

Генетика микроорганизмов. Основы биотехнологии.

План лекции

- Особенности генетики бактерий.
- Плазмиды, транспозоны, Is-элементы.
- Формы изменчивости микроорганизмов.
- Типы рекомбинаций и их характеристика.
- Особенности генетики вирусов.
- Генетические методы, применяемые в диагностике инфекционных болезней.
- Биотехнология: разделы, достижения и перспективы.

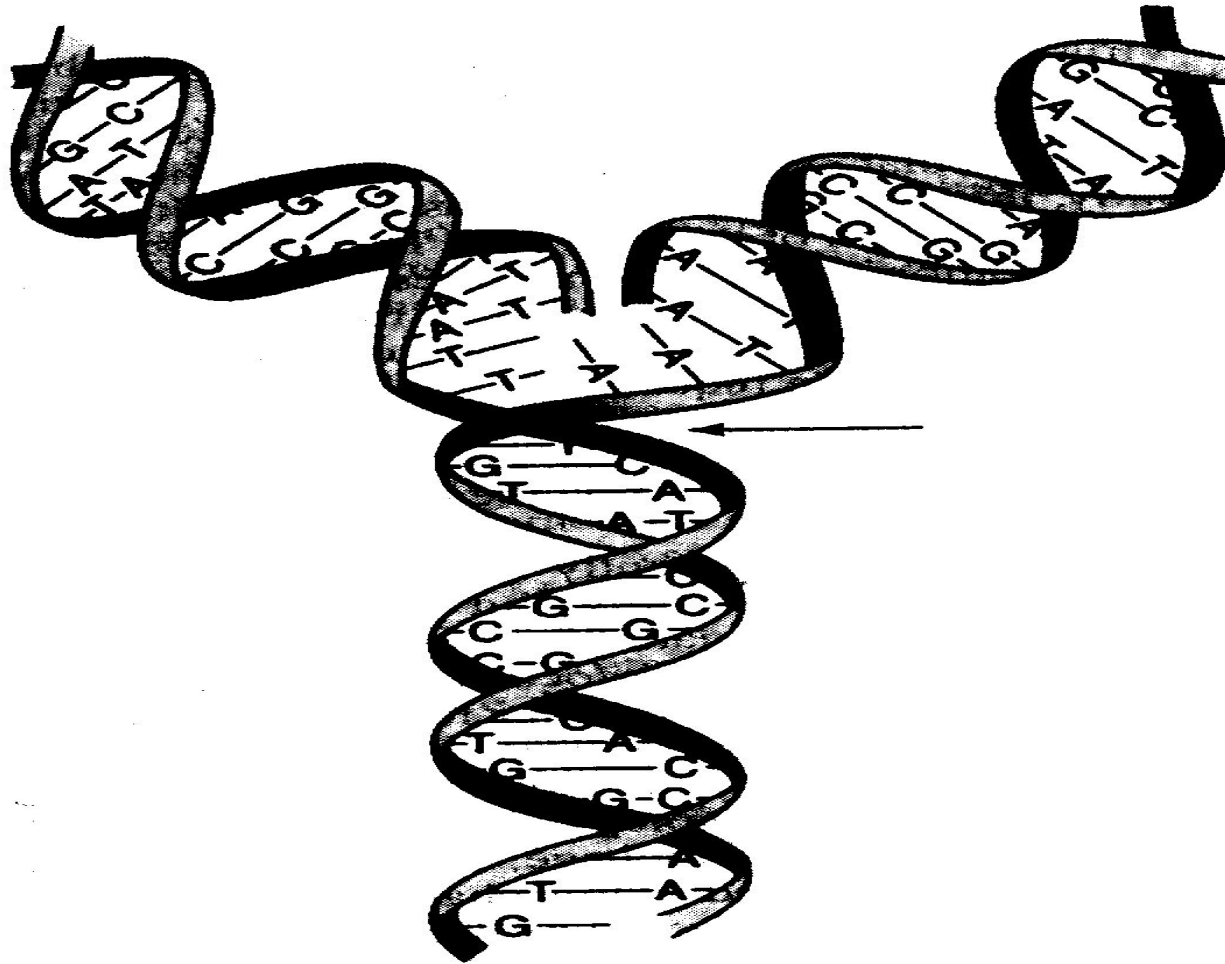
Особенности генетики бактерий

1. Хромосома находится в суперспирализованной форме и свободно располагается в цитоплазме.
2. Бактерии имеют гаплоидный набор, но содержание ДНК у них непостоянно.
3. Передача генетической информации происходит как по вертикали, так и горизонтали.
4. Очень часто помимо хромосомного гена имеется дополнительный плазмидный геном.

