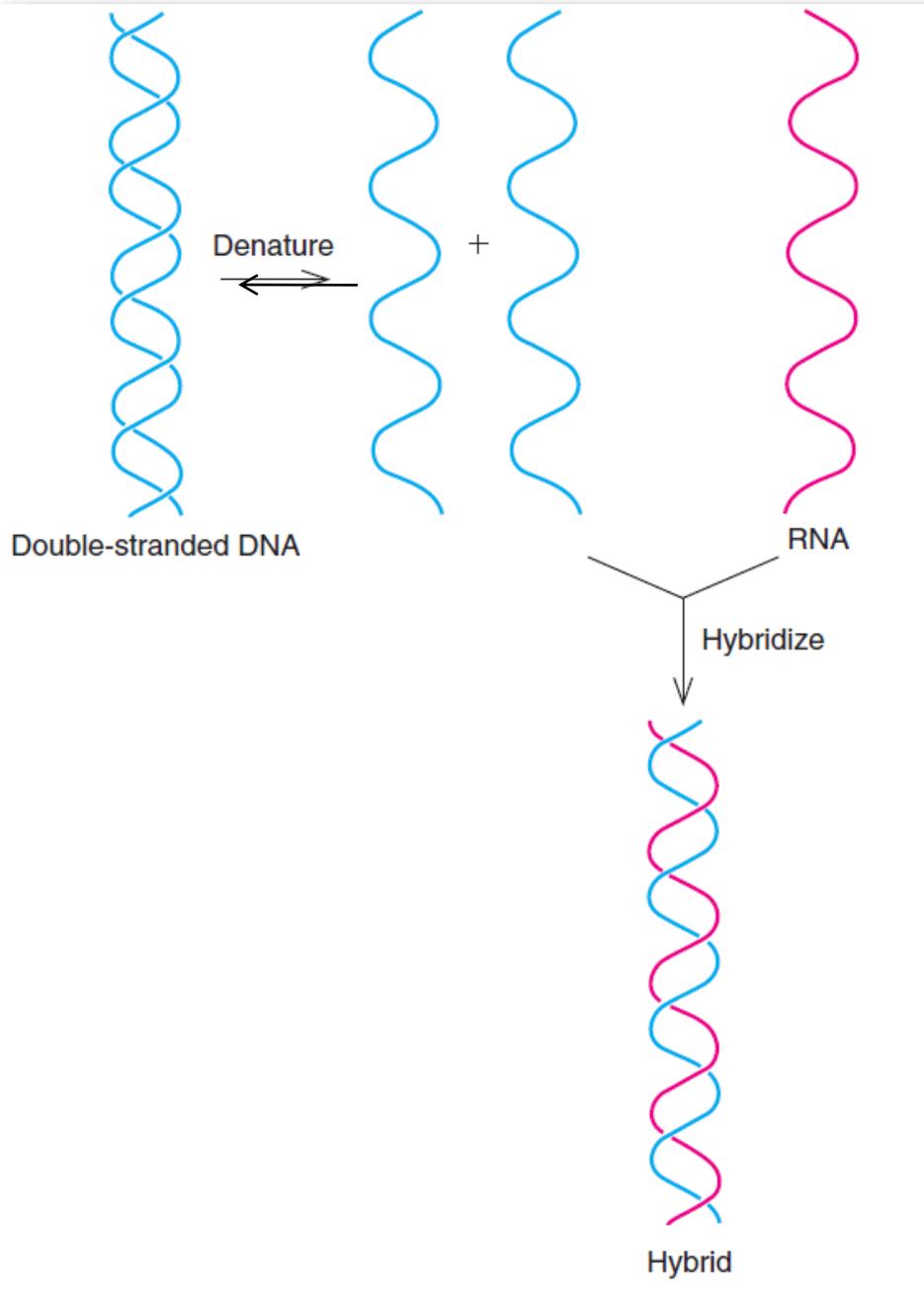
# Зависимость температуры плавления геномной ДНК от ее GC-состава



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

В АТ-ДНК содержание GC = 0

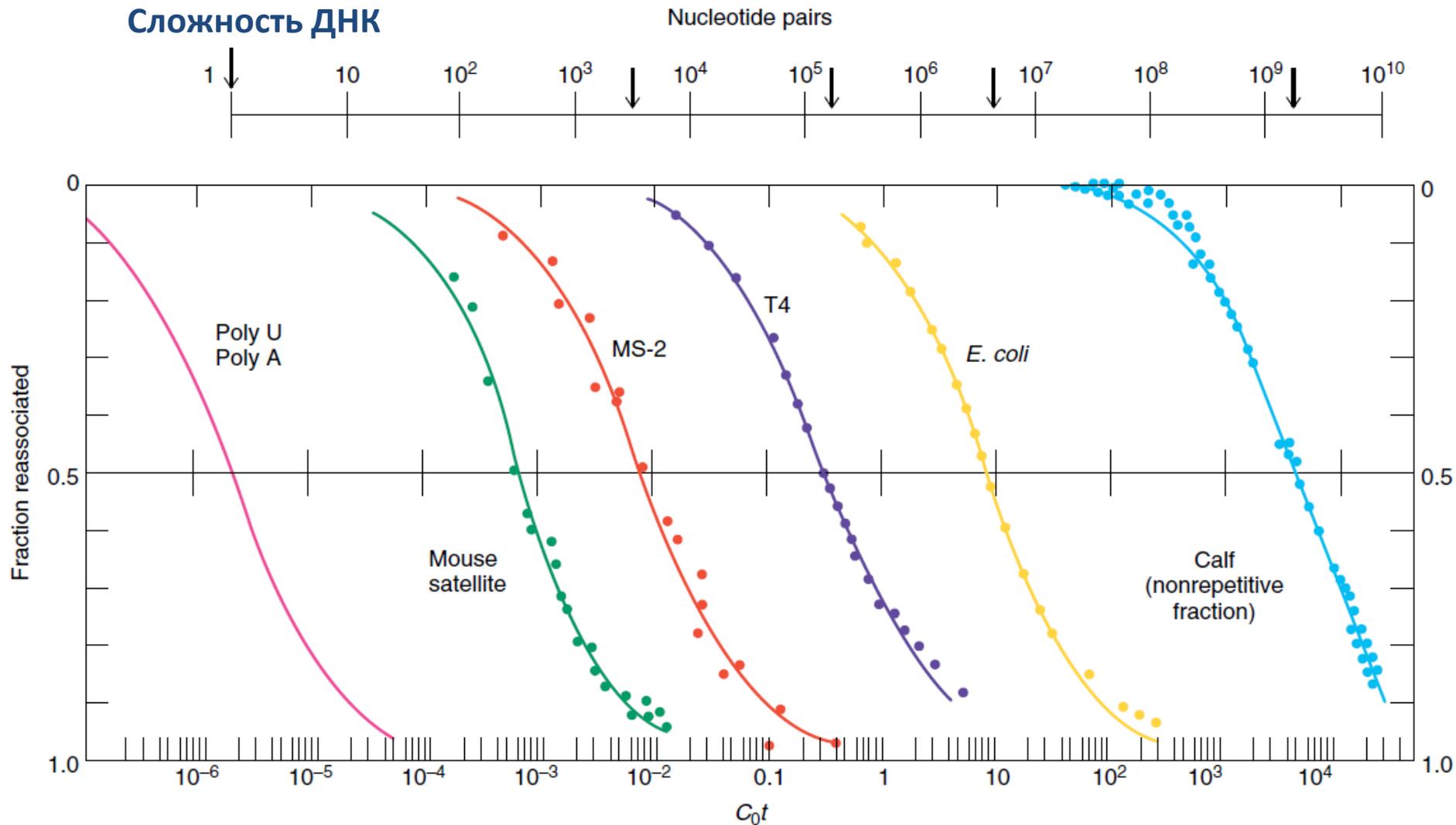
# Ренатурация (гибридизация, отжиг) ДНК и РНК



