

Лекция 10

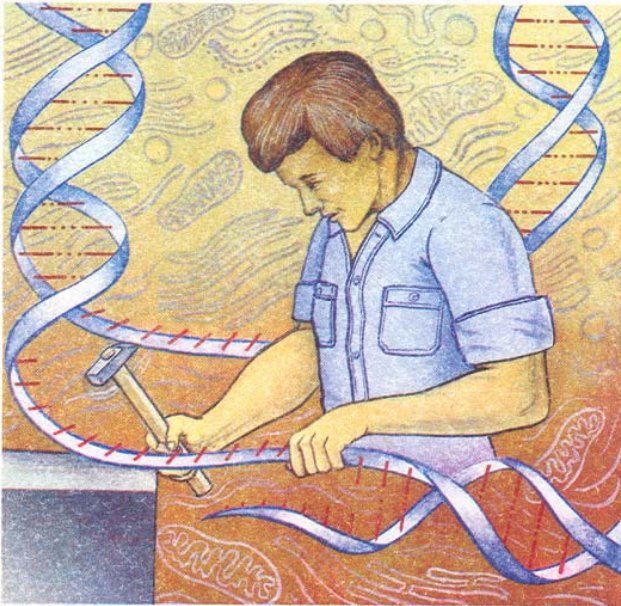
Геном

Лекция 9

Копылов
ММР
знаний

А.А.БОГДАНОВ Б.М.МЕДНИКОВ

Власть над геном



1989

Плазмиды - $10^3 - 10^4$
Вирусы - $10^3 - 10^4$
Митохондрии и
Хлоропласты - $10^4 - 10^5$

ПРОКАРИОТЫ - $10^5 - 10^6$
ЭУКАРИОТЫ

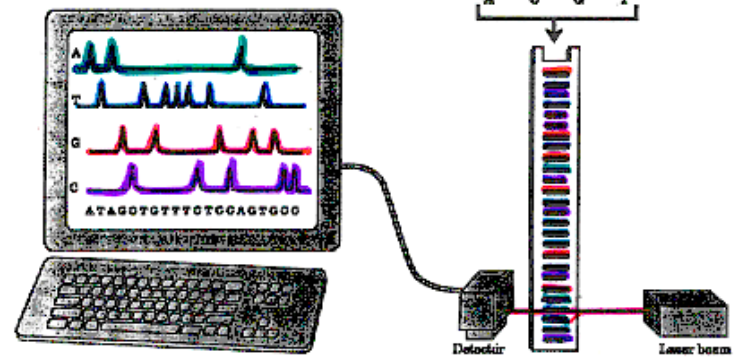
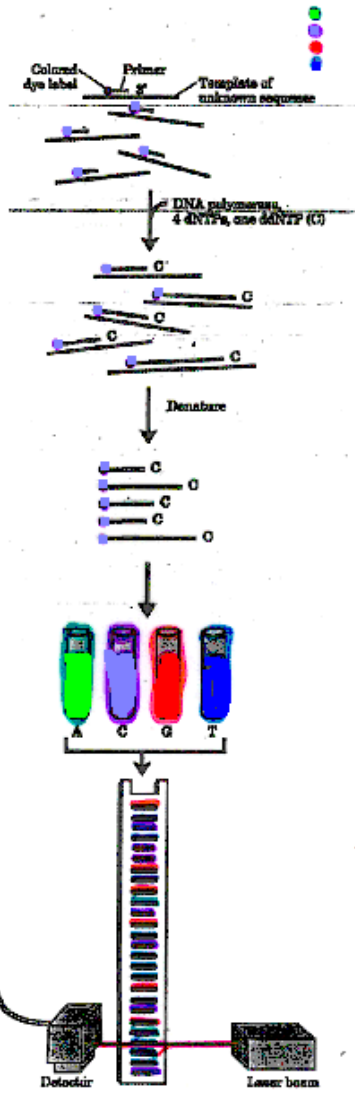
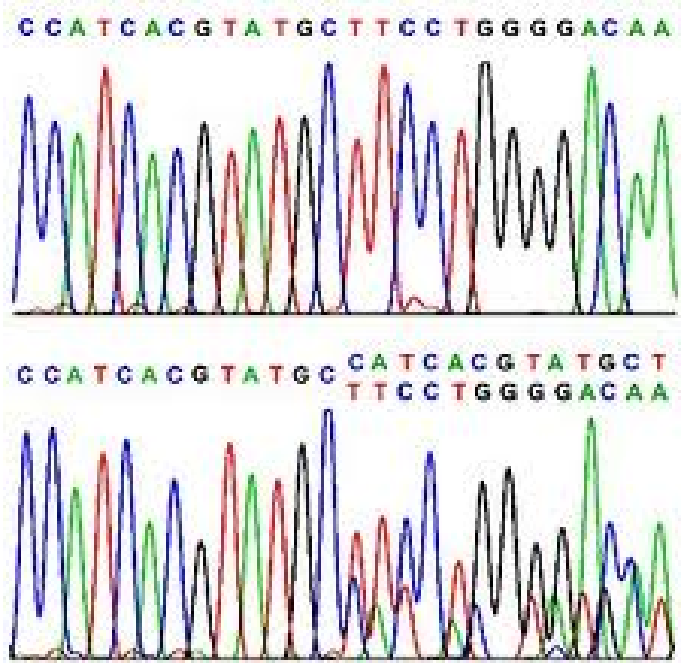
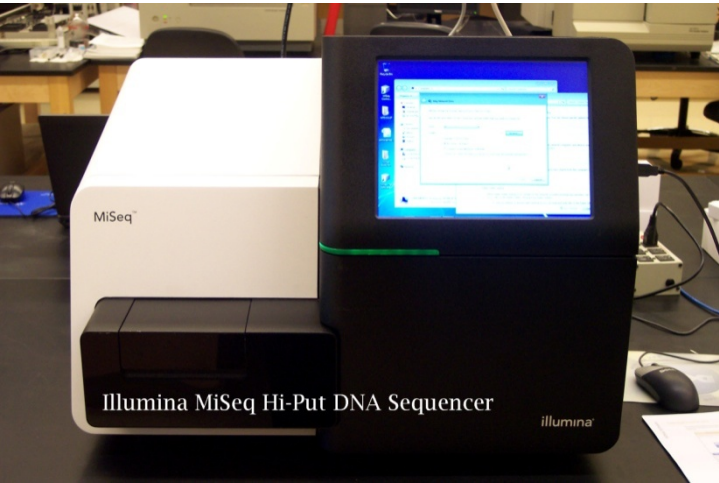
Дрожжи - 10^7

Животные - $10^8 - 10^9$

Растения - $10^9 - 10^{11}$



2 500 знаков/стр,
400 стр/книгу
 10^6 знаков/книгу



Автоматическое
секвенирование
Определение
первичной
структуры ДНК

In January 2012, Life Technologies introduced a sequencer to decode a human genome in one day for \$1,000

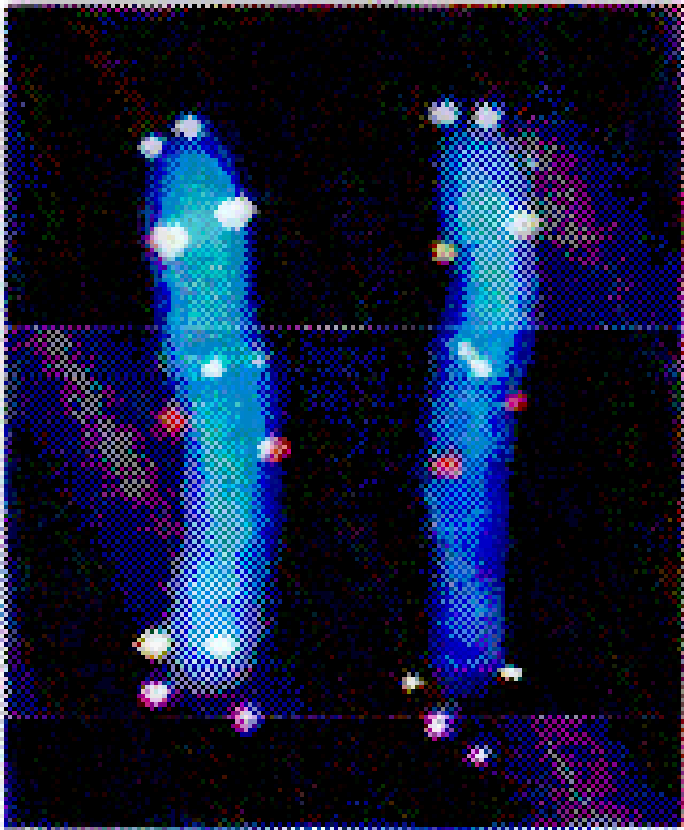
АВТОМАТИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ ДНК

Model 380B
DNA Synthesizer

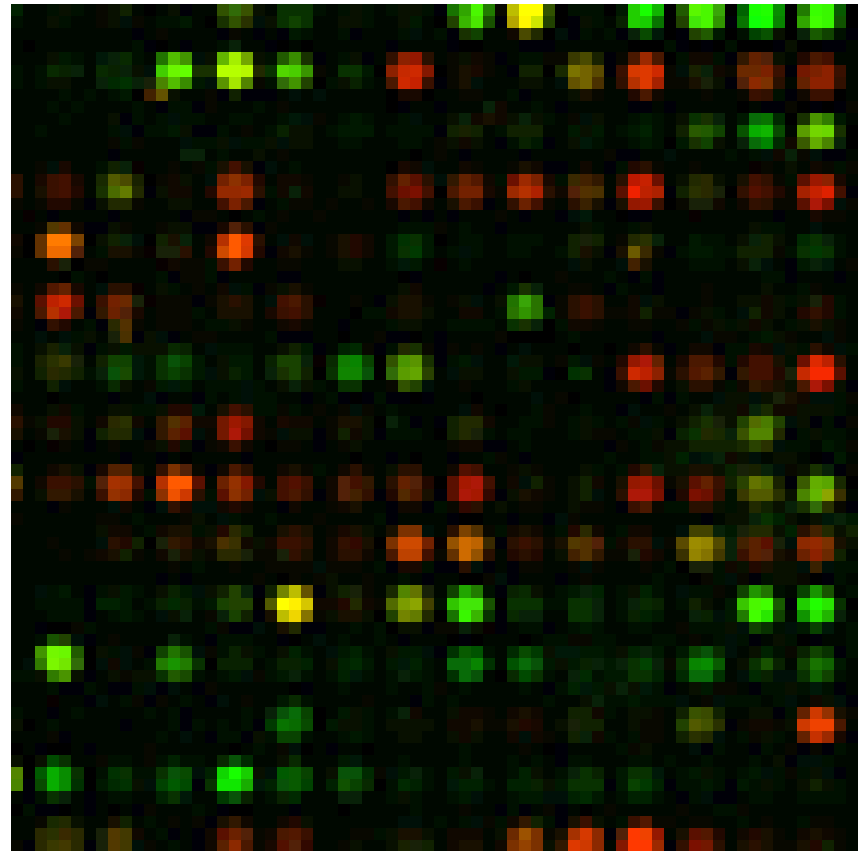


R S M A N U A L

Гибридизационная диагностика генов с флуоресцентными метками



Анализ на хромосомах

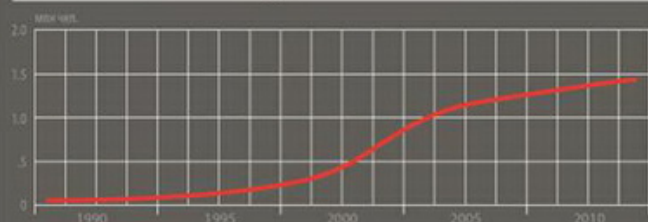


Массовый анализ
на микрочипах

Распространение ВИЧ-инфекции и смертность от СПИДа

В мире насчитывается от 31 до 35 миллионов ВИЧ-инфицированных

Инфицированные ВИЧ, % населения



В большинстве регионов мира отмечается положительная динамика, однако в странах СНГ эпидемия продолжает разрастаться: с 2000 года количество инфицированных почти утроилось

Ежегодная смертность (тыс. чел.)



Россия относится к странам с наиболее высокой смертностью от СПИДа



Источник: UNAIDS (оценки на 2009 год)

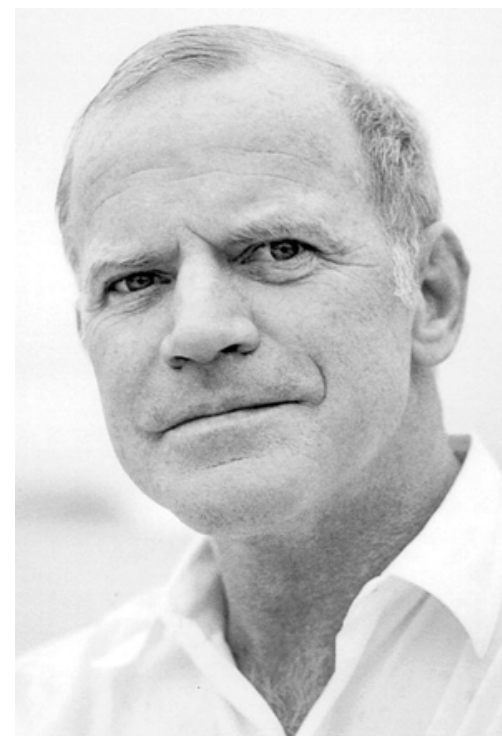
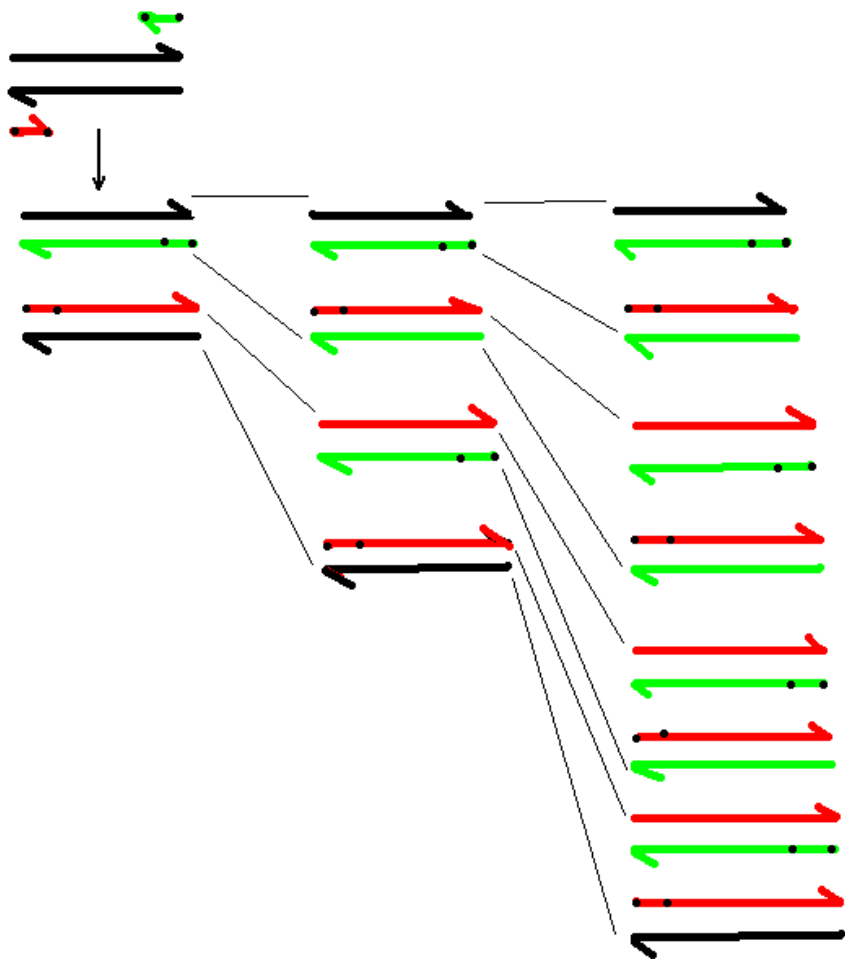
С 2000 по 2009 гг число людей, живущих с **ВИЧ** в Восточной Европе и Центральной Азии, увеличилось **почти в три** раза.