Модули генома бактерий

1. Хромосома (нуклеоид).
2. Плазмиды.
3. Умеренные бактериофаги.
4. Транспозоны.
5. Is-элементы.

Строение ДНК



Плазмиды и свойства бактерий - носителей плазмид

Категории

F-плазмиды

R-плазмиды

Col-плазмиды

Ent-плазмиды

Нly-плазмиды

Биодеградивные
плазмиды

Криптические плазмиды

Свойства

Донорные функции

Антибиотикоустойчивость

Синтез колицинов

Синтез энтеротоксинов

Синтез гемолизинов

Расщепление органических
и неорганических соединений

Неизвестны

Свойства плазмид

1. Саморегулируемая репликация.
2. Явление поверхностного исключения.
3. Явление несовместимости.
4. Контроль числа копий плазмид.
5. Контроль стабильного поддержания.
6. Контроль равномерного распределения дочерних плазмид в дочерние бактериальные клетки.
7. Способность к самопереносу.
8. Способность к мобилизации на перенос.
9. Способность наделять клетку хозяина дополнительными биологическими свойствами.

Транспозоны – участки ДНК, свободно перемещающиеся вдоль хромосомы бактерий и способные внедряться и выходить из неё. В своём составе они имеют гены, обеспечивающие транспозицию, и структурные гены.

Характеристика транспозонов.

1. Состоят из 2000 – 25000 пар нуклеотидов.
2. При включении в ДНК вызывают в ней дупликацию, а при перемещении – делеции и инверсии.
3. Могут находиться в свободном состоянии в виде кольцевой молекулы.
4. Реплицируются только в составе хромосомы бактерий.
5. Способны к перемещению с хромосомной ДНК в плазмиду и наоборот.

Is-последовательности – простейший тип мигрирующих элементов (фрагменты ДНК длиной 1000 пар нуклеотидов).

Is-последовательности самостоятельно не реплицируются и содержат информацию, необходимую только для их транспозиции.

Основные функции Is-последовательностей.

1. Координация взаимодействия транспозонов, плазмид и умеренных бактериофагов как между собой, так и с хромосомой бактериальной клетки.
2. «Выключение» гена или функция промотора.
3. Индуцирование мутаций типа делеций или инверсий при перемещении и дупликации при встраивании в хромосому.

Формы изменчивости микроорганизмов

- **Фенотипическая
(модификации)**

1. Кратковременные
2. Длительные

- **Генотипическая**

1. Мутации
2. Рекомбинации

Классификация мутаций

1. По происхождению:

- 1) спонтанные;
- 2) индуцированные.

2. По протяжённости изменений повреждения ДНК:

- 1) точечные;
- 2) протяжённые (абerrации).

3. По количеству мутировавших генов:

- 1) генные (чаще всего точечные):
 - а) прямые;
 - б) обратные;
- 2) хромосомные:
 - а) делеции;
 - б) инверсии;
 - в) дупликации.

