



## Генетически модифицированные микроорганизмы: получение, использование, биобезопасность.

**Преподаватель:** старший преподаватель  
кафедры молекулярной биологии и генетики,  
PhD, Сmekенов И.Т.

**Дисциплина:** Рекомбинация ДНК

*(Лекция 8)*

## ЦЕЛЬ ЛЕКЦИИ

Изучить методы создания генетически модифицированных микроорганизмов. Рассмотреть направления их использования в науке, промышленности и медицине. Ознакомиться с принципами биобезопасности при работе с ГММ. Рассмотреть особенности создания и применения ГММ на примере дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

### Задачи

- ✓ Понять, как ГММ используются для производства белков, ферментов и метаболитов.
- ✓ объяснить, почему *S. cerevisiae* используется как модельный организм и платформа экспрессии
- ✓ описать механизмы экспрессии рекомбинантных белков в дрожжах
- ✓ отличать дрожжевые экспрессионные векторы от бактериальных
- ✓ объяснить принцип дрожжевого двугибридного анализа для изучения белок-белковых взаимодействий
- ✓ классифицировать мобильные элементы генома: транспозоны, ретротранспозоны, LTR-элементы
- ✓ привести примеры мобильных элементов у дрожжей (Ty-элементы) и у человека (Alu, LINE/SINE)
- ✓ сформулировать преимущества и ограничения использования дрожжей для получения гетерологичных белков

### Ключевые термины

*S. cerevisiae*, yeast expression system, shuttle vector, promoter GAL1,  $\alpha$ -factor secretion signal, two-hybrid system, UAS, Ty elements, retrotransposon, LTR, SINE, LINE, Alu repeat, episomal plasmid (YEp), integrative plasmid (YIp), centromeric plasmid (YCp).

**1. Генетически модифицированные микроорганизмы (ГММ)** — это микроорганизмы, в геном которых **введены, удалены или изменены гены** с целью получения новых свойств или продукции биотехнологического значения.

## **2. Методы получения ГММ:**

- Использование **векторов** (плазмид, вирусных конструкций).
- **Трансформация** клеток микроорганизмов (химическая, электропорация).
- Методы **целевого редактирования генома** (CRISPR/Cas9, ZFN, TALENs).
- Физические методы (биобаллистика).

## **3. Применение ГММ:**

- **Промышленная биотехнология:** производство ферментов, биоэтанола, витаминов, аминокислот.
- **Медицина:** синтез рекомбинантных белков, вакцин, терапевтических нанободи.
- **Научные исследования:** изучение функций генов, моделирование метаболических путей.

## **4. Особенности работы с *S. cerevisiae*:**

- Простейший и безопасный эукариотический организм, широко применяемый в биотехнологии.
- Используется для производства рекомбинантных белков человека, ферментов, биоэтанола, а также в качестве модели для изучения клеточной биологии.
- Легко поддаётся трансформации и генетическим модификациям, благодаря наличию **плазмид и стабильных интеграционных систем**.

## **5. Биобезопасность:**

- Все работы с ГММ регламентируются **уровнями биологической безопасности (BSL1–4)**.
- Для *S. cerevisiae* обычно используется **BSL-1**, так как она непатогенна для человека и животных.
- Основные меры: работа в ламинарных шкафах, стерильная техника, контроль отходов.



## ОСНОВНЫЕ ВОПРОСЫ

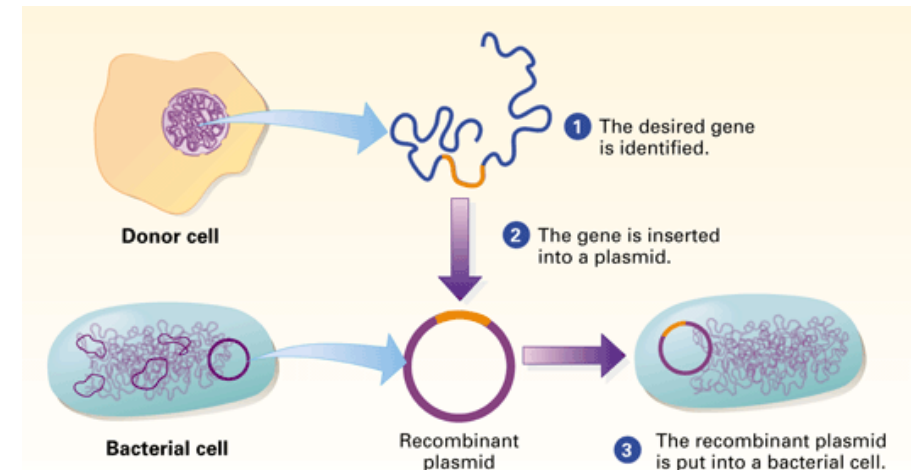
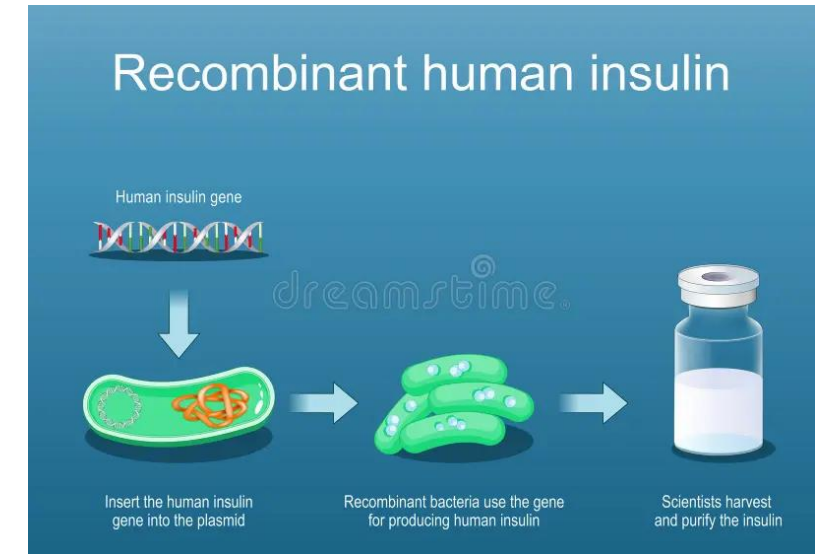
- 1) Что такое генетически модифицированный микроорганизм и зачем его создают?
- 2) Какие методы переноса генов в микроорганизмы существуют?
- 3) Чем методы химической трансформации отличаются от электропорации и биобаллистики?
- 4) Как редактирование генома (CRISPR/Cas9, ZFN, TALENs) применяется для создания ГММ?
- 5) Какие направления промышленного и медицинского применения ГММ наиболее распространены?
- 6) Почему *S. cerevisiae* считается удобной моделью для генетических модификаций? Какие продукты получают с помощью трансгенных дрожжей?
- 7) Что такое уровни биологической безопасности и как они применяются при работе с ГММ? Какие меры биобезопасности необходимы при работе с *S. cerevisiae*?
- 8) В чём основные преимущества использования дрожжей по сравнению с бактериальными ГММ?

# Получение и Использование ГМ-Микроорганизмов (ГММ)

Микроорганизмы (бактерии, дрожжи, грибы), генетический материал которых был изменен *in vitro* с помощью методов генной инженерии для получения желаемых свойств.

## Процесс конструирования:

- ✓ **Цель:** Встраивание целевого гена (например, гена человеческого белка) в плазмиду.
- ✓ **Инструменты:** Рестриктазы, ДНК-лигаза, векторы (плазмиды).
- ✓ **Введение в клетку:** Трансформация (для бактерий) или трансфекция/электропорация (для дрожжей) рекомбинантной плазмиды в клетку-хозяина.
- ✓ **Селекция:** Отбор трансформированных клеток с помощью маркеров устойчивости к антибиотикам.



# Использование ГММ (Применение)

## Сфера

Медицина и Фармацевтика

Сельское хозяйство

Пищевая промышленность

Экология (Биоремедиация)

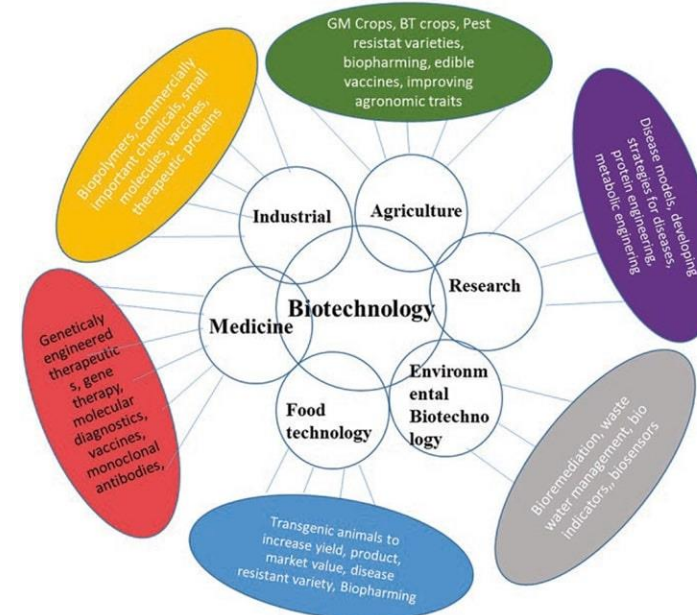
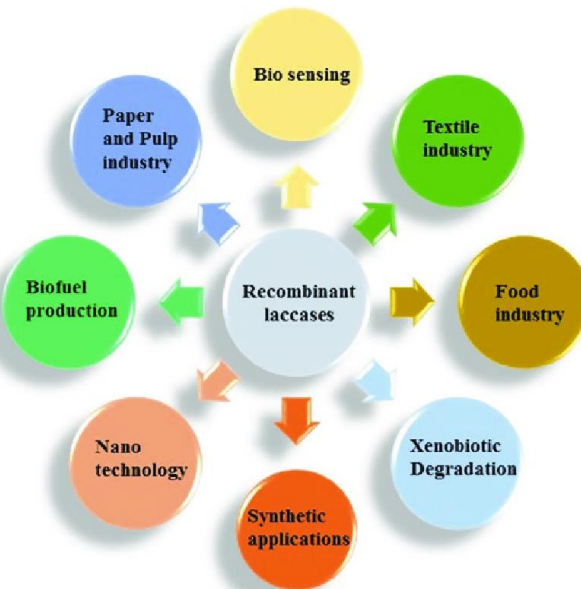
## Примеры Использования

Производство рекомбинантных белков: Инсулин человека, гормон роста, интерфероны, факторы свертывания крови.

Биопестициды: Бактерии, продуцирующие белки, токсичные для насекомых. Улучшение почв: Микроорганизмы, фиксирующие азот.

Производство ферментов: Ферменты для сыроварения, амилазы для выпечки. Витамины и аминокислоты.

Разрушение загрязнителей: Микробы, способные расщеплять нефть, пестициды и другие токсичные вещества.

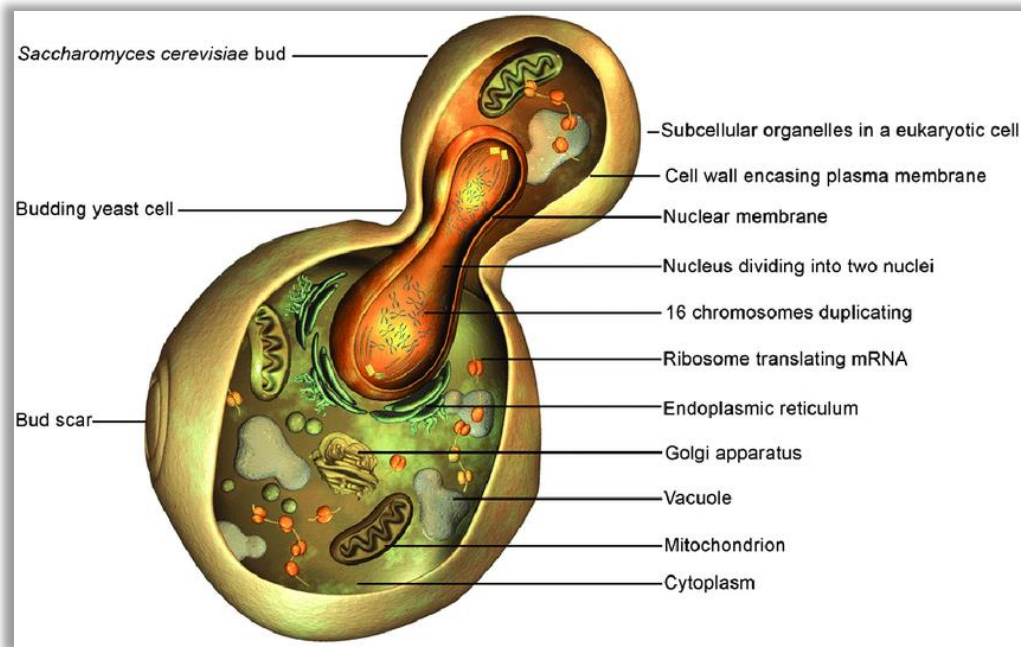


# Пекарские дрожжи (лат. *Saccharomyces cerevisiae*)

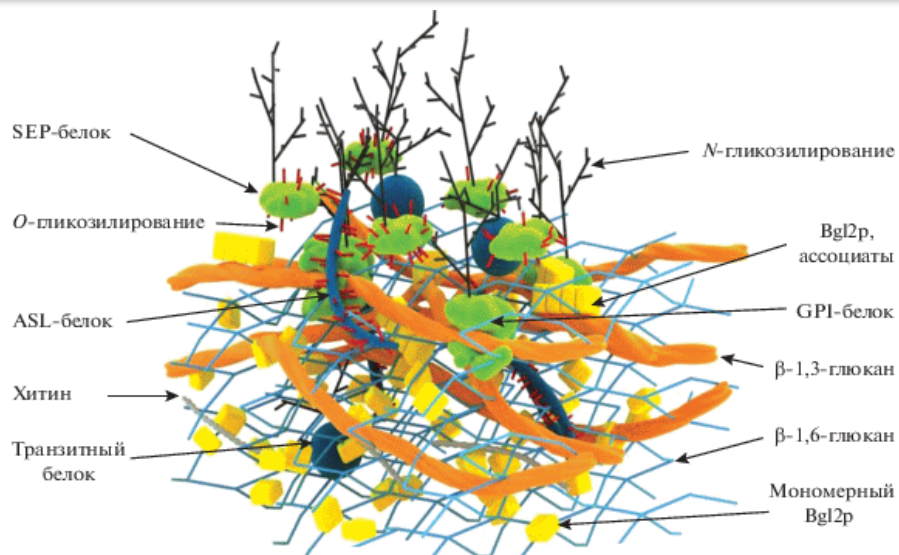
- Вид одноклеточных микроскопических (5—10 мкм в диаметре) грибов (дрожжей) из класса сахаромикетов, широко используемый в производстве алкогольной и хлебопекарной продукции, а также в научных исследованиях.
- В 1996 году пекарские дрожжи стали первыми эукариотами, чей геном был полностью секвенирован.
- Кроме этого, дрожжи *S. cerevisiae* входят в список организмов «Безопасные в обращении» (GRAS, generally recognized as safe - В целом признанные безопасным).
- Любая популяция дрожжей на 50 % состоит из клеток, образовавшихся во время последнего акта деления. На поверхности таких клеток имеется только один родовой шрам. Из остальных 50 % клеток у 25 % обнаруживается один дочерний шрам, у 12,5 % - два и у других 12,5 % - больше двух дочерних шрамов. Одной из причин снижения физиологического состояния дрожжей является увеличение доли старых клеток в популяции.



# Основные характеристики и особенности:



1. **Геном:** Полностью секвенирован, содержит около **12 миллионов пар нуклеотидов** и примерно **6 000 генов**.
2. **Рост:** Быстрый и простой в культивировании в лабораторных условиях (**поколение ~90 минут**).
3. **Генетические инструменты:** Эффективная **гомологичная рекомбинация** позволяет точно удалять, вставлять или модифицировать гены.
4. **Безопасность:** Считается безопасным организмом (**GRAS — Generally Recognized As Safe**) для лабораторного и промышленного использования.
5. **Эукариотическая система:** Содержит органеллы и выполняет **посттрансляционные модификации**, подобные высшим эукариотам.
6. **Лёгкость генетической модификации:** Гены могут быть легко удалены, сверхэкспрессированы или заменены с помощью гомологичной рекомбинации.
7. **Плазмидные системы:** **Шаттл-векторы** позволяют клонирование и экспрессию генов как в дрожжах, так и в бактериях.
8. **Промышленное и биотехнологическое значение:** Широко используется для производства рекомбинантных белков, ферментов, вакцин и биоэтанола.



# Применение в генной инженерии:

## ✓ Экспрессия белков:

Дрожжи используются как эукариотическая система экспрессии для получения рекомбинантных белков с правильным фолдингом и посттрансляционными модификациями.

Экспрессия рекомбинантных белков, таких как инсулин, интерфероны и вирусные антигены.

## ✓ Метаболическая инженерия:

Модифицированные штаммы дрожжей конструируют для синтеза ценных метаболитов, таких как этанол, фармацевтические соединения и биологически активные химические вещества.

## ✓ Функциональная геномика:

Исследования с нокаутом и сверхэкспрессией генов помогают определить функции генов и метаболические пути.

Изучение регуляции генов, клеточного цикла и метаболизма в эукариотических клетках.

## ✓ Разработка вакцин:

*S. cerevisiae* используется для экспрессии вирусных антигенов при создании вакцин (например, поверхностный антиген вируса гепатита В).

Разработка дрожжевых систем дисплея для эволюции антител или ферментов.

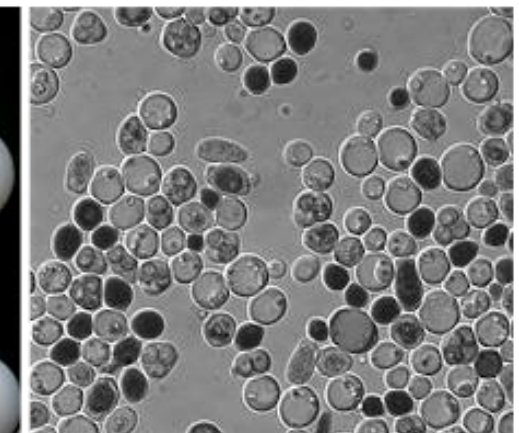
## ✓ Синтетическая биология:

Дрожжи служат платформой для сборки искусственных хромосом и сложных генетических цепей.



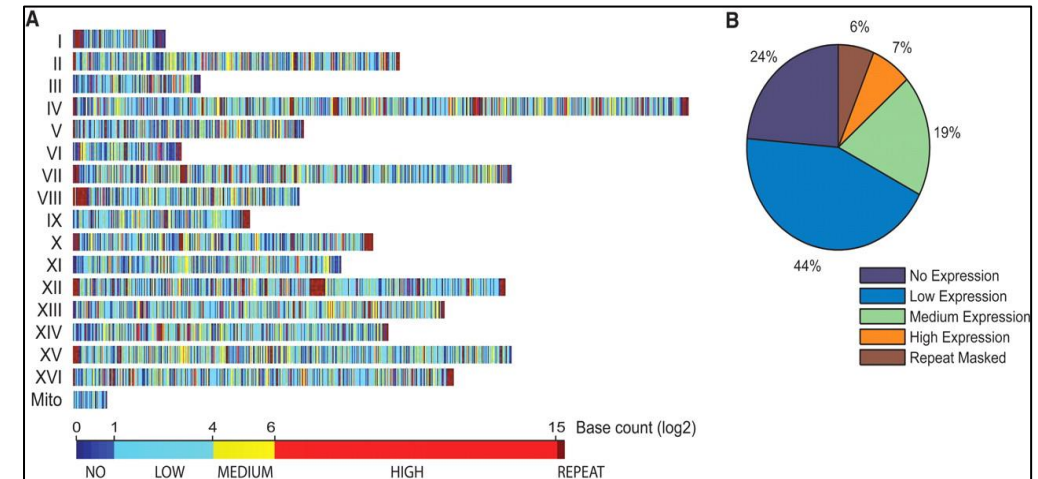
# Морфология колоний *Saccharomyces cerevisiae*

- ❖ Колонии *Saccharomyces cerevisiae*, выращенные на плотных питательных средах (например, YPD-агар), как правило, имеют **круглую форму, гладкую поверхность и кремообразную текстуру**. Они выглядят **непрозрачными или слегка блестящими** и имеют **белый или кремовый цвет**.
- ❖ При длительной инкубации колонии могут становиться **слегка приподнятыми или морщинистыми** из-за плотного роста клеток. Края обычно **ровные и чёткие**, хотя у некоторых штаммов могут наблюдаться слегка неровные очертания.
- ❖ Под микроскопом клетки дрожжей имеют **овальную или округлую форму**, размером **5–10 мкм**, и размножаются **почкованием**. В условиях дефицита питательных веществ *S. cerevisiae* могут образовывать **псевдогифы или настоящие гифы**, из-за чего поверхность колонии становится более шероховатой.



# *Saccharomyces cerevisiae* был разработан как модельный эукариотический организм по ряду причин, таких как:

- ✓ *Saccharomyces cerevisiae* — это небольшие отдельные клетки со временем удвоения 1,25–2 часа при 30 °C, и, что немаловажно, их легко культивировать. Следовательно, они позволяют быстро получать и поддерживать множество штаммов при низких затратах. *S. cerevisiae* можно генетически модифицировать, добавляя новые гены и удаляя их с помощью различных методов гомологичной рекомбинации.
- ✓ *Saccharomyces cerevisiae* стали первым полностью секвенированным эукариотическим геномом. Последовательность генома была опубликована в 1996 году и регулярно обновляется в базе данных геномов *Saccharomyces*.
- ✓ В настоящее время считается, что геном состоит из 12 156 677 пар оснований и 6275 генов, расположенных на 16 хромосомах. Возможность культивировать этот вид дрожжей в гаплоидном состоянии упрощает выделение мутантов и гаплоидно-диплоидных гибридов.
- ✓ Как эукариот, *S. cerevisiae* имеет внутреннюю структуру клеток, сходную с таковой у растений и животных.