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

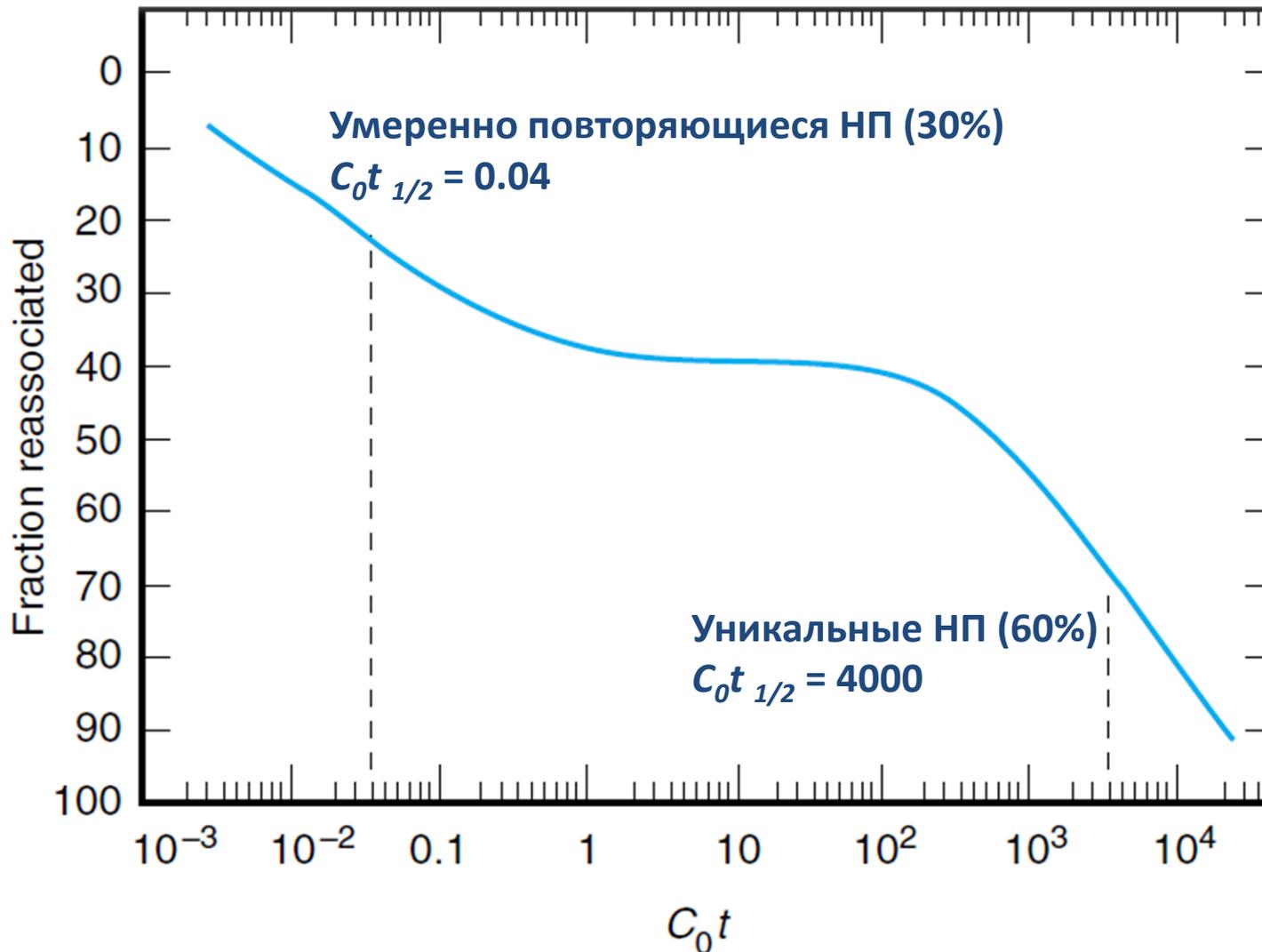
Температура гибридации ниже температуры плавления ДНК

# Кинетика ренатурации разных ДНК



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

# $C_0t$ -кривая для ДНК тимуса теленка



Умеренно повторяющиеся НП (30%)  
 $C_0t_{1/2} = 0.04$

Уникальные НП (60%)  
 $C_0t_{1/2} = 4000$

Высоко повторяющиеся НП (10%) ренатурируют до начала эксперимента

# 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

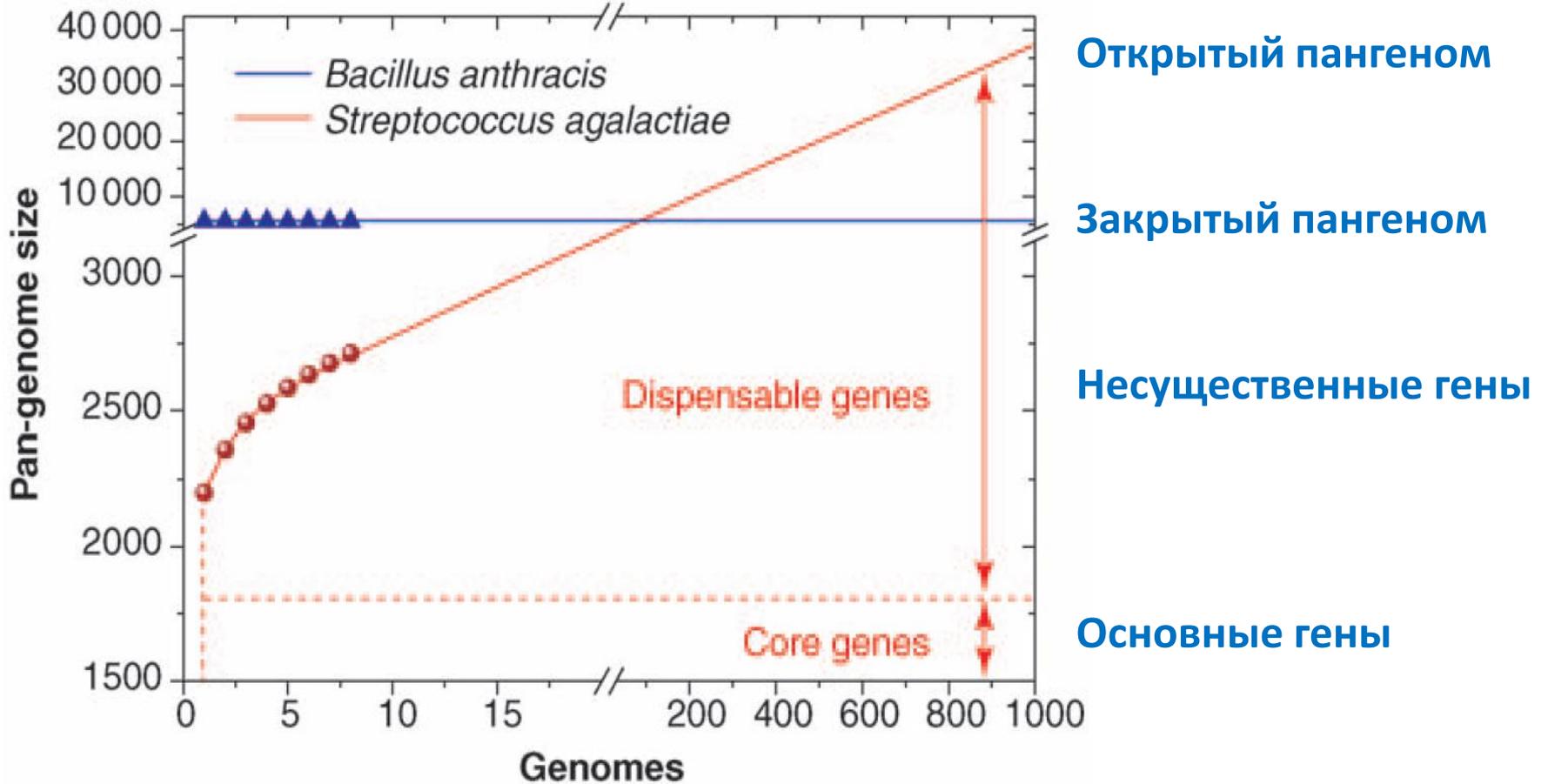
CAGCCT

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

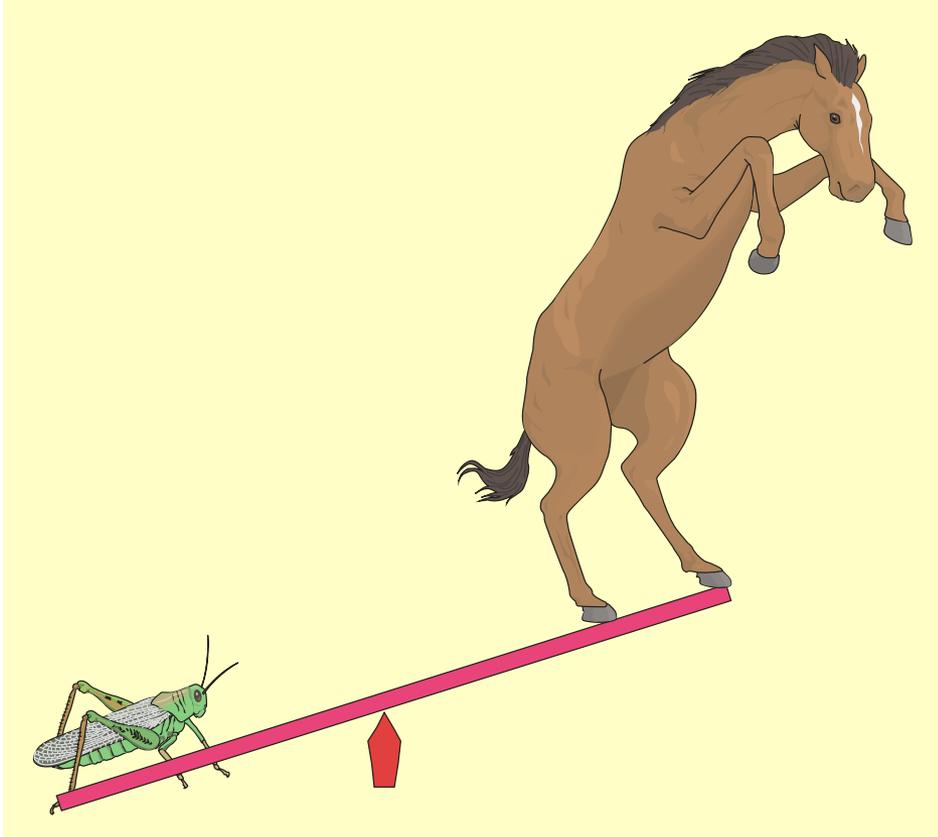
# Концепция бактериального пангенома (pan-genome)