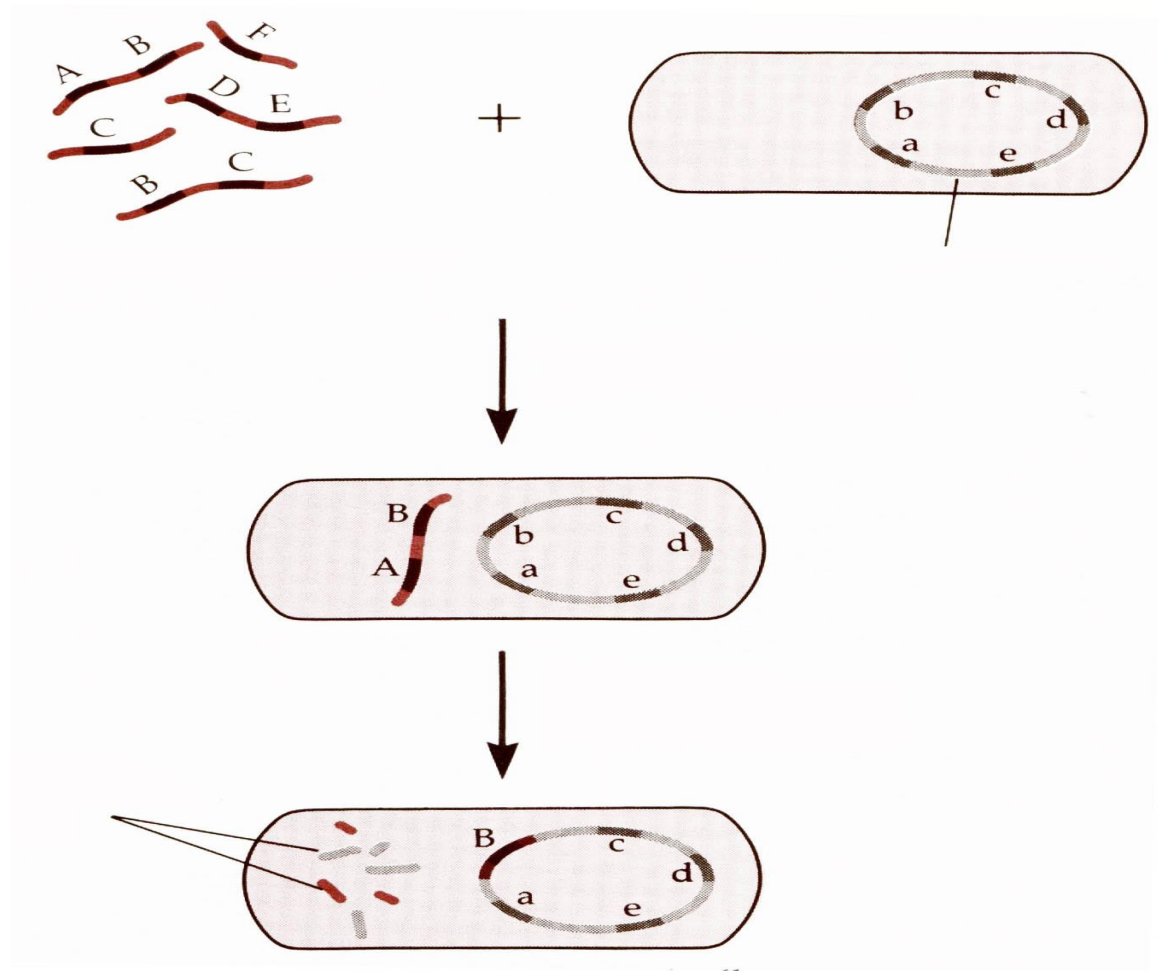
3. По фенотипическим последствиям:

- 1) нейтральные;
- 2) условно-летальные;