В 2009 г, по оценкам, это число достигло 1,4 млн чел (т.е. 1 из неск 100), в 2000 г оно было 0,53

В мире насчитывается от 31 до 35 миллионов ВИЧ-инфицированных

Получение ДНК

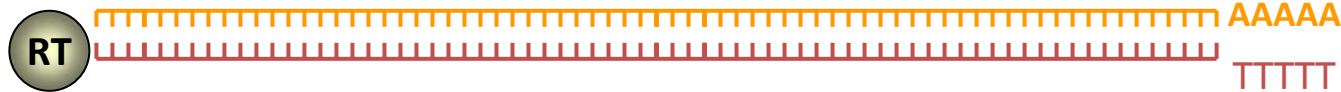
Полимеразная цепная реакция (ПЦР)



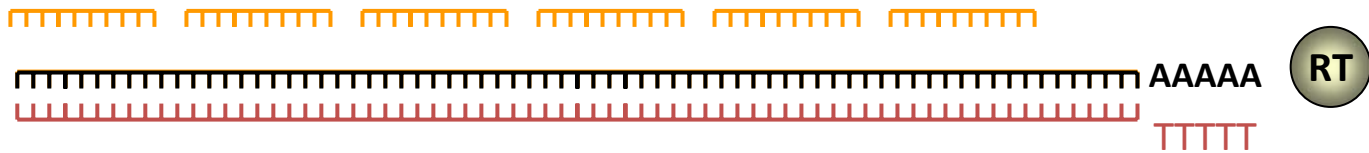
Кэрри Маллис
Нобелевская премия
по химии 1993 г.



Oligo dT primer is bound to mRNA



Reverse transcriptase (RT) copies first cDNA strand

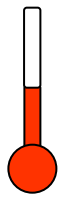


Reverse transcriptase digests and displaces mRNA and copies second strand of cDNA

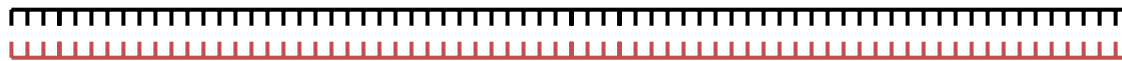


Double strand cDNA

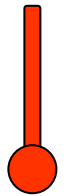
Копирование мРНК в кДНК обратной транскриптазой



50°



A. Double strand DNA



96°



B. Denature



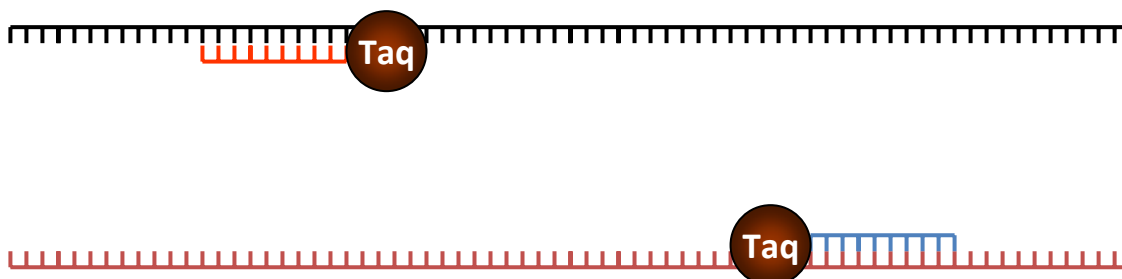
50°



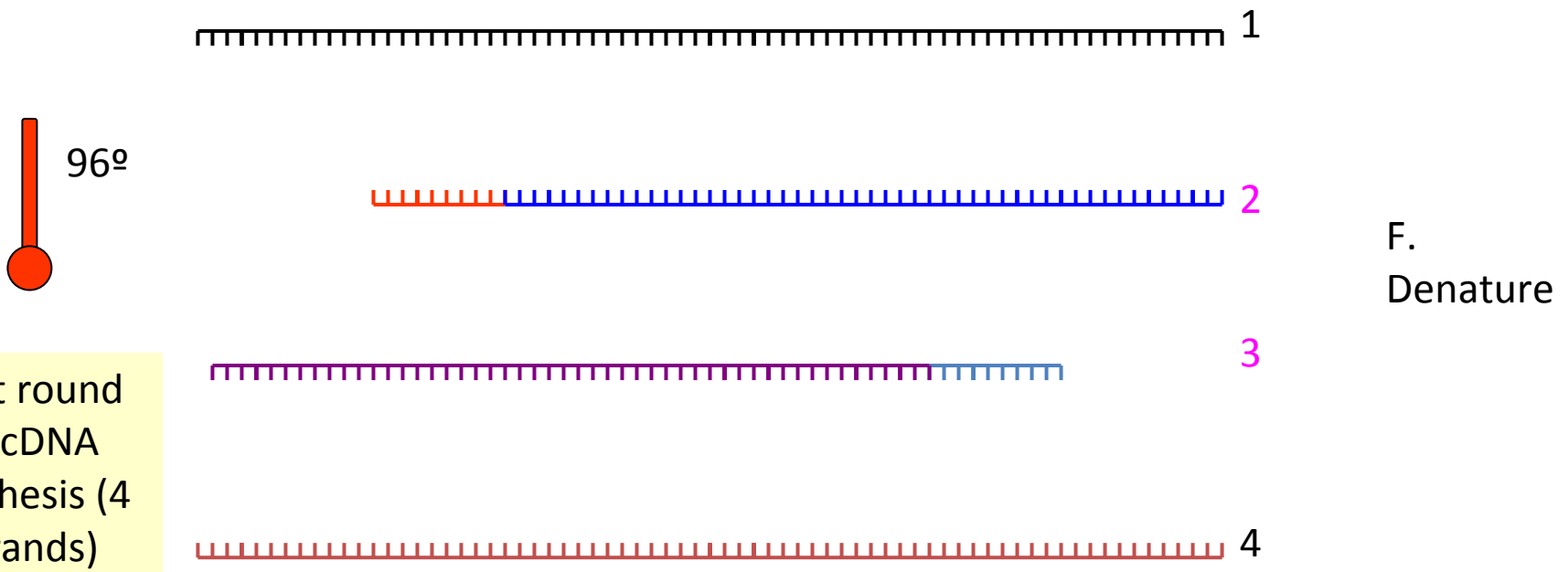
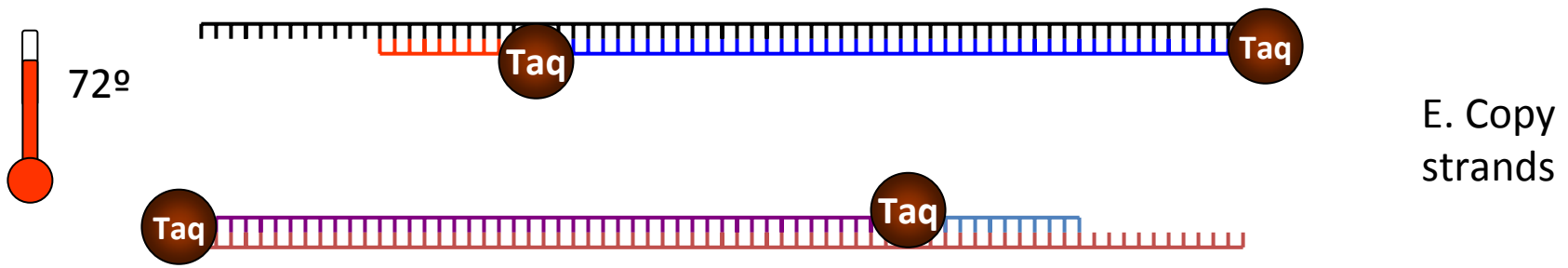
C. Anneal primers



72°



D. Polymerase binds



First round
of cDNA
synthesis (4
strands)



50°

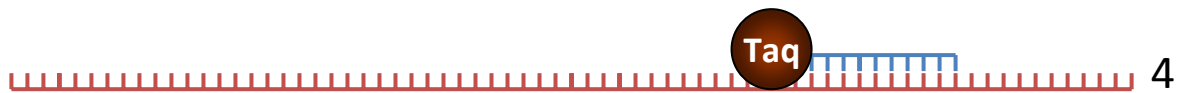
G. Anneal primers



72°

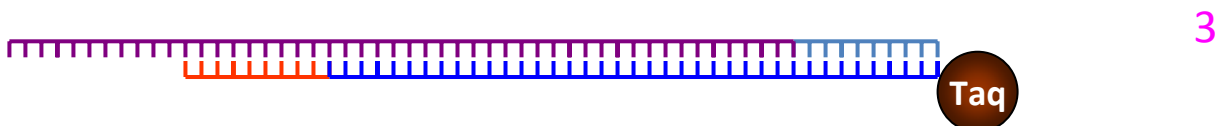
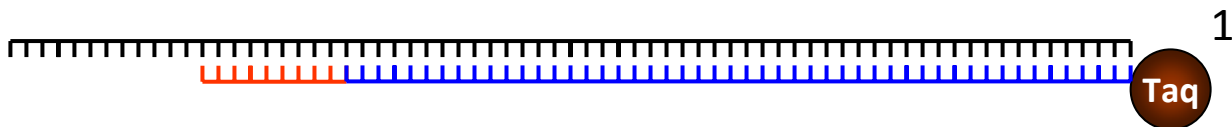


H.
Polymerase
binds



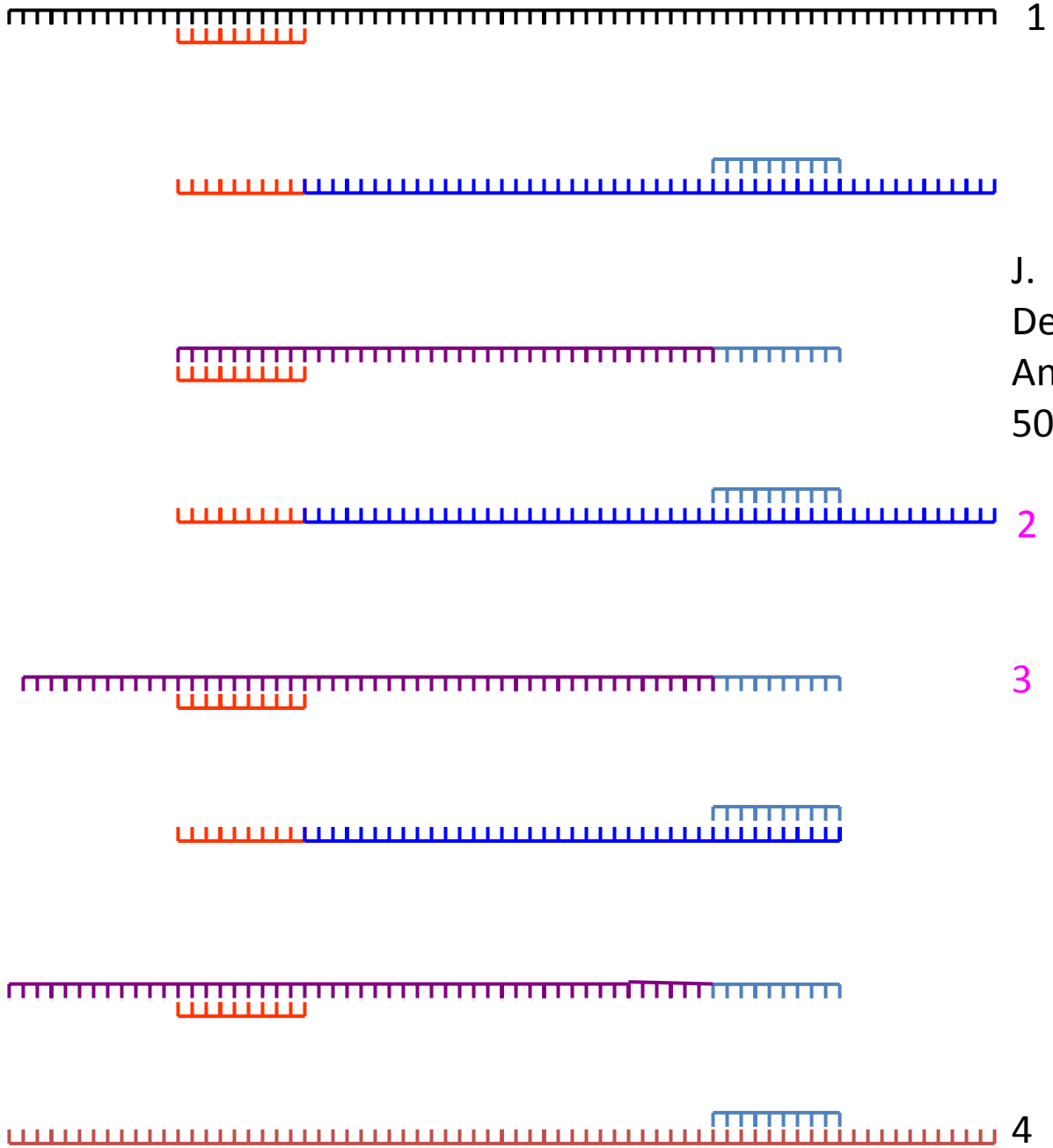
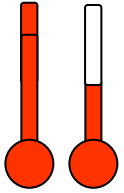


72°



I. Copy strands

Second round of cDNA synthesis (8 strands)