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

**Метагеномика**

# Парадокс C (C-value paradox)



• *C.A. Thomas, 1971 г.*

Размеры генома:

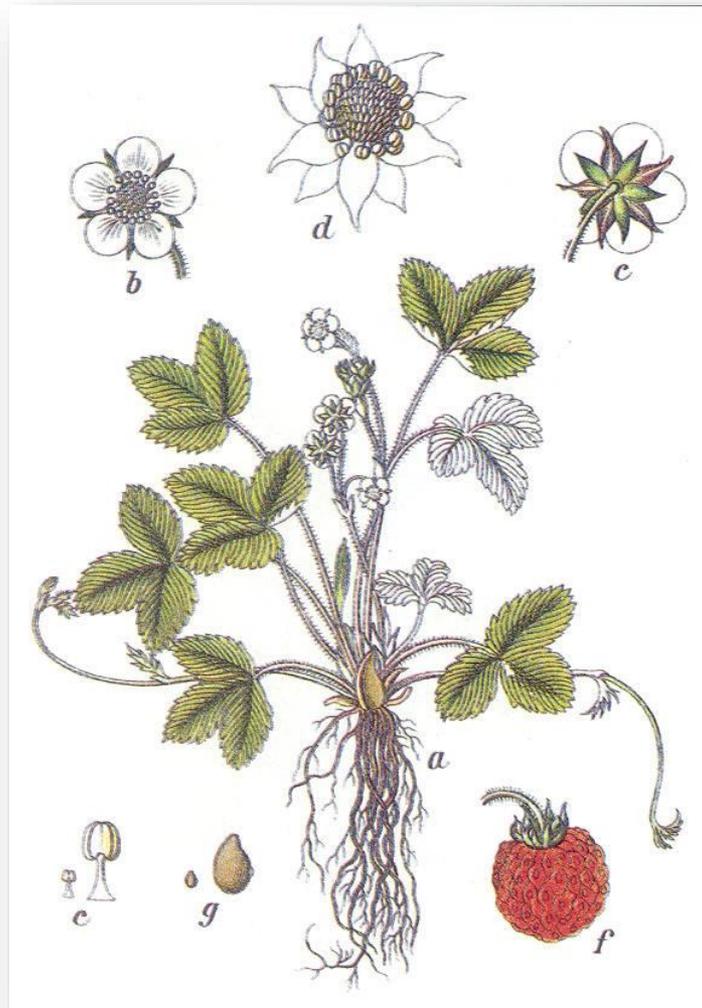
Кузнечик – 17 pg

Лошадь – 3,2 pg

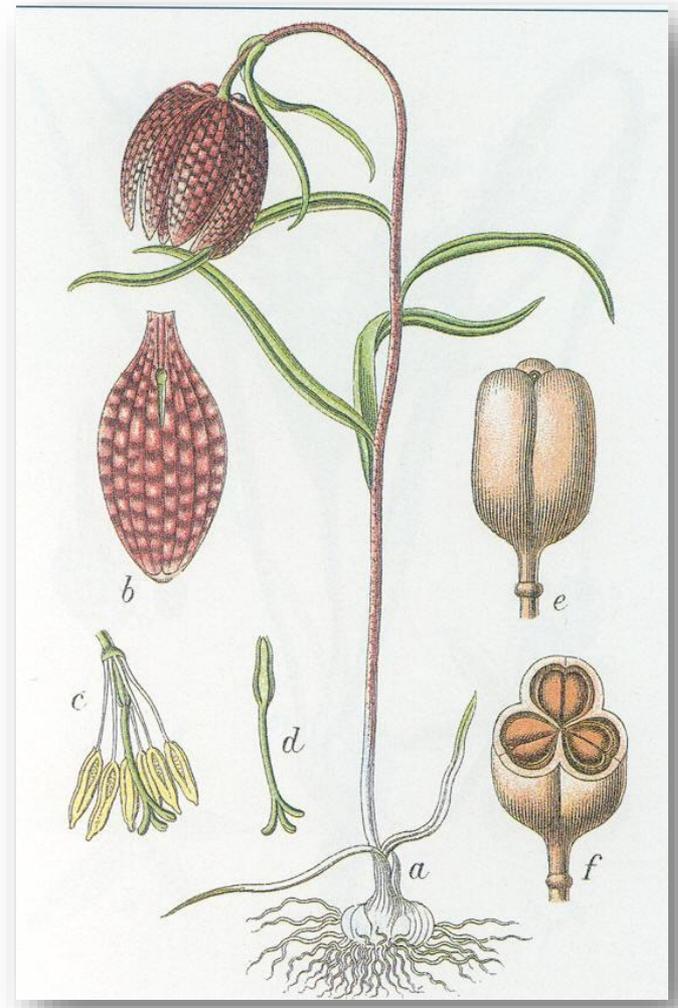
1 pg ДНК = 1000 млн.п.н.

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

# Растения с экстремальными размерами генома



Земляника *Fragaria viridis* – 0,11 pg



Рябчик *Fritillaria assyriaca* – 127,4 pg

# 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

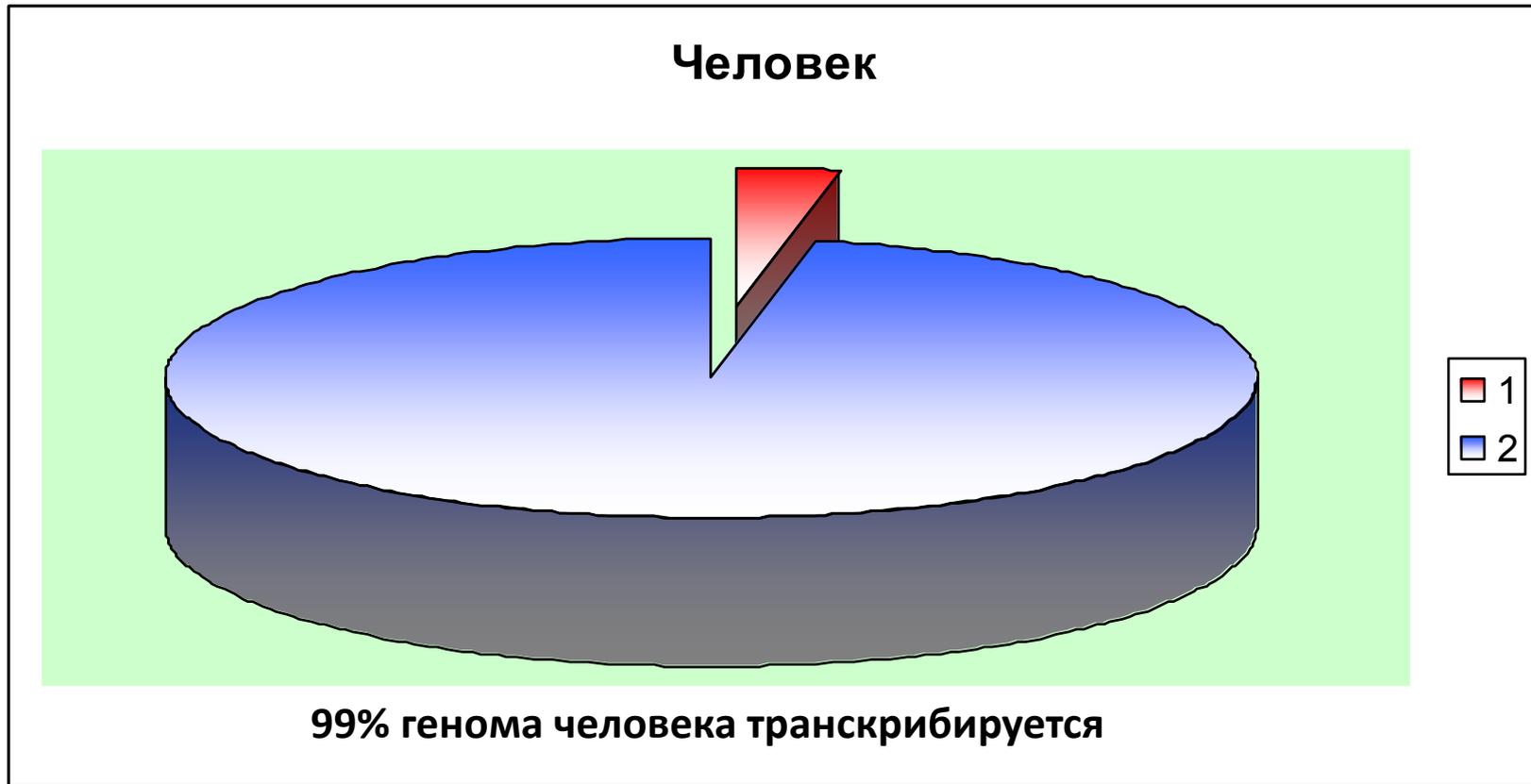
❖ Двоякодышащие рыбы	133 pg
❖ Хвостатые амфибии	
Саламандры ( <i>Американский протей</i> )	121 pg
❖ Ракообразные	
( <i>Атлантическая глубоководная креветка</i> )	38 pg
❖ Плоские черви	
( <i>Otomesostoma auditivum</i> )	20 pg
❖ Насекомые	
Кузнечики ( <i>Podisma pedestris</i> )	17 pg
❖ Млекопитающие	
Летучая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

---

1 pg ДНК = 1000 млн.п.н.