- 3) летальные.

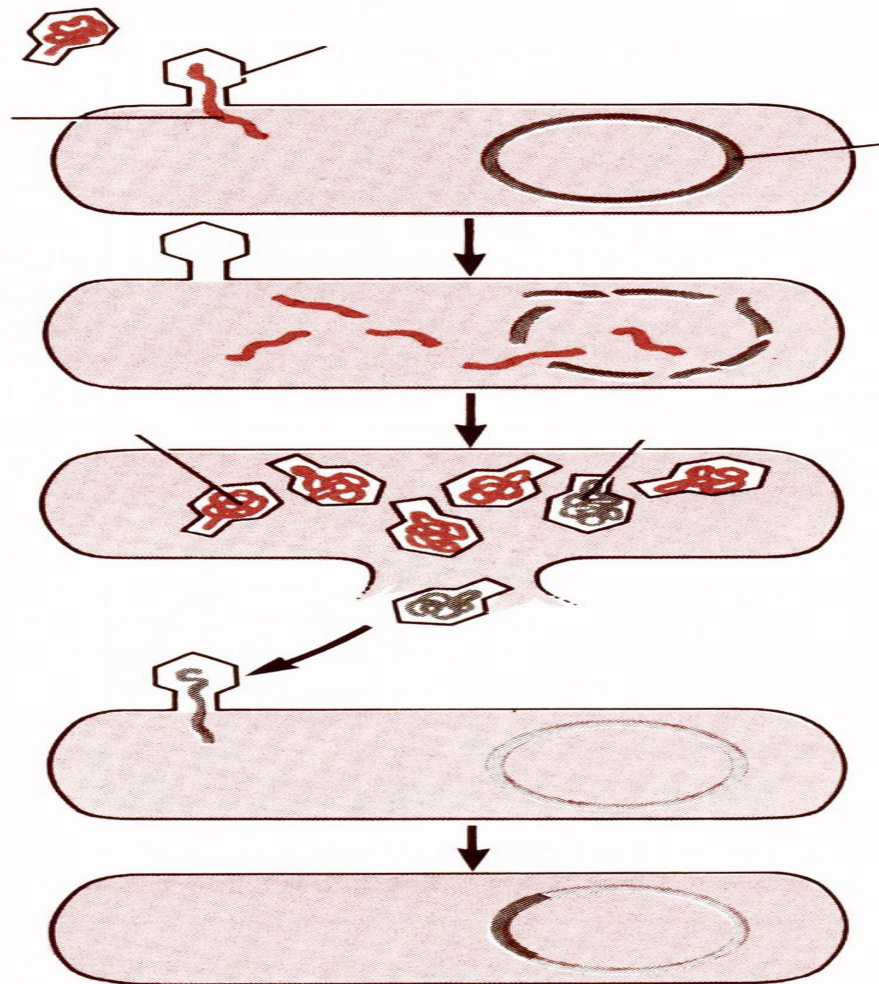
Классификация рекомбинаций по молекулярному механизму.