Геном *Saccharomyces cerevisiae* составляет приблизительно 12 Мб, организованный в 16 хромосом.

| Loc | Type | Name | RefSeq                       | INSDC                      | Size (Mb) | GC%  | Protein | rRNA | tRNA | Other RNA | Gene | Pseudogene |
|-----|------|------|------------------------------|----------------------------|-----------|------|---------|------|------|-----------|------|------------|
|     | Chr  | I    | <a href="#">NC_001133.9</a>  | <a href="#">BK006935.2</a> | 0.23      | 39.3 | 94      | -    | 4    | 2         | 101  | 1          |
|     | Chr  | II   | <a href="#">NC_001134.8</a>  | <a href="#">BK006936.2</a> | 0.81      | 38.3 | 416     | -    | 13   | 6         | 435  | -          |
|     | Chr  | III  | <a href="#">NC_001135.5</a>  | <a href="#">BK006937.2</a> | 0.32      | 38.5 | 168     | -    | 10   | 4         | 184  | 2          |
|     | Chr  | IV   | <a href="#">NC_001136.10</a> | <a href="#">BK006938.2</a> | 1.53      | 37.9 | 766     | -    | 28   | 4         | 799  | 1          |
|     | Chr  | V    | <a href="#">NC_001137.3</a>  | <a href="#">BK006939.2</a> | 0.58      | 38.5 | 288     | -    | 20   | 9         | 318  | 1          |
|     | Chr  | VI   | <a href="#">NC_001138.5</a>  | <a href="#">BK006940.2</a> | 0.27      | 38.7 | 128     | -    | 10   | 4         | 143  | 1          |
|     | Chr  | VII  | <a href="#">NC_001139.9</a>  | <a href="#">BK006941.2</a> | 1.09      | 38.1 | 540     | -    | 36   | 10        | 586  | -          |
|     | Chr  | VIII | <a href="#">NC_001140.6</a>  | <a href="#">BK006934.2</a> | 0.56      | 38.5 | 292     | -    | 11   | 5         | 308  | -          |
|     | Chr  | IX   | <a href="#">NC_001141.2</a>  | <a href="#">BK006942.2</a> | 0.44      | 38.9 | 213     | -    | 10   | 3         | 232  | 6          |
|     | Chr  | X    | <a href="#">NC_001142.9</a>  | <a href="#">BK006943.2</a> | 0.75      | 38.4 | 365     | -    | 24   | 6         | 395  | -          |
|     | Chr  | XI   | <a href="#">NC_001143.9</a>  | <a href="#">BK006944.2</a> | 0.67      | 38.1 | 318     | -    | 16   | 5         | 339  | -          |
|     | Chr  | XII  | <a href="#">NC_001144.5</a>  | <a href="#">BK006945.2</a> | 1.08      | 38.5 | 520     | 12   | 21   | 18        | 573  | 2          |
|     | Chr  | XIII | <a href="#">NC_001145.3</a>  | <a href="#">BK006946.2</a> | 0.92      | 38.2 | 471     | -    | 21   | 16        | 508  | -          |
|     | Chr  | XIV  | <a href="#">NC_001146.8</a>  | <a href="#">BK006947.3</a> | 0.78      | 38.6 | 398     | -    | 14   | 6         | 418  | -          |
|     | Chr  | XV   | <a href="#">NC_001147.6</a>  | <a href="#">BK006948.2</a> | 1.09      | 38.2 | 546     | -    | 20   | 11        | 579  | 2          |
|     | Chr  | XVI  | <a href="#">NC_001148.4</a>  | <a href="#">BK006949.2</a> | 0.95      | 38.1 | 474     | -    | 17   | 7         | 500  | 2          |
|     |      | MT   | <a href="#">NC_001224.1</a>  | -                          | 0.09      | 17.1 | 19      | 2    | 24   | 1         | 46   | -          |

# Рибосомная РНК дрожжей (100-140 копий tandemных повторов на гаплоид)

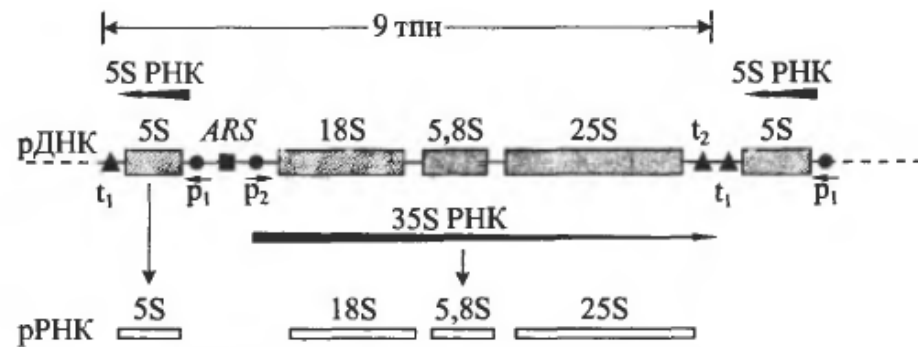
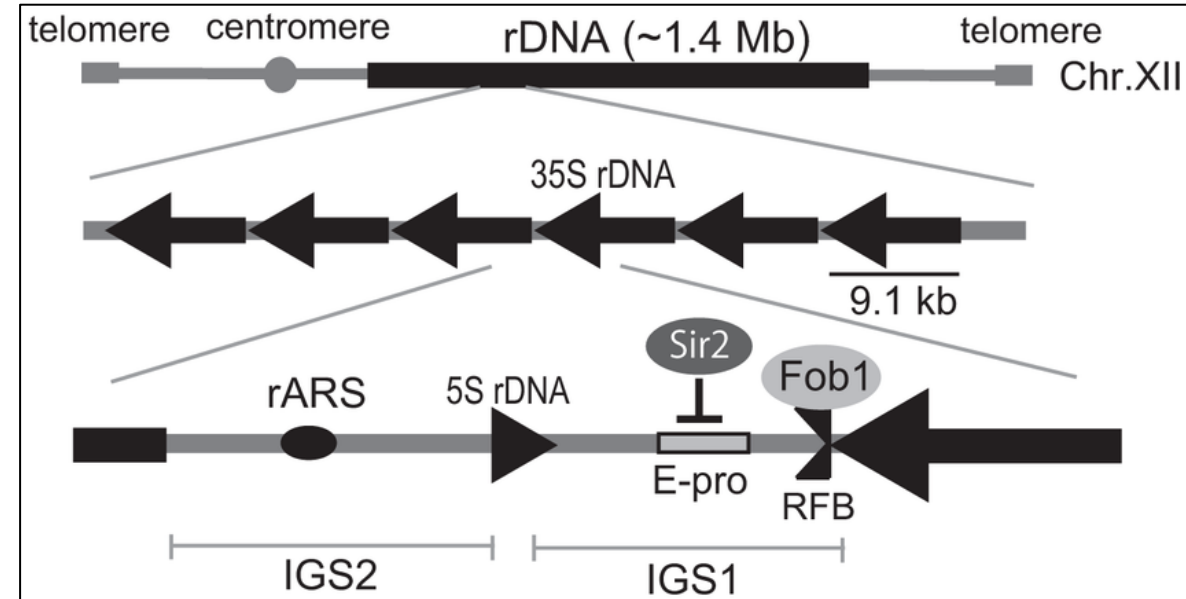


Рис. 12.2. Организация повторяющейся единицы генов рРНК *S. cerevisiae*.

$p_1$ ,  $p_2$  — промоторы, с которых инициируется транскрипция соответственно 5S рРНК и 35S рРНК — предшественника трех классов рРНК;  $t_1$  и  $t_2$  — терминаторы транскрипции рибосомных оперонов; *ARS* — область начала репликации ДНК. Направление транскрипции показано стрелками

Рибосомная ДНК (рДНК) *Saccharomyces cerevisiae* кодируется локусом RDN1, областью длиной приблизительно 1–2 Мб, состоящей из 100–200 tandemных копий повтора длиной 9,1 кб, расположенной на правом плече хромосомы XII. Каждый повтор содержит гены 5S, 5.8S, 25S (=35S) и 18S рРНК, а также три типа спейсерных областей: внутренние транскрибируемые спейсеры (ITS1 и ITS2), внешние транскрибируемые спейсеры (5' ETS и 3' ETS) и нетранскрибируемые спейсеры (NTS1 и NTS2).

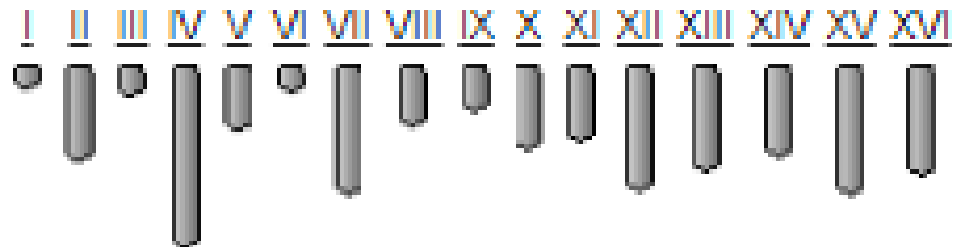


## Структура области рДНК у почкующихся дрожжей.

*rARS* и *RFB* — точка начала репликации и сайт блокировки соответственно. *IGS 1* и *2* — межгенные спейсеры. *E-pro* — двунаправленный промотор некодирующей транскрипции. Стрелки указывают направление транскрипции генов 5S и 35S рРНК. Белок, блокирующий вилку, *Fob1p* связывается с сайтом блокировки репликативной вилки (*RFB*) в *IGS1* и ингибирует репликативную вилку, проходящую слева на рисунке. *Sir2* репрессирует транскрипцию с *E-pro*.

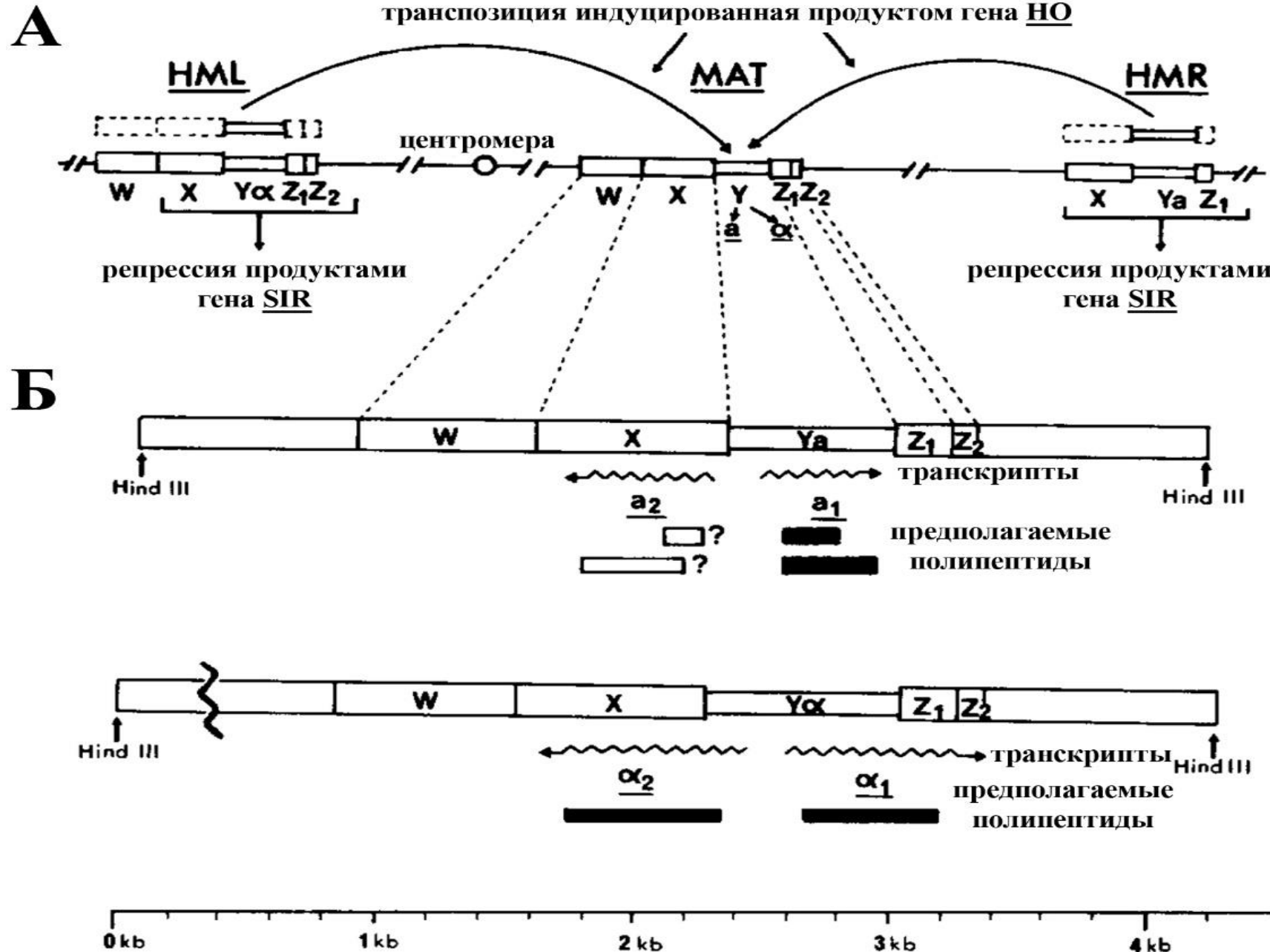
# Дрожжи в генной инженерии

- Некоторые из свойств, которые делают дрожжи, особенно подходящими для биологических исследований, включают быстрый рост, рассеянность клеток, легкость изоляции мутантов, с четко определенной генетической системой и, что самое важное, имеют универсальную систему трансформации ДНК. В отличие от многих других микроорганизмов, *S. cerevisiae* жизнеспособны с множеством маркеров в геноме. Ниже описаны локусы, широко используемые для интеграции генов в геном дрожжей.



# HO locus дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

- HO locus дрожжей *S. cerevisiae* регулирует частоту взаимопревращений типов спаривания (a или  $\alpha$ ). Данный locus способствует сайт-специфической, однонаправленной транспозиции кассеты генетической информации из HML и HMR locus (где кассеты молчат) в locus типа спаривания, где a- или  $\alpha$ -кассеты экспрессируются и определяют тип дрожжевых клеток (рисунок 9)

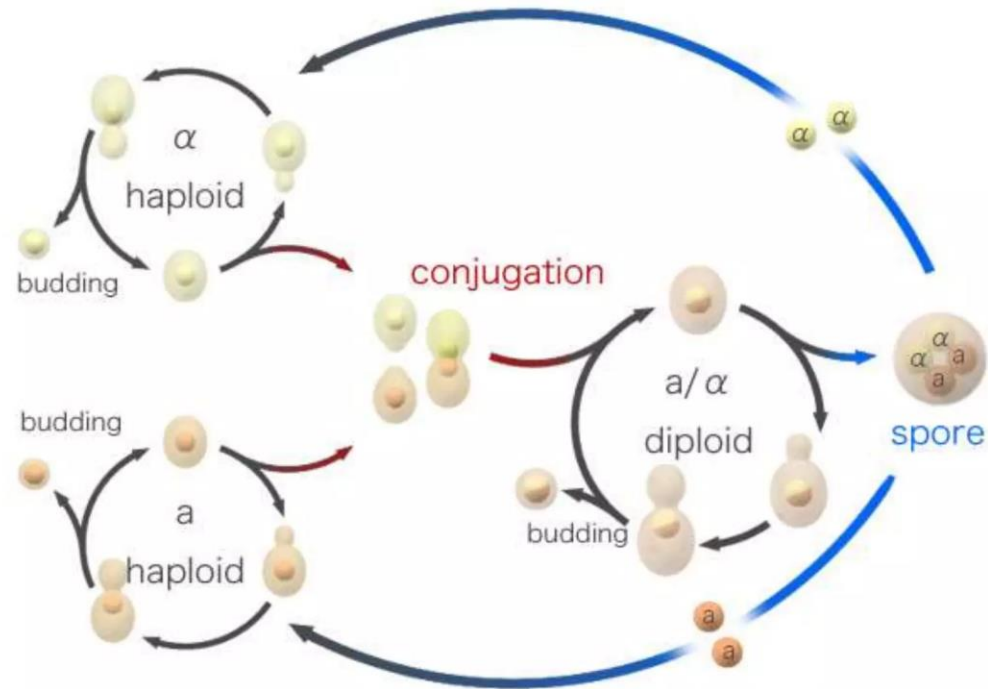


Расположение HML, MAT и HMR на хромосоме III *S. cerevisiae* с указанием местоположения W, X, Y $\alpha$  (Y $\alpha$ ) Z<sub>1</sub> и Z<sub>2</sub> сегментов. Б) Показано выравнивание транскриптов МАТ $\alpha$  и МАТ $\alpha$  (волнистые стрелки) с локусами МАТ $\alpha$  и МАТ $\alpha$ . Вопрос – функция не обнаружена; Закрашенная ячейка – положительные полипептиды; Открытые ячейки – возможные полипептиды.

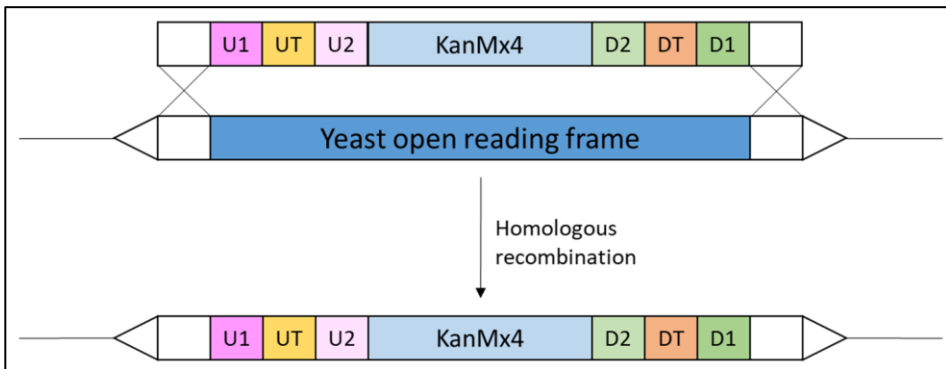
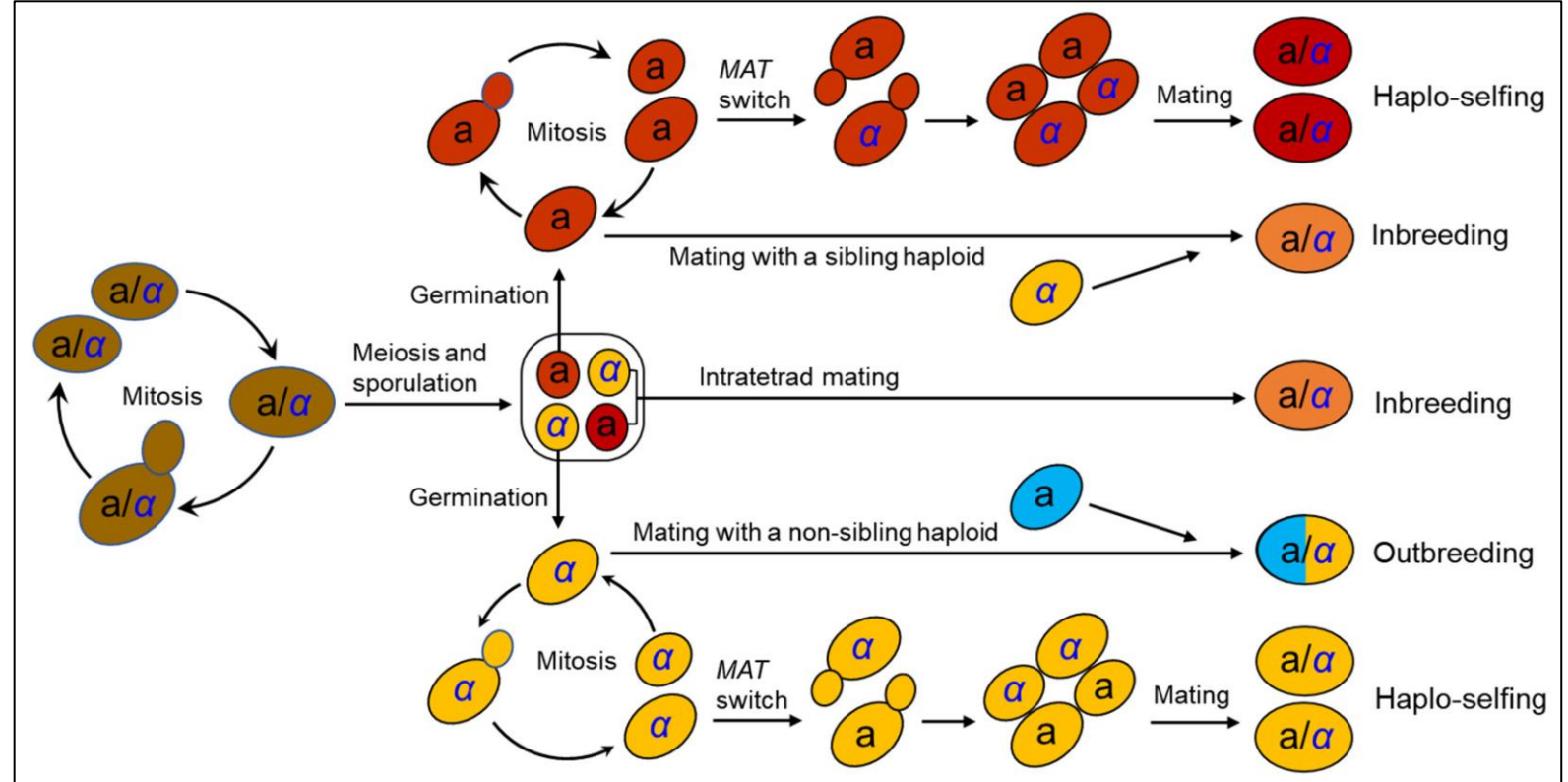
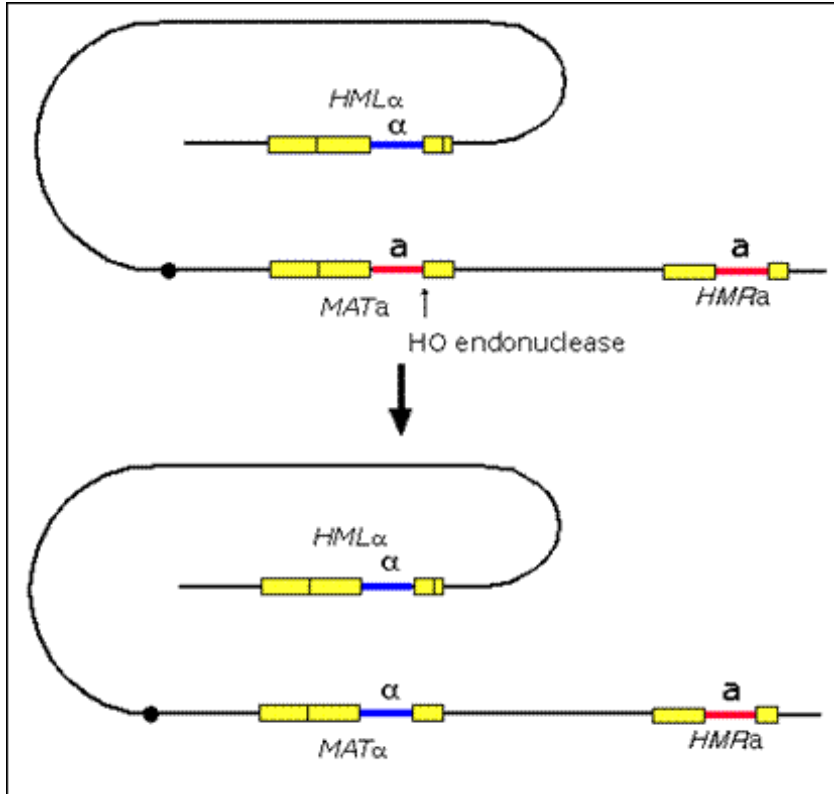
# Локус НО дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

- Локус НО у дрожжей *S. cerevisiae* регулирует частоту взаимоконверсий типа спаривания ( $a$  или  $\alpha$ ). Этот локус обеспечивает сайт-специфическую однонаправленную транспозицию генетической информационной кассеты из локусов HML и HMR (где кассеты не экспрессируются) в локус типа спаривания, где экспрессируются  $a$ - или  $\alpha$ -кассеты, определяющие тип дрожжевых клеток.