J.
Denature at 96°
Anneal primers at
50°

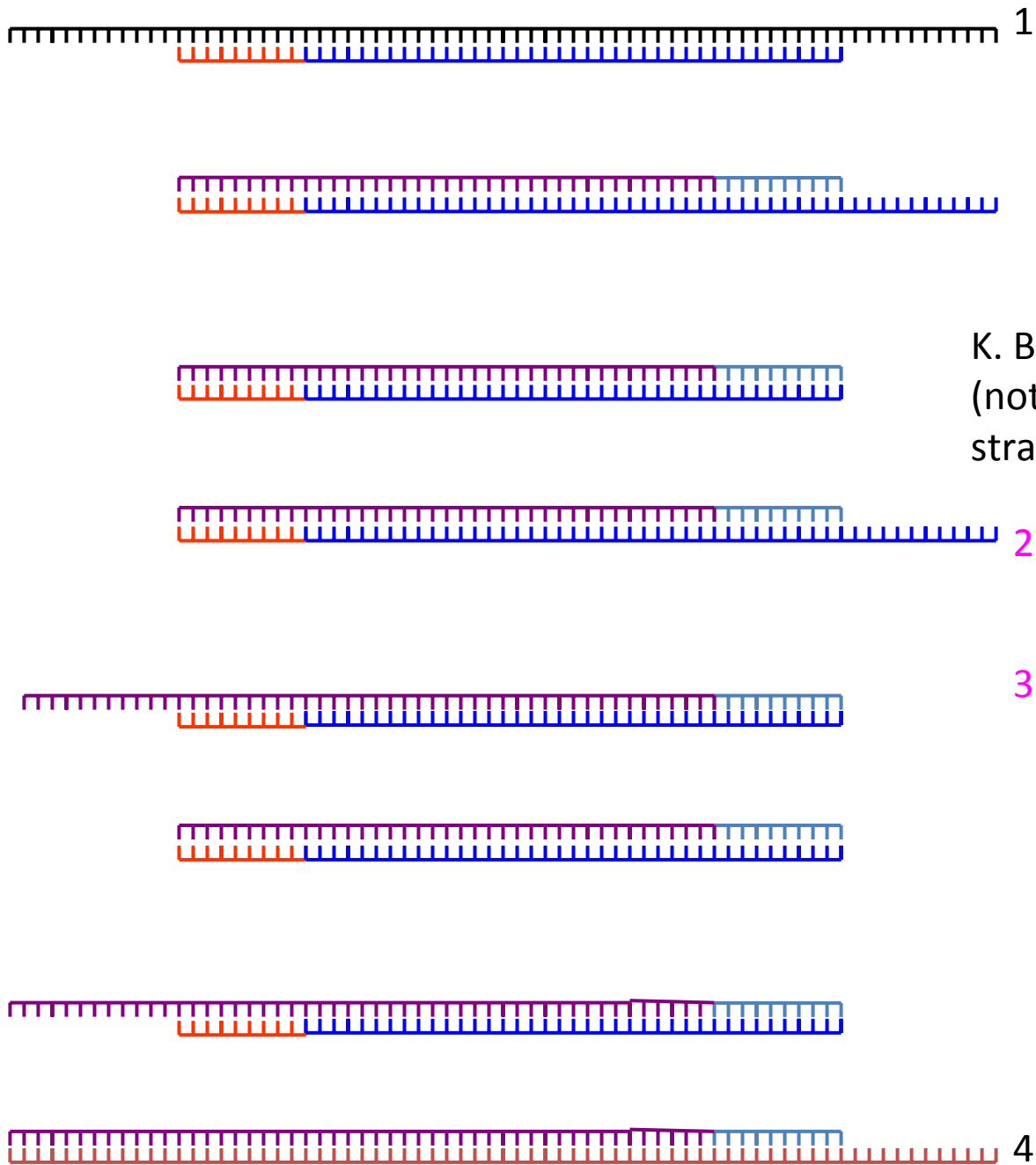
2

3

4

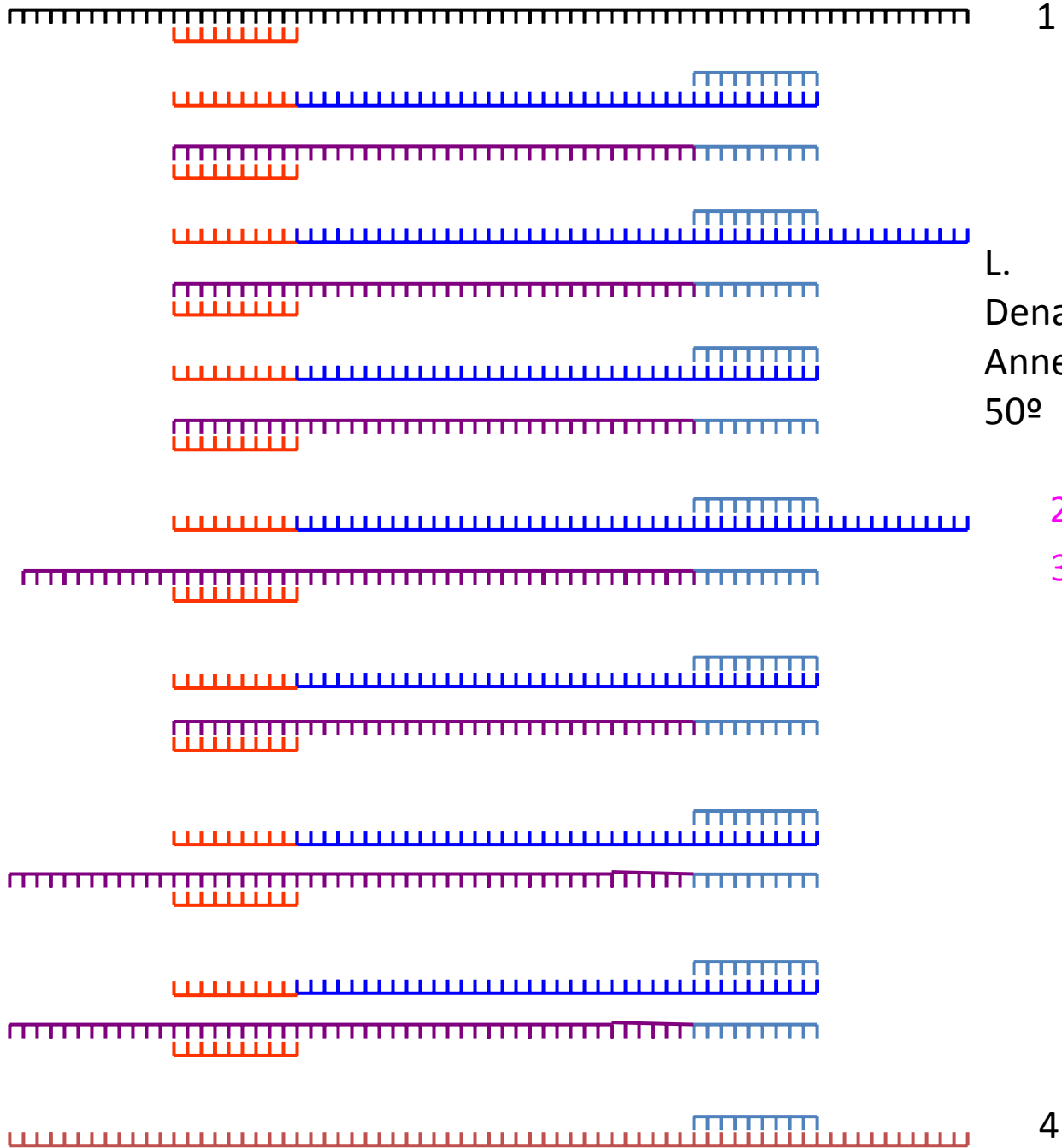
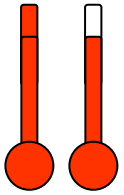


72°



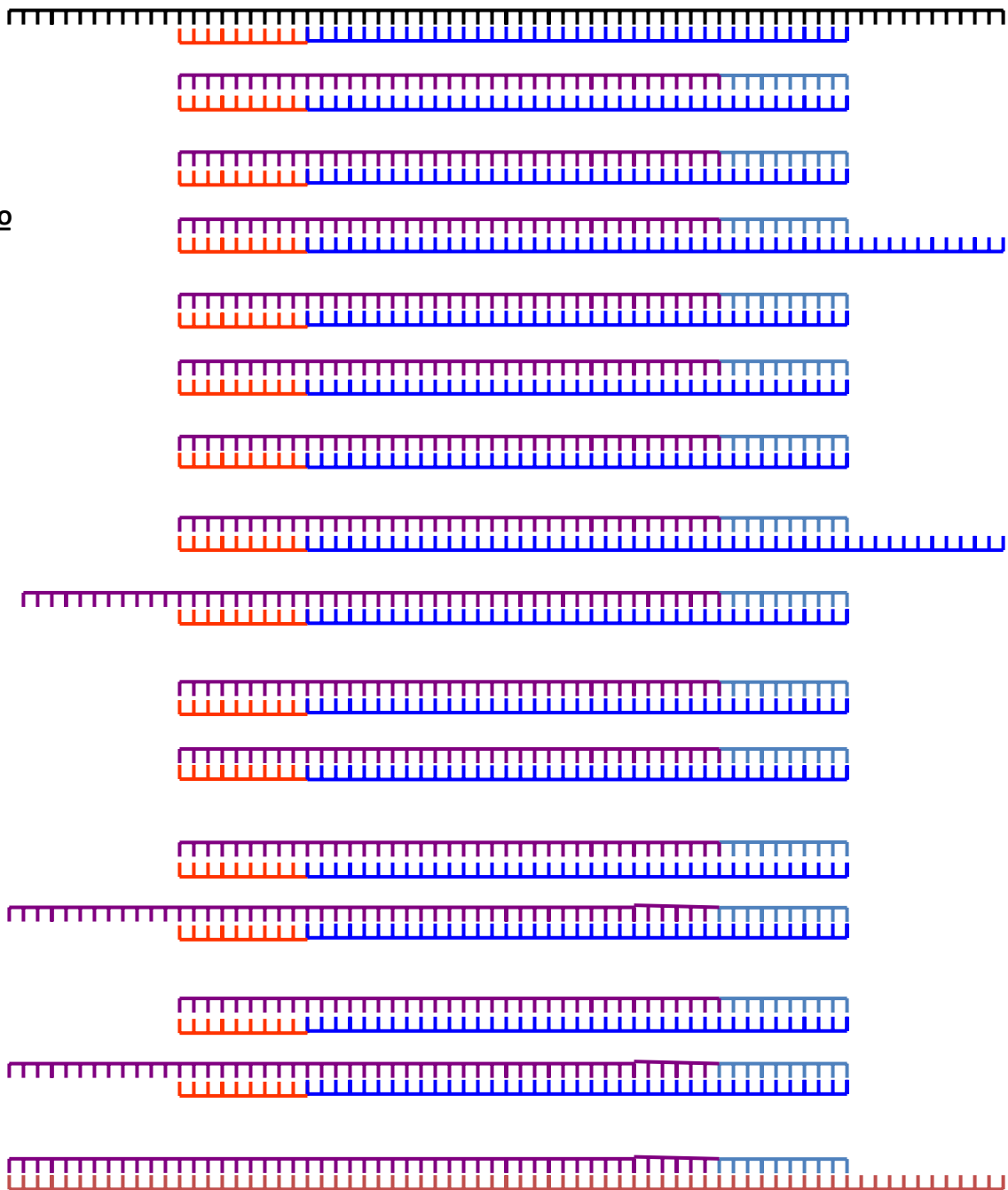
K. Bind polymerase
(not shown) and copy
strands

Third
round of
cDNA
synthesis
(16
strands)





72°



1

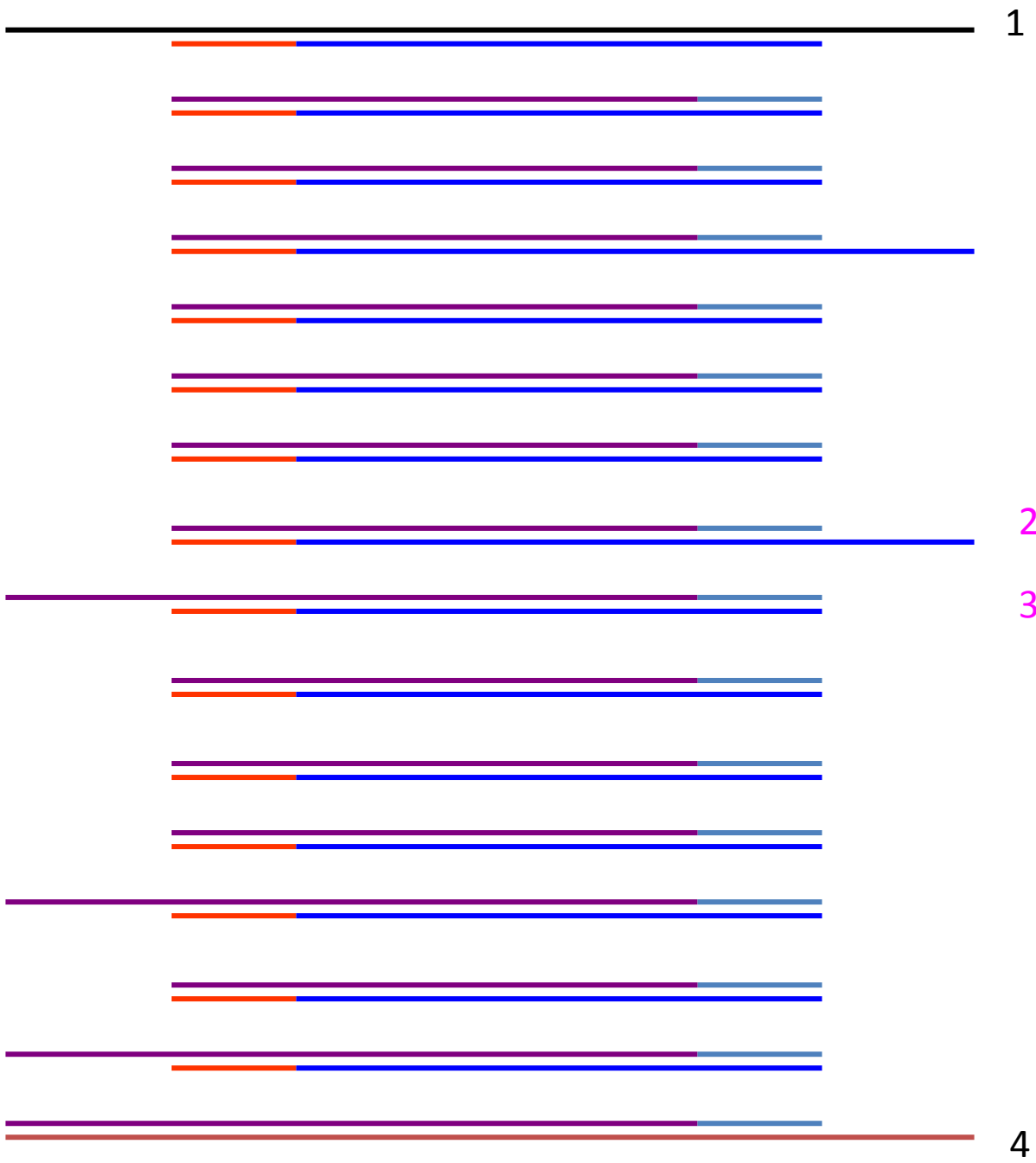
M.
Copy strands at
72°

2

3

4

Fourth
round of
cDNA
synthesis
(32
strands)