- **Гомологичные** – обмен между участками ДНК, обладающими высокой степенью гомологии.
- **Сайт-специфические** – происходят в определённых участках генома и не требуют высокой степени гомологии ДНК.
- **Незаконные или репликативные** – не зависят от функционирования генов *recA*, *B*, *C*, *D* (REC-системы).

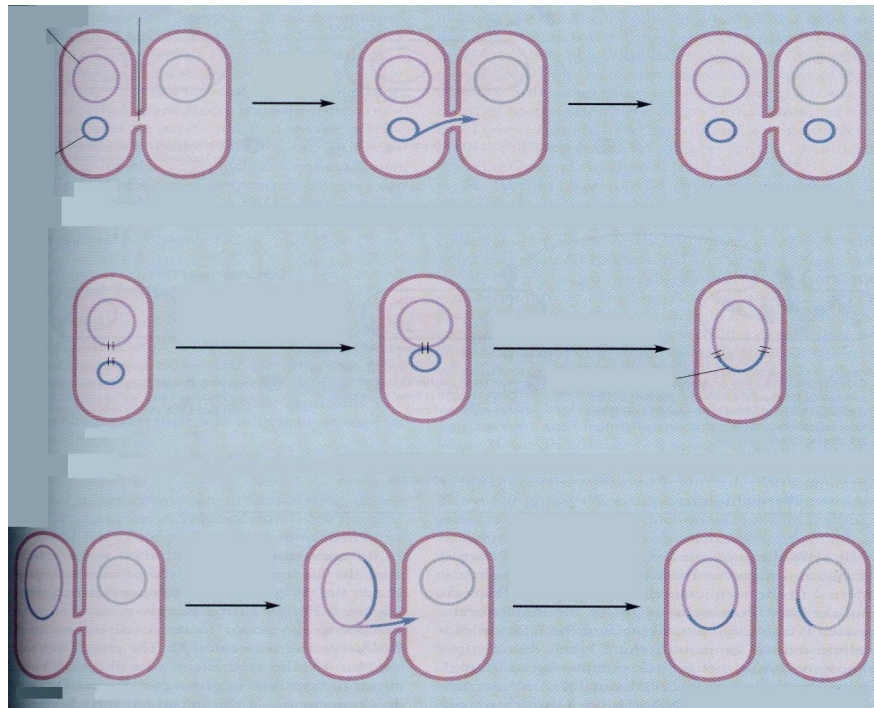
Трансформация



Трансдукция



Конъюгация



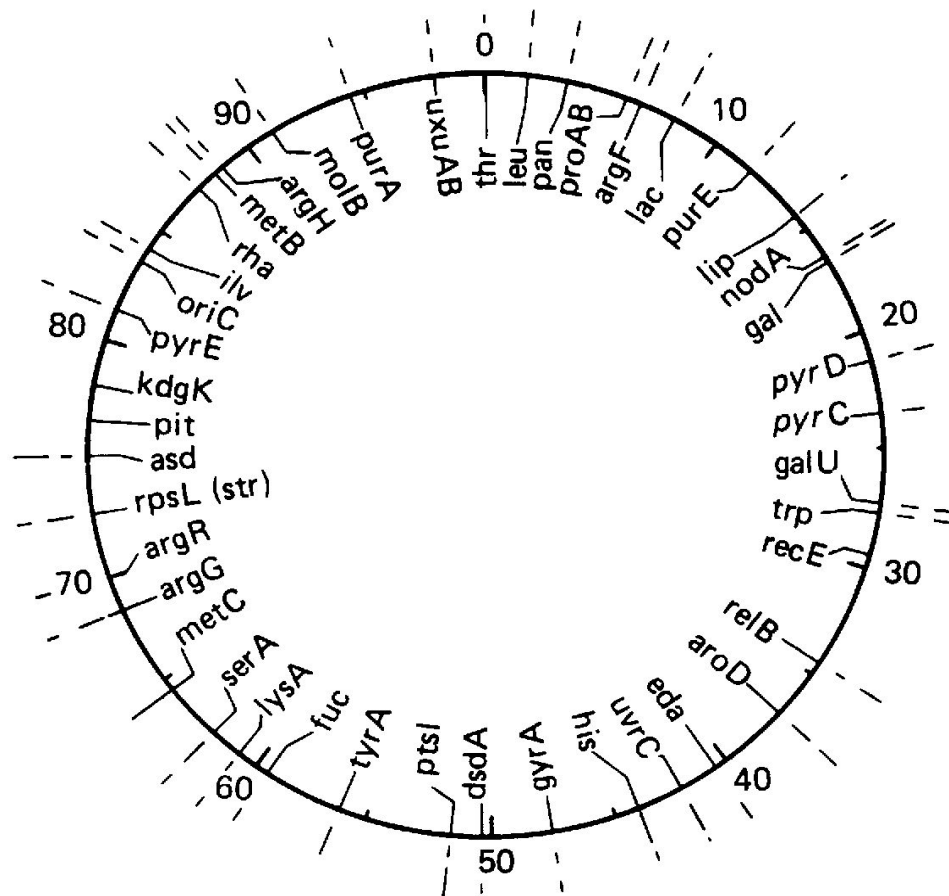
Формы изменчивости вирусов.

- **Генетическая рекомбинация.**
- **Генетическая реактивация.**
- **Комплементация.**
- **Фенотипическое смешивание.**

Генетические методы, применяемые в диагностике инфекционных болезней.