# Парадокс исчезает, **загадка** остается

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

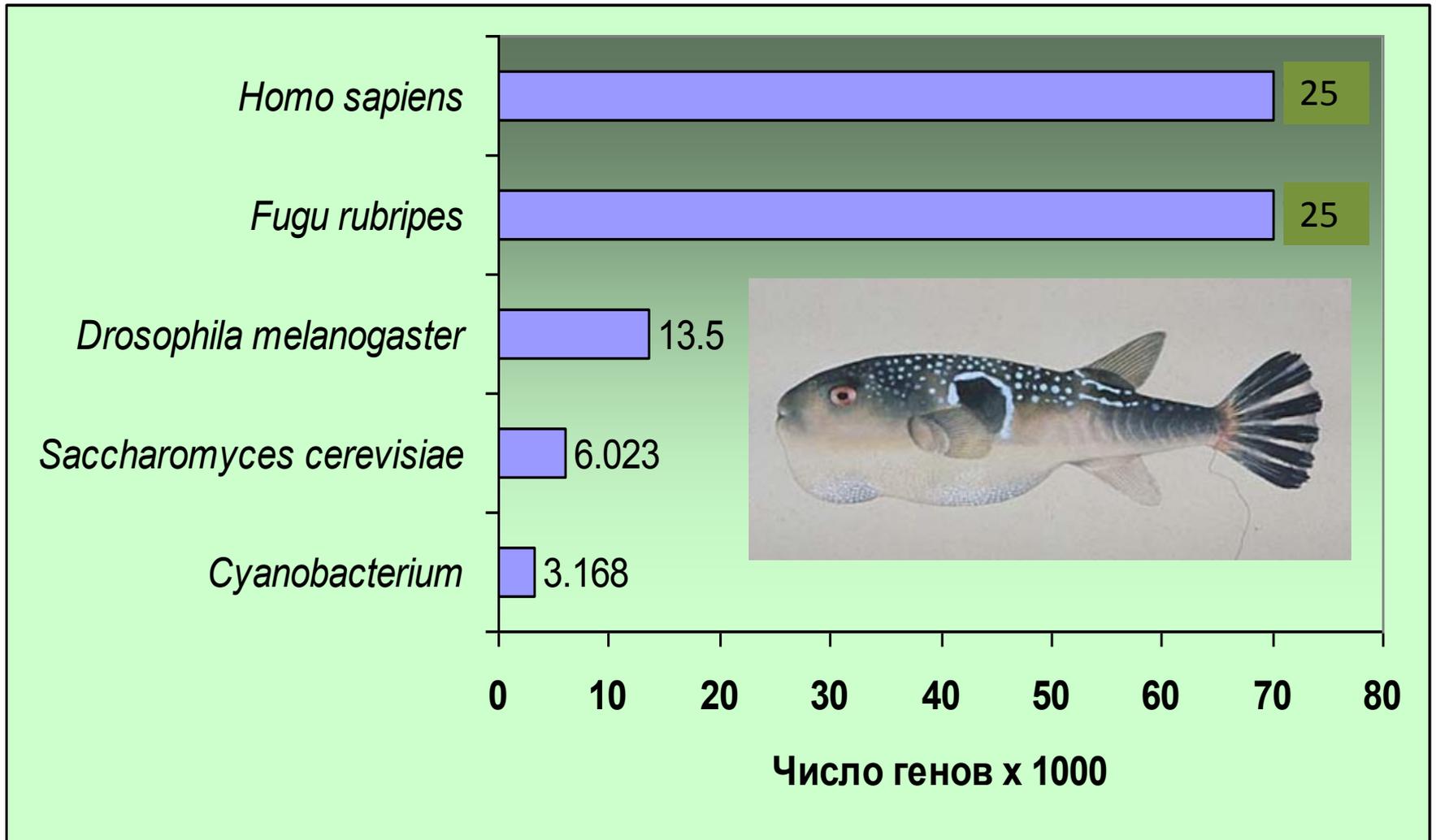


Кодирующие последовательности (**1**) ~ 2% от всего генома

# 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 –  $8,15 \times 10^{37}$

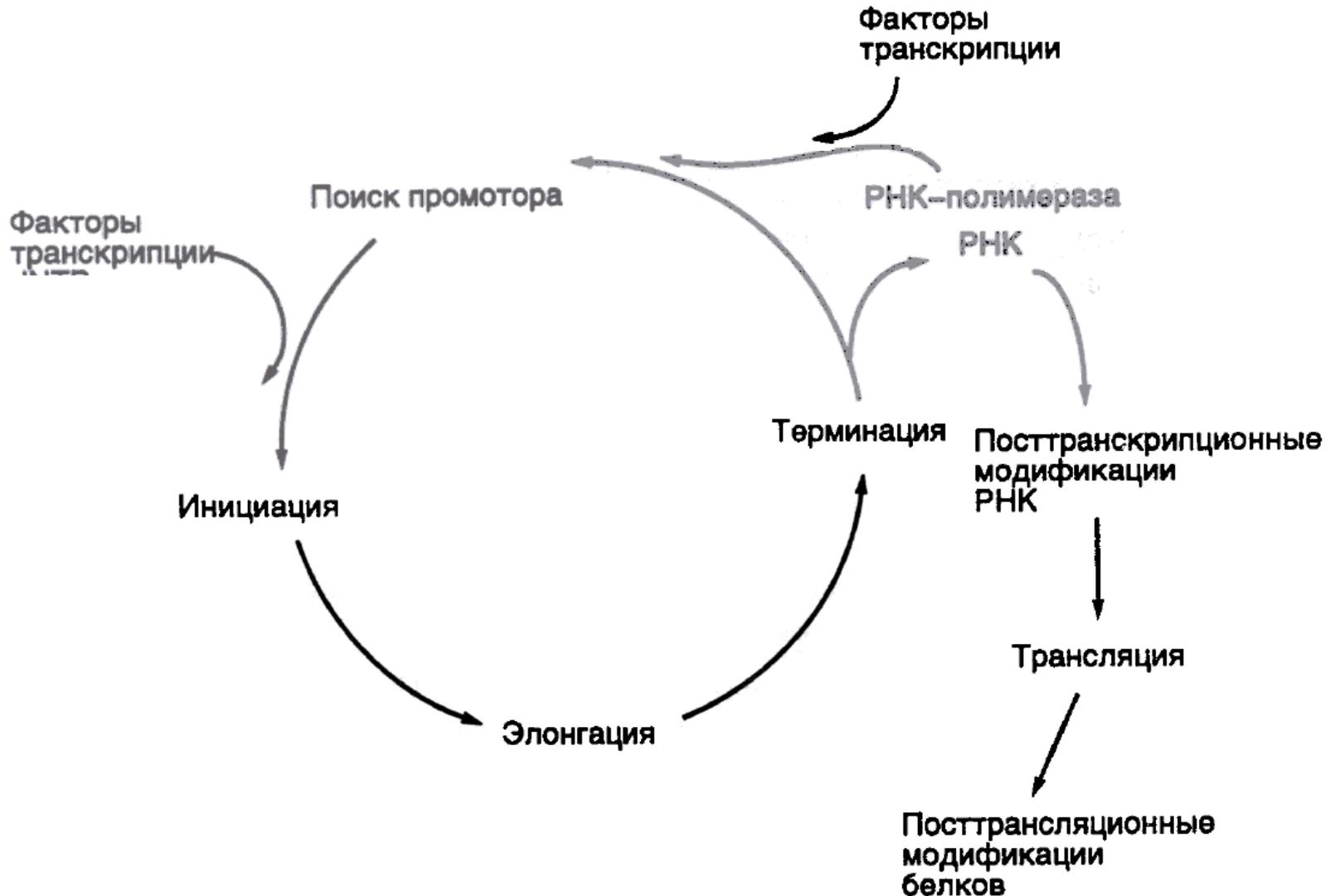
Дрозофила –  $7,95 \times 10^{34}$

Показано число сочетаний по 10 из 28000 или 14000

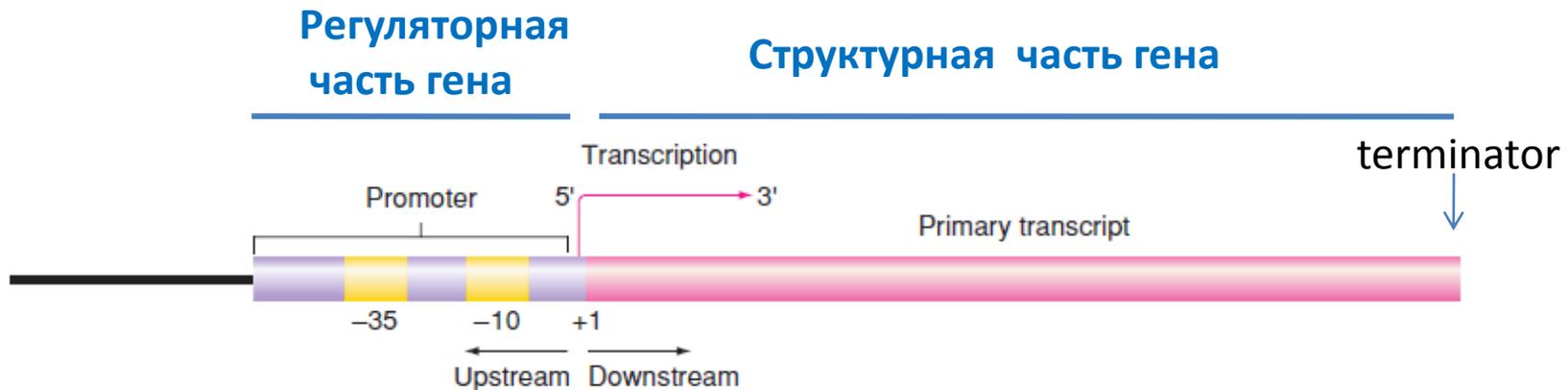
# Резюме по геному

- ❖ 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



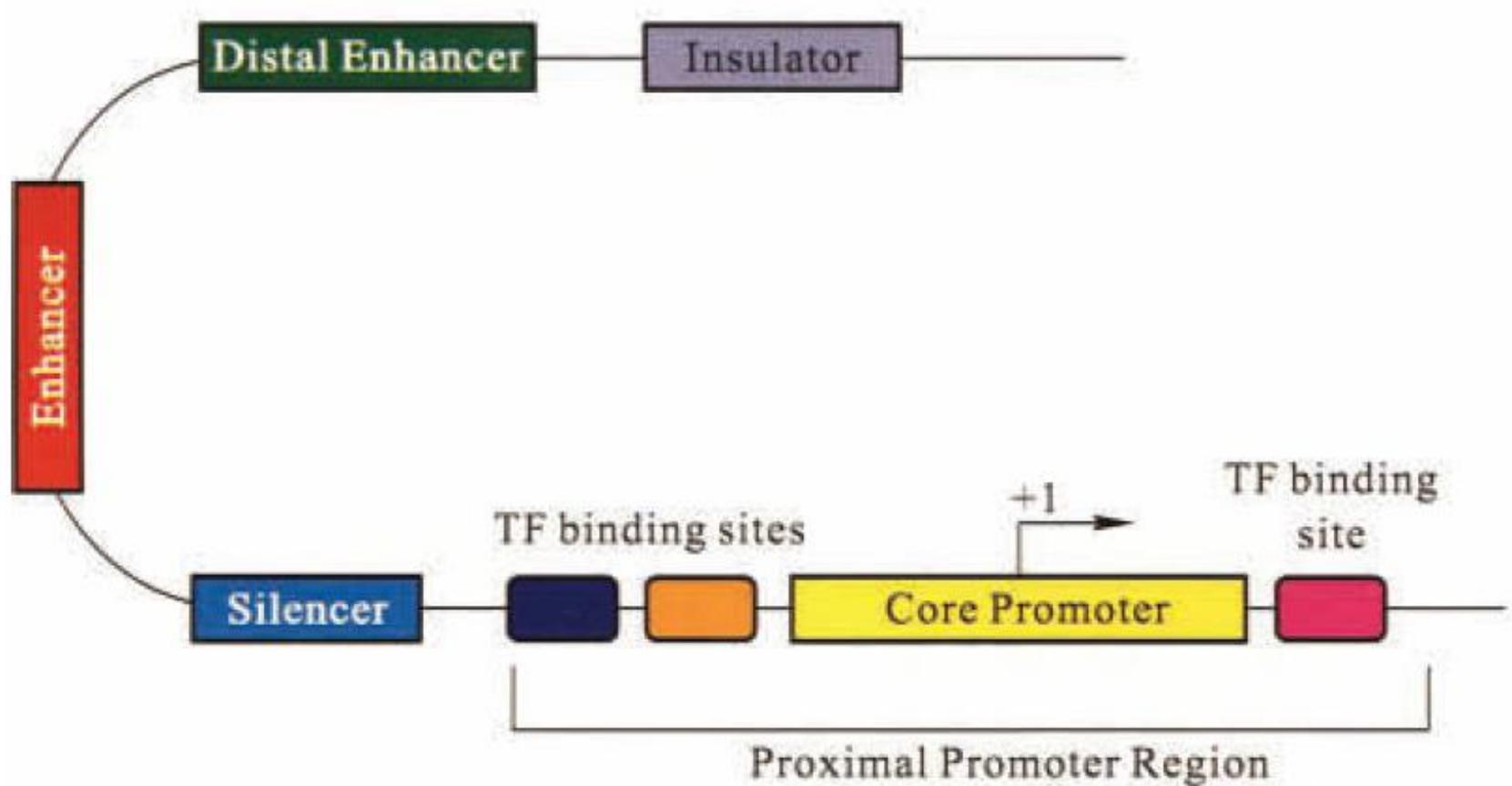
# Структура бактериального гена и его некоторых сильных промоторов



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

rrn X1	ATGCATTTTTCCGCTTGTCTTCCTGA	• •	GCCGACTCCCTATAAT	GCGCCTCCATCGACACGGCGGAT