cDNA strands (32) are now shown as lines

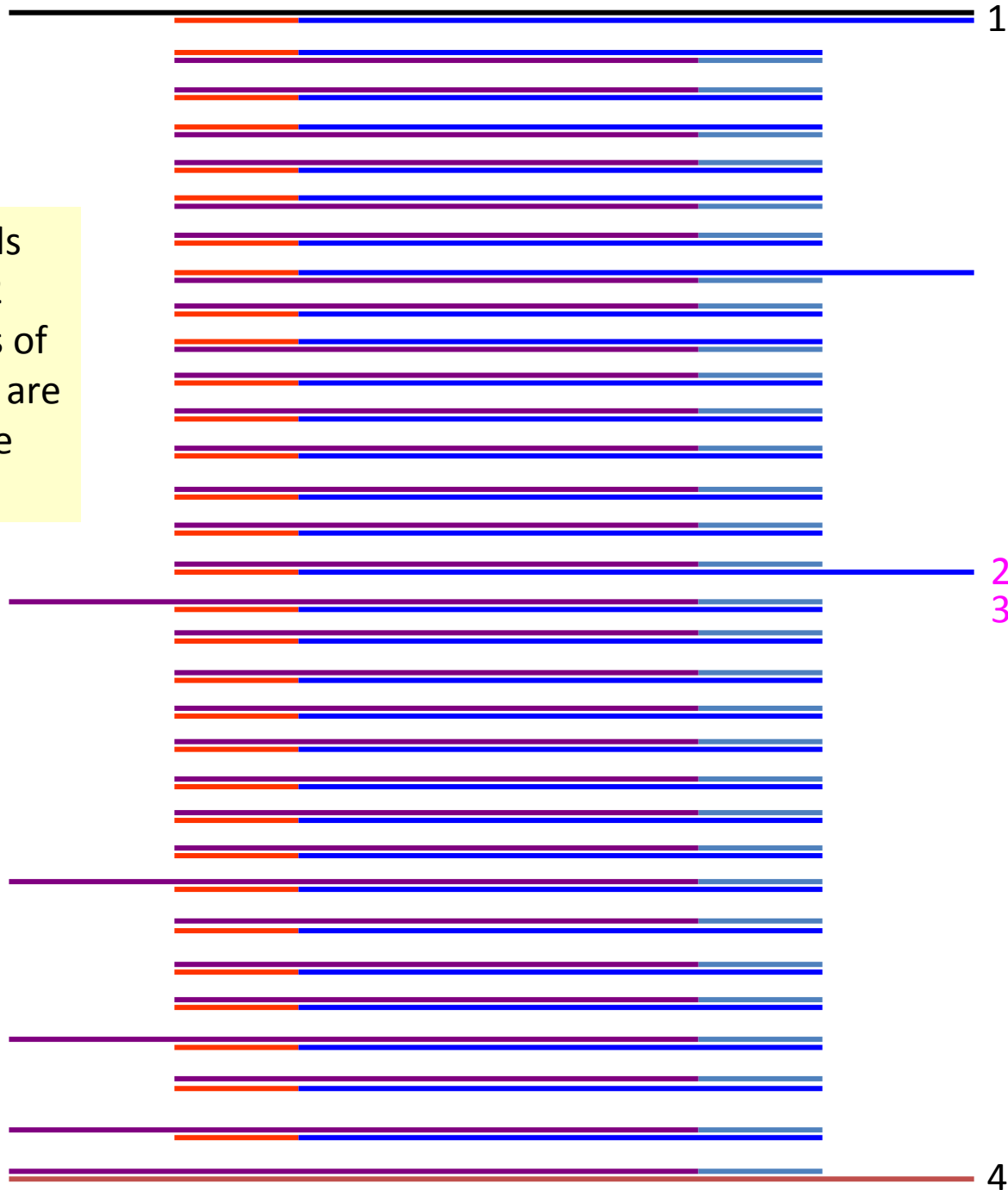
1

2

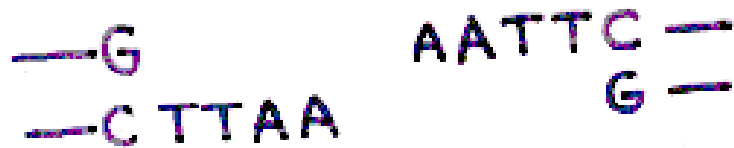
3

4

After 5 rounds
there are 32
double strands of
which 24 (75%)
are same size



EcoRI



HpaII



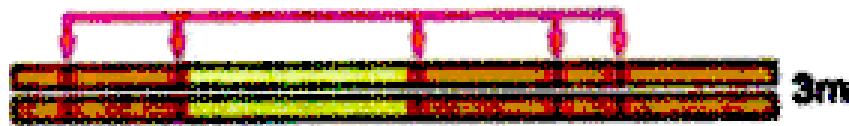
HpaI



Эндонуклеазы
рестрикции II
(рестриктазы)
гидролизуют
ДНК
по определенным
участкам

Полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ)

гидролиз рестриктазой



мама
ДНК хромосомы 3

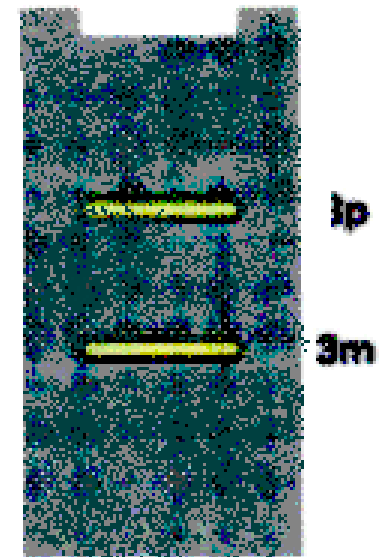


папа
ДНК хромосомы 3

другой вариант
последовательности
нуклеотидов

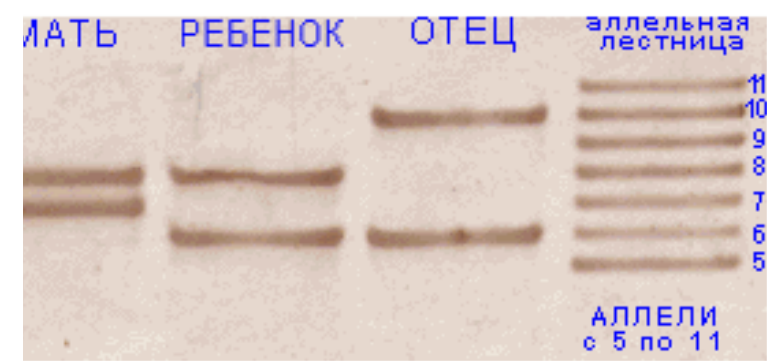
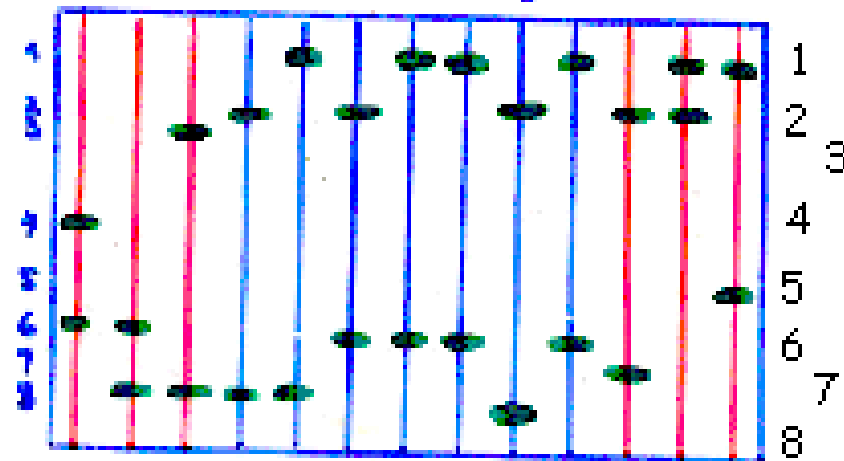
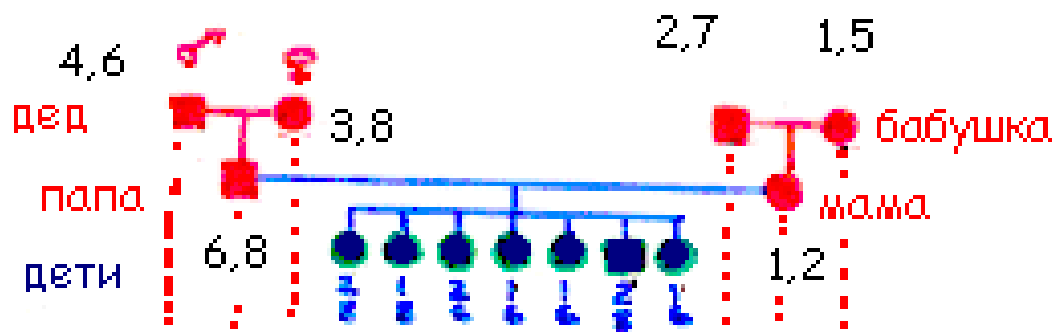


ЗОНД



Полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ)

Сэр Алек Джеффрис, 1985



Дактилоскопия ДНК

Идентификация личности

Идентификация родства

Идентификация царской семьи

Инцест Египетских фараонов

Кто была Ева и откуда она

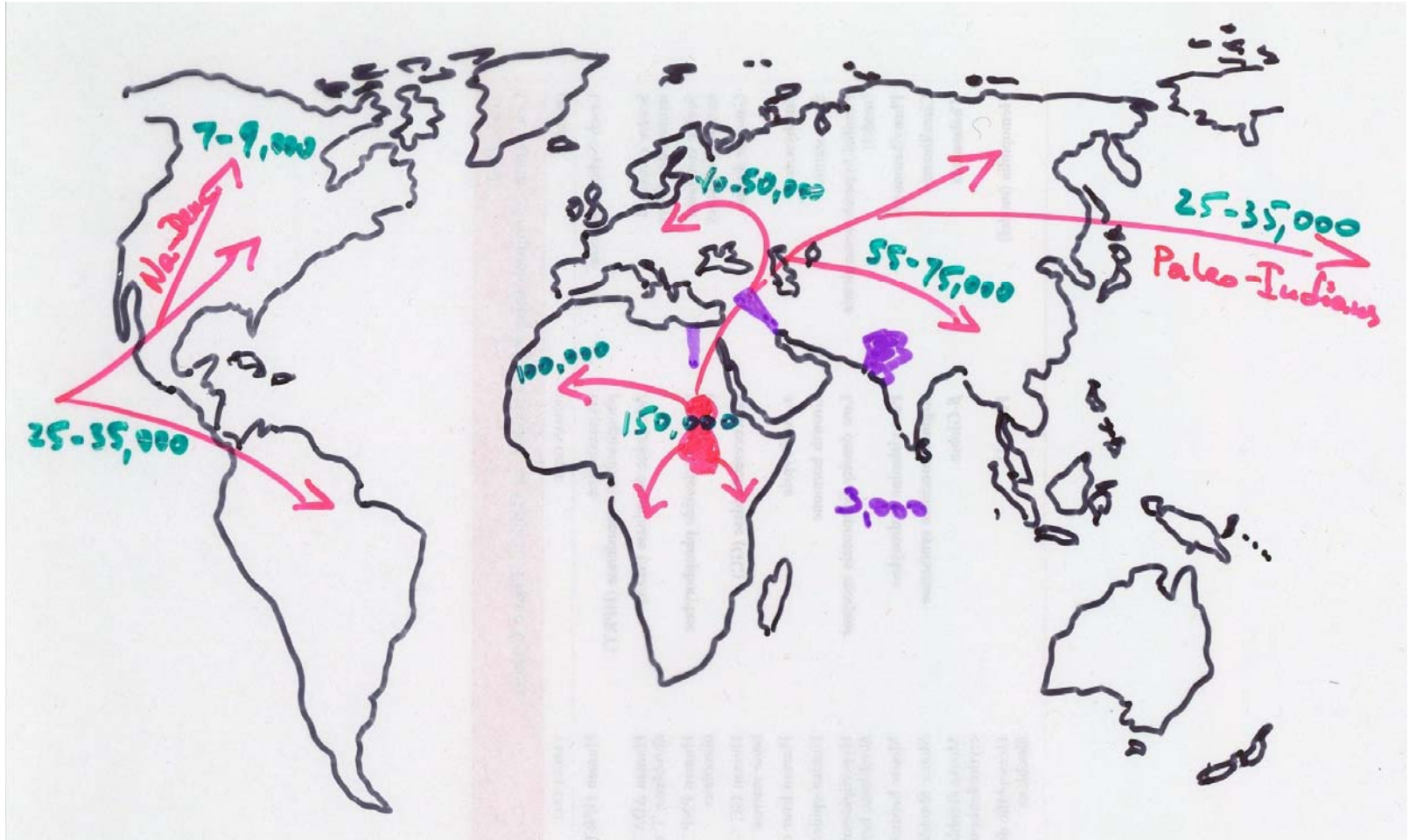
Неандертальцы и *Homo sapiens*

Полиморфизм
тандемных
повторов (STR)

1998
CODIS:
Combined DNA
Index System

Где родилась Ева?

В Мемфисе, Вавилоне или Мохенджо-Даро?



В Мемфисе, Африка

Рекорды дактилоскопии ДНК

2006 г.

идентификация

ДНК

через

33 тыс лет

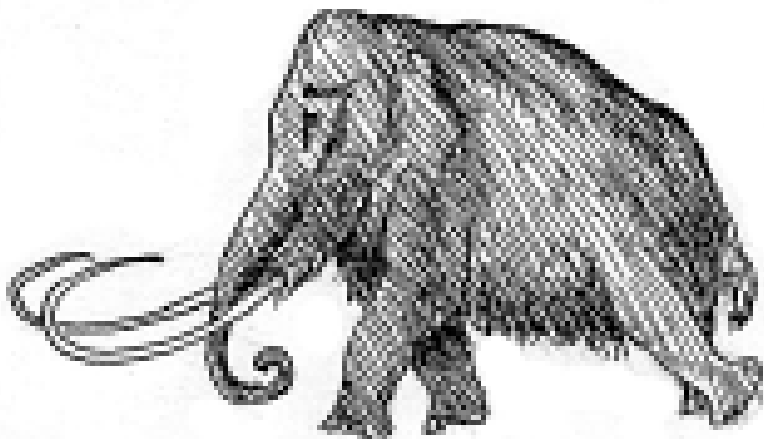
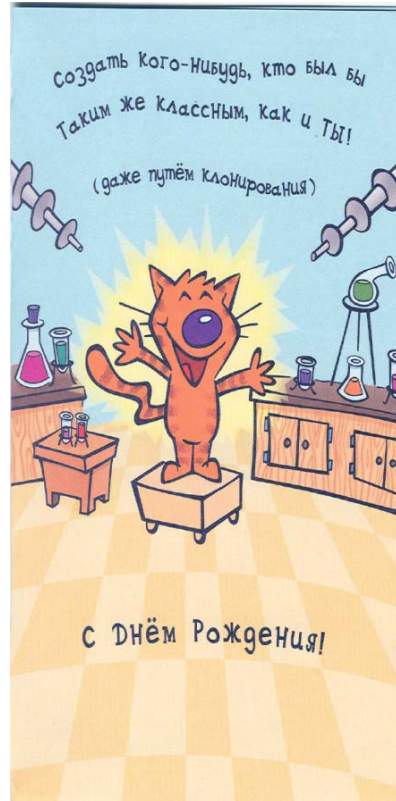


Figure 1. The Right Back Leg of the Woolly Mammoth (*M. primigenius*) Found in Siberia

The well-preserved mammoth body fragment with foot (33 × 36 cm), shin, and ankle-joint (the total length is ~88 cm) was found in the Enmynveem River valley (north-eastern Siberia, Chukotka). The tissue material (bones, muscles, and skin) had no visible marks of tissue damage by insects or other animals. Radiocarbon dating of the skin and muscle tissue determined that the mammoth lived $32,850 \pm 900$ y ago [12].

Что такое клонирование?



Клон -
генетически
идентичное
потомство одной
клетки
(одного организма)

Клонирование:

- живого объекта (организма, клеток),
- неживого объекта (ДНК) - жаргон!

КЛОНИРОВАНИЕ - точное воспроизведение живого объекта в нескольких копиях...

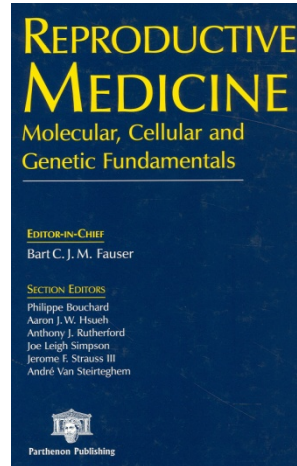
Все «копии» должны обладать идентичной наследственной информацией, т.е. нести идентичный набор генов.