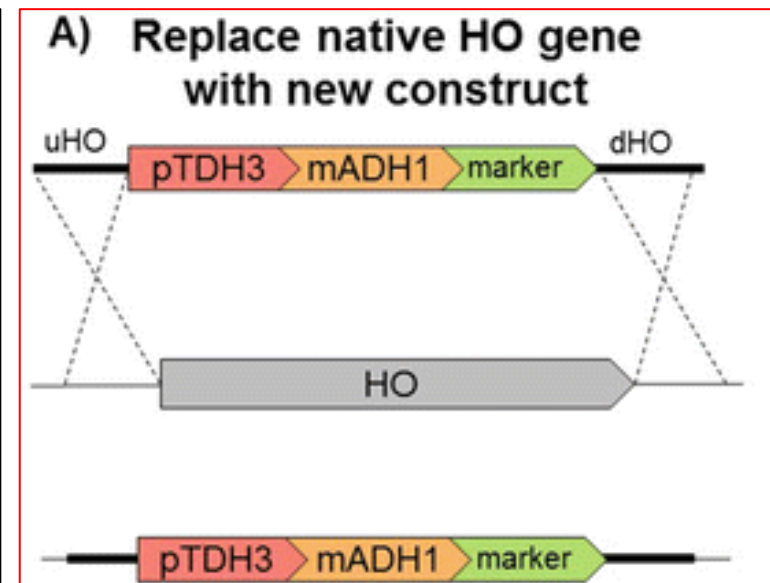
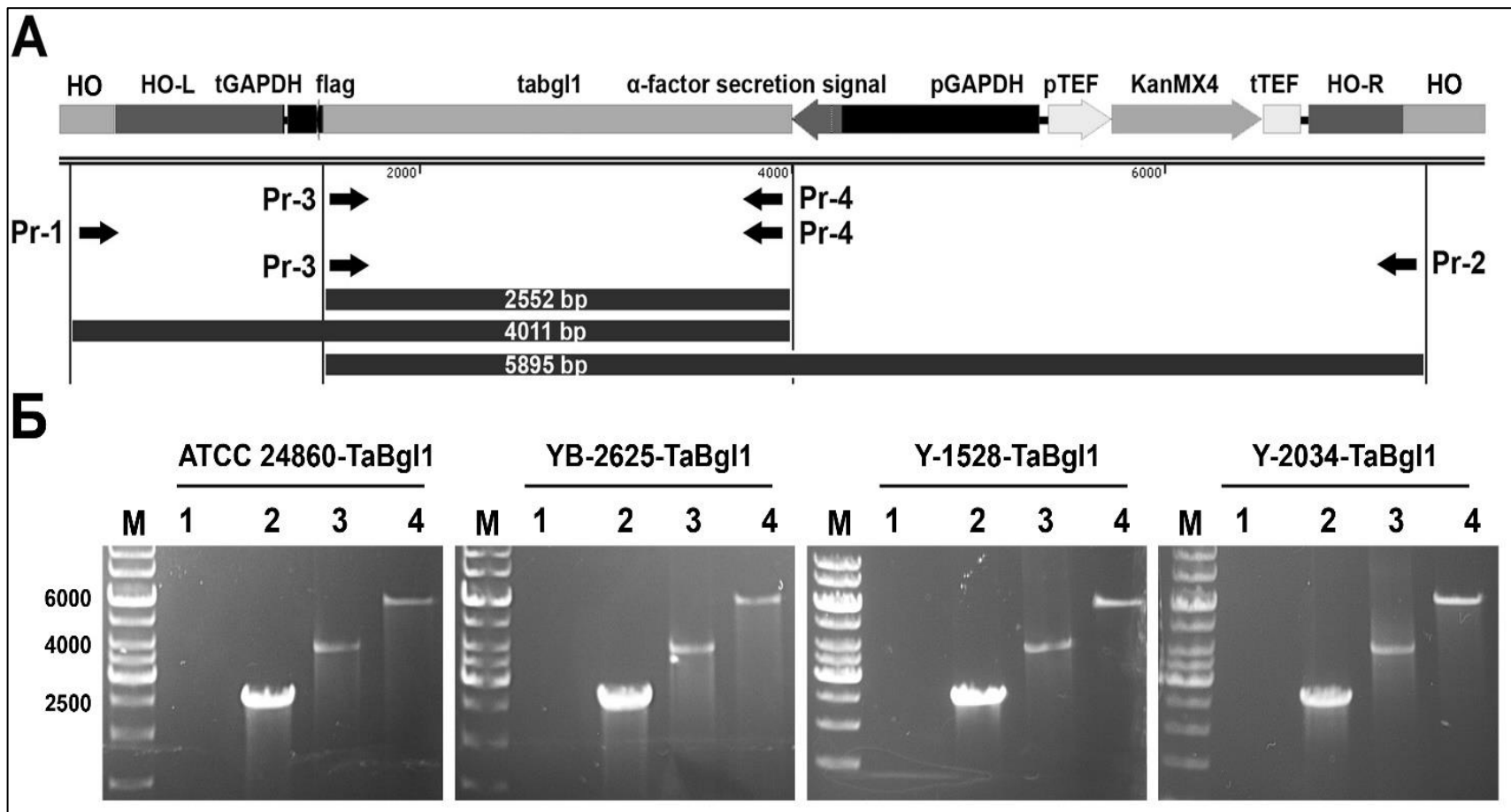
## The lifecycle of *S. cerevisiae*



# Changes in mating types in yeast and the involvement of the HO locus in genetic engineering



Yeast ascospores

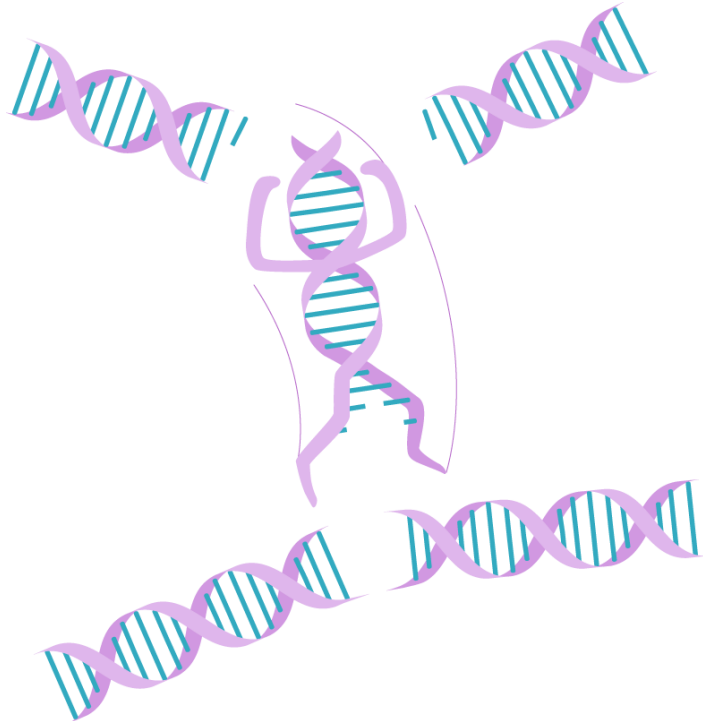


А) Схема интегративной кассеты, содержащей ген *tabgl1*, слитый с промотором *GAPDH*, фланкированной участками, гомологичными локусу *HO* (*HO-R* и *HO-L*) хромосомы IV *S. cerevisiae*; Электрофорез продуктов ПЦР в агарозном геле. М - маркер размера молекулы 1 кб; 1 - отрицательный контроль; 2 - праймеры Pr3 и Pr4; 3 - праймеры Pr1 и Pr4; 4 - праймеры Pr2 и Pr3.

Рисунок - Подтверждение корректной интеграции кассеты *pHO-KanMX4-pGAPDH-α-tabgl1-flag-tGAPDH-HO* в локус *HO* хромосомы дрожжей

# Мобильные генетические элементы

- Мобильные генетические элементы (МГЭ) — это дискретные сегменты ДНК, имеющие нефиксированную локализацию на хромосоме и способные перемещаться по геному.



- Мобильные элементы были открыты в 1950 г. Б. МакКлинтоком (McClintock, 1950, 1951; Federoff, 1994), изучавшим изменчивость окраски зерен кукурузы.

- ✓ Барбара МакКлинток обнаружила, что эти последовательности ДНК могут перемещаться внутри генома, вызывая изменения экспрессии генов и структуры хромосом.
- ✓ У кукурузы транспозоны отвечают за вариабельность окраски зерен и играют ключевую роль в эволюции и регуляции генома.



У видов таких родов, как *Drosophila* и *Arabidopsis*, МГЭ может занимать до 30% всего генома, у млекопитающих — около половины генома, а у амфибий и растений — от 70 до 90%.

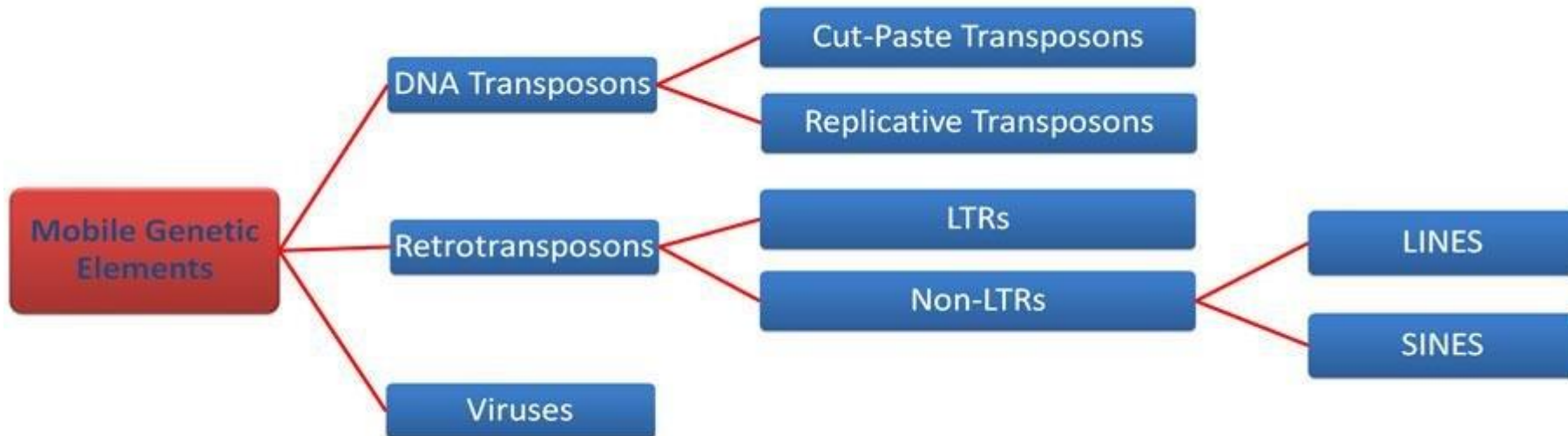
- В 1960-х годах МГЭ были обнаружены у микроорганизмов.
- В конце 1970-х годов — у дрозофилы, практически одновременно в США и СССР.
- В США МГЭ были обнаружены группой генетиков под руководством Д. Хогнесса.

BARBARA  
McCLINTOCK

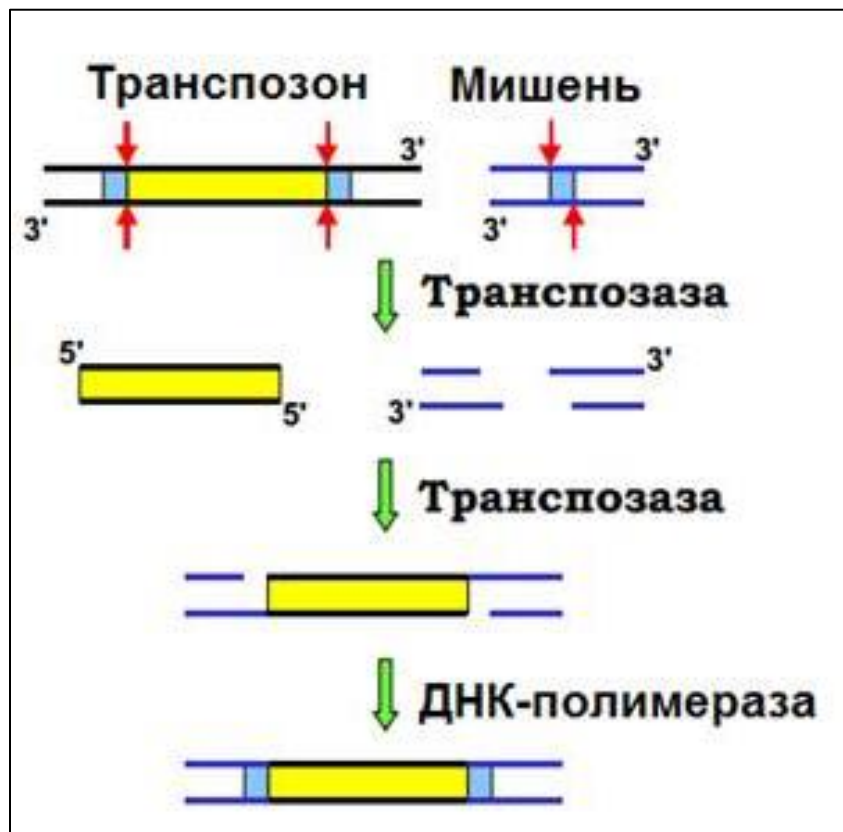
Nobel Prize in Physiology or Medicine 1983

# Классификация мобильных генетических элементов

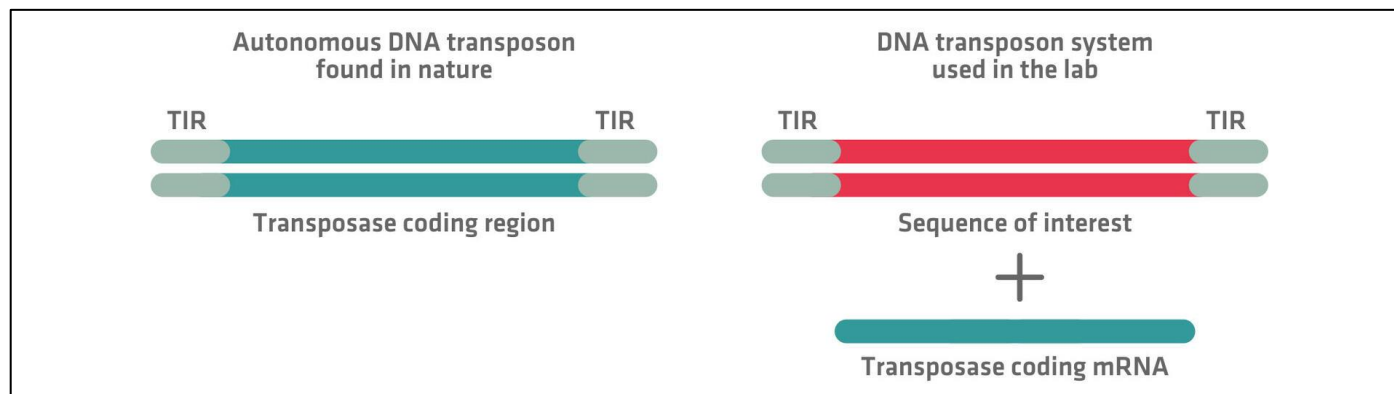
- Классификация мобильных генетических элементов основана на различиях в их структуре и связанных с ними механизмах перемещения в геноме.



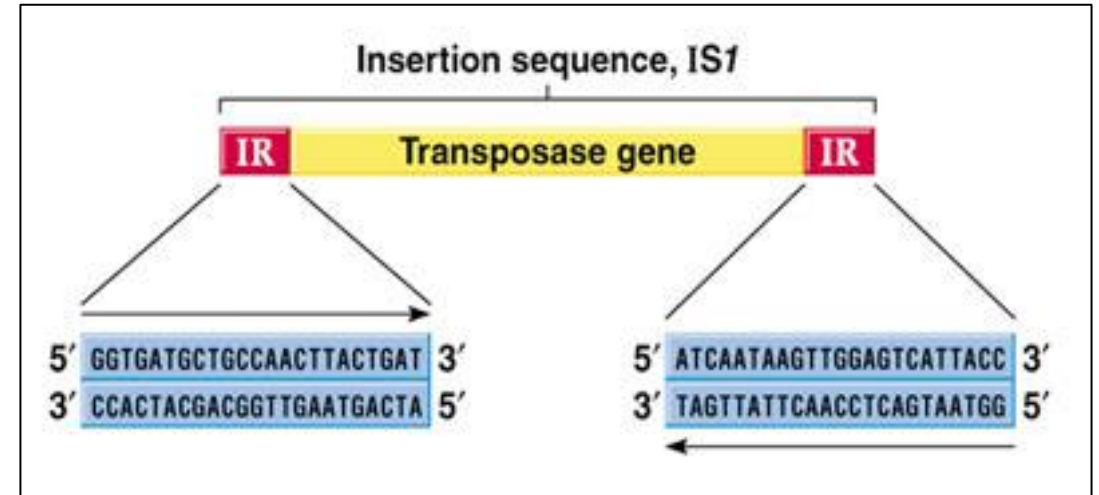
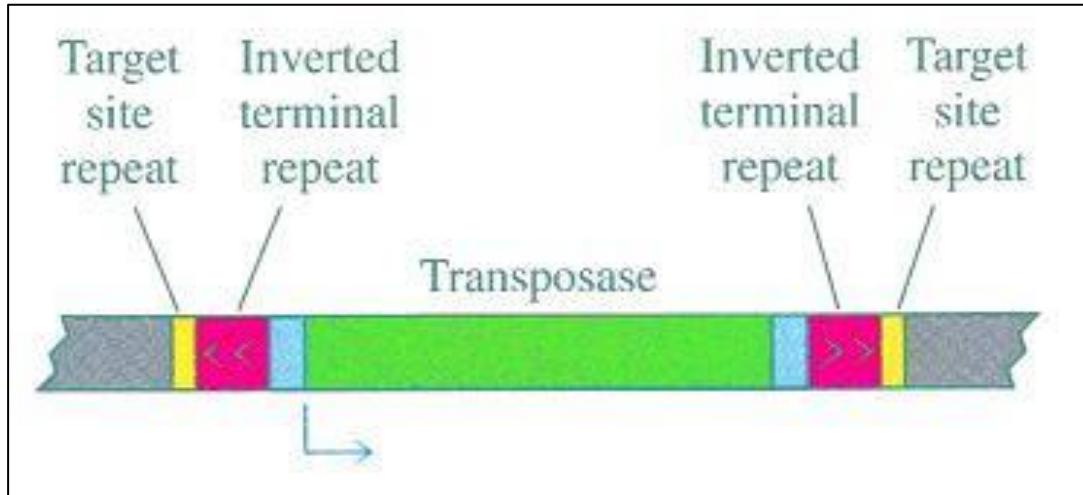
# Класс I. Транспозоны ДНК-транспозоны или классические транспозоны



- Кодировывает белок транспозазу;
- Транспозаза вырезает транспозон и встраивает его в другое место;
- На месте, где находился транспозон, образуется повтор.