rrn (DXE) <sub>2</sub>	CCTGAAATTCAGGGTTGACTCTGAAA	• •	GAGGAAAGCGTAATATAC	GCCACCTCGCGACAGTGAGC
rrn A1	TTTTAAATTTCTCTTGTGAGGCCGG	• •	AATAACTCCCTATAAT	GCGCCACCACTGACACGGAACAA
rrn A2	GCAAAAATAAATGCTTGACTCTGTAG	• •	CGGGAAGGCGTATTATGC	ACACCCGCGCCGCTGAGAA
λ P <sub>R</sub>	TAACACCGTGCCTGTTGACTATTTTA	• •	CCTCTGGCGGTGATAATGG	TTGCATGTACTAAGGAGGT
λ P <sub>L</sub>	TATCTCTGGCGGTGTTGACATAAATA	• •	CCTACTGGCGGTGACTACTGA	GCACATCAGCAGGACGCAC
T7 A3	GTGAAACAACCGTTGACAACATGA	• •	AGTAAACACGGTACGATGT	ACCACATGAAACGACAGTGA
T7 A1	TATCAAAAAGAGTATTGACTTAAAGT	• •	CTAACCTATAGGATACTTA	CAGCCATCGAGAGGGACACG
T7 A2	ACGAAAAACAGGTATTGACAACATGA	• •	AGTAACATGCAGTAAGATAC	AAATCGCTAGGTAACACTAG
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

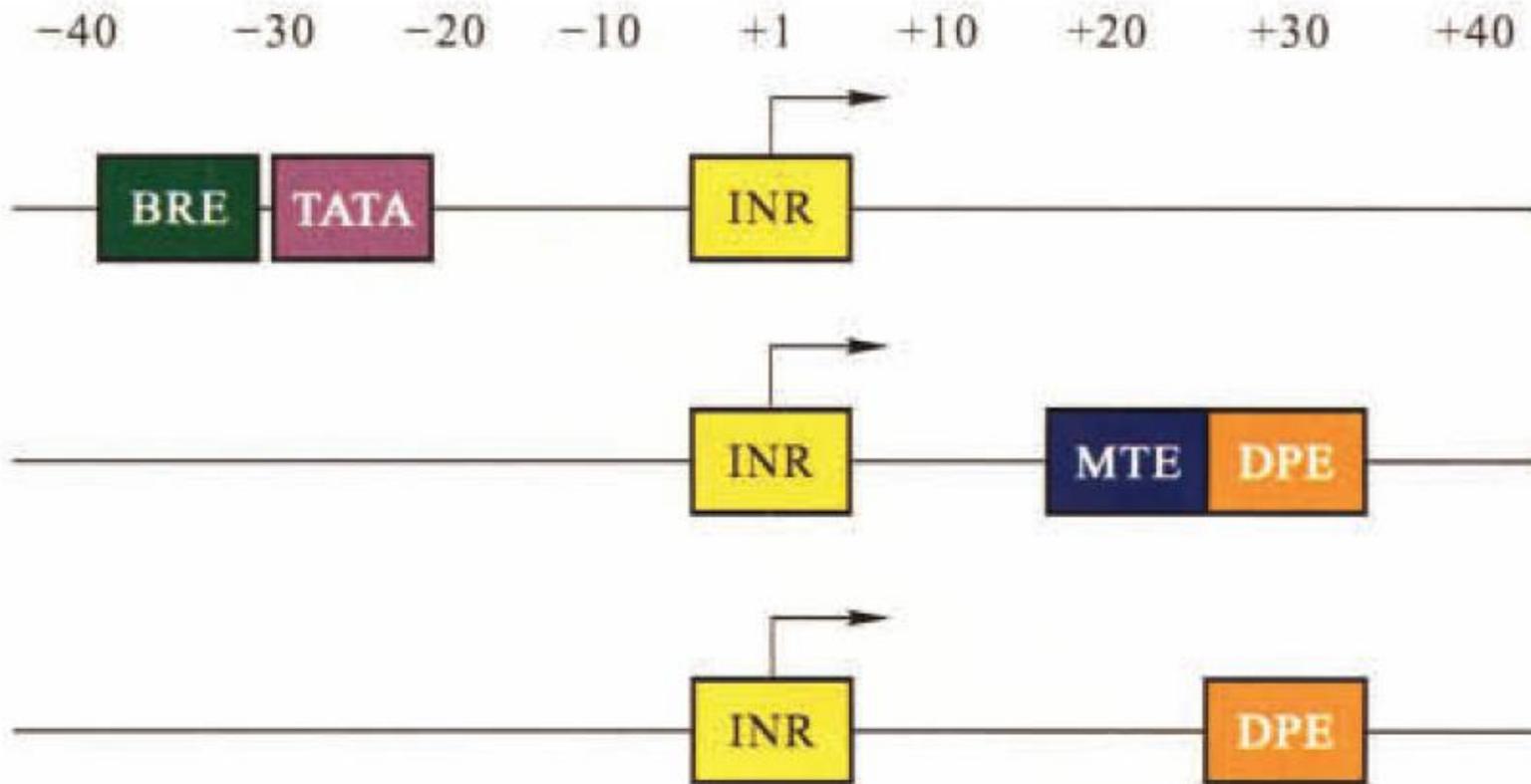
## **Энхансеры и сайленсеры** обеспечивают