Генетики получают клоны размножением партеногенезом, т.е. бесполом путем, без предшествующего оплодотворения. Естественное клонирование человека - феномен однойяйцевых близнецов.

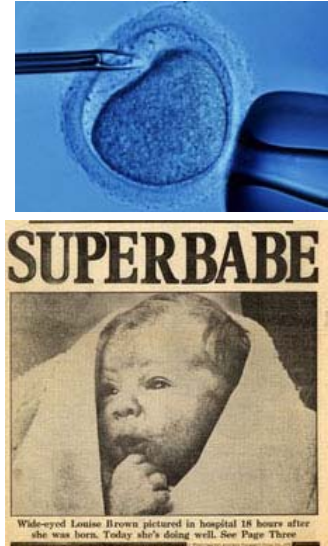
Л.И. Корочкин

Клонирование ДНК - жаргон!

Не путать с "Репродуктивной медициной"



ЭКО
25 июля 1978 г.
Louise Brown
30 лет - 4 млн

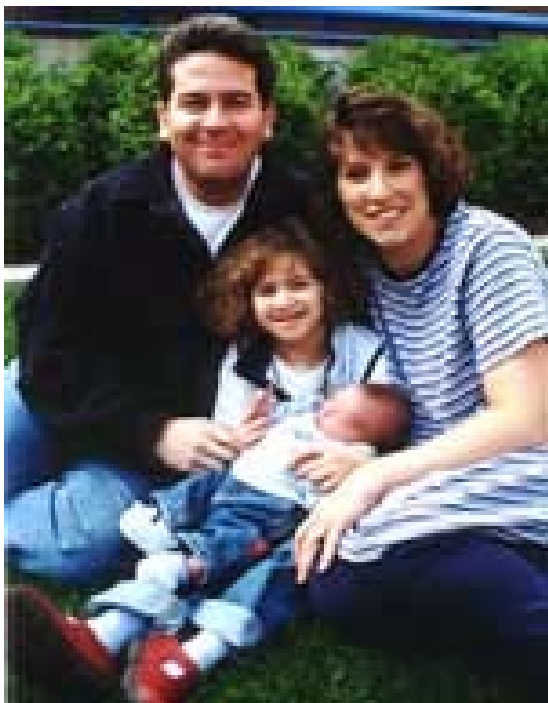


The Nobel Prize in
Physiology or Medicine
2010
Robert G. Edwards
University of Cambridge,
UK
"for the development of
in vitro fertilization"

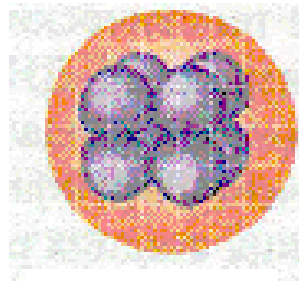


Не путать с "Пре-имплантационной диагностикой и естественным терапевтическим "клонированием"

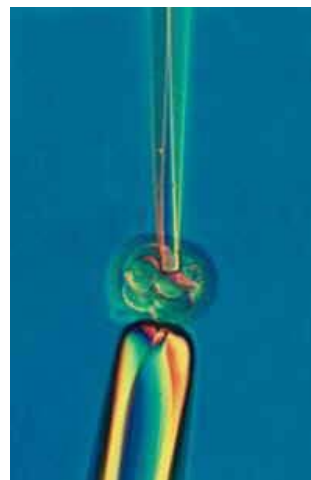
Клетки НЕ разбирают
на компоненты и детей НЕ убивают!



Молли и Адам Нэш
с родителями



эмбрион из
8 клеток



Естественное
выращивание
генетически
недефектного
брата (сестры)
для пересадки
органа
(костный мозг)
генетически
дефектному
родственнику

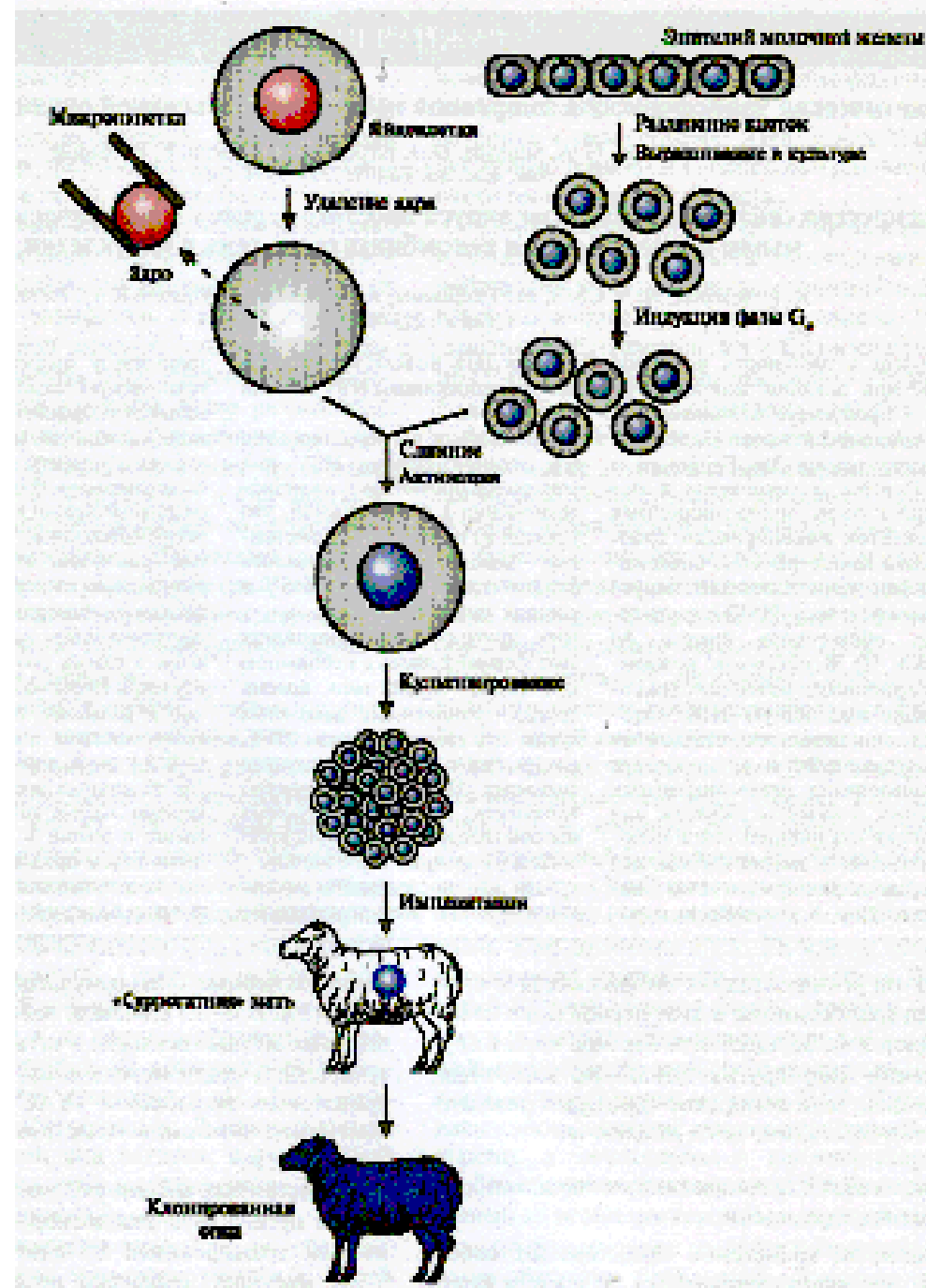
окт. 19, 2000
авг (рожд)

Пересадка ядер и клонирование

"Don't clone
humans!"

Science

2001, 291, 2552

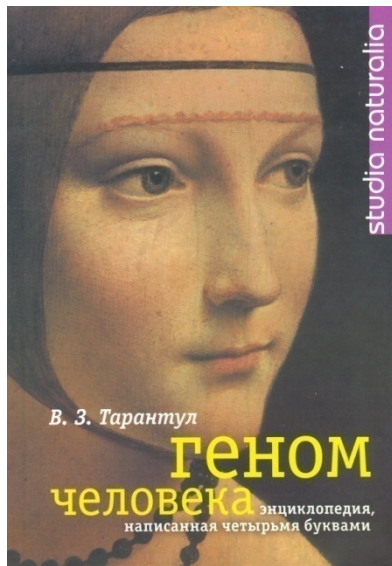


Цикл III

Генотип и фенотип

8. Регуляция, передача сигнала (рак)
9. Геном, плазмиды, вирусы (ВИЧ)
10. Генетическая инженерия (ГМО)

Дополнительная литература



ЛУЧШИЙ
ЗАРУБЕЖНЫЙ
УЧЕБНИК

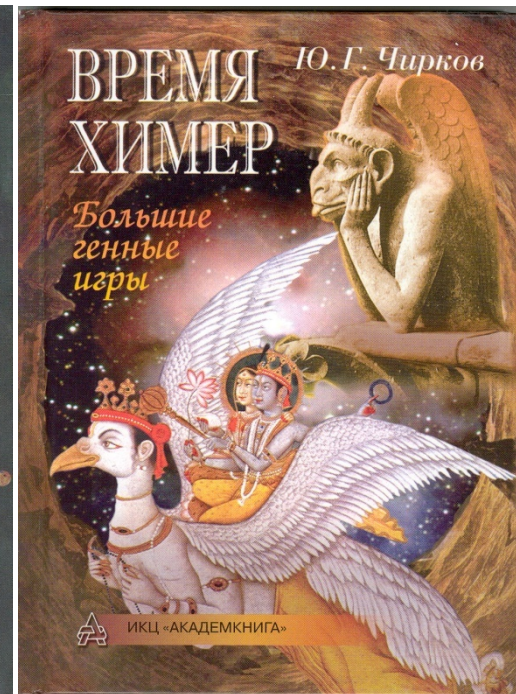
Б. Глик, Дж. Пастернак

Молекулярная биотехнология

Принципы и применение



Издательство «МИР»



ЭНЦИКЛОПЕДИЯ
СОВРЕМЕННОЕ
ЕСТЕСТВОЗНАНИЕ

В 2000 году Международная Соросовская Программа Образования в Области Точных Наук при поддержке Правительства Российской Федерации выпустила 10-томную энциклопедию "Современное Естествознание". Это издание создано 350 ведущими российскими учеными и преподавателями высшей школы и отражает развитие естествознания за последнюю четверть века. Энциклопедия рассчитана на преподавателей средних школ, учителей старших классов, студентов и аспирантов вузов, ей присвоен статус "научно-педагогический учебник для среднего звена". Министерство образования России выпустило энциклопедию в 10 томах бесплатно в крупнейших библиотеках России и во всех высших учебных заведениях страны. По многочисленным просьбам читателей в 2001 году предприятие планирует издать энциклопедию в 10 томах, которая будет распространена по подписке. Цена каждого тома составит около 200 руб., стоимость его отправки почтой – около 20 руб. Если Вы хотите заказать энциклопедию целиком или отдельные тома, пришлите нам заявку по адресу: 117234 Москва, а/я 590, энциклопедия "Современное Естествознание" или по электронной почте teacher@issep.rssi.ru. В зависимости от количества полученных заявок мы сообщим Вам уточненную сумму и расчетный счет.

Телефоны для справок: (095) 939-4195, 939-4503
Адрес в Интернете: www.issep.rssi.ru



Конструирование рекомбинантных ДНК

Рекомбинантные ДНК

Суть конструирования рекомбинантных ДНК заключается во встраивании фрагментов ДНК, среди которых находится интересующий нас участок ДНК, в так называемые векторные молекулы ДНК (или просто векторы) - плазмидные или вирусные ДНК, которые могут быть перенесены в клетки про- или эукариот и там автономно реплицироваться. На следующем этапе проводится отбор тех клеток, которые несут в себе рекомбинантные ДНК (с помощью маркерных признаков, которыми обладает сам вектор), и затем индивидуальных клонов с интересующим нас сегментом ДНК (используя признаки или пробы, специфичные для данного гена или участка ДНК).

Генная инженерия - 4/5 основных этапа

In vitro (в пробирке)

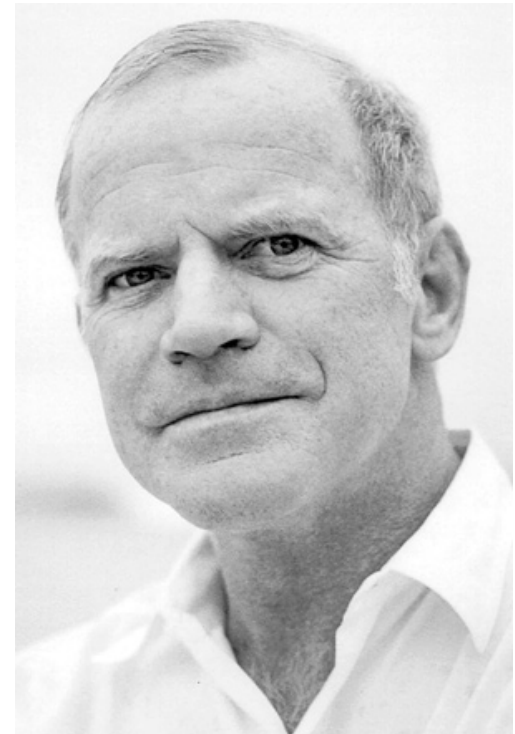
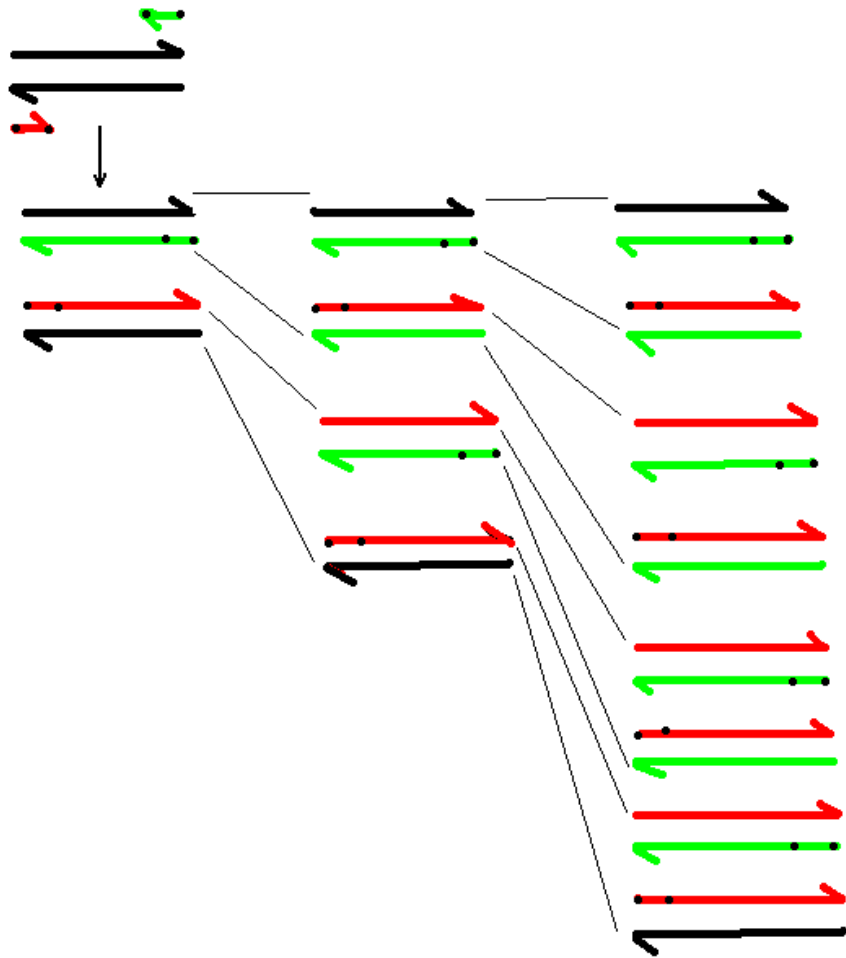
1. Получение генов (ПЦР)
- 1'. Выбор вектора
2. Получение рекомбинантных ДНК

In vivo (в клетке)

3. Введение рек. ДНК в клетку
(трансформация)
4. Отбор целевых клеток (скрининг)
Библиотеки генов

Этап 1. Получение ДНК

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)



Кэрри Маллис
Нобелевская премия
по химии 1993 г.