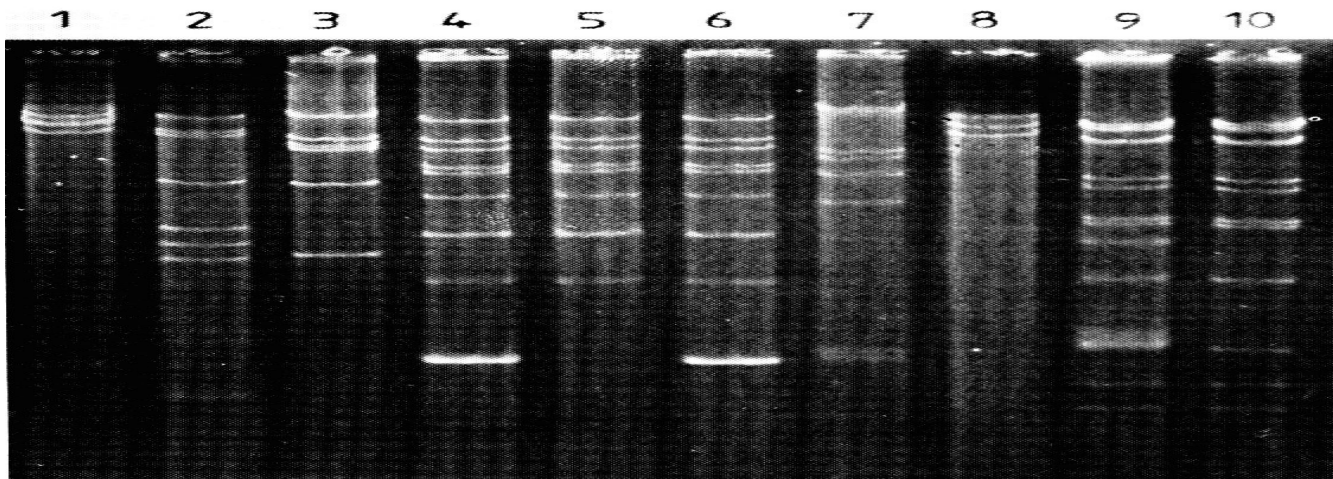
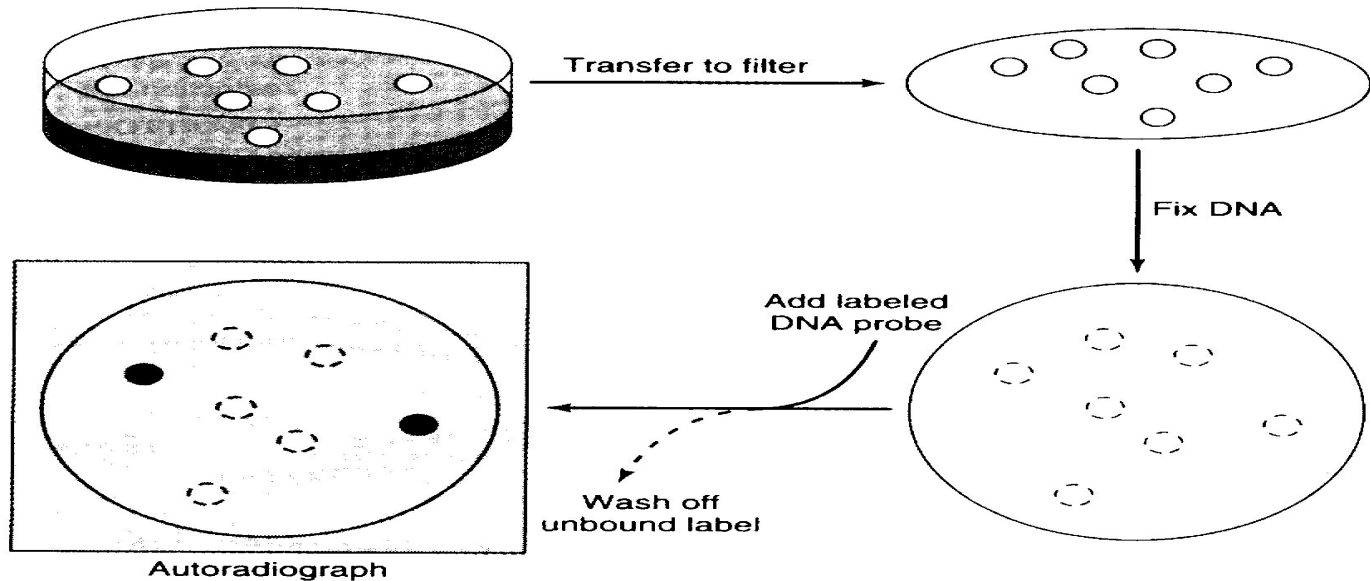
- Рестрикционный анализ.

Генетическая карта E.coli



Генетические методы, применяемые в диагностике инфекционных болезней.