(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



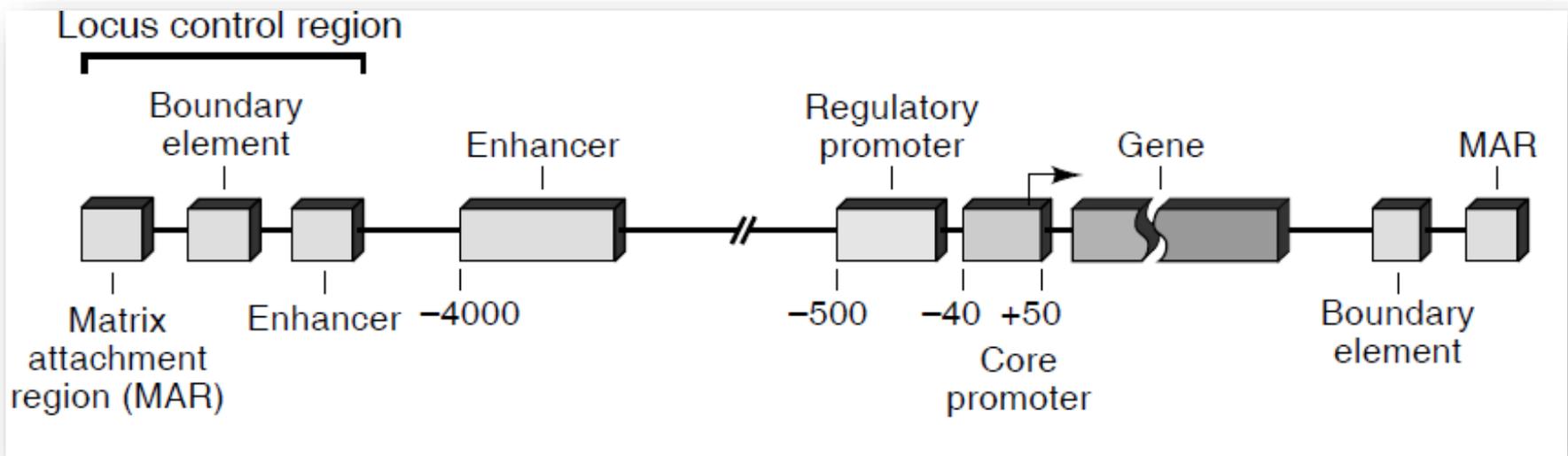
**INR** – инициатор, **TATA** – TATA-бокс, **DPE** - downstream promoter element (нижний промоторный элемент), **MTE** - motif ten element – все являются сайтами связывания субъединиц TFIID, **BRE** – сайт TFIIB

# Межмолекулярные взаимодействия на промоторе РНК-полимеразы II

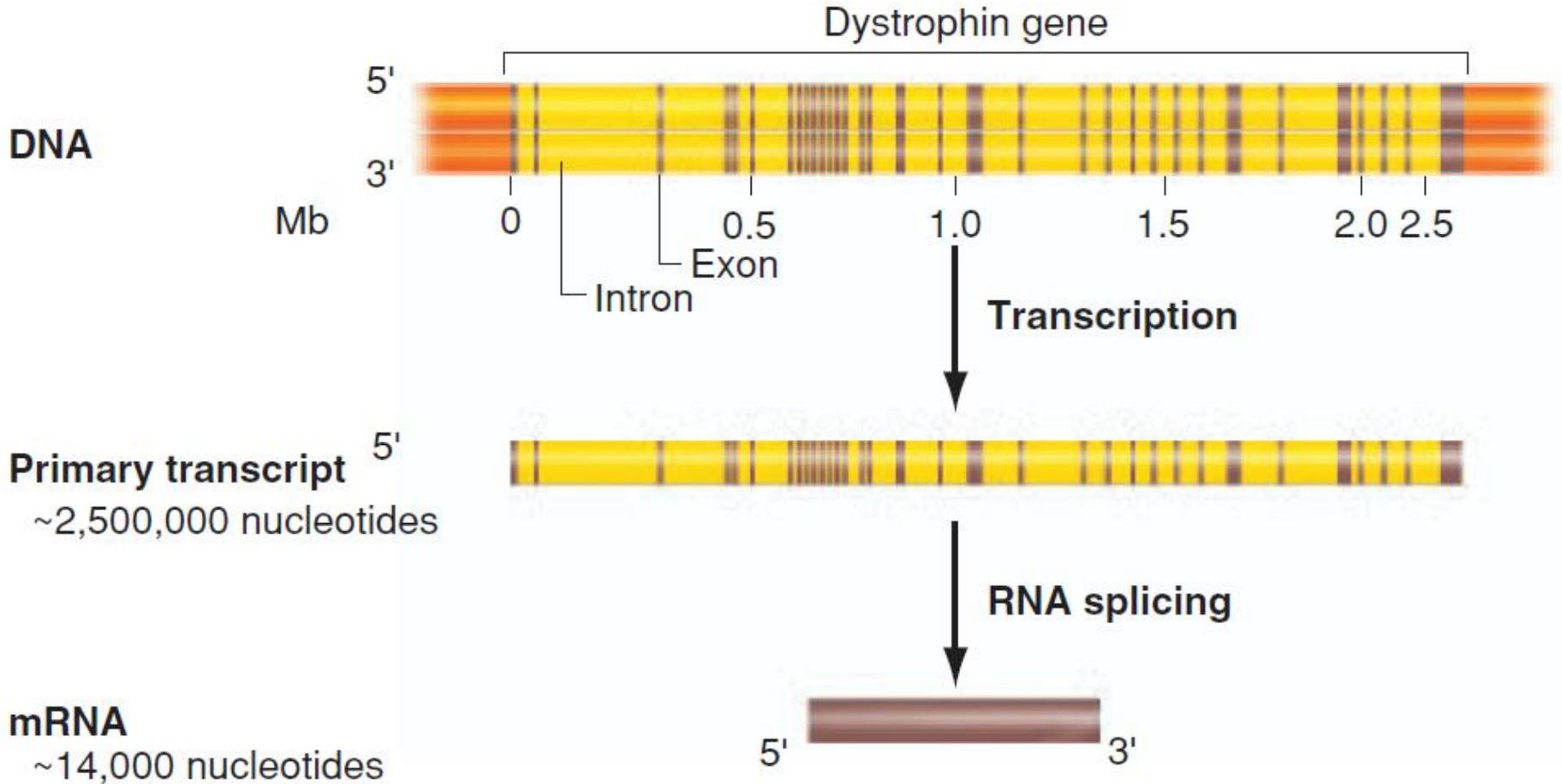


**ФТ** – факторы транскрипции; **ОФТ** – основные факторы транскрипции;  
**РЭ** – регуляторные элементы (последовательности) ДНК,  
**КТ** – коактиваторы транскрипции