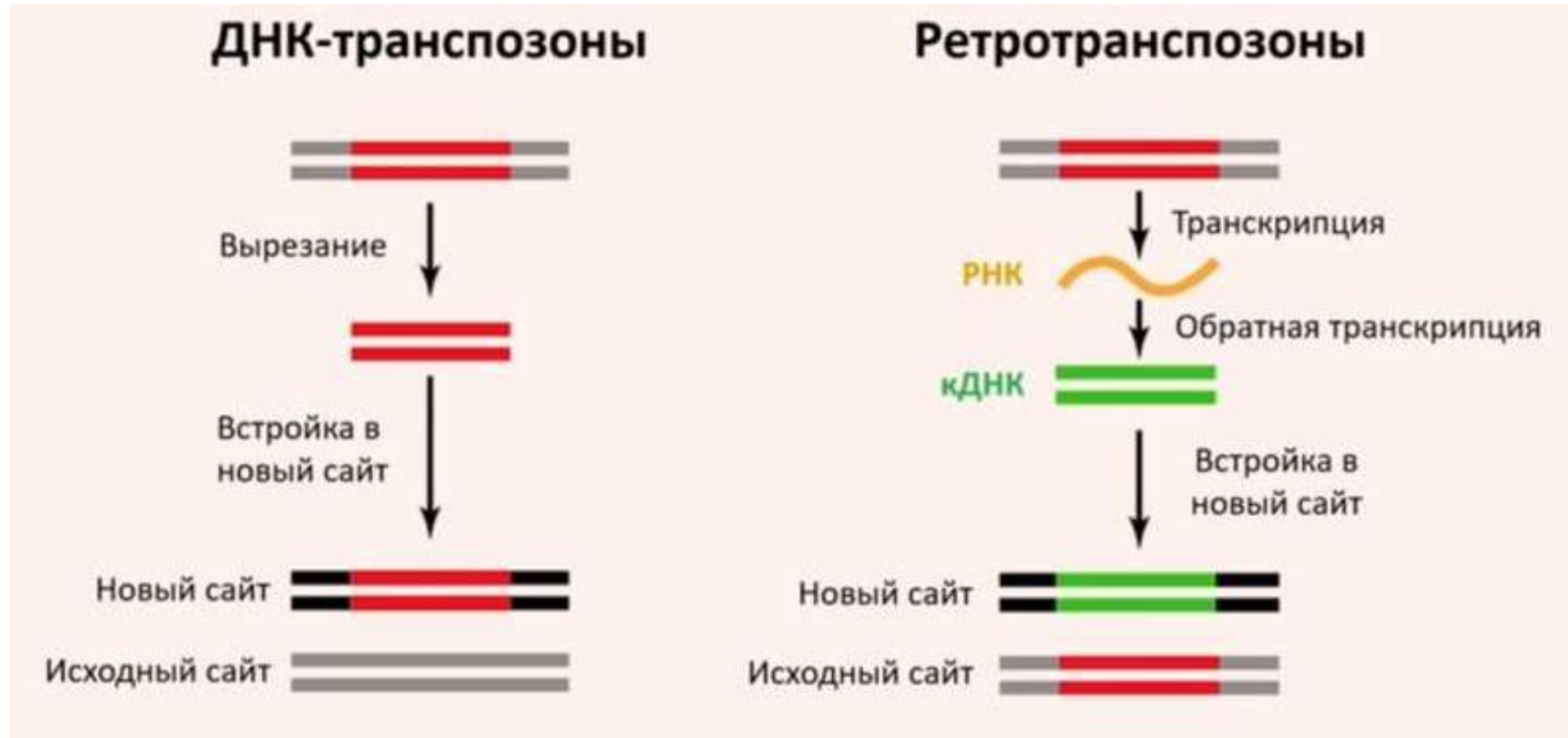
- **ДНК-транспозоны** первоначально были обнаружены у бактерий, но теперь их обнаружили в геномах многих эукариот, включая дрожжи, насекомых, червей, животных и людей.



Этот метод встраивания называется **механизмом ДНК-ДНК**.

## Класс II. Ретротранспозоны

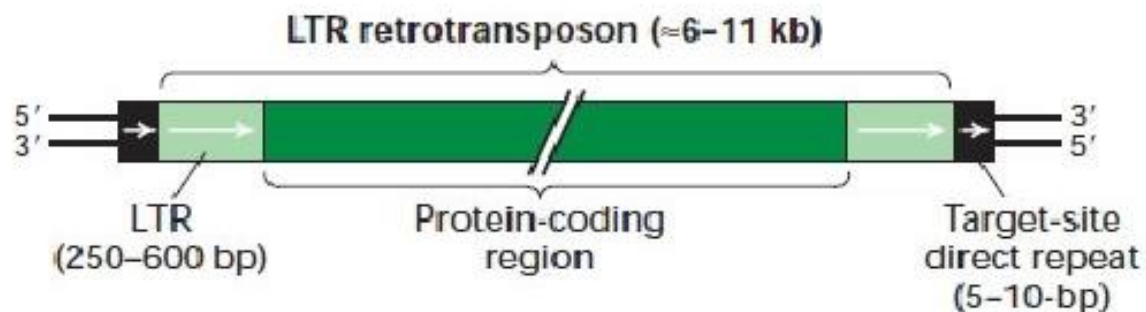
- К этому классу относятся элементы, которые в процессе своего движения сначала синтезируют цепочку РНК, к которой затем с помощью фермента обратной транскриптазы синтезируется комплементарная цепочка ДНК. После дупликации двухцепочечная ДНК способна встраиваться в различные области хромосом хозяина. Такой способ встраивания называется механизмом ДНК–РНК–ДНК.



- Подкласс LTR-ретротранспозонов представляет собой класс мобильных генетических элементов, характеризующихся наличием длинных концевых повторов (LTR) — идентичных последовательностей из нескольких сотен пар оснований, расположенных на обоих концах элемента.
- Эти LTR содержат промоторные и регуляторные области, необходимые для транскрипции и интеграции. Центральные области элементов этого подкласса фланкированы с обоих концов длинными концевыми повторами (LTR длиной от 250 до 500 п.н.).

## Retrotransposons

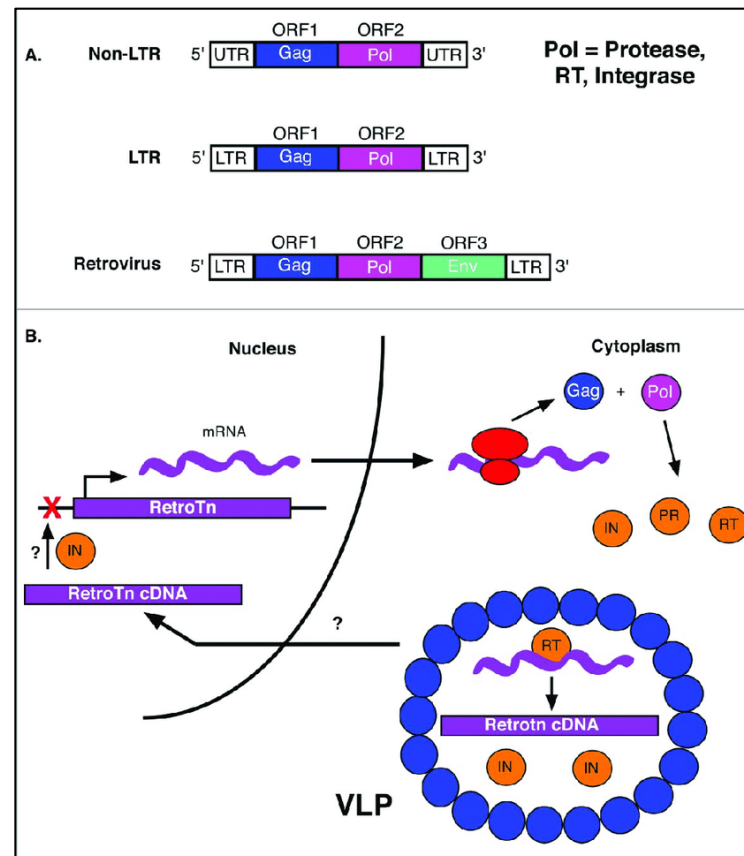
- LTR retrotransposons
- Non-LTR retrotransposons - transposons in mammals generally



### General structure of eukaryotic LTR retrotransposons

Lodish *et al.*, Molecular Cell Biology, 7<sup>th</sup> ed. Fig 10-11

- **gag (группоспецифический антиген) — кодирует структурные белки, образующие вирусоподобные частицы (ВПЧ).**
- **В ретротранспозонах *S. cerevisiae* белки Gag аналогичны белкам вирусного капсида, но не продуцируют инфекционные частицы.**
- **pol (полимераза) — кодирует ферменты, необходимые для цикла ретротранспозиции.**



**Ретротранспозоны и механизм ретротранспозиции LTR.** (А) Не-LTR-транспозоны кодируют как Gag, так и Pol, но не фланкированы LTR. LTR-ретротранспозоны содержат гены gag и pol, окруженные LTR. Помимо генов gag и pol, ретровирусы кодируют ген env. (В) Gag и pol мРНК ретротранспозона сначала транслируются в полипротеин. Протеаза (PR) Pol расщепляет пептид на ферменты интегразу (IN) и обратную транскриптазу (RT). RT, ретротранспозон и IN затем упаковываются в вирусоподобные частицы (VLP) для импорта в ядро, где кДНК ретротранспозона интегрируется в геном (красный X). Механизмы, посредством которых содержимое VLP локализуется в ядре, а кДНК ретротранспозона интегрируется в целевой сайт, неизвестны (?).

- ❑ У *Saccharomyces cerevisiae* LTR-ретротранспозоны, в основном элементы Ty (Ty1–Ty5), стали ценными инструментами в генной инженерии и молекулярной биологии. Эти элементы структурно и функционально сходны с ретровирусами и могут интегрироваться в геном дрожжей, что делает их полезными для изучения экспрессии генов, стабильности генома и механизмов транспозиции.

## ПРИМЕНЕНИЕ LTR-РЕТРОТРАНСПОЗОНОВ В *S. CEREVISIAE*:

### Инсерционный мутагенез:

- Ty-элементы могут случайным образом встраиваться в различные геномные локусы, нарушая или изменяя функцию генов. Это свойство используется для создания библиотек мутантов и идентификации генов, участвующих в определённых клеточных процессах.

### Исследования экспрессии генов:

- Сильные промоторы и энхансеры, расположенные в Ty LTR, используются для управления экспрессией репортерных или гетерологичных генов. Исследователи часто используют последовательности LTR в качестве промоторных элементов в векторах экспрессии.

### Модельная система для ретротранспозиции:

- *S. cerevisiae* служит безопасной и простой эукариотической моделью для изучения механизмов ретротранспозиции, обратной транскрипции и интеграции, которые важны для понимания ретровирусов и мобильных элементов человека.

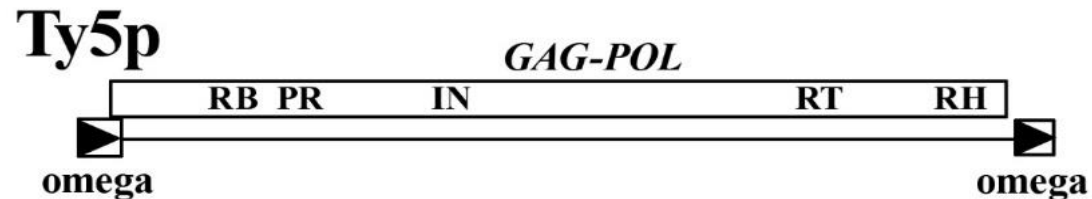
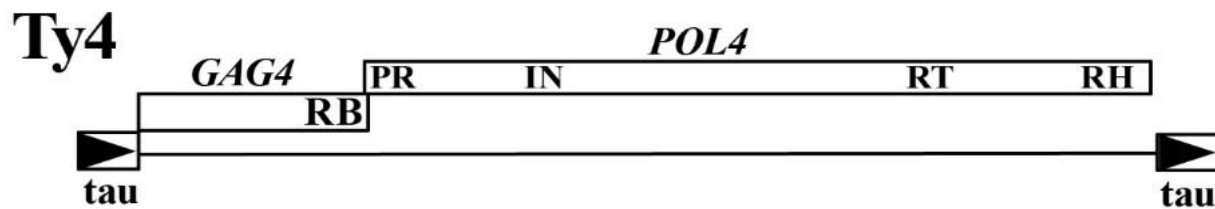
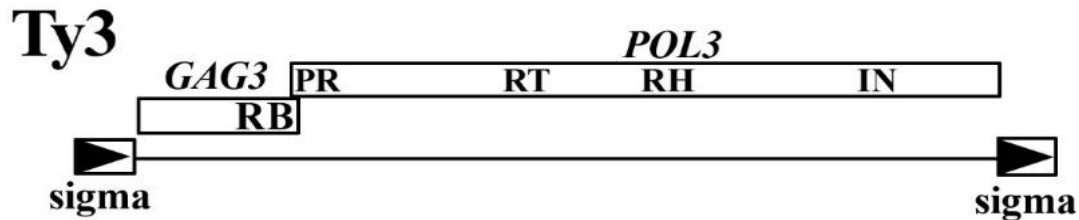
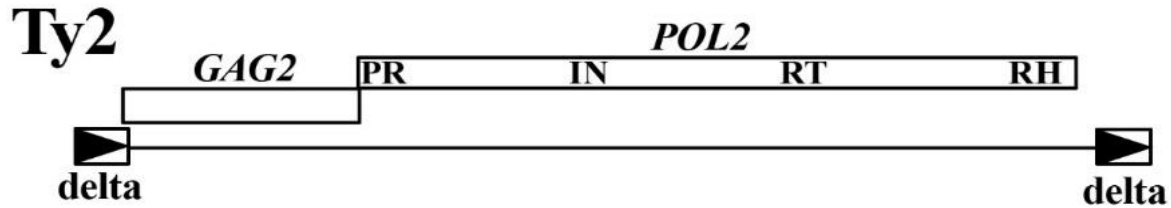
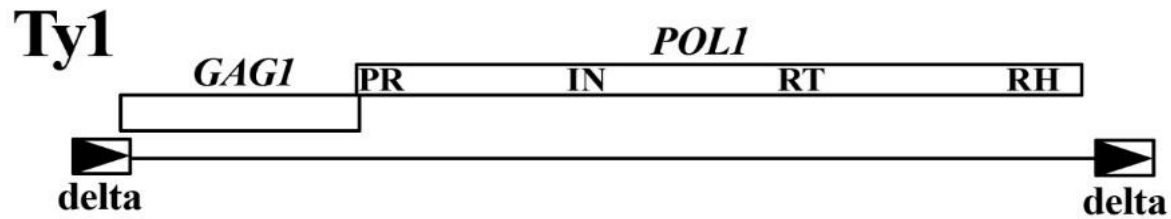
### Геномная инженерия и исследования эволюции:

- Ty-элементы используются для изучения того, как мобильная ДНК способствует эволюции генома, ремоделированию хроматина и генетической изменчивости. Они также помогают в разработке стратегий целенаправленной модификации генома.

Подводя итог, можно сказать, что ретротранспозоны Ty в *S. cerevisiae* являются не только естественными компонентами его генома, но и мощными биотехнологическими инструментами для изучения и манипулирования эукариотическими генами.

# Ту элементы

- Длинные терминальные повторы Ту элемента, известные как  $\delta$ -последовательности, являются хорошими мишенями для интеграции посредством гомологичной рекомбинации, так как имеется около 425 копий во всем геноме дрожжей.
- Ту элементы принадлежат к группе ретротранспозонов. Аббревиатура «Ту» означает «Транспозоны дрожжей». Ретротранспозоны и ретровирусы *S. cerevisiae* часто сравниваются из-за сходства между их жизненными циклами и их механизмом интеграции кДНК в геномы клеток-хозяина.
- Ту последовательность содержит два гена: *tya1* и *tyb1*, которые соответствуют генам *gag* и *pol* генов ретровирусов, соответственно.



Консервативные области кодирования в открытой рамке считывания: *RB* - РНК-связывающий белок, *PR* - протеиназа, *IN* - интеграз, *RT* - обратная транскриптаза, *RH*-RNase H.

- Фланкированный с LTR (длинными терминальными повторами) (334 нуклеотидными последовательностями), называемых дельта ( $\delta$ )
- Ty1 встречается около 30 копий на гаплоидный геном. > Ty2 встречается около 10 копий на гаплоидный геном.
- Ty3 встречается около 4 копий на гаплоидный геном.

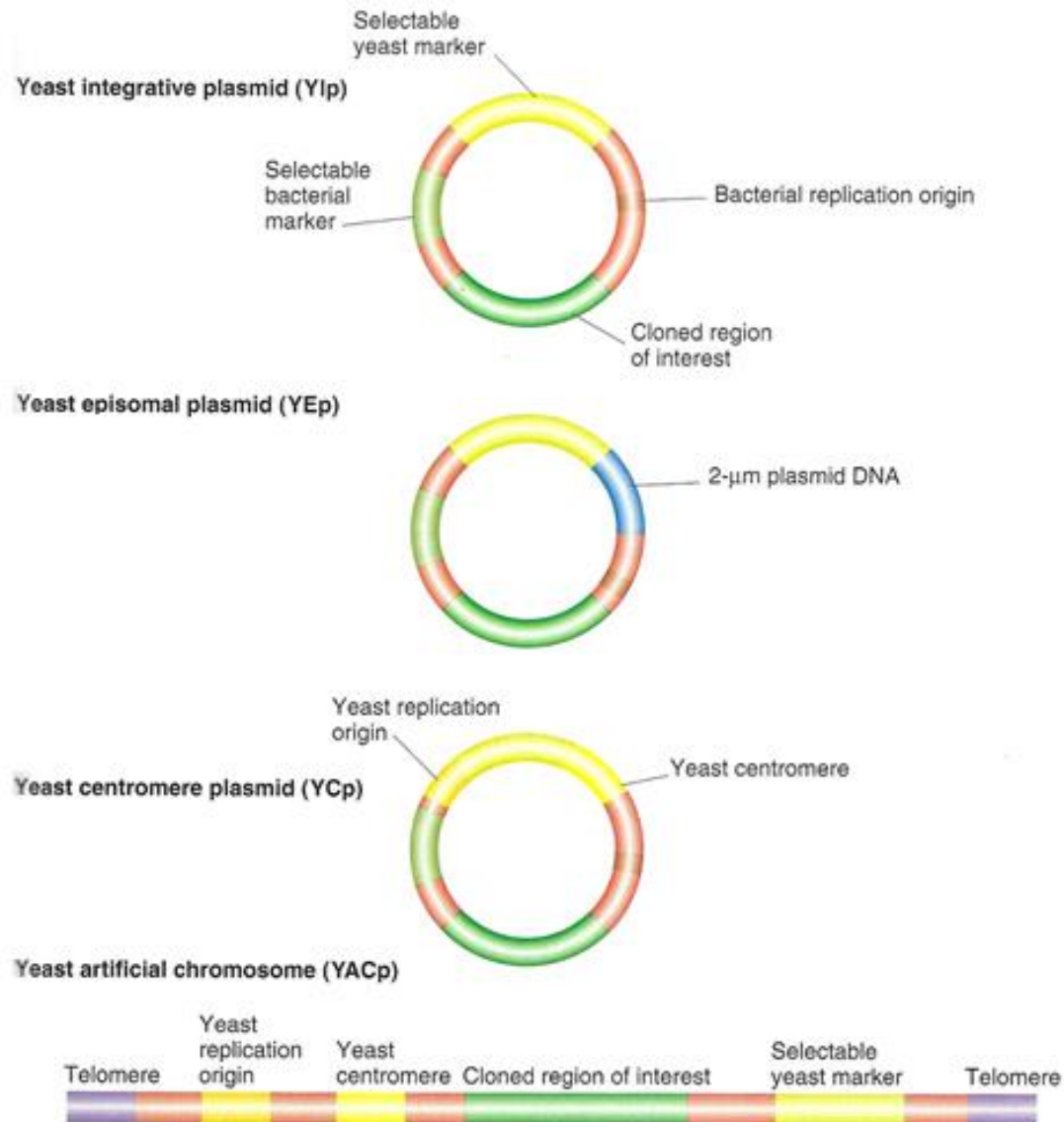
- **Повторяющиеся длинный концевой последовательности (LTR)** представляет собой нуклеотидную последовательность , характеристика концов *ретровирусов* и *ретротранспозонов* .
- Он производится с помощью обратной транскрипции в РНК вируса или ретротранспозона
- Он участвует в интеграции этих вирусных или мобильных элементов в геном хозяина.
- Таким образом, после интеграции в ДНК провирусный геном оказывается фланкированным двумя LTR, 5' и 3' .
- 5 'LTR содержит промотор, который обеспечивает транскрипцию ретровируса РНК.