Этап 2. Векторная ДНК

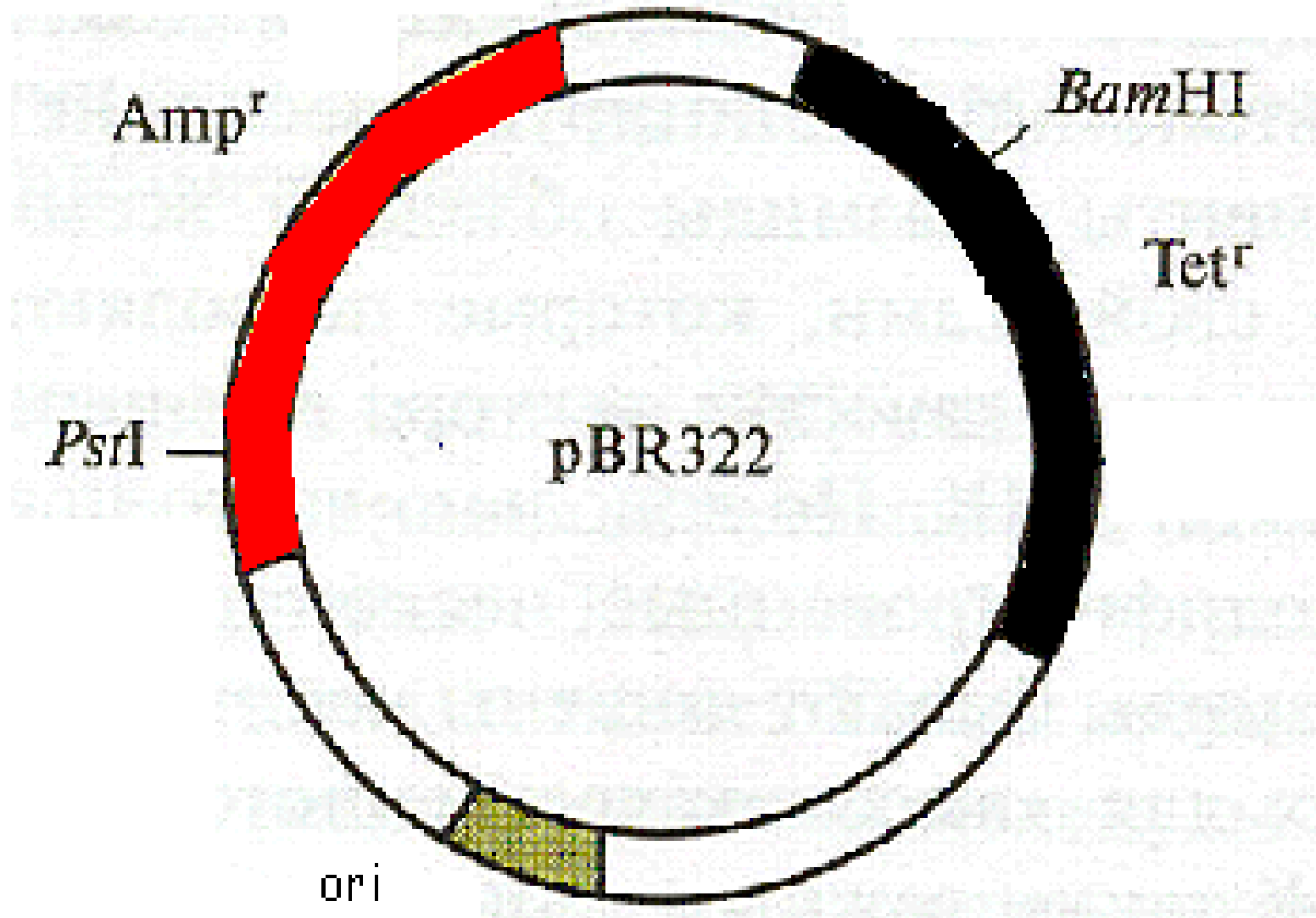
Векторы

Векторные молекулы ДНК должны обладать следующими свойствами:

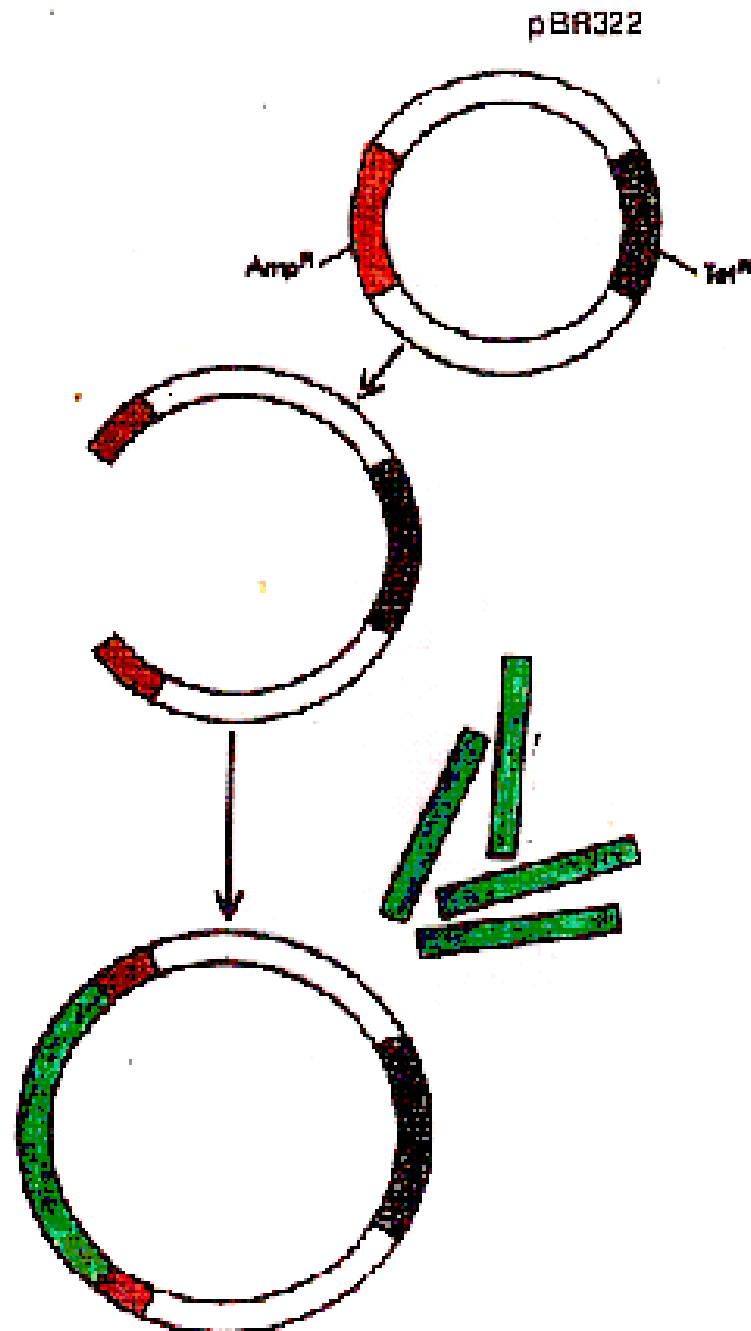
- 1) способностью автономно реплицироваться в клетке-реципиенте, т.е. быть самостоятельным репликоном;
- 2) содержать один или несколько маркерных генов, благодаря экспрессии которых у клетки-реципиента появляются новые признаки, позволяющие отличить трансформированные клетки от исходных;
- 3) содержать по одному или, самое большее, по два участка (сайта) для различных рестриктаз в разных районах (в том числе в составе маркерных генов), но не в области, ответственной за их репликацию.

В качестве исходных молекул для конструирования векторов используются либо плазмиды, либо ДНК бактериофагов и вирусов.

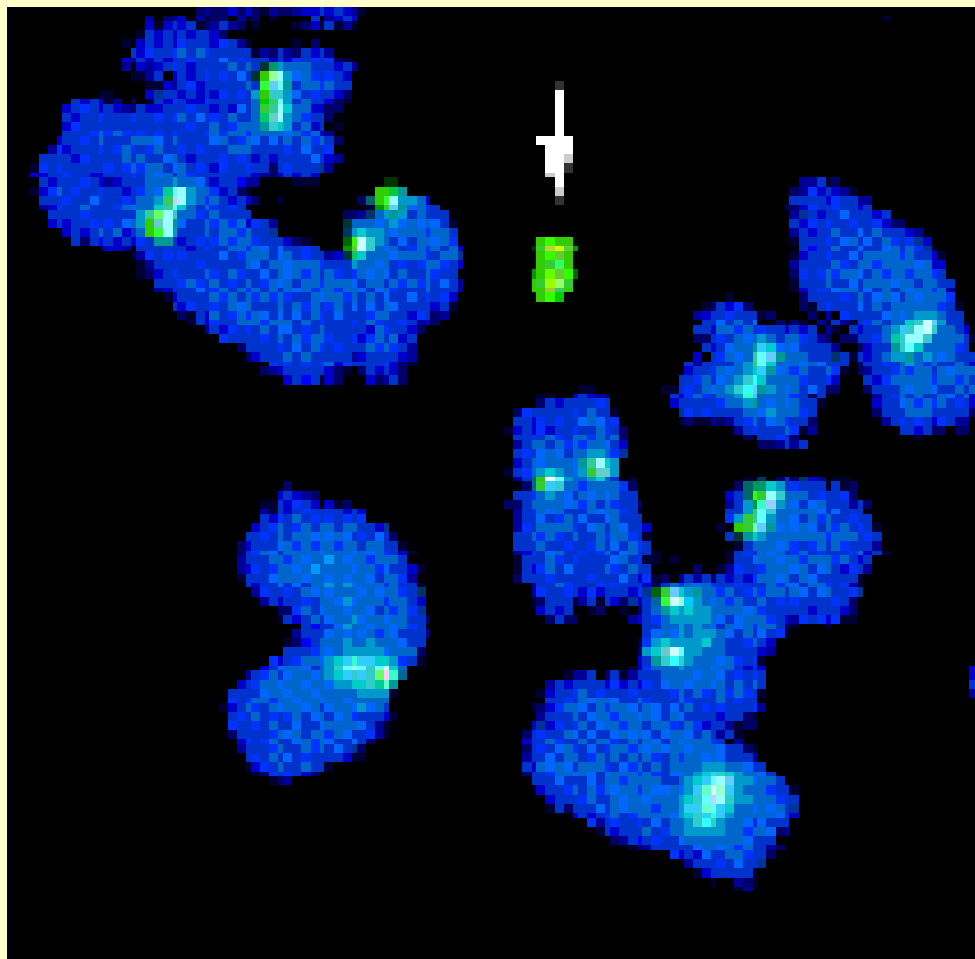
Вектор для прокариот



Получение рекомбинантных ДНК



Искусственная мини-хромосома



Стрелка показывает на искусственную мини-хромосому, которая функционирует как натуральная (голубая)

Может служить мега-вектором для клонирования ДНК

Этап 3. Трансформация - введение ДНК в клетку

Физические:

Микроинъекция

Электропорация

Эндоцитоз

Биобаллистика

(W, Au - 0,1 мкм)

Слияние мембран:

Липосомы

Рецепторный

Химические:

- Ca^{2+}

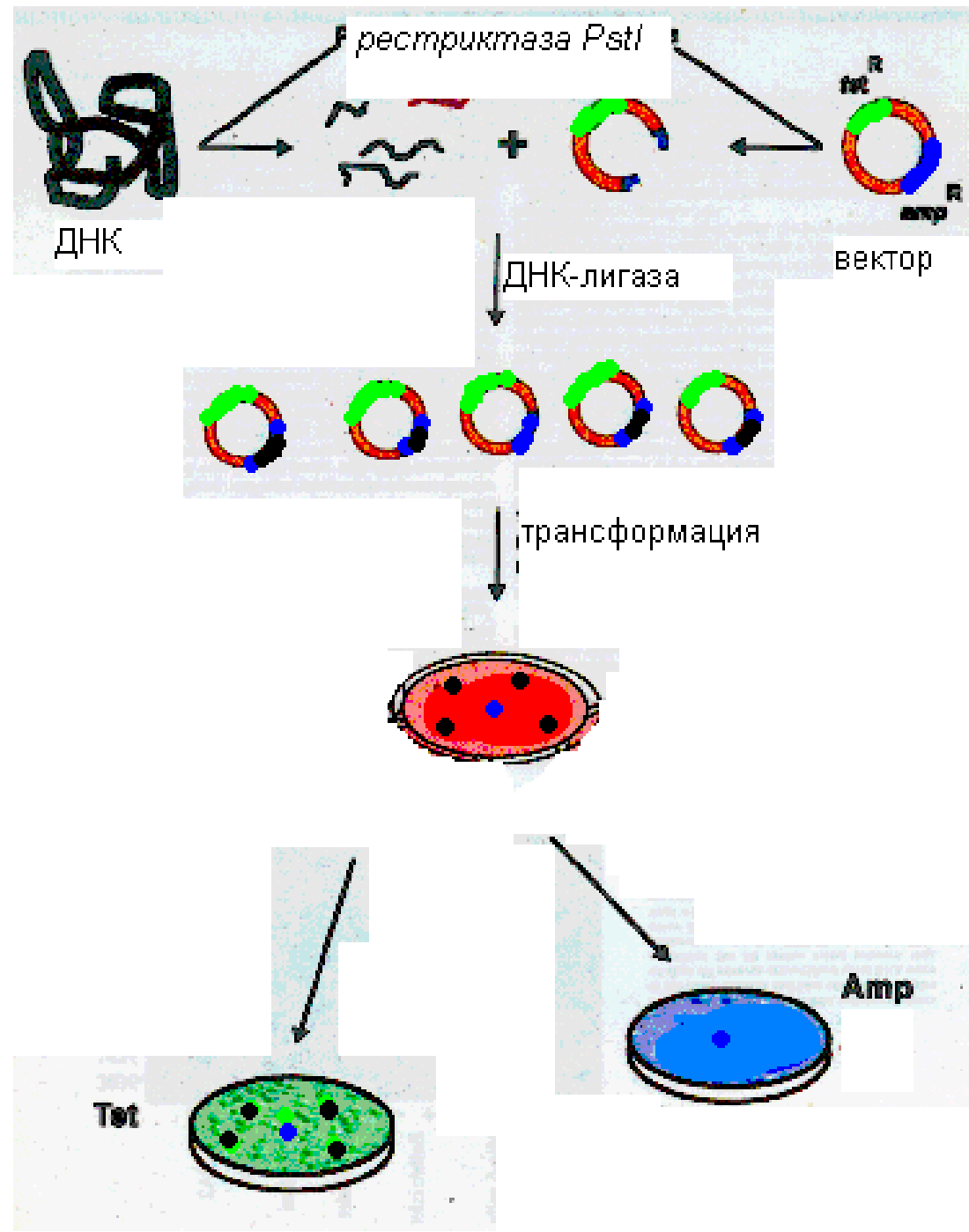
Рекомбинантные вирусы (?)