# Обобщенная структура эукариотического гена

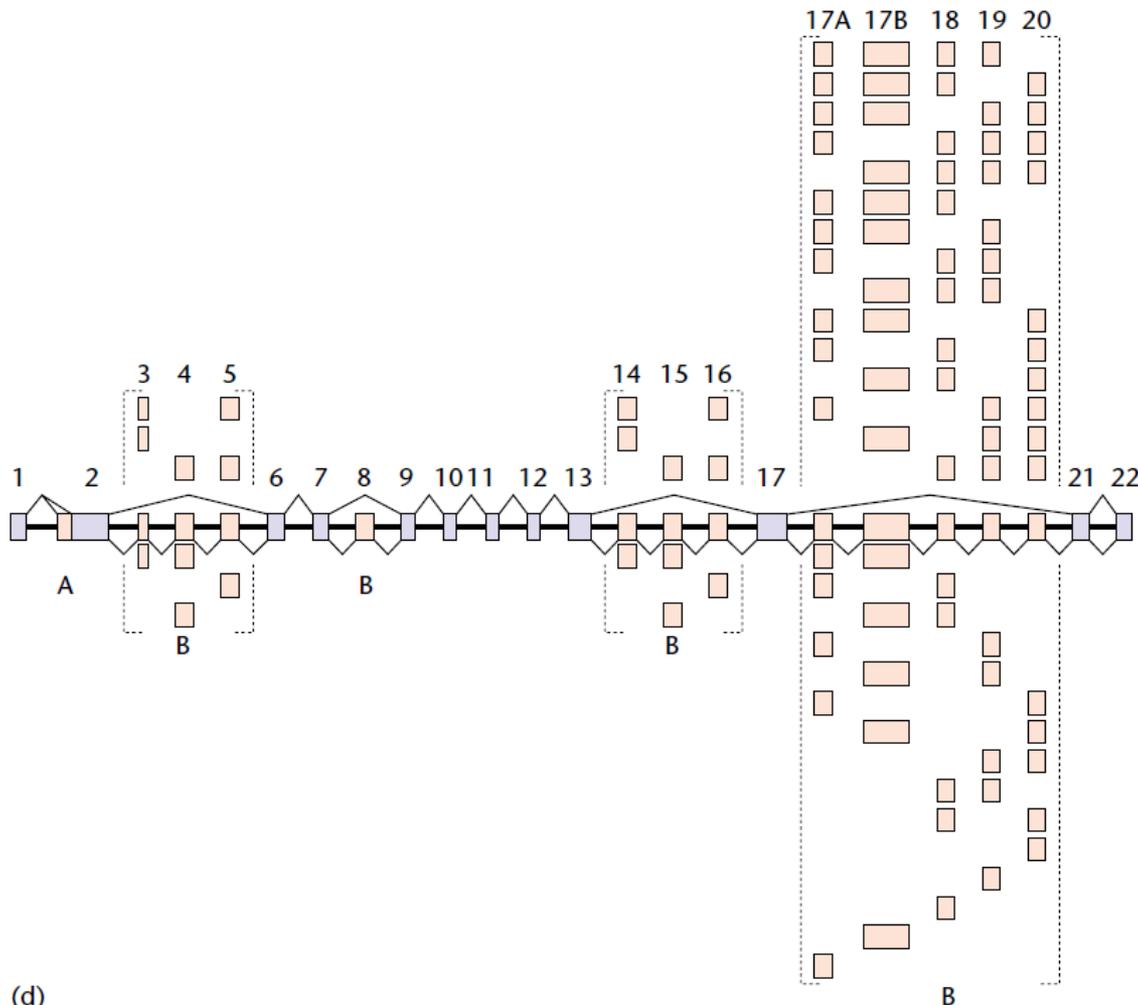


# Ген дистрофина человека и продукты его транскрипции



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

# 33 продукта альтернативного сплайсинга транскрипта одного гена



(d)

- У человека:
- В среднем – 8-9 интронов
- Ген титина (коннектина) – 362 интрона
- Самые большие интроны – 1 млн п.н.
- 300 безинтронных генов (половина имеет отношение к системам передачи сигналов, а пятая часть кодирует гистоны)
- 95% претерпевают АС
- 10-11 изоформ мРНК/ген
- 20 687 генов – 100 000 белков



# Разнообразиие 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

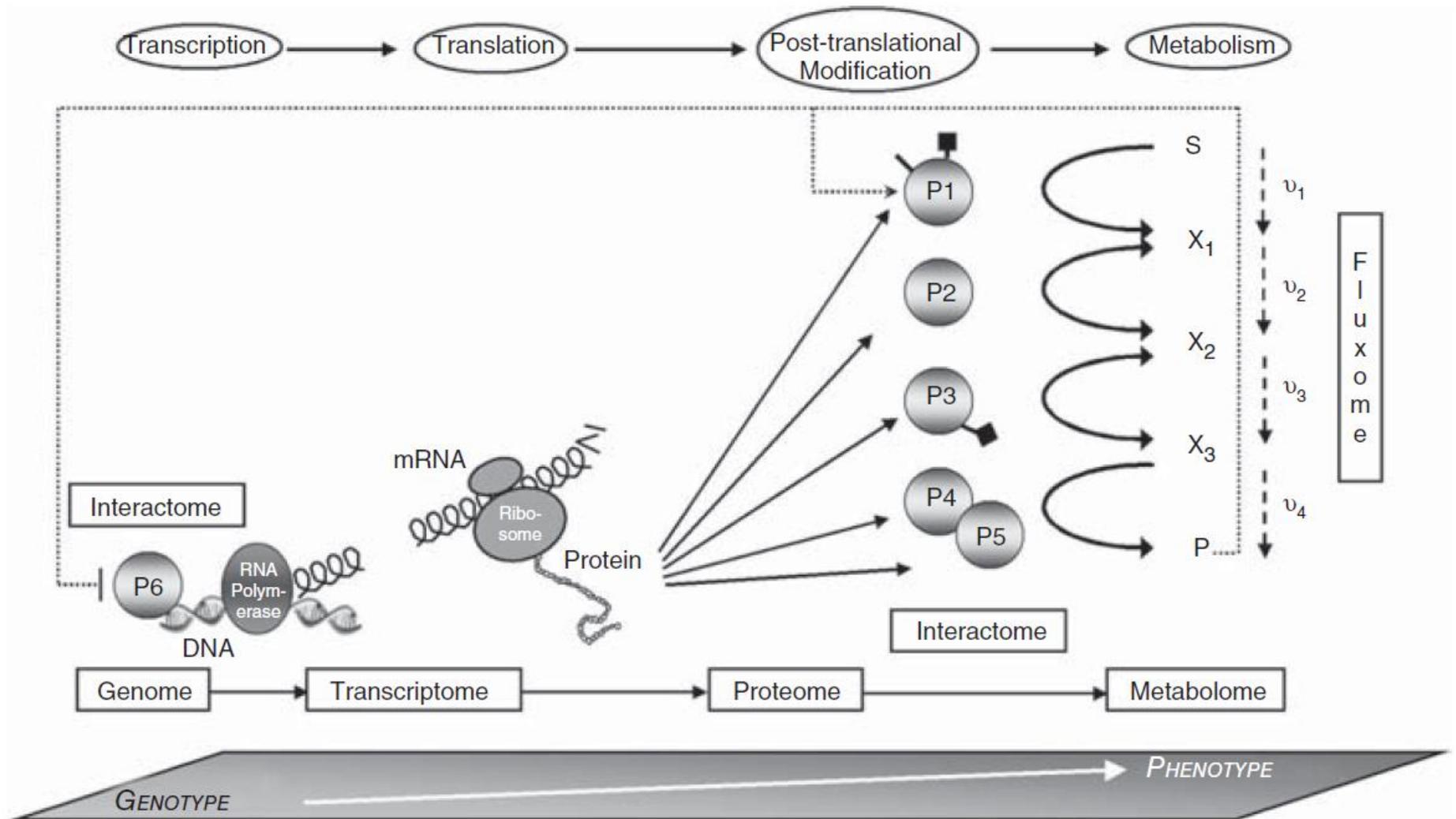
- ❖ Ген – фрагмент нуклеиновой кислоты, в последовательности которой закодирована информация о последовательностях других НК или белков
- ❖ Изменения фенотипа организма однозначно (?) связаны с мутационными изменениями его генотипа (т.е. изменениями последовательностей генов)
- ❖ Генотипические изменения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