### Alu-ретротранспозоны



- Левый мономер ■ A,B box - промоторные регионы для РНК-полимеразы III
- A-богатая последовательность ■ Правый мономер ■ Олиго(A)-богатая последовательность

# Дрожжевые клонирующие вектора



- **Интегративная плазмида дрожжей.** Этот тип вектора для дрожжей имеет бактериальный ориджин репликации и бактериальный селективный маркер (например, устойчивость к ампициллину), что позволяет выращивать его в *E. coli*. У него отсутствует дрожжевой ориджин репликации, но он несет селективный маркер дрожжей, например, ген фермента, необходимого для биосинтеза аминокислоты. Имеется множественный сайт клонирования для вставки ДНК. При трансформации дрожжевых клеток этой плазмидой рекомбинация между плазмидой и геномом дрожжей в месте селективного маркера интегрирует всю плазмиду в геном дрожжей.
- **Эписомальная плазмида дрожжей.** Этот тип вектора для дрожжей существует в виде эписомы с высоким числом копий на клетку и функционирует так же, как бактериальная плазмида.
- **Плазмида с центромерой дрожжей.** Это кольцевая плазмида, содержащая клонированную центромеру дрожжей. Центромерные плазмиды поддерживаются в количестве одной копии на клетку, как и небольшие кольцевые хромосомы.
- **Искусственная хромосома дрожжей.** Добавление дрожжевых теломер к плазмиде, содержащей центромеру, создаёт искусственную хромосому дрожжей, способную принимать очень большие вставки.

# Промотеры

- TEF1 - Translational elongation factor EF-1 alpha;
- PGK1 - 3-phosphoglycerate kinase;
- GAPDH - Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase;

## *Galactose metabolism:*

- GAL1 – galactokinase;
- GAL7 - transferase
- GAL10 - epimerase,

Экспрессия рекомбинантных белков в дрожжах, особенно *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*, имеет ряд важных преимуществ по сравнению с бактериальными или млекопитающими системами:

#### Эукариотическая обработка белков

Дрожжи являются эукариотическими организмами, поэтому они могут выполнять посттрансляционные модификации, такие как гликозилирование, образование дисульфидных связей и протеолитическую обработку, которые часто необходимы для правильного сворачивания и биологической активности эукариотических белков.

#### Высокоуровневая экспрессия

Дрожжи способны продуцировать большое количество рекомбинантного белка, особенно при использовании сильных промоторов (например, GAL1 или AOX1) и многокопийных плазмид. Это делает их пригодными как для исследований, так и для промышленного производства.

#### Легкая секреция белков

Многие дрожжевые системы предназначены для секреции рекомбинантных белков в культуральную среду, что упрощает очистку и снижает загрязнение белками хозяина.

#### Простое культивирование

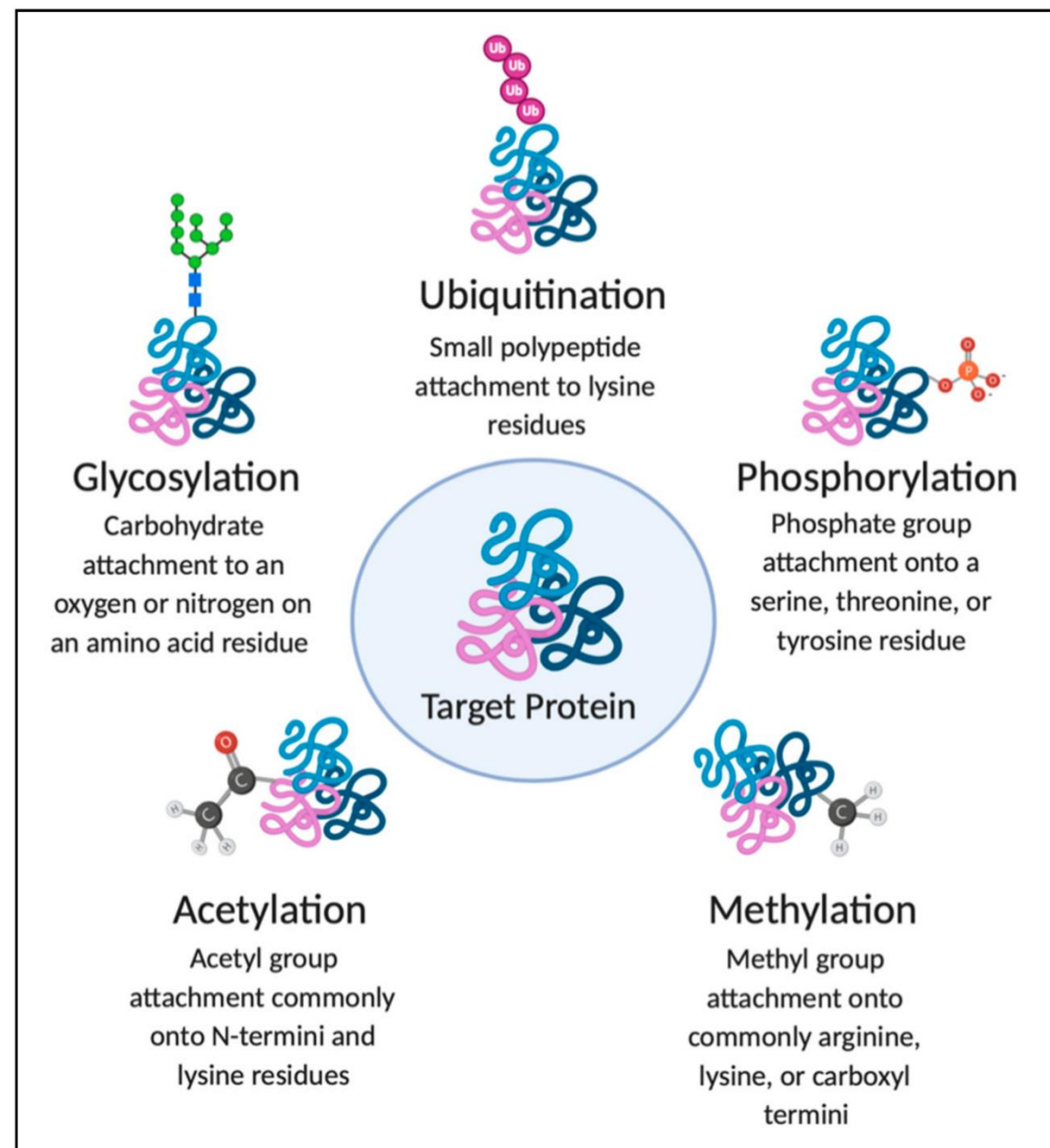
Дрожжи быстро растут на недорогих средах в простых условиях (аэробное встряхивание или ферментация), сочетая в себе простоту бактериального культивирования с преимуществами эукариотической экспрессии.

#### Безопасный и непатогенный

Дрожжи общепризнанно считаются безопасными (GRAS) организмами и не вырабатывают эндотоксины, что делает их пригодными для производства фармацевтических препаратов и вакцин.

#### Генетическая стабильность и доступные инструменты

Существует широкий спектр генетических инструментов, векторов и мутантных штаммов для эффективного клонирования, селекции и экспрессии. Геномы дрожжей также генетически стабильны, сохраняя вставленные гены на протяжении многих поколений.



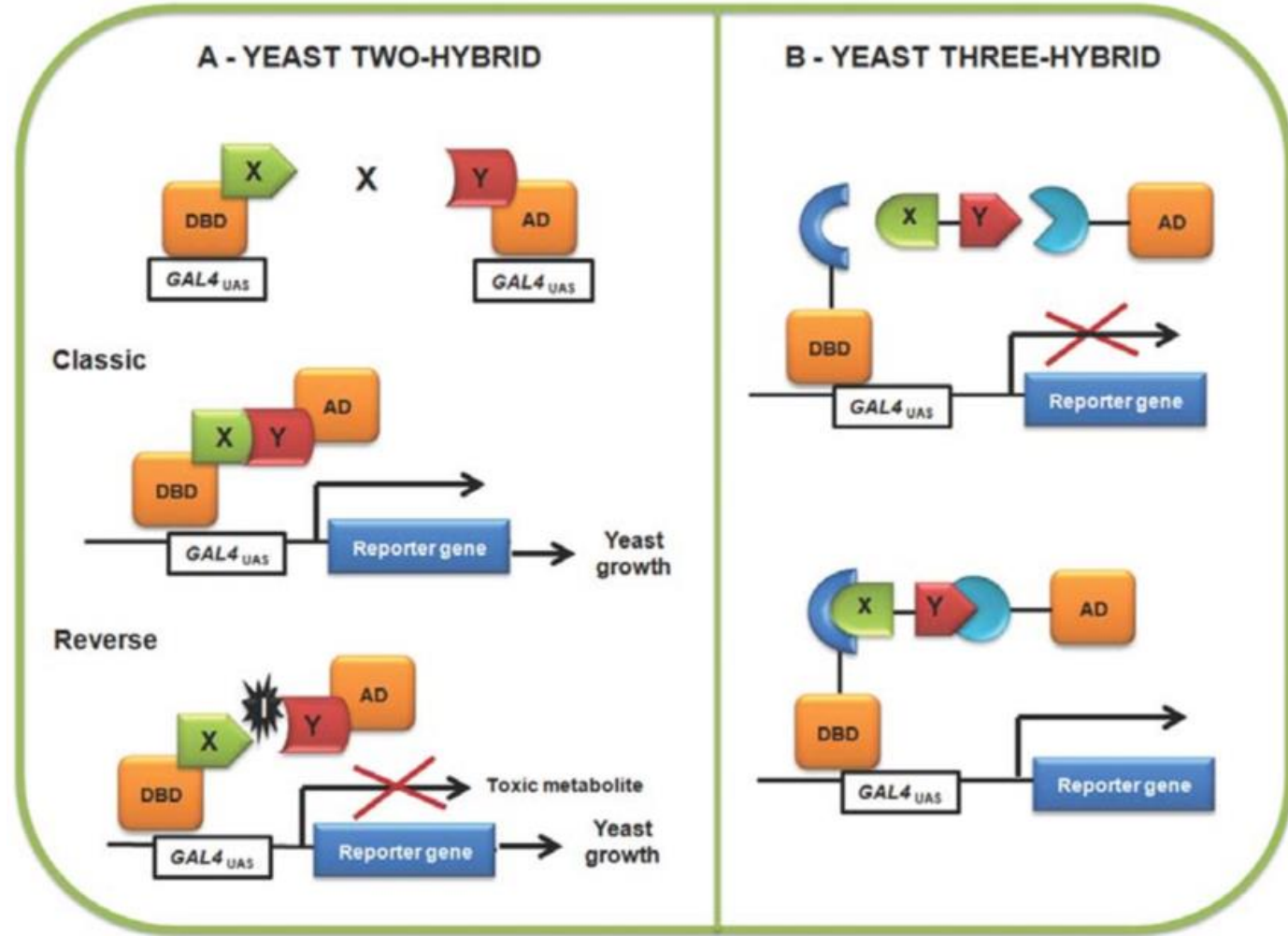
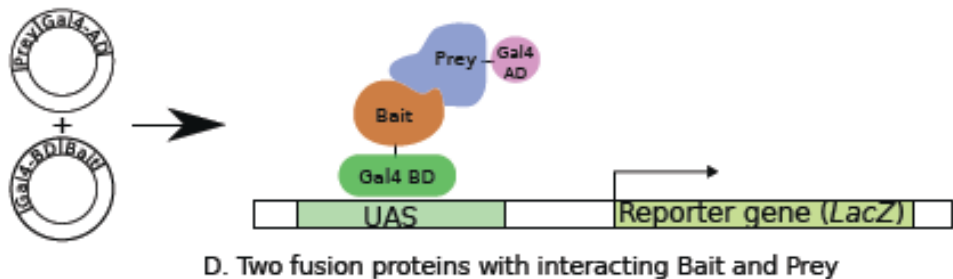
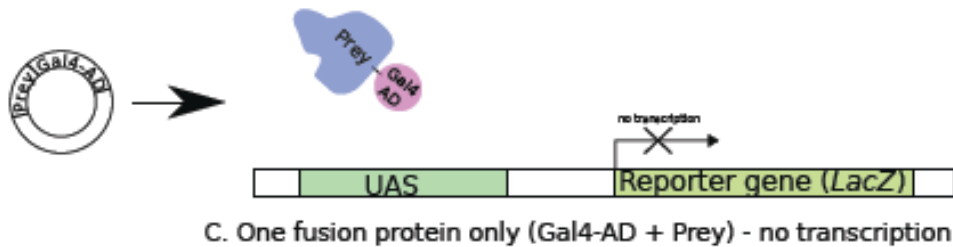
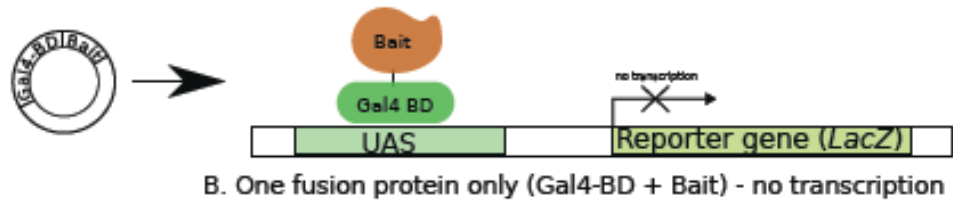
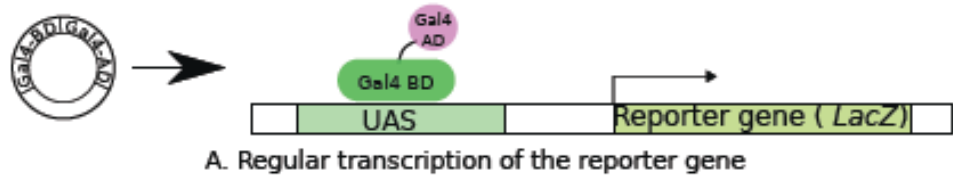
## Обзор наиболее часто используемых двугибридных векторов. В последнем столбце указано происхождение промотора и регистрационный номер в EMBL (AC).

| Имя                   | Выделение-маркер | Функциональная область | промотор, AC                                                          |
|-----------------------|------------------|------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| <b>На основе GAL4</b> |                  |                        |                                                                       |
| pMA424                | <i>HIS3</i>      | GAL4DB                 | Исходный вектор, 12 кб                                                |
| pGBT9                 | <i>TRP1</i>      | GAL4DB                 | ADH1 (усеченный)<br>AC: <a href="#">U07646</a>                        |
| pAS1                  | <i>TRP1</i>      | GAL4DB + HA            | ADH1 (полная длина),<br>CYH2                                          |
| pAS2                  | <i>TRP1</i>      | GAL4DB + HA            | ADH1 (полная длина)<br>CYH2<br>AC: <a href="#">U30496</a>             |
| pAS2-1                | <i>TRP1</i>      | GAL4DB                 | ADH1 (полная длина)<br>CYH2<br>AC: <a href="#">U30497</a>             |
| pGAD2F                | <i>LEU2</i>      | GAL4AD                 | Исходный вектор, 13 кб                                                |
| pGAD424               | <i>LEU2</i>      | GAL4AD                 | ADH1 (усеченный)<br>AC: <a href="#">U07647</a>                        |
| pGAD10                | <i>LEU2</i>      | GAL4AD                 | ADH1 (усеченный)<br>AC: <a href="#">U13188</a>                        |
| pGAD-GL               | <i>LEU2</i>      | GAL4AD                 | ADH1 (усеченный)                                                      |
| pGAD-GH               | <i>LEU2</i>      | GAL4AD                 | ADH1 (полная длина)                                                   |
| pGAD1318              | <i>LEU2</i>      | GAL4AD                 | ADH1 (полная длина)                                                   |
| pSE1107               | <i>LEU2</i>      | GAL4AD                 |                                                                       |
| pSD-10                | <i>URA3</i>      | VP16AD                 |                                                                       |
| pACT1                 | <i>LEU2</i>      | GAL4AD                 |                                                                       |
| pACT2                 | <i>LEU2</i>      | GAL4AD + HA            | ADH1 (усеченный),<br>средняя экспрессия<br>AC: <a href="#">U29899</a> |

|                       |               |                               |                                                                            |
|-----------------------|---------------|-------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| <b>На основе LexA</b> |               |                               |                                                                            |
| pBTM116               | <i>TRP1</i>   | LexA                          | ADH1 (усеченный)                                                           |
| pLexA                 | <i>HIS3</i>   | LexA                          | ADH1 (полная длина)<br>= pEG202                                            |
| pB42AD                | <i>TRP1</i>   | B42 + SV40 NLS + HA           | GAL1 (полноразмерный),<br>индуцибельный промотор<br>= pJG4-5               |
| pHybLex /<br>Zeo      | <i>Зеоцин</i> | LexA                          | ADH1 (усеченный)                                                           |
| pYESTrp               | <i>TRP1</i>   | Эпитоп V5 + SV40 NLS +<br>B42 | GAL1 (полноразмерный),<br>индуцибельный промотор                           |
| pGilda                | <i>HIS3</i>   | LexA                          | GAL1 (полноразмерный), индуцибельный<br>промоторный<br>центромерный вектор |

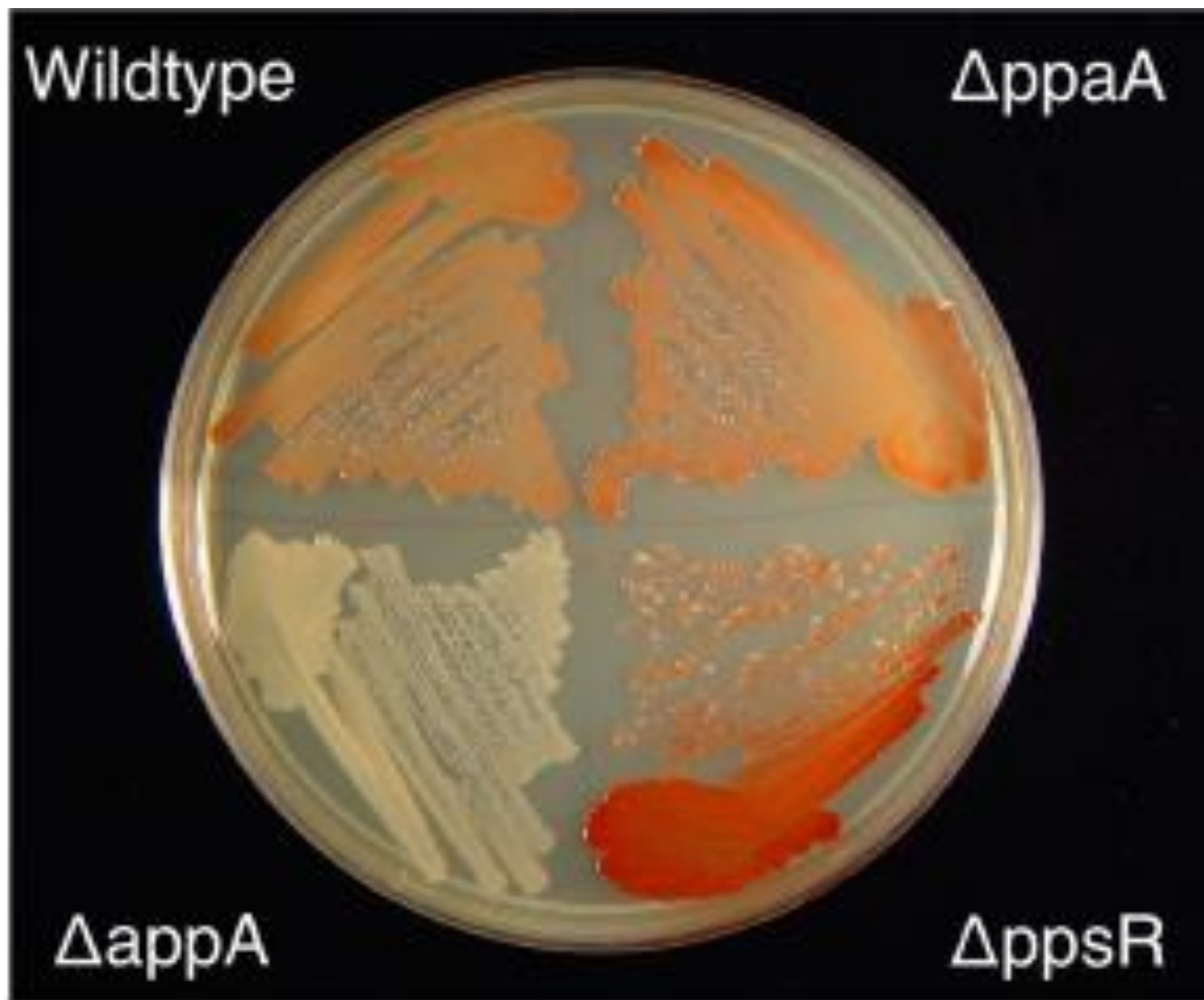
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC140126/>

# Обзор анализа Y2H: поиск взаимодействия между двумя белками



UAS - upstream activator sequence  
(последовательность активатора выше по течению)

## Пример анализа Y2H на селективной среде



## Фенотип штамма дрожжей (L40):

**MM:** синтетическая минимальная среда

**A:** аденин; **W:** триптофан; **L:** лейцин; **H:** гистидин

|        | MM<br>+<br>A,W,L, H | MM<br>+<br>A,W,L, (-H) | MM<br>+<br>A,L,H, (-W) | MM<br>+<br>W,L,H (-A) | MM<br>+<br>A,W,H, (-L) |
|--------|---------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|
| Growth | YES                 | NO                     | NO                     | NO                    | NO                     |