Аденовирус

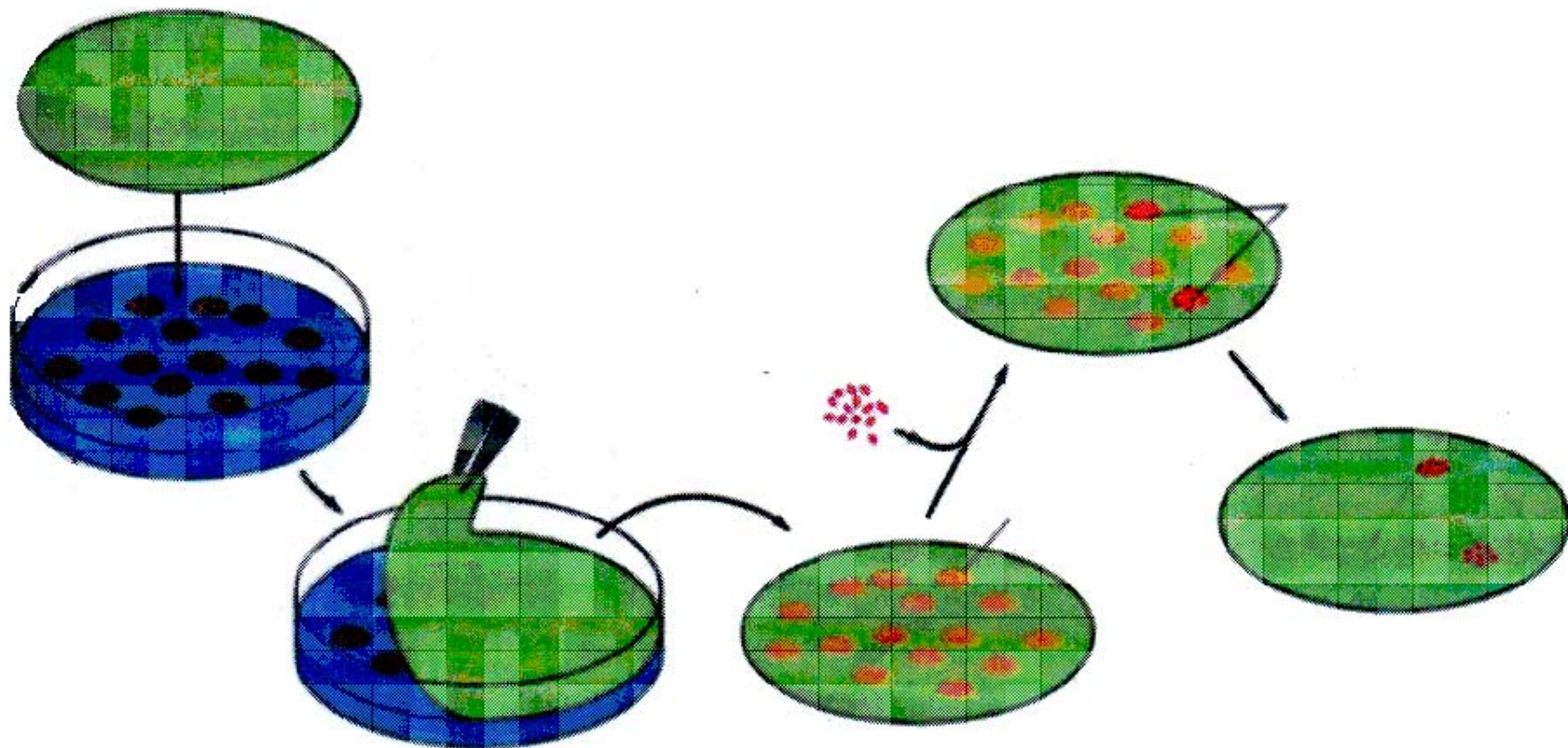
Герпеса

ВИЧ

Этап 4 «Клонирование ДНК»



ИДЕНТИФИКАЦИЯ КЛОНОВ с рекомбинантной ДНК при помощи зонда



Гены флуоресцентных белков медузы работают в бактериях



Трансгенные организмы (ГМО, ГМТ)

Цель введения нового гена в клетку:

- Замена дефектного гена для восстановления функции
- Новый ген для изменения фенотипа
(новые свойства)
- Новый ген для продукции новых веществ
(клеточные фабрики или фабрики - организмы)

Делеция гена в клетке

Генетический нокаут (ДНК)

Генетический нокдаун (мРНК)

Рекомбинантные белки, разрешенные для лечения человека

БЕЛОК

Вакцины

Моноклональные антитела

Антигемофильный фактор

Гормон роста

ДНКаза I

Инсулин

Интерлейкин

Интерфероны

Тканевый активатор

плазминогена

(тромболитик)

Эритропоэтин

ЗАБОЛЕВАНИЕ

Гемофилия

Дефицит у детей

Муковисцидоз

Сахарный диабет

Рак почки

Множественный эрфект

Острый инфаркт миокарда

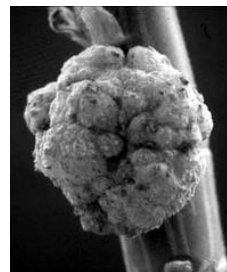
Острая обширная эмболия
легочной артерии

Анемия, заболевания почек

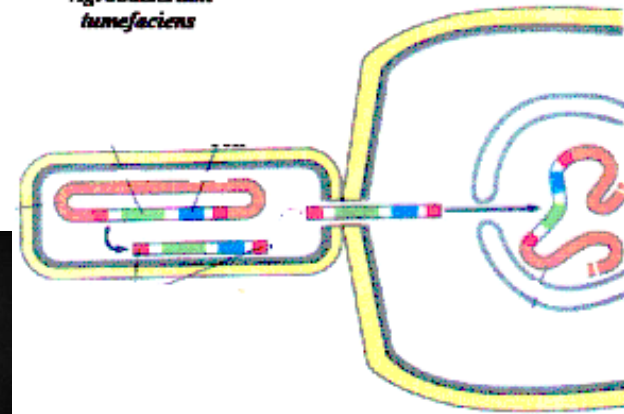


Получение трансгенных растений

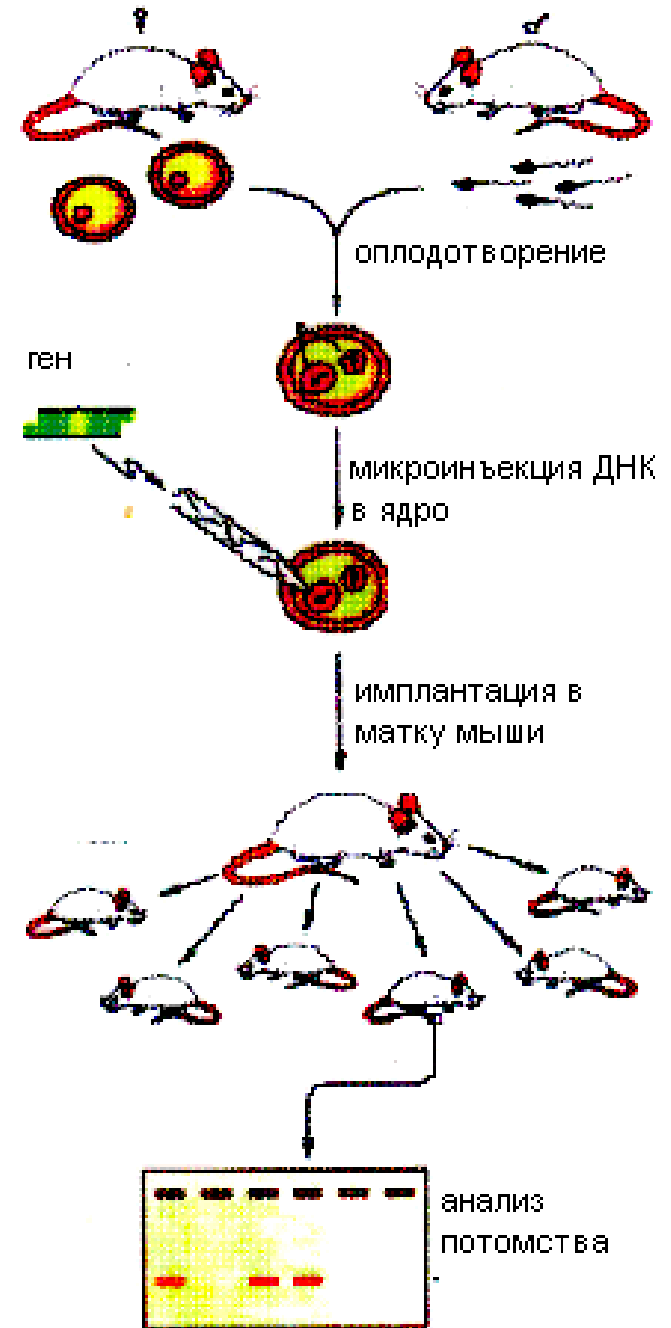
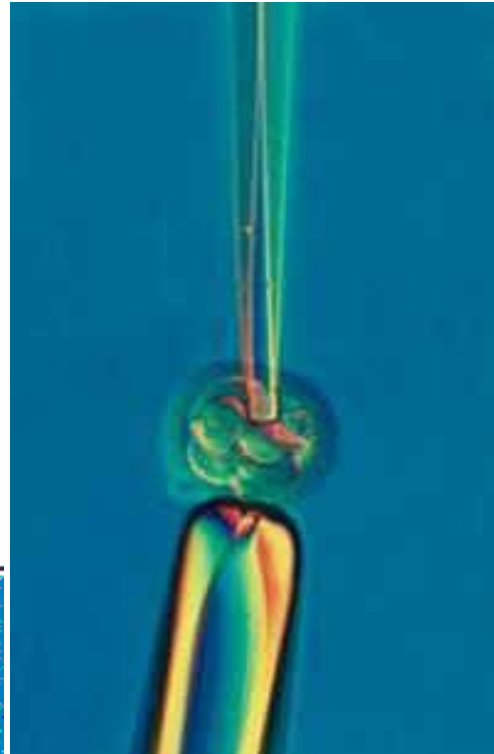
устойчивость к неблагоприятным факторам и полезные потребительские свойства



Agrobacterium tumefaciens



Получение трансгенных животных



Трансгенные млекопитающие, не относящиеся к человеку

Авторы: P. Leder, T. A. Stewart

Заявитель: President and Fellows of Harvard College, Cambridge, Mass.

U. S. Patent 4 736 866

Дата выдачи патента: 12 апреля 1988 г.

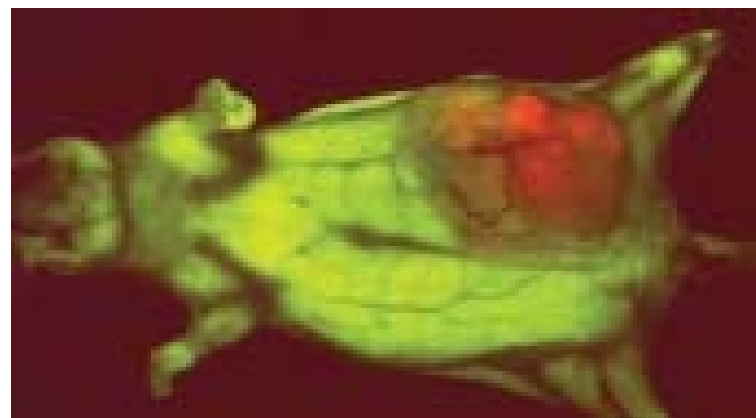
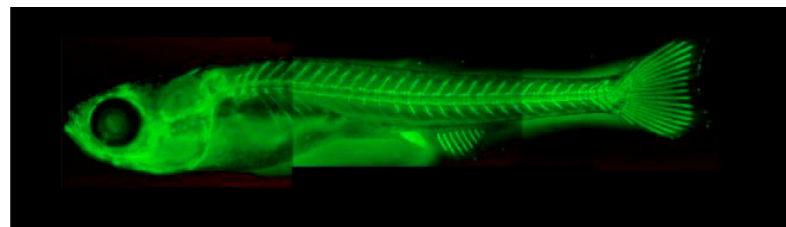
В 1980 г. Верховный суд США вынес определение, что изобретение, которое включает «что-либо, созданное под солнцем руками человека», является охраноспособным. В 1988 г. было запатентовано первое животное, полученное с помощью методов генной инженерии, — трансгенная мышь. В ее ДНК был встроены ген, ответственный за образование злокачественных опухолей (онкоген), который находился под контролем промотора на основе длинного концевой повтора вируса опухоли молочных желез мыши (LTR MMTV). Онкоген представлял собой ген *тус* вируса миелоцитоматоза цыпленка ОК10. Изобретение заключалось в клонировании химерного гена LTR MMTV—*тус* в плазмиде, введении линейаризованной плазмидной ДНК в мужской пронуклеус оплодотворенных одноклеточных мышинных яйцеклеток, идентификации потомков, экспрессирующих ген *тус*, и получении линий трансгенных мышей. У животных одних линий ген *тус* экспрессировался в различных тканях, у животных других экспрессия ограничивалась одной или несколькими тканями. По утверждению Ледера

и Стюарта, введение конструкции LTR MMTV—*тус* в клетки мышей «увеличивает вероятность развития неопластических образований у животных». Таких трансгенных животных можно использовать для тестирования различных соединений на их способность индуцировать или предотвращать возникновение опухолей. Кроме того, они могут служить источником клеток различных тканей (например, сердечной мышцы), которые обычно бывает трудно выращивать в культуре. Начиная с 1980 г. фирма Du Pont продает одну из линий таких трансгенных мышей под торговым названием «Онко-Мыши». Другие предпочитают использовать название «Гарвардская онкомышь» или просто «онкомышь».

Выдача патента США № 4 736 866 вызвала многочисленные споры, причем большинство опасений носило этический характер. Противники патентования трансгенных животных считали, что подобные патенты посягают на незыблемые жизненные принципы, угрожают целостности видов и поощряют не-

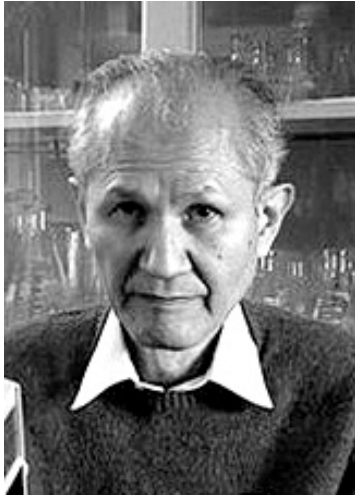
гуманное обращение с животными. Несмотря на все это, в США начиная с 1988 г. выдано множество патентов на различные трансгенные организмы. Среди них — патенты на трансгенные животные, которые используются в качестве моделей для изучения развития доброкачественной опухоли простаты, воспалительных заболеваний, нарушений метаболизма в жировой ткани, тромбоцитопении. До настоящего времени ни у судов, ни у правительства США не возникало сомнений в правомерности патентов такого рода. В США патентование трансгенных животных больше не является предметом дискуссий. Однако в Европе и других странах оно остается серьезной проблемой, которая до конца не решена, хотя Гарвардская онкомышь запатентована Европейским Патентным ведомством. Вынося положительное решение, эксперты сочли, что польза от такой трансгенной системы перевешивает возможные негативные последствия. Однако часть общественности и некоторые политические партии продолжают выступать против указанного решения.