# Хорошо забытое старое

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

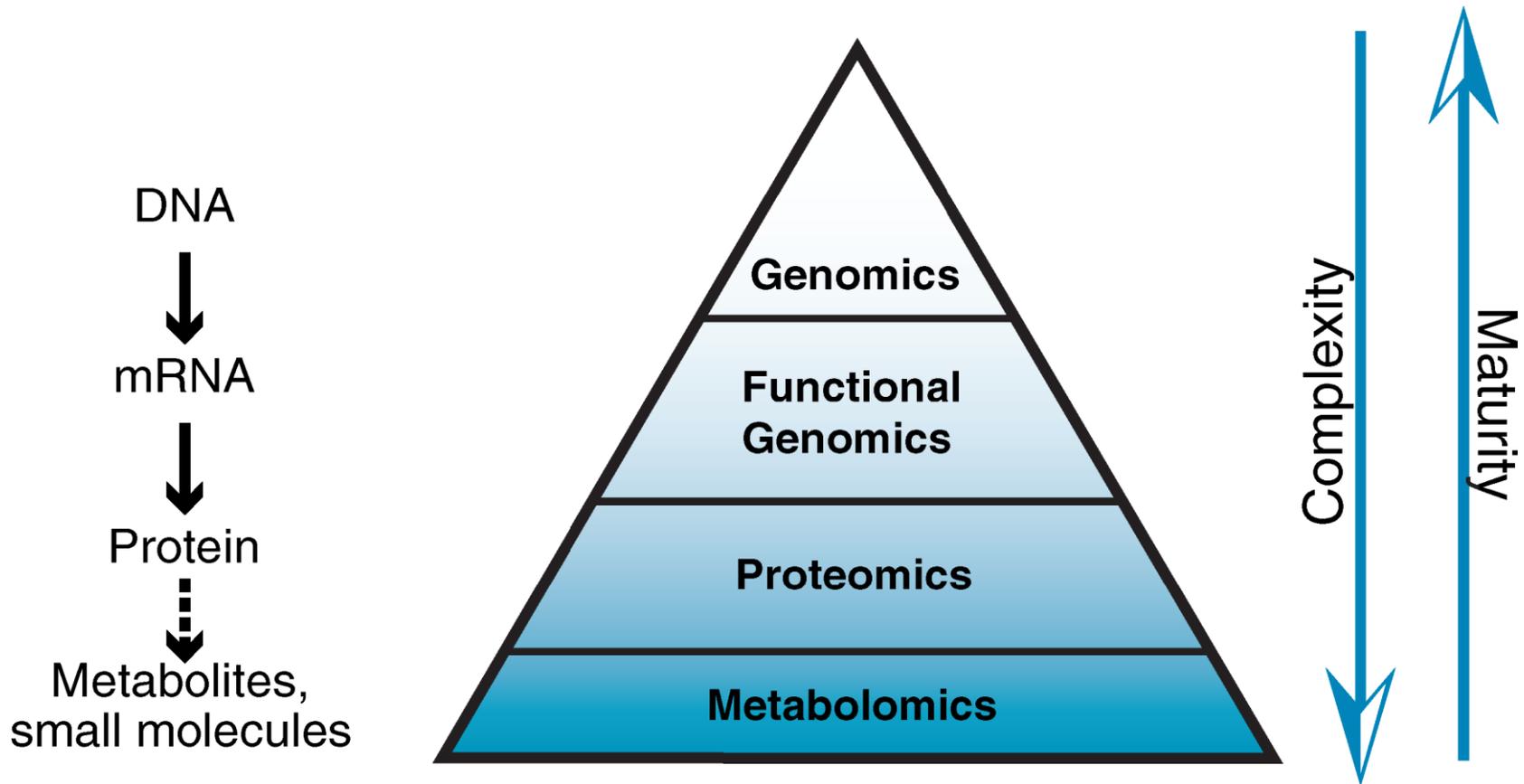
**Один ген – один признак**

# Центральная догма молекулярной биологии

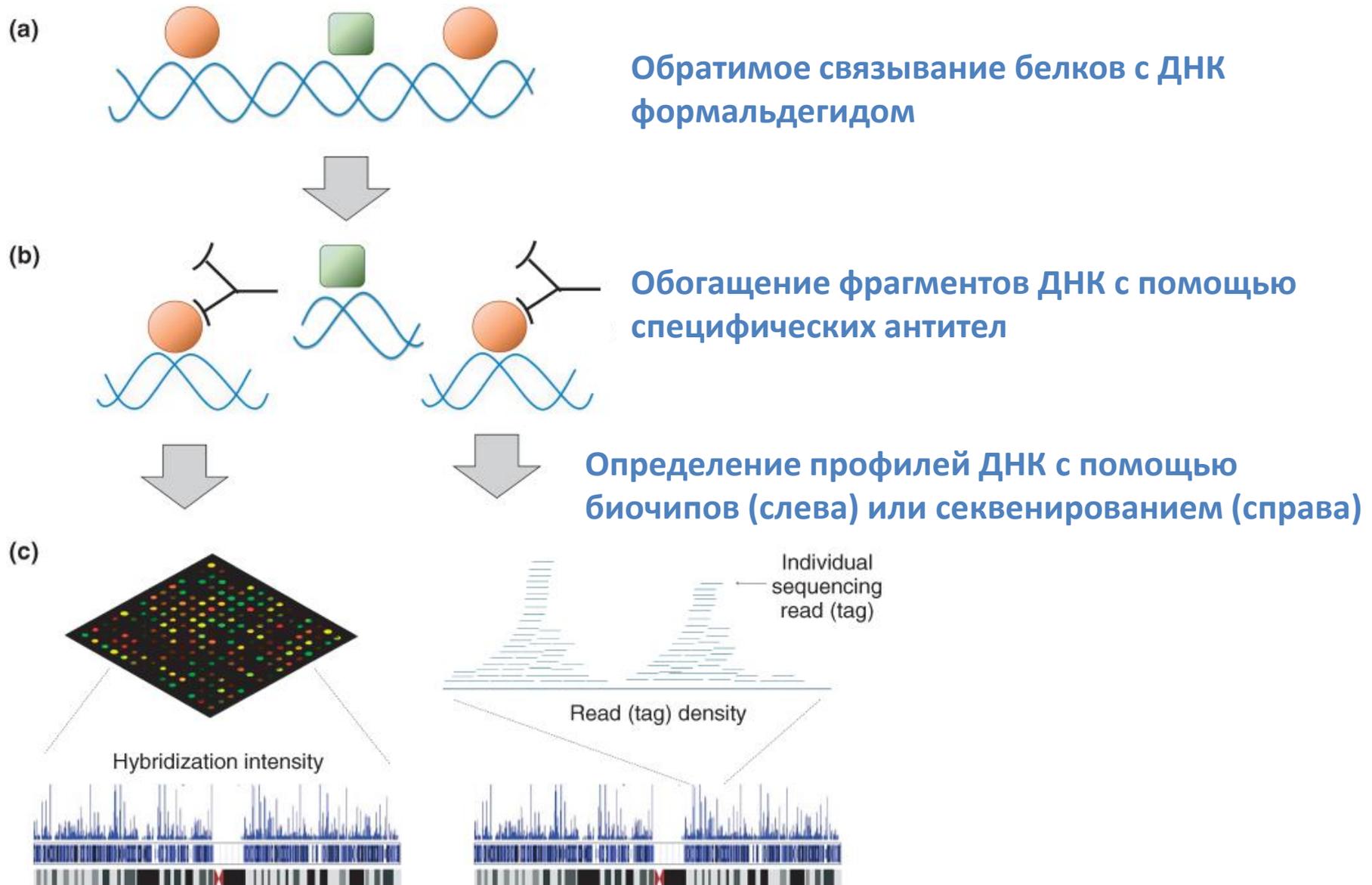


Формирование фенотипа под действием генотипа в соответствии с центральной догмой

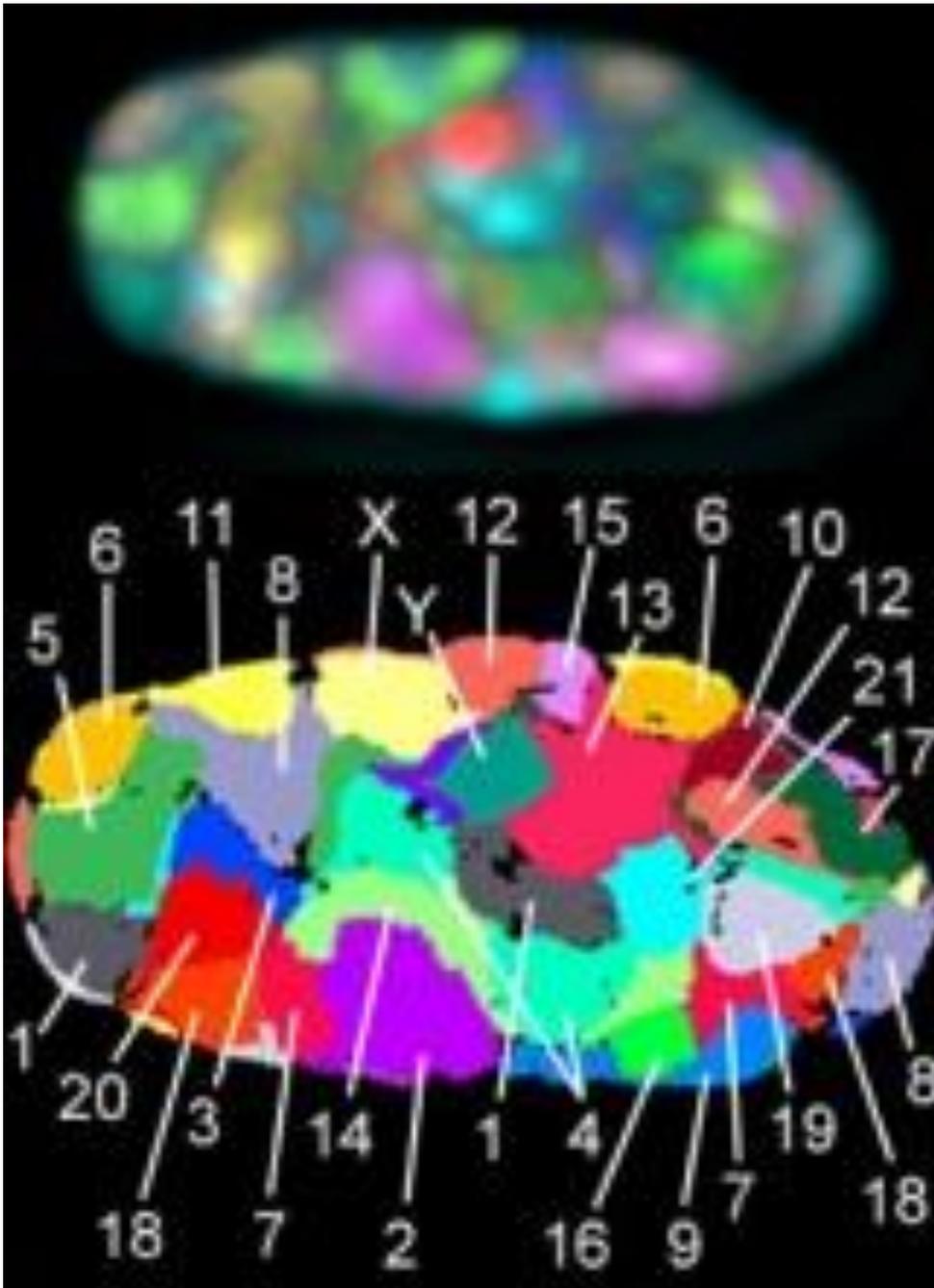
# Системные подходы в молекулярной биологии и генетике



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



# Хромосомные территории в интерфазном ядре фибробластов человека



Многоцветная FISH (