## Фенотип штамма дрожжей (L40):

**MM:** синтетическая минимальная среда

**A:** аденин; **W:** триптофан; **L:** лейцин; **H:** гистидин

|                                   | MM<br>+<br>A,W,L, (-H) | MM<br>+<br>A,L,H, (-W) | MM<br>+<br>W,L,H (-A) | MM<br>+<br>A,W,H, (-L) | MM<br>+<br>A, H, (-W,L) |
|-----------------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------|
| L40                               | –                      | –                      | –                     | –                      | –                       |
| L40 + p#1-<br>Bait                |                        |                        |                       |                        |                         |
| L40 + p#2-<br>Prey                |                        |                        |                       |                        |                         |
| L40 + p#1-<br>Bait + p#2-<br>Prey |                        |                        |                       |                        |                         |

## Фенотип штамма дрожжей (L40):

**ММ:** синтетическая минимальная среда

**А:** аденин; **W:** триптофан; **L:** лейцин; **H:** гистидин

|                                   | ММ<br>+<br>A,W,L, (-H) | ММ<br>+<br>A,L,H, (-W) | ММ<br>+<br>W,L,H (-A) | ММ<br>+<br>A,W,H, (-L) | ММ<br>+<br>A, H, (-W,L) |
|-----------------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------|
| L40                               | –                      | –                      | –                     | –                      | –                       |
| L40 + p#1-<br>Bait                | –                      | +                      | –                     | –                      | –                       |
| L40 + p#2-<br>Prey                |                        |                        |                       |                        |                         |
| L40 + p#1-<br>Bait + p#2-<br>Prey |                        |                        |                       |                        |                         |

## Фенотип штамма дрожжей (L40):

**ММ:** синтетическая минимальная среда

**А:** аденин; **W:** триптофан; **L:** лейцин; **H:** гистидин

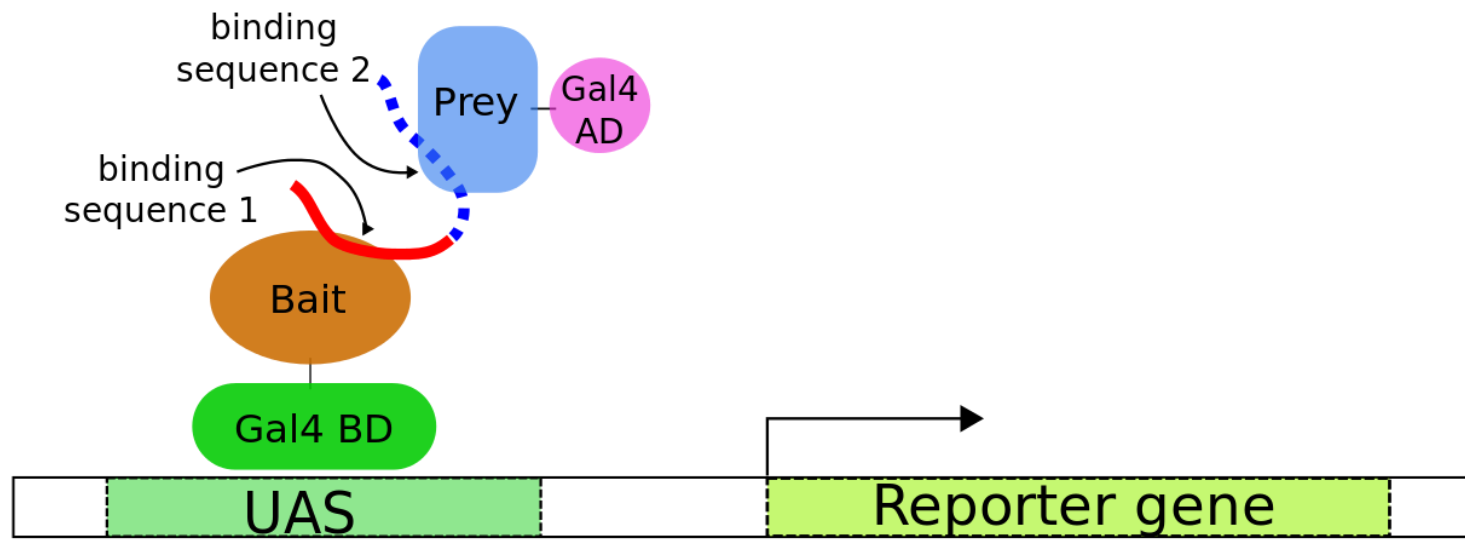
|                                   | ММ<br>+<br>A,W,L, (-H) | ММ<br>+<br>A,L,H, (-W) | ММ<br>+<br>W,L,H (-A) | ММ<br>+<br>A,W,H, (-L) | ММ<br>+<br>A, H, (-W,L) |
|-----------------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------|
| L40                               | –                      | –                      | –                     | –                      | –                       |
| L40 + p#1-<br>Bait                | –                      | +                      | –                     | –                      | –                       |
| L40 + p#2-<br>Prey                | –                      | –                      | –                     | +                      | –                       |
| L40 + p#1-<br>Bait + p#2-<br>Prey |                        |                        |                       |                        |                         |

## Фенотип штамма дрожжей (L40):

**ММ:** синтетическая минимальная среда

**А:** аденин; **W:** триптофан; **L:** лейцин; **H:** гистидин

|                                   | ММ<br>+<br>A,W,L, (-H) | ММ<br>+<br>A,L,H, (-W) | ММ<br>+<br>W,L,H (-A) | ММ<br>+<br>A,W,H, (-L) | ММ<br>+<br>A, H, (-W,L) |
|-----------------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------|
| L40                               | –                      | –                      | –                     | –                      | –                       |
| L40 + p#1-<br>Bait                | –                      | +                      | –                     | –                      | –                       |
| L40 + p#2-<br>Prey                | –                      | –                      | –                     | +                      | –                       |
| L40 + p#1-<br>Bait + p#2-<br>Prey | –                      | +                      | –                     | +                      | +                       |



**A**

– Leu

**B**

+ X-Gal

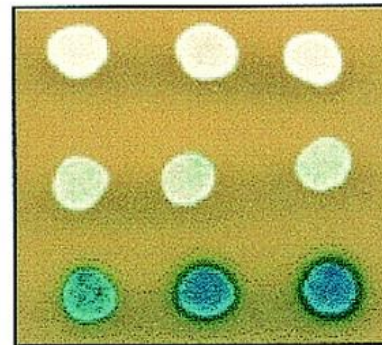
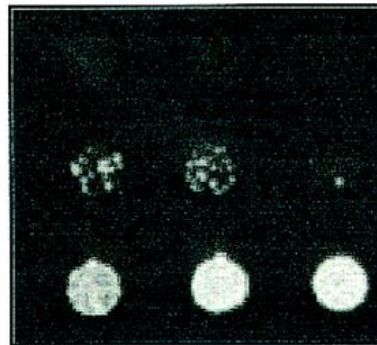
**C**

$\beta$ -Galactosidase activity

DBD-GlnB  $\times$  AD

DBD  $\times$  AD-NtrB

DBD-GlnB  $\times$  AD-NtrB



**2**

**9**

**1388**

DDO

QDO

QDO/X/A

BD-AH05NP  
AD-PLSCR1

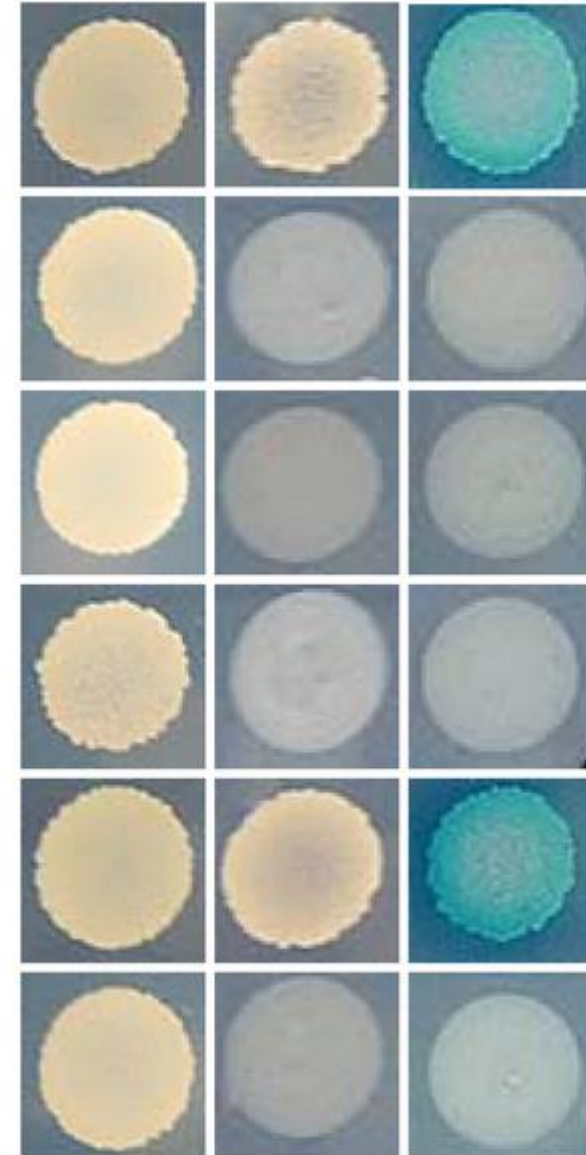
BD  
AD-PLSCR1

BD-AH05NP  
AD

BD  
AD

BD-p53  
AD-T

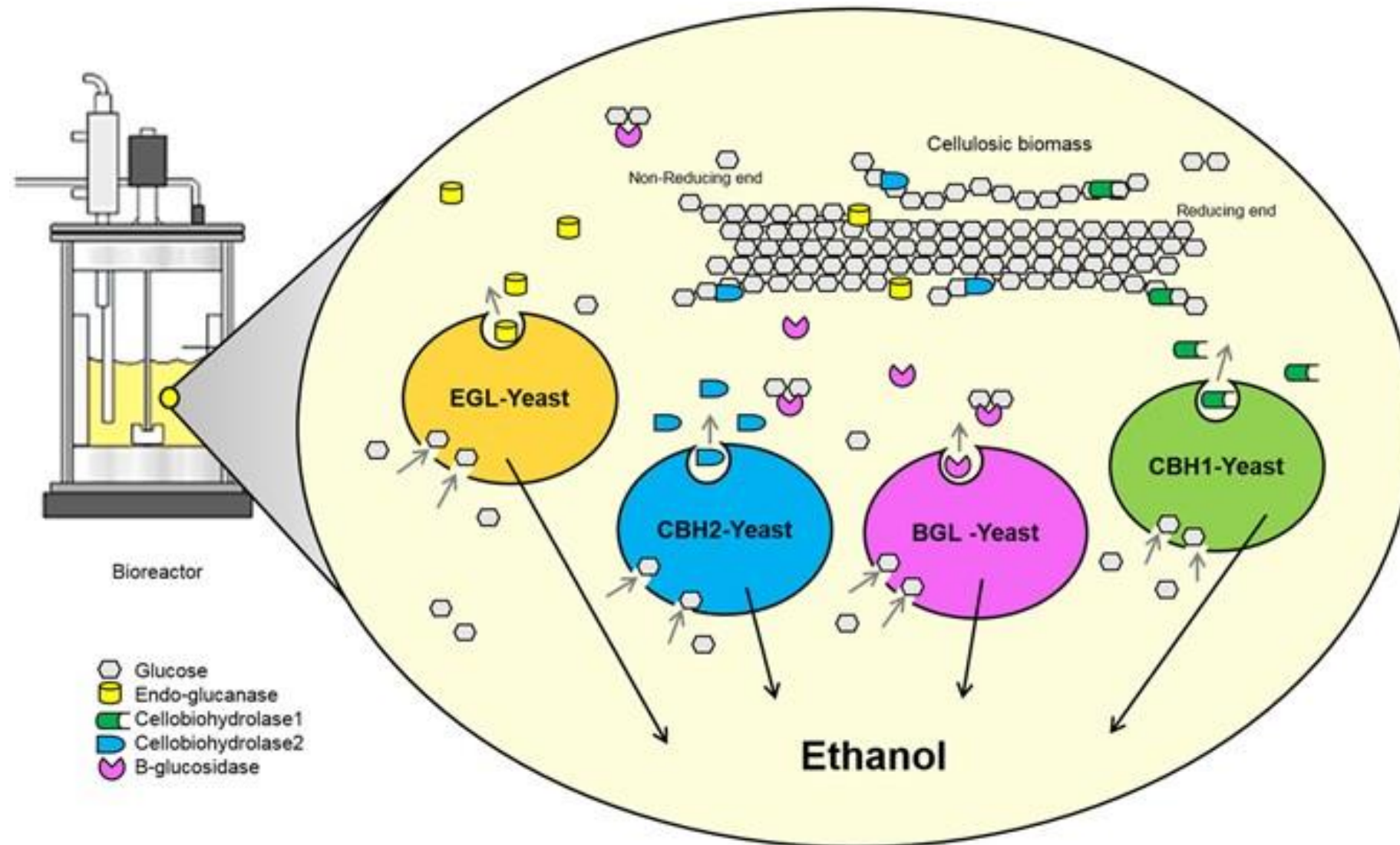
BD-Lam  
AD-T



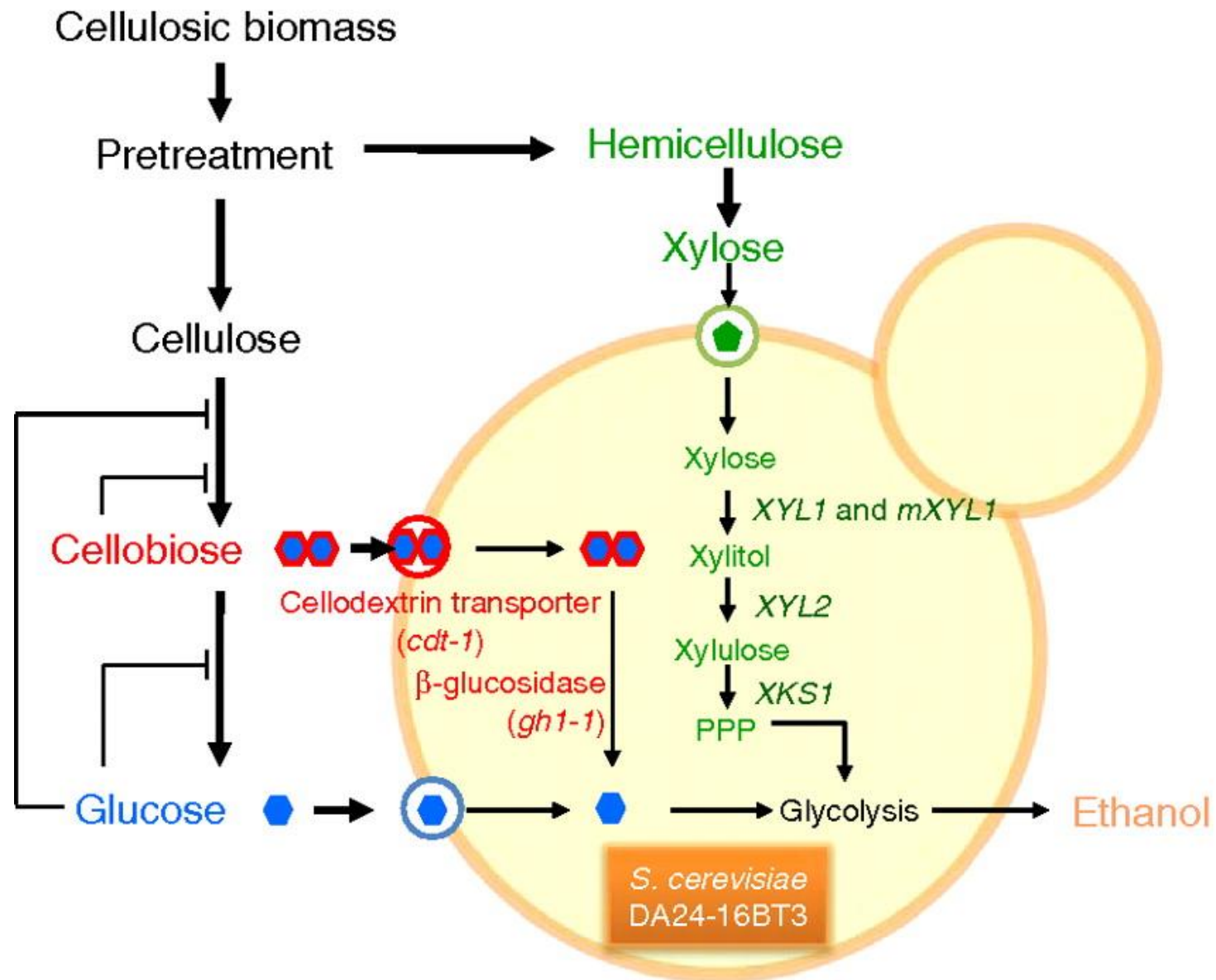
# Метаболическая инженерия

- Метаболическая инженерия, то есть целенаправленное перенаправление метаболических потоков, сыграла исключительную роль в улучшении штаммов дрожжей для всех упомянутых выше промышленных применений.
- В отличие от классических методов генетического улучшения штаммов, таких как селекция, мутагенез, скрещивание и гибридизация, метаболическая инженерия обеспечивает два основных преимущества: (i) направленную модификацию штаммов без накопления нежелательных мутаций и (ii) введение генов чужеродных организмов для придания *S. cerevisiae* новых свойств.
- Последнее особенно важно для промышленной биотехнологии, поскольку открывает пути расширения спектра используемых промышленных сред (например, лигноцеллюлозной биомассы) и/или для получения соединений, которые *S. cerevisiae* в природе не образуют.

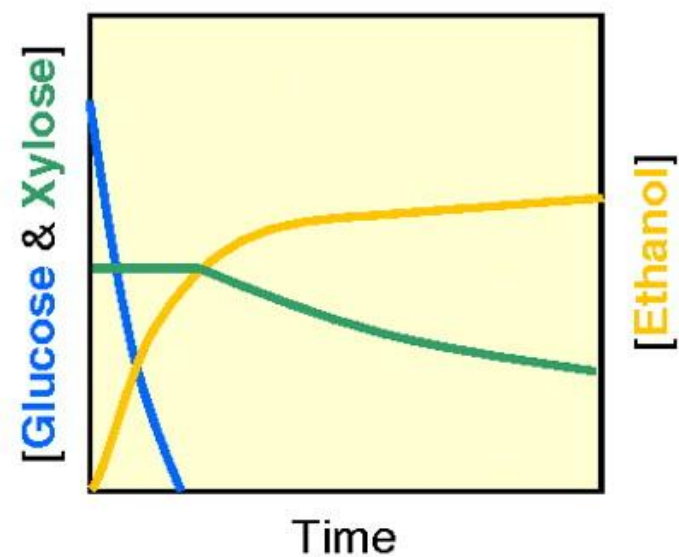
# Производство этанола



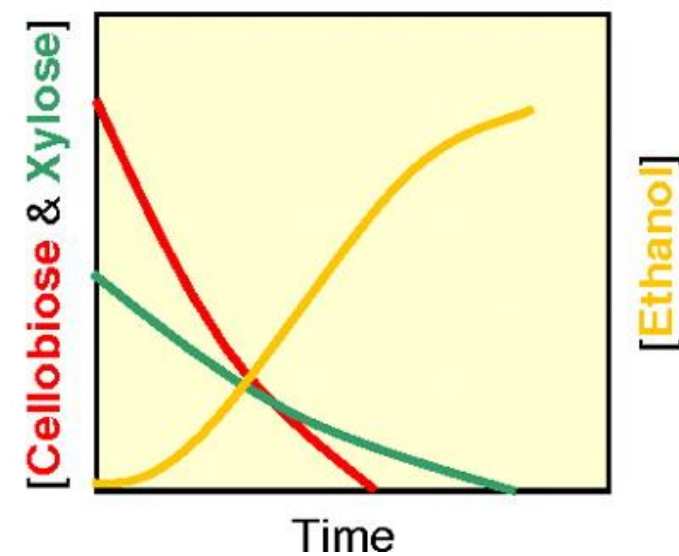
A



B



C



# Комплементационные анализы мутантов дрожжей.

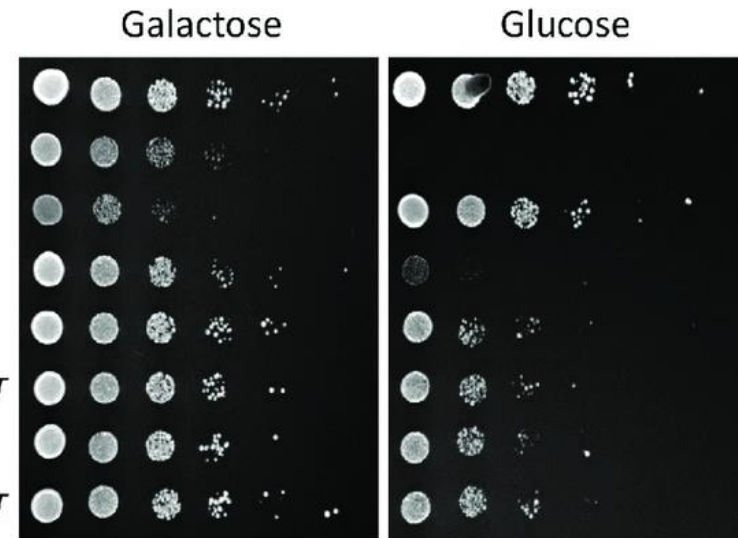
А. Комплементационный анализ мутанта дрожжей *tps1Δ tps2Δ*. В. Комплементационный анализ одного мутанта *tps1Δ*. W303-1A — контроль дикого типа, способный расти как на галактозе, так и на глюкозе.