Гены флуоресцентных белков медузы работают в животных



Химера из белка клетки (раковый белок)
и
флуоресцентного белка

Нобелевская премия по химии 2008



Osamu Shimomura

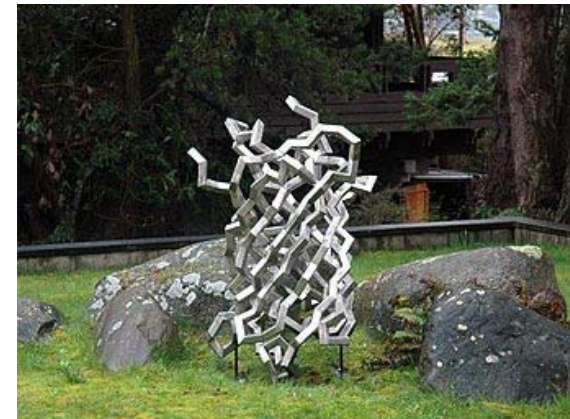


Martin Chalfie



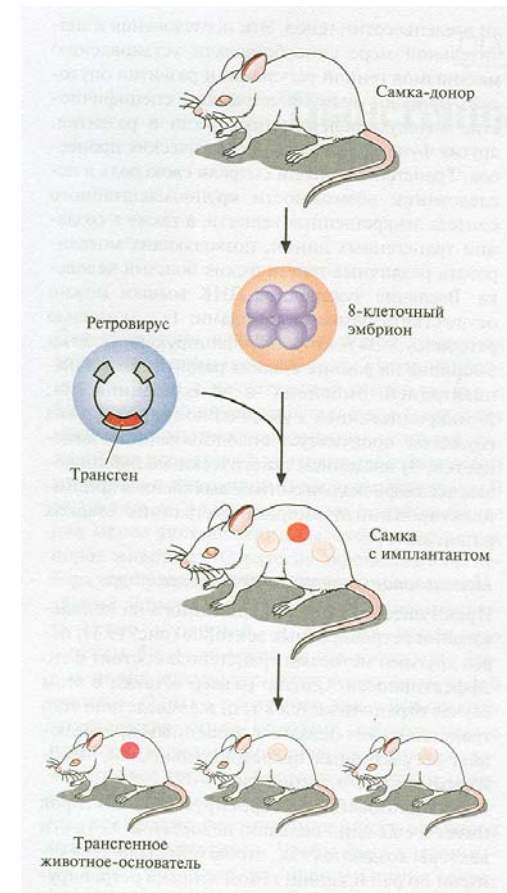
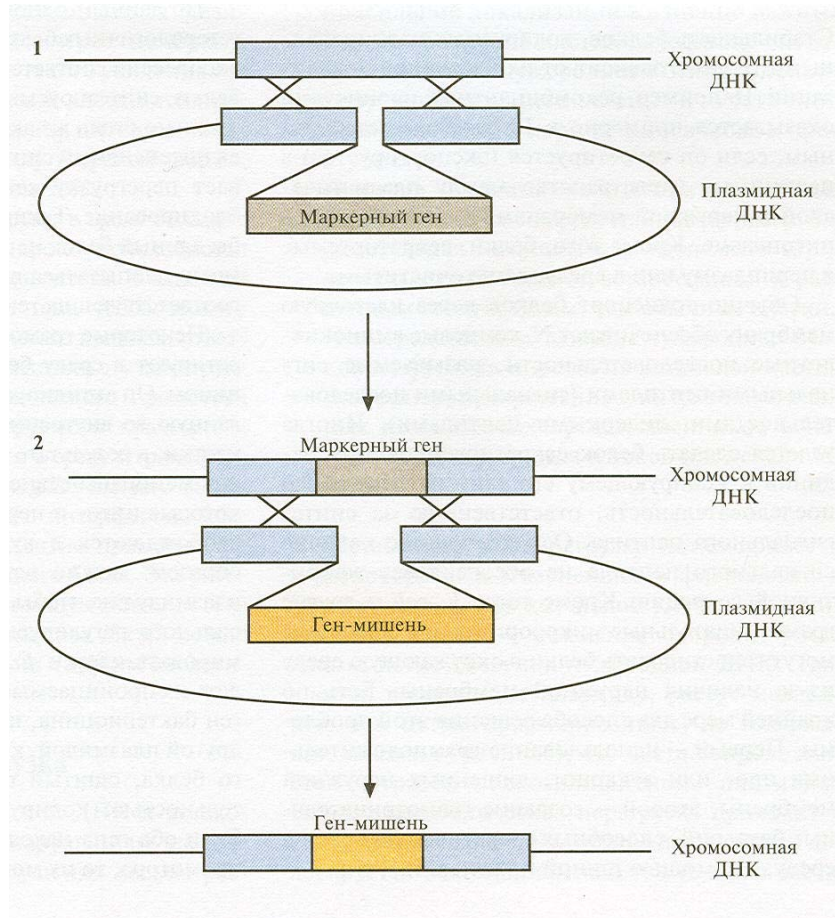
Roger Y. Tsien

for the discovery and development of the green fluorescent protein, GFP



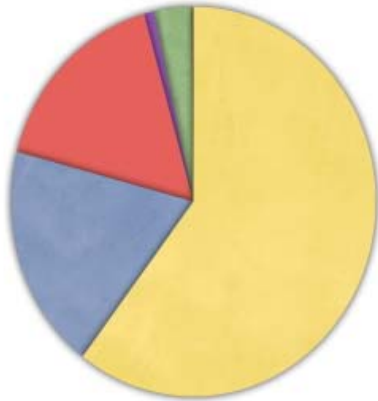
Генотерапия

замена дефектного гена на нормальный



Только: соматические клетки конкретного пациента

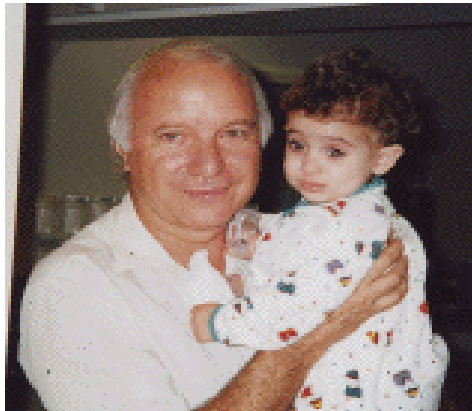
Phases of Gene Therapy Clinical Trials



- Phase I 60.4% (n=928)
- Phase I/II 18.7% (n=288)
- Phase II 16.5% (n=254)
- Phase II/III 0.8% (n=13)
- Phase III 3.4% (n=52)
- Single subject 0.1% (n=2)

The Journal of Gene Medicine, © 2009 John Wiley and Sons Ltd

www.wiley.co.uk/genmed/clinical



14.09.1990

Бетезда, НИЗ, США

дефект аденозиндезаминазы
(иммунодефицит)

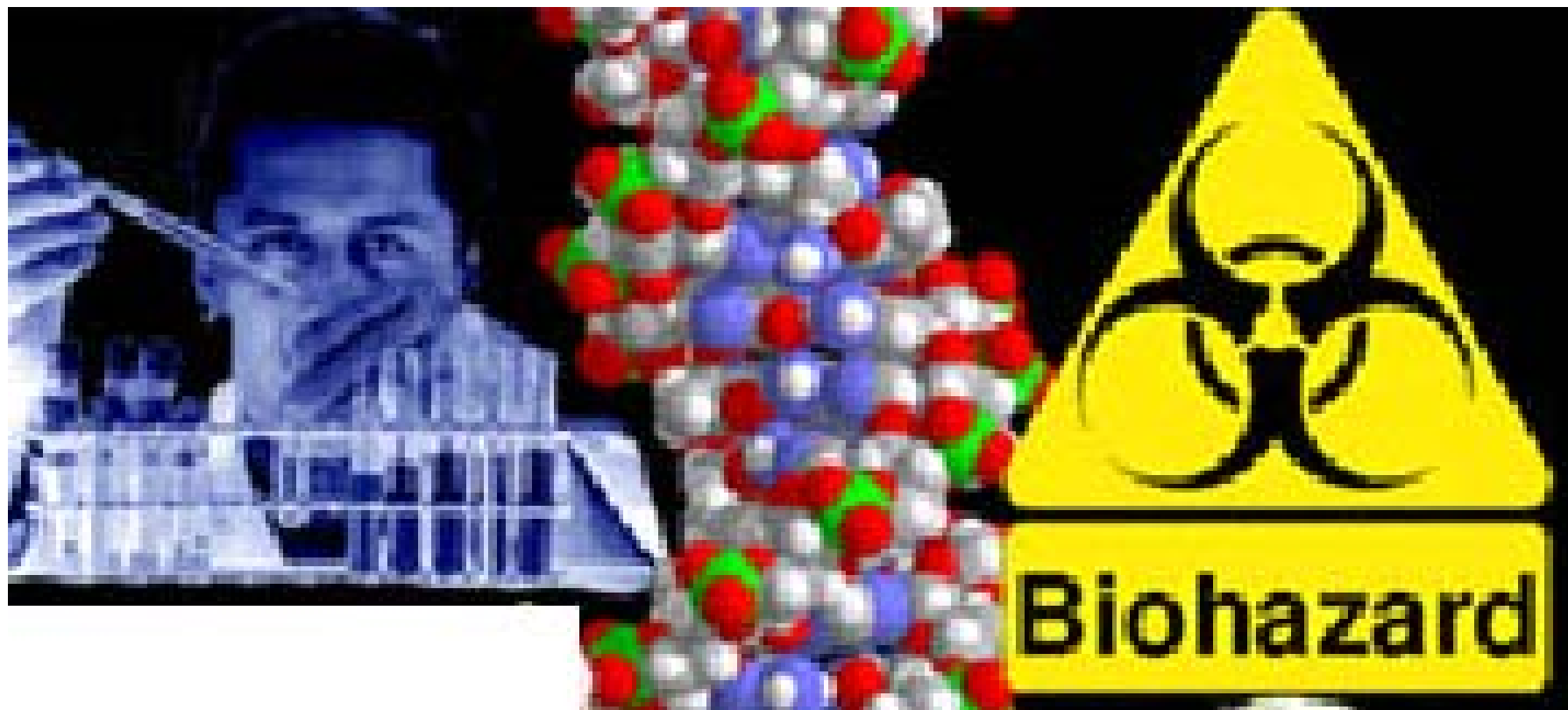
Генотерапия



The Journal of Gene Medicine, © 2009 John Wiley and Sons Ltd

www.wiley.co.uk/genmed/clinical

Генетический контроль и биологическая безопасность



Межведомственная комиссия по проблемам генно-инженерной деятельности МВКГИД (www.iasgea.ru)

Таблица 1.1. История развития молекулярной биотехнологии

Дата	Событие
1917	Карл Эрки ввел термин «биотехнология»
1943	Произведен пенициллин в промышленном масштабе
1944	Эвери, МакЛеод и МакКарти показали, что генетический материал представляет собой ДНК
1953	Уотсон и Крик определили структуру молекулы ДНК
1961	Учрежден журнал “Biotchnology and Bioengineering”
1961–1966	Расшифрован генетический код
1970	Выделена первая рестрицирующая эндонуклеаза
1972	Корана и др. синтезировали полноразмерный ген тРНК
1973	Бойер и Коэн положили начало технологии рекомбинантных ДНК
1975	Колер и Мильштейн описали получение моноклональных антител
1976	Изданы первые руководства, регламентирующие работы с рекомбинантными ДНК
1976	Разработаны методы определения нуклеотидной последовательности ДНК
1978	Фирма Genentech выпустила человеческий инсулин, полученный с помощью <i>E. coli</i>
1980	Верховный суд США, слушая дело <i>Даймонд против Чакрабарти</i> , вынес вердикт, что микроорганизмы, полученные генноинженерными методами, могут быть запатентованы
1981	Поступили в продажу первые автоматические синтезаторы ДНК
1981	Разрешен к применению в США первый диагностический набор моноклональных антител
1982	Разрешена к применению в Европе первая вакцина для животных, полученная по технологии рекомбинантных ДНК
1983	Для трансформации растений применены гибридные Ti-плазмиды
1988	Выдан патент США на линию мышей с повышенной частотой возникновения опухолей, полученную генноинженерными методами
1988	Создан метод полимеразной цепной реакции (ПЦР)
1990	В США утвержден план испытаний генной терапии с использованием соматических клеток человека
1990	Официально начаты работы над проектом «Геном человека»
1994–1995	Опубликованы подробные генетические и физические карты хромосом человека
1996	Ежегодный объем продаж первого рекомбинантного белка (эритропоэтина) превысил 1 млрд. долларов
1996	Определена нуклеотидная последовательность всех хромосом эукариотического микроорганизма (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
1997	Клонировано млекопитающее из дифференцированной соматической клетки

История важнейших открытий

1901- Ландштейнер открыл группы крови, начало переливания крови

1906 - первая пересадка трупной роговицы

1910 - Томас Морган открыл хромосомы - органеллы наследственности

1926 - Меллер открыл мутагенные эффекты радиации и химических веществ

1912- Бантинг и Бест открыли инсулин и причину диабета

1936 - первые ферменты получены в кристаллическом состоянии

1944 - Освальд Эвери и Маклин МакКарти доказали, что изолированная ДНК встраивается в геном бактерий, изменяя их фенотип

1904 - Нобелевская премия в области физиологии и медицины присуждена Ивану Петровичу Павлову за открытие условных рефлексов

1951 - первая операция коронарного шунтирования (коронарный байпасс)

1953 - Джеймс Уотсон и Френсис Крик открыли двойную спираль ДНК

1955 - первая пересадка почки

1956 - первая коронарная ангиопластика

1961 - Маршалл Ниренберг расшифровал генетический код

1961 - первые пересадки гематогенных стволовых клеток для спасения обреченных пациентов

1964 - Чарлз Яновский подтвердил линейное соответствие генов и белков бактерий

1967 - первая пересадка сердца и печени

1969 - группа исследователей из Гарвардской медицинской школы изолировала первый ген человека

1974 - Стенли Коэн и Герберт Бойер пересадили ген лягушки в

бактериальную клетку. Начало генной инженерии

1976 - создана первая биотехнологическая компания Genentech; начались пересадки генов человека в клетки микроорганизмов для промышленной выработки инсулина, интерферона и других полезных белков

1980 - Мартин Кляйн создал первую трансгенную мышь путем пересадки гена человека в оплодотворенную яйцеклетку мыши

1982 - генно-инженерный инсулин, наработанный бактериями, разрешен для использования в медицине

1983 - открыта полимеразная цепная реакция (техника многократного клонирования коротких цепей ДНК) - стало возможным синхронно изучать работу многих генов

1985 - техника "генетической дактилоскопии" ДНК стала использоваться в мировой криминалистике

1985 - первые пересадки фетальной нервной ткани для лечения болезни Паркинсона

1988 - выдан первый патент на генетически модифицированное животное

1990 - начало работ по международному проекту Геном Человека

1997 - клонировано первое млекопитающее - овца по кличке Долли; затем последовали удачные эксперименты по клонированию мышей и других млекопитающих

1997-1998 - изолирование эмбриональных стволовых клеток человека в виде бессмертных линий

1998 - создание методов одновременной регистрации активности 1000-2000 генов в геноме человека и млекопитающих

1999-2000 - полная расшифровка генома 10 бактерий, дрожжей.