В. Эта мутация приводит к нарушению роста на глюкозе. Столбцы представляют десятикратные серийные разведения.

doi:10.1371/journal.pone.0168075.g003

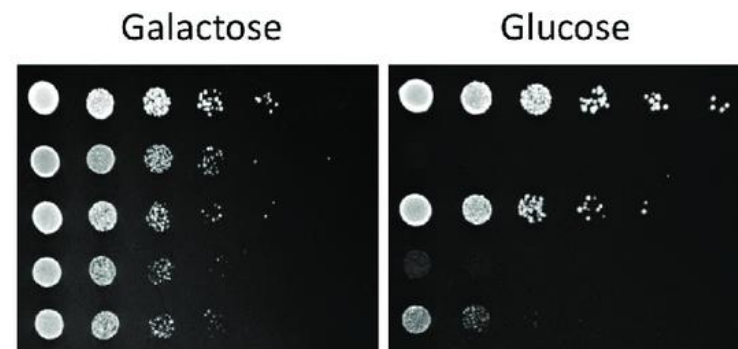
А

W303-1A + pURA3ΔNLS  
*tps1Δ tps2Δ* + pURA3ΔNLS  
*tps1Δ tps2Δ* + *ScTPS1*  
*tps1Δ tps2Δ* + *AcTPS1.1a*  
*tps1Δ tps2Δ* + *AcTPS1.2a*  
*tps1Δ tps2Δ* + *AcTPS1.2a EXT*  
*tps1Δ tps2Δ* + *AcTPS1.2b*  
*tps1Δ tps2Δ* + *AcTPS1.2b EXT*



В

W303-1A + pURA3ΔNLS  
*tps1Δ* + pURA3ΔNLS  
*tps1Δ* + *ScTPS1*  
*tps1Δ* + *AcTPS1.1a*  
*tps1Δ* + *AcTPS1.2a*



# Системы отображения дрожжей

Новые системы отображения на основе *S. cerevisiae* позволяют устранить недостатки ранее упомянутых систем экспрессии благодаря ряду ключевых факторов:

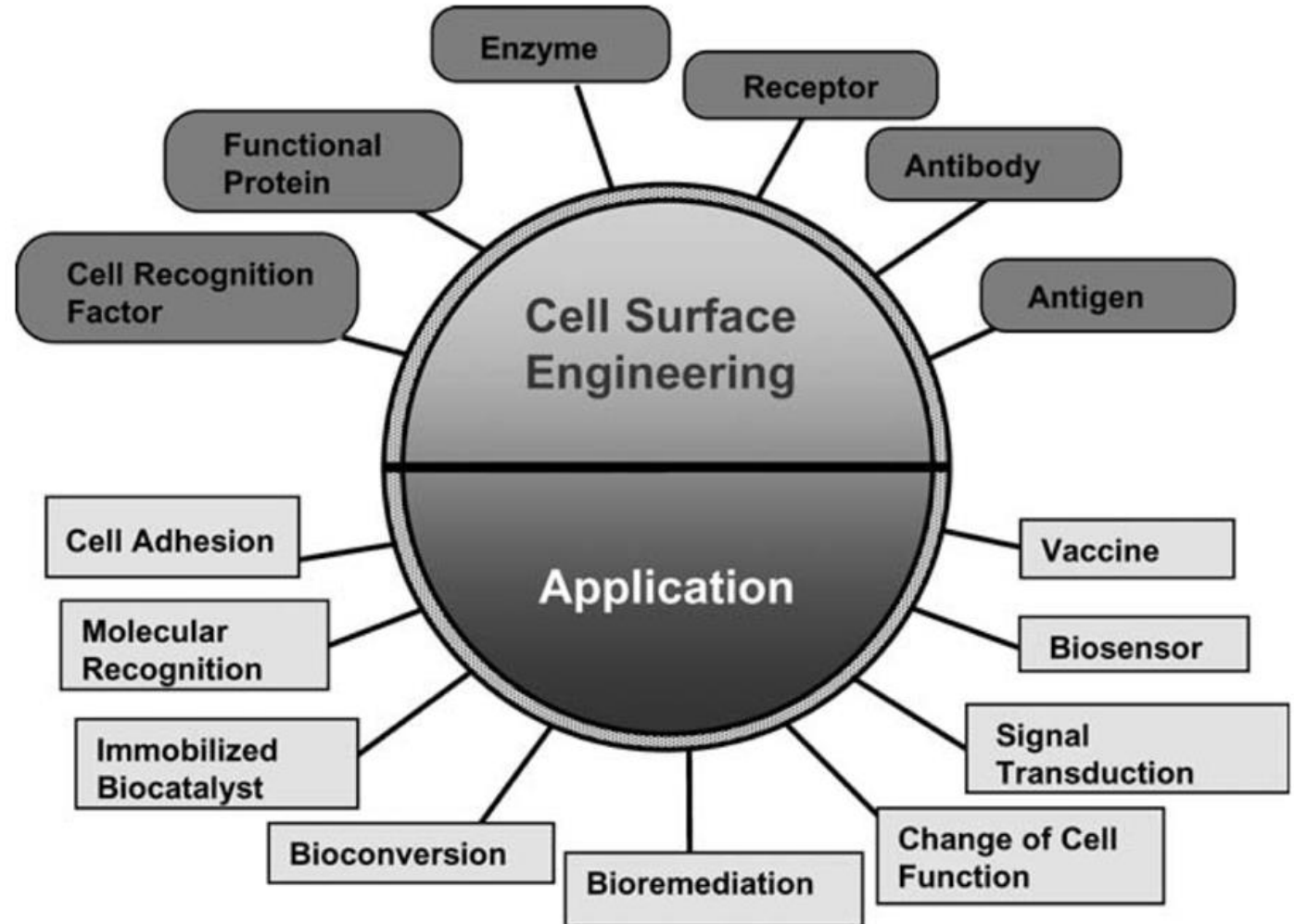
- Удобный хозяин для генной инженерии
- Гибкость к различным генетическим манипуляциям
- Жесткость структуры клеточной стенки
- Простота культивирования в недорогой среде

Дрожжи имеют жёсткую клеточную стенку, состоящую из  $\beta$ -связанных глюканов и маннопротеинов.

Наличие GPI (гликозилфосфатидилинозитольных) якорей играет важную роль в отображении гетерологичных белков.

**Fig. 1** Yeast cell-surface engineering and its application to biotechnology

# Возможные варианты использования YSDS



(Kondo and Ueda, 2004)

# Характеристика структуры поверхности дрожжей

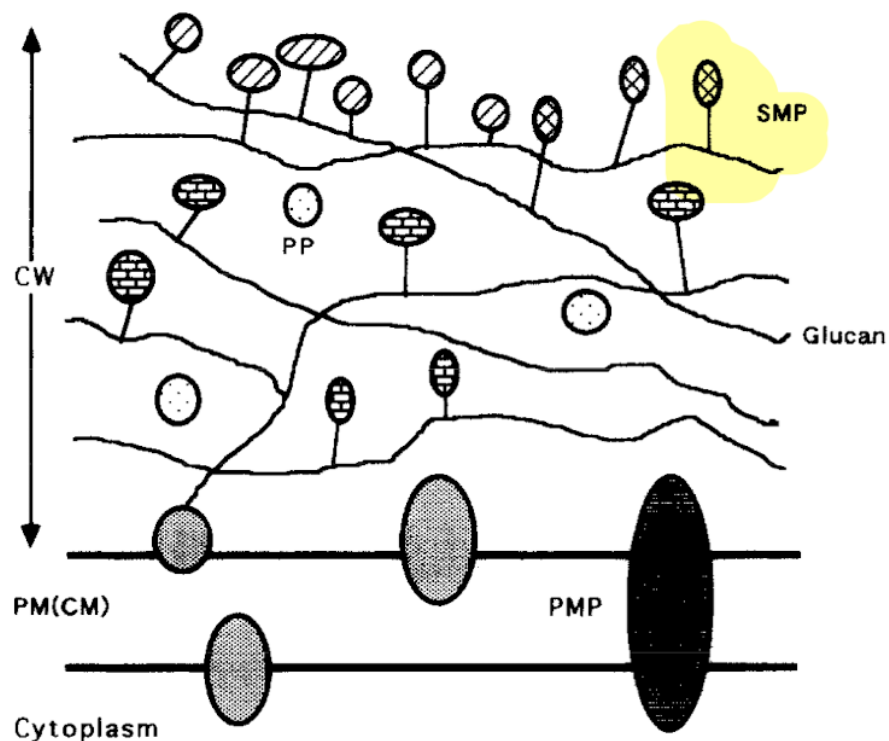


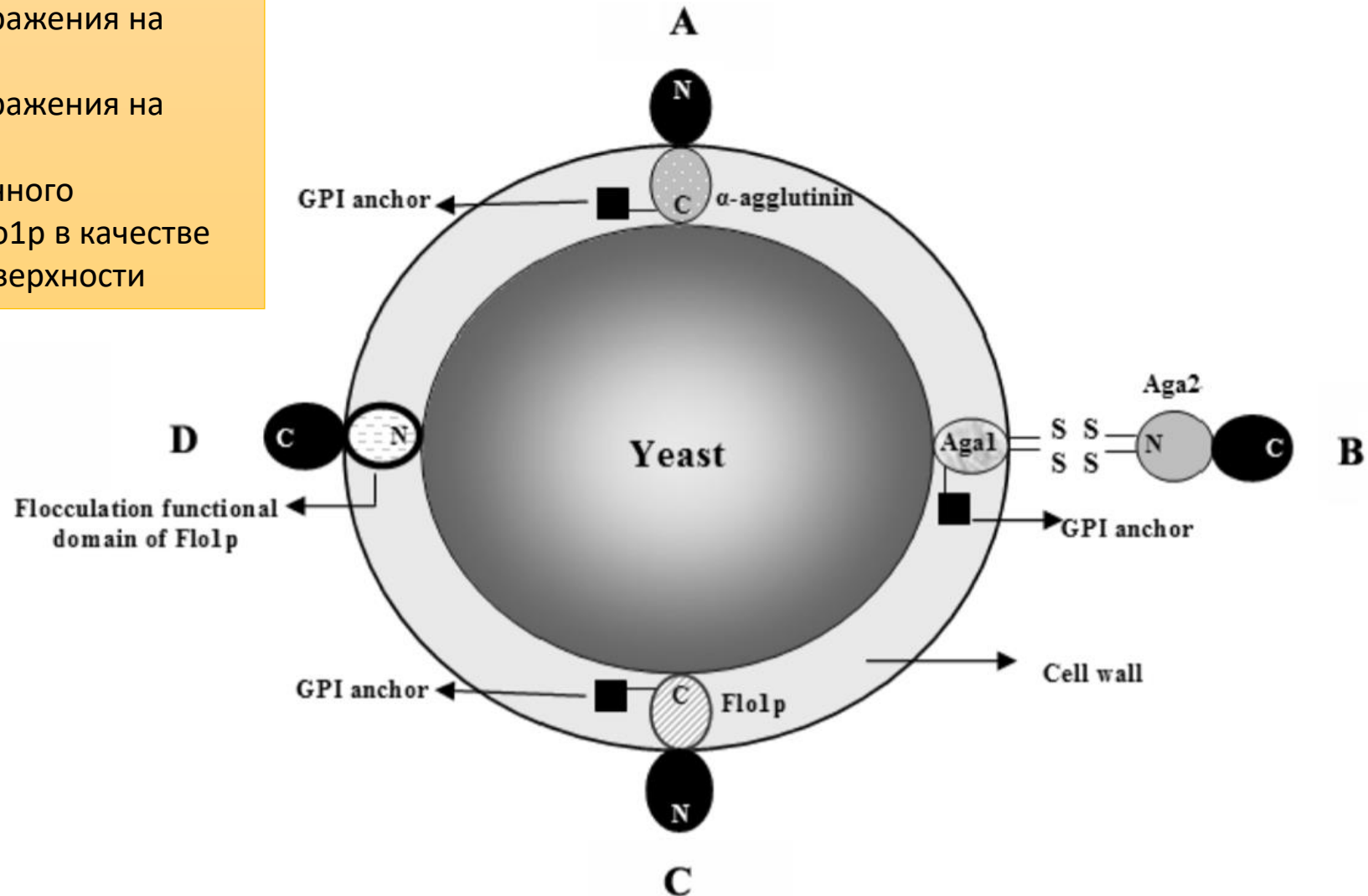
FIG. 2. Structure of cell surface of *S. cerevisiae*. The cell surface is composed of a cell wall (CW) and plasma membrane (PM or CM (cell membrane)). PMP, plasma membrane protein; PP, SDS-extractable periplasmic protein; SMP, glucanase-extractable surface-layer mannoprotein.

Поверхностные белки делятся на две группы: SDS – экстрагируемые маннопротеины (слабо ассоциированные) маннопротеины, экстрагируемые глюканазой

Агглютинины – это белки, экстрагируемые глюканазой, которые опосредуют межклеточную адгезию у *S. cerevisiae*.

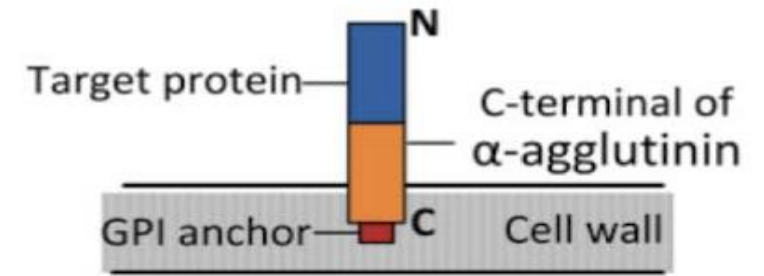
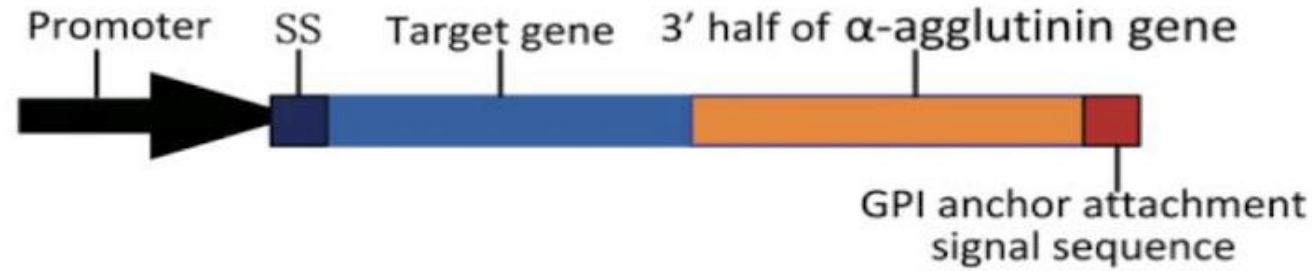
## Типы систем отображения на поверхности дрожжей

1. Использование систем отображения на основе  $\alpha$ -агглютина
2. Использование систем отображения на основе  $\alpha$ -агглютина
3. Использование систем отображения на основе Flo1p
4. Использование флокуляционного функционального домена Flo1p в качестве системы отображения на поверхности

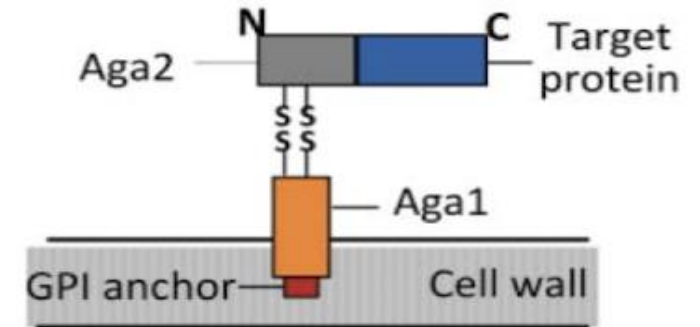
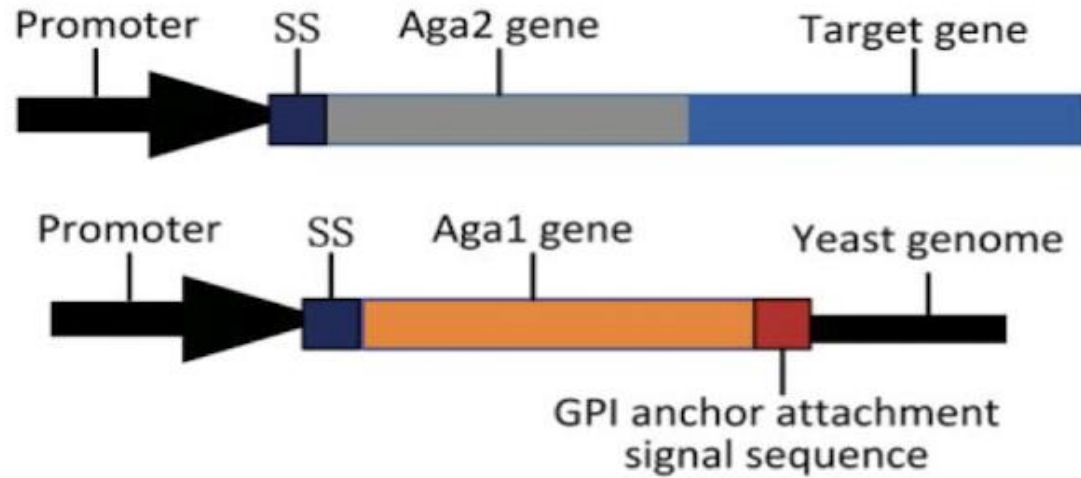


**Figure 3.** Yeast surface display systems. A:  $\alpha$ -agglutinin system, B:  $\alpha$ -agglutinin system, C: Flo1p system and D: flocculation domain of Flo1p. Black ovals are passenger proteins.

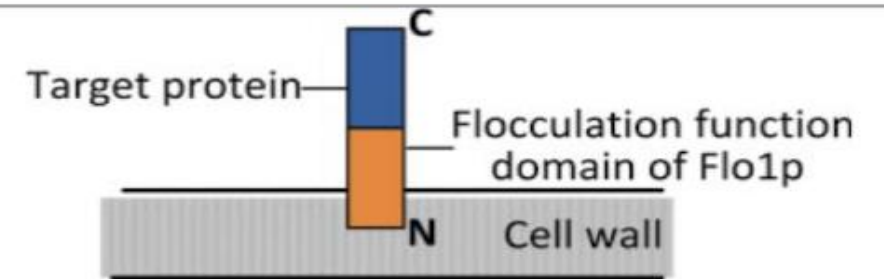
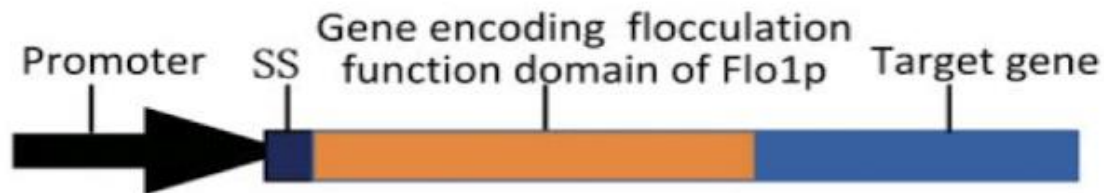
(a)

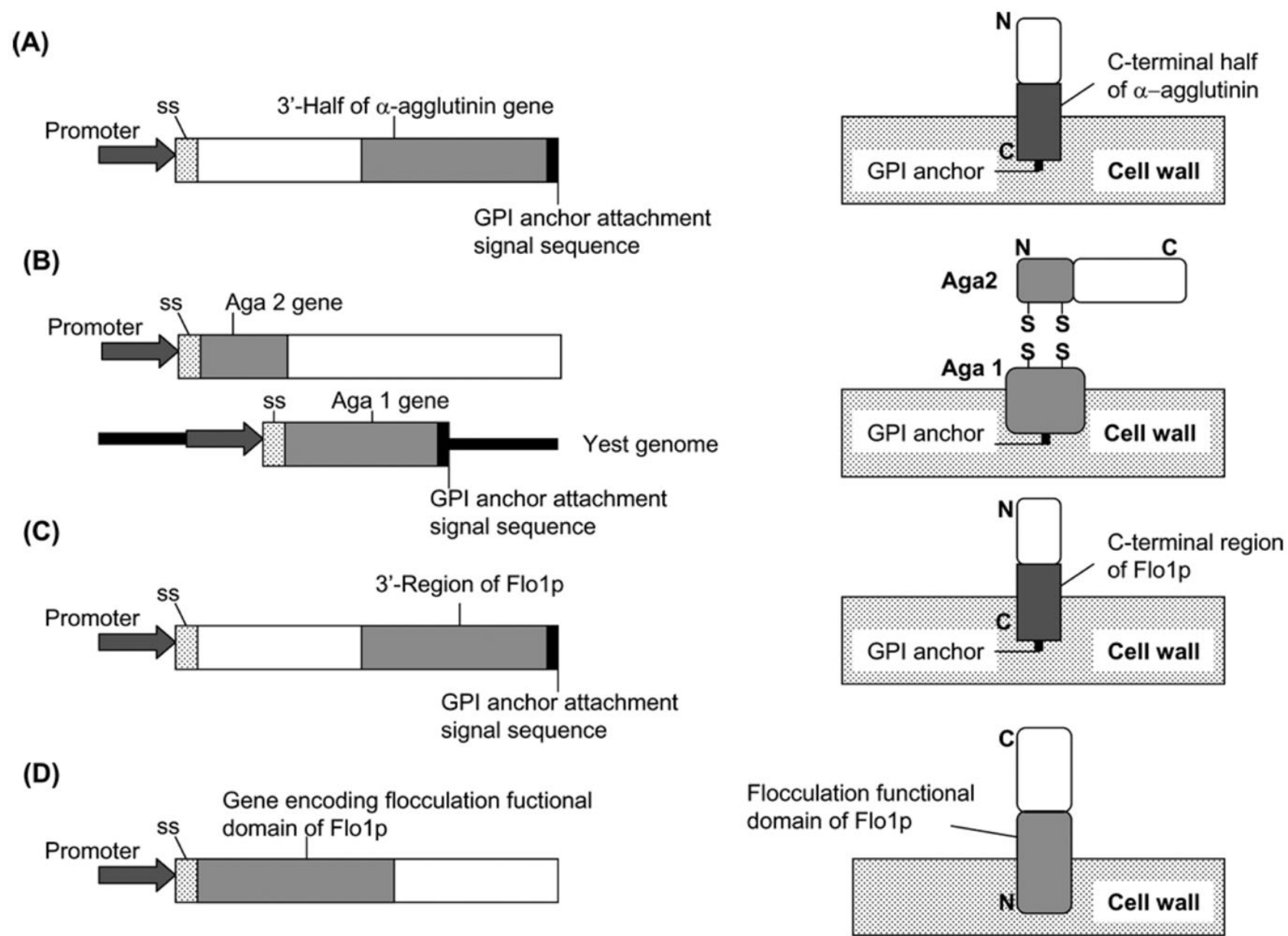


(b)

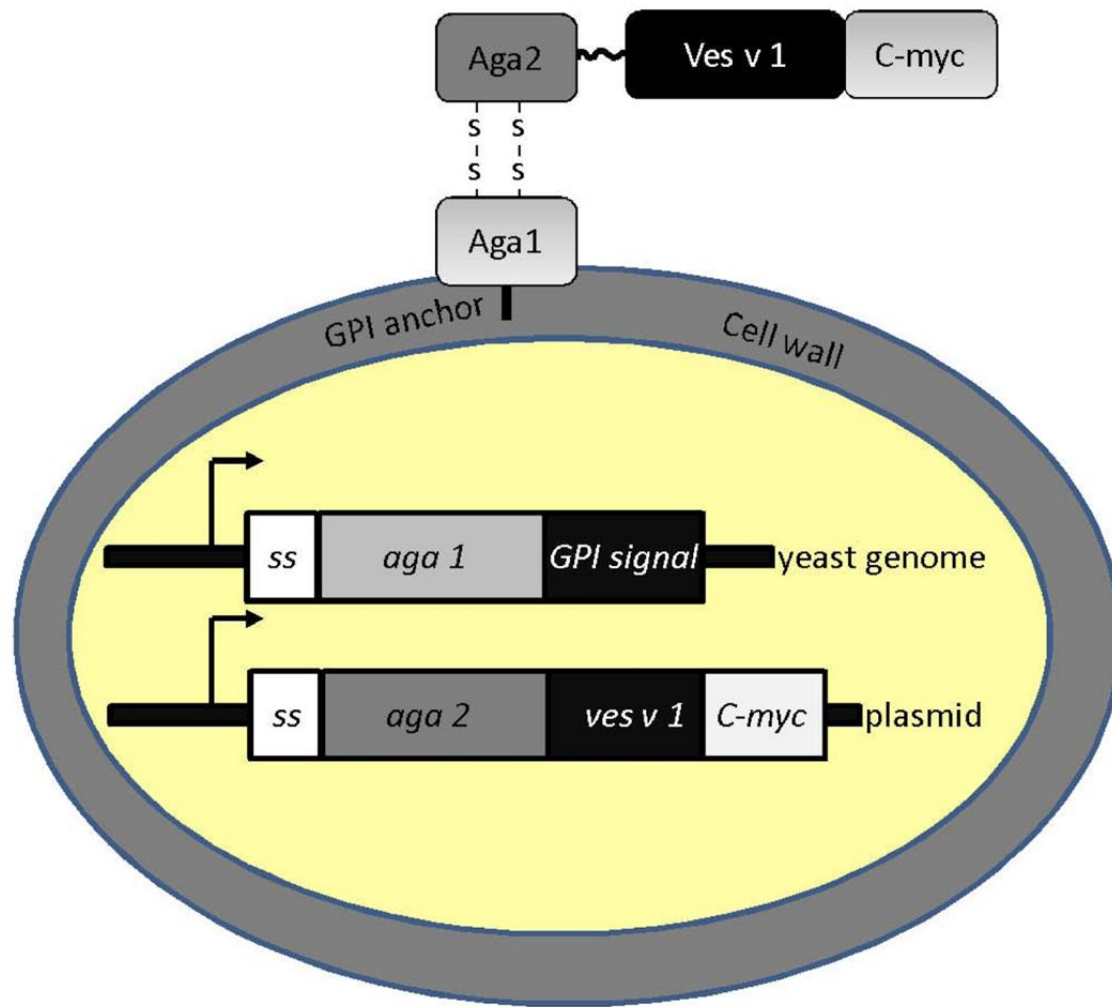


(c)



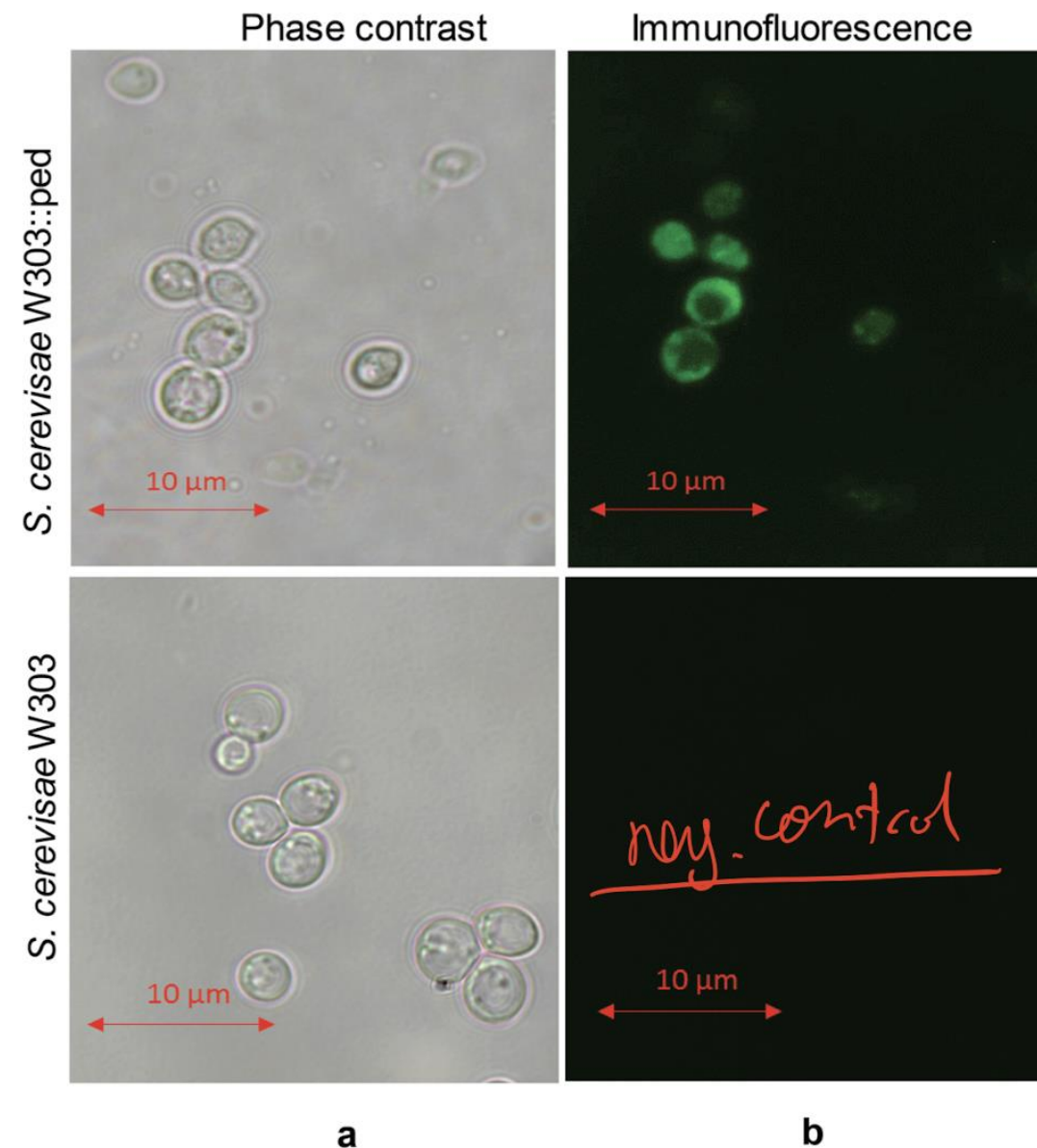
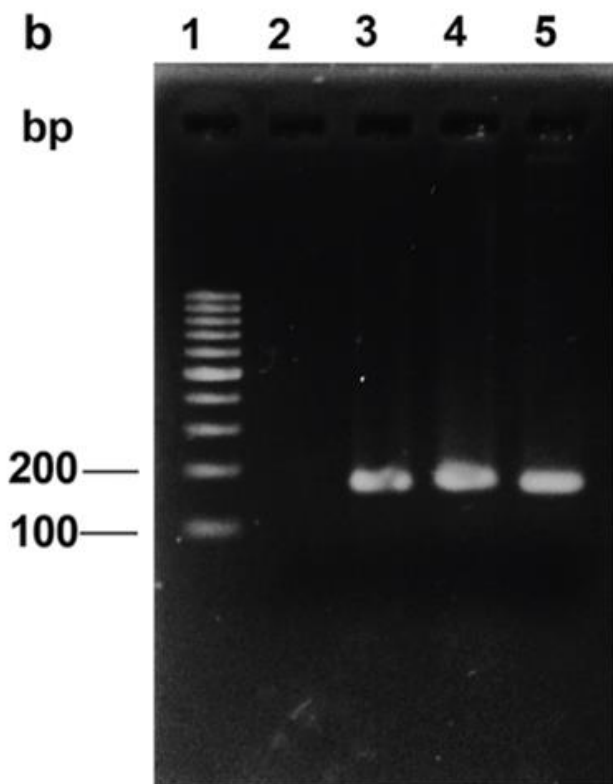
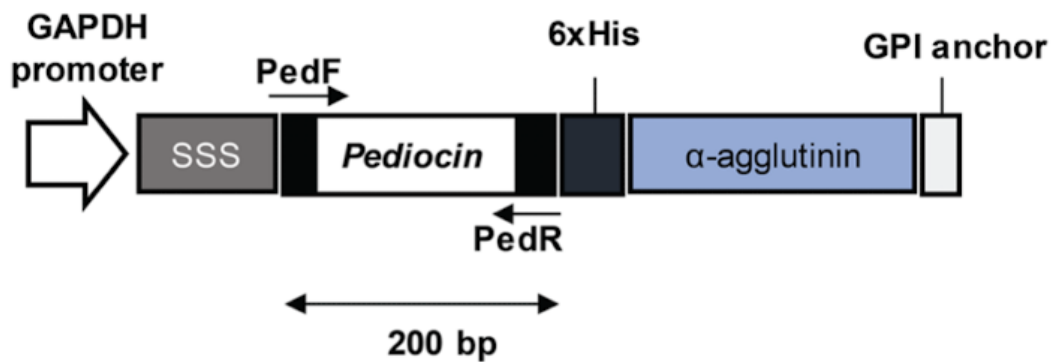


**Fig. 2** Yeast cell surface display systems using **A**  $\alpha$ -agglutinin, **B**  $\alpha$ -agglutinin, **C** C-terminus region of Flo1p, and **D** N-terminus flocculation function domain of Flo1p

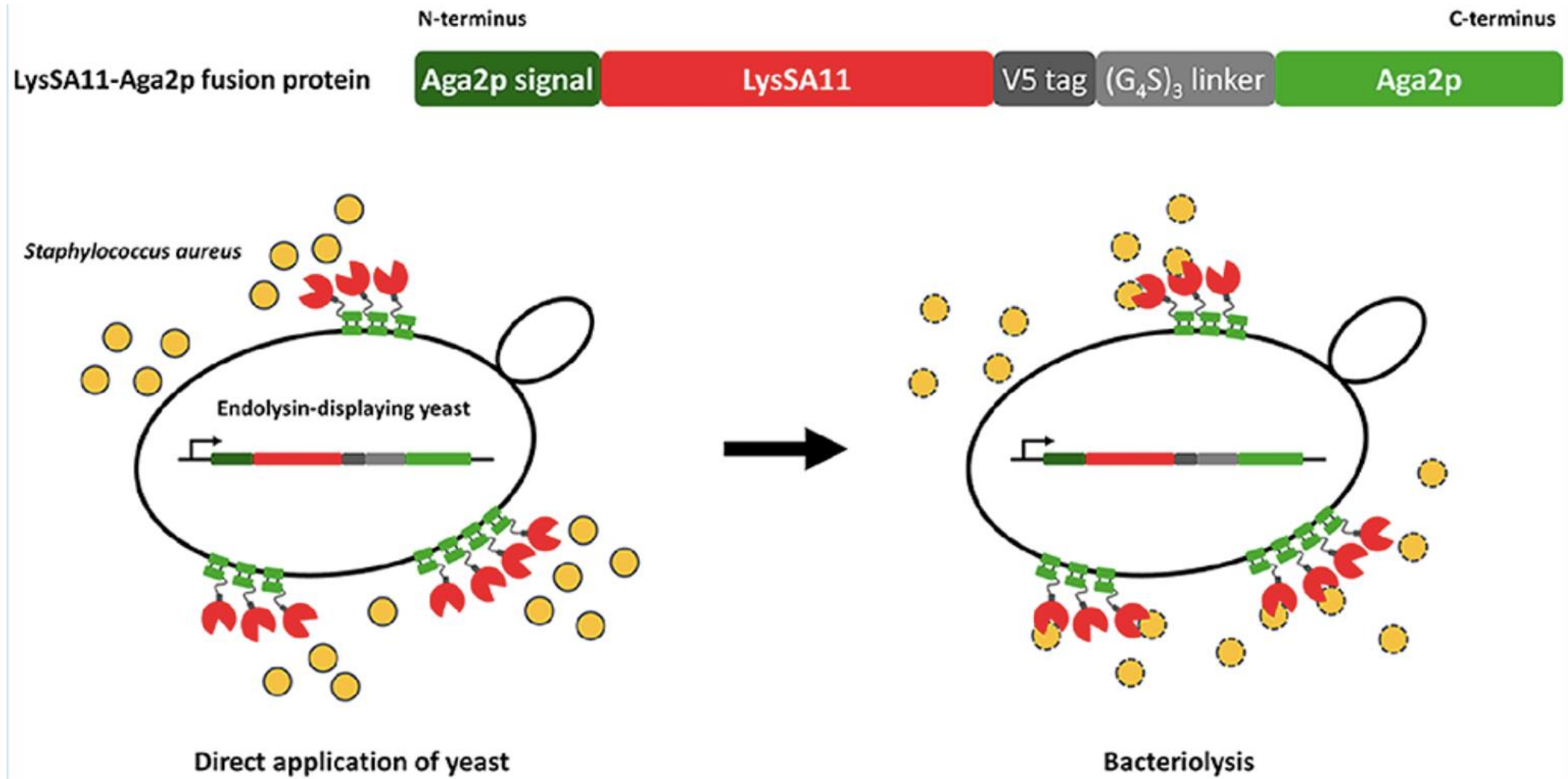


**Figure 1 The principle of surface display using a-agglutinin system.** The allergen of interest (here shown *ves v 1*) is cloned in-frame with *aga2* gene and introduced into a yeast strain that can overexpress *aga1* gene. The resulting proteins, *Aga1* and *Aga2*-allergen fusion, get connected by disulfide bonds in the secretion process and are exported together on the surface of the cell where *Aga1* remains attached to the cell wall by the glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor.

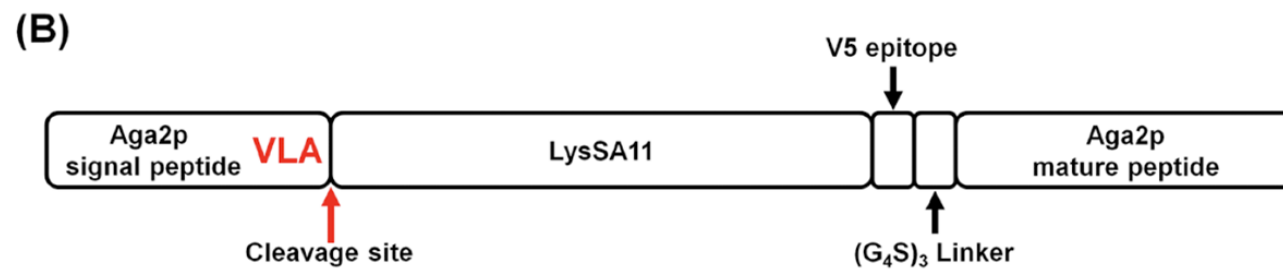
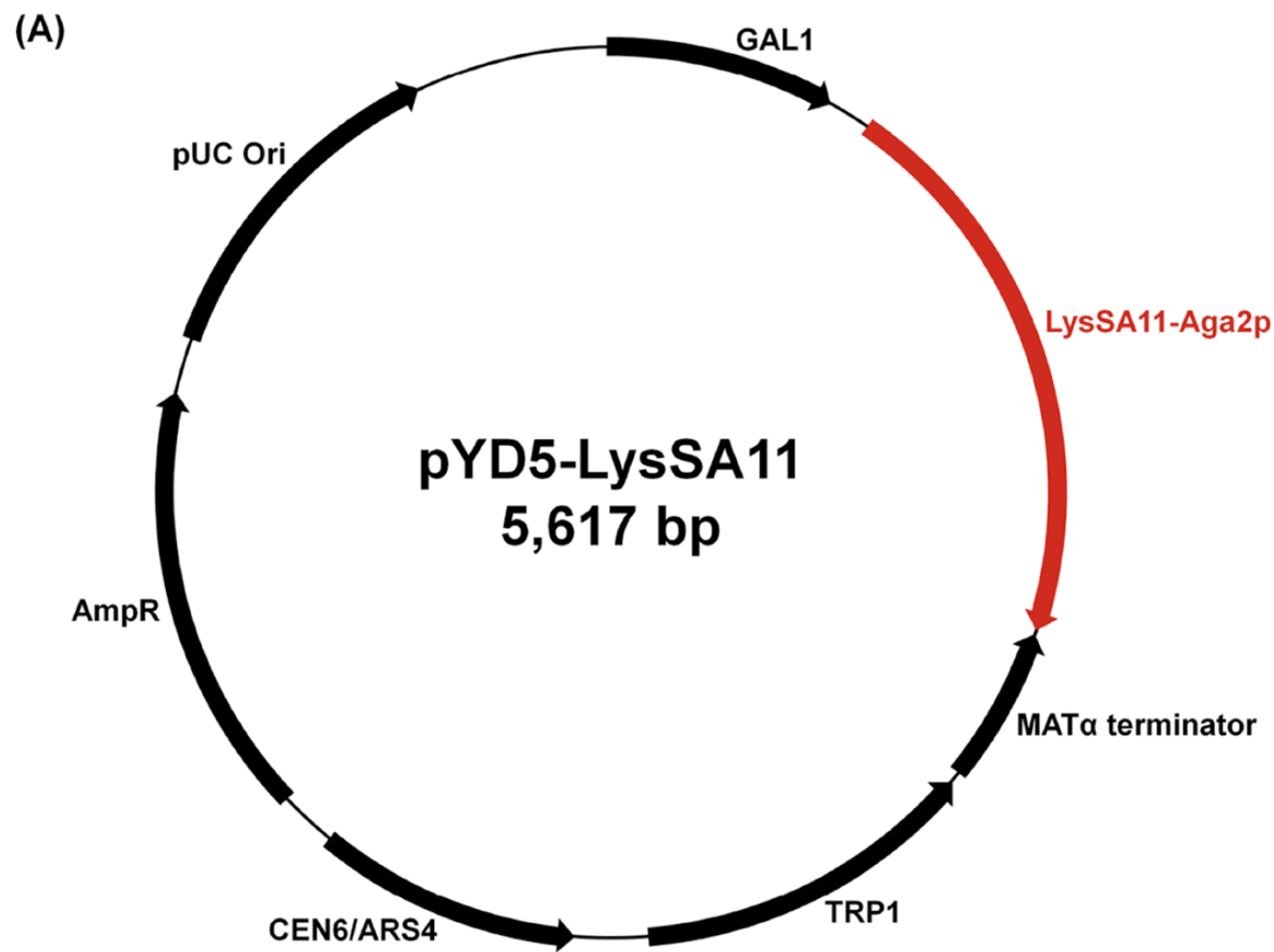
Штаммы EBY100 —  
сверхэкспрессия *aga1*



(Nguyen et al, 2020)



(Chun et al, 2020)



(Chun et al, 2020)

# Список Литературы

- 1.Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рафф М., Робертс К., Уотсон Дж. *Молекулярная биология клетки*. (В 3-х томах). Перевод с английского. **5-е или 6-е издание**. Москва: Лаборатория знаний (ранее БИНОМ). Года выпуска: **2013–2020**.
- 2.Уотсон Дж. Д., Бекер Т. А., Майерс Р. А., Уейнер А. М. *Молекулярная биология гена*. (Перевод с английского). **7-е издание** или более позднее. Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний. Года выпуска: **2014–2020**.
- 3.Глик Б. Р., Пастернак Дж. Дж. *Молекулярная биотехнология. Принципы и применение*. (Перевод с английского). **2-е или 3-е издание**. Москва: Мир. Года выпуска: **2002–2014**.
- 4.Сингер М., Берг П. *Гены и геномы*. (Перевод с английского). Москва: Мир. Год выпуска: **1998** (и более поздние переиздания).
- 5.Щелкунов С. Н. *Генетическая инженерия*. Учебное пособие. Москва: РИЦ НГУ / ИНФРА-М. Года выпуска: **2004** (и последующие переиздания).