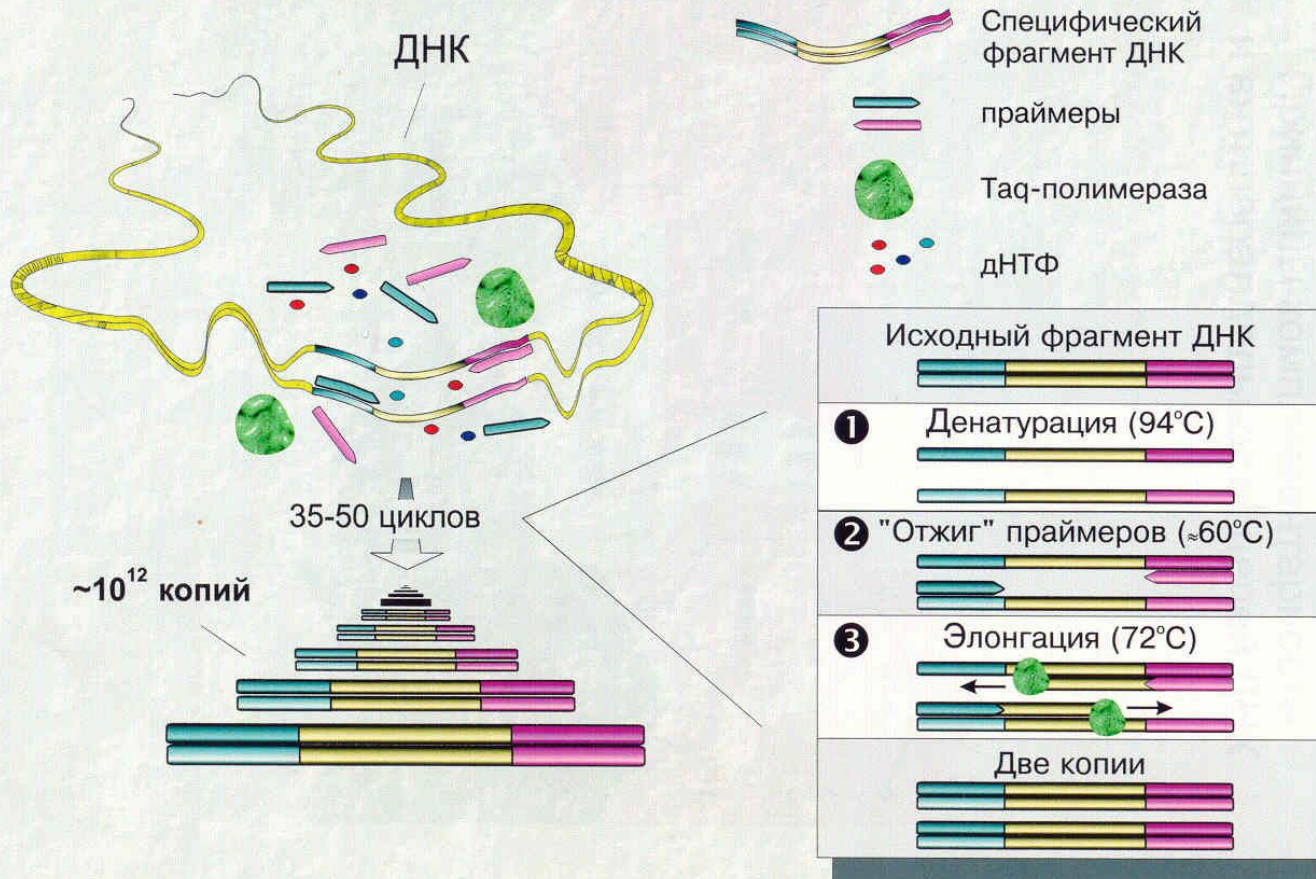
- Метод молекулярной гибридизации.



Генетические методы, применяемые в диагностике инфекционных болезней.

- Полимеразная цепная реакция.

Принцип полимеразной цепной реакции (ПЦР)



Генетические методы, применяемые в диагностике инфекционных болезней.

- **Рестрикционный анализ.**
- **Метод молекулярной гибридизации.**
- **Полимеразная цепная реакция.**
- **Риботипирование и опосредованная транскрипцией амплификация рибосомальной РНК.**

Разделы биотехнологии.

- **Фундаментальная биотехнология.**
- **Медицинская биотехнология.**
- **Сельскохозяйственная биотехнология.**
- **Пищевая биотехнология.**
- **Промышленная биотехнология.**
- **Экологическая биотехнология.**

Медицинские технологии.

- Создание новых технологий производства вакцин и других иммунологических препаратов для диагностики, лечения и специфической профилактики инфекционных заболеваний;
- Создание новых молекулярно-генетических методов диагностики и лечения врождённых патологий и наследственных заболеваний;
- Разработка новых методов диагностики и лечения онкологических заболеваний.
- Новые методологические подходы к лечению, диагностике и профилактике «соматических» заболеваний.

Этапы генетической инженерии.

- Получение гена, кодирующего необходимый признак вместе со структурами, обеспечивающими его функцию.
- Подбор необходимого проводника (вектора).
- Соединение гена с вектором.
- Введение рекомбинантной ДНК в подходящую клетку-реципиент.
- Отбор клеток, получивших дополнительный ген и обеспечивших его функционирование.

Способы получения генов.

- **Фрагментация всей хромосомы с помощью ферментов-рестриктаз.**
- **Синтез нужных генов по естественным копиям.**
- **Синтез ДНК-копий на матриксных мРНК данного гена с помощью РНК-зависимых ДНК-полимераз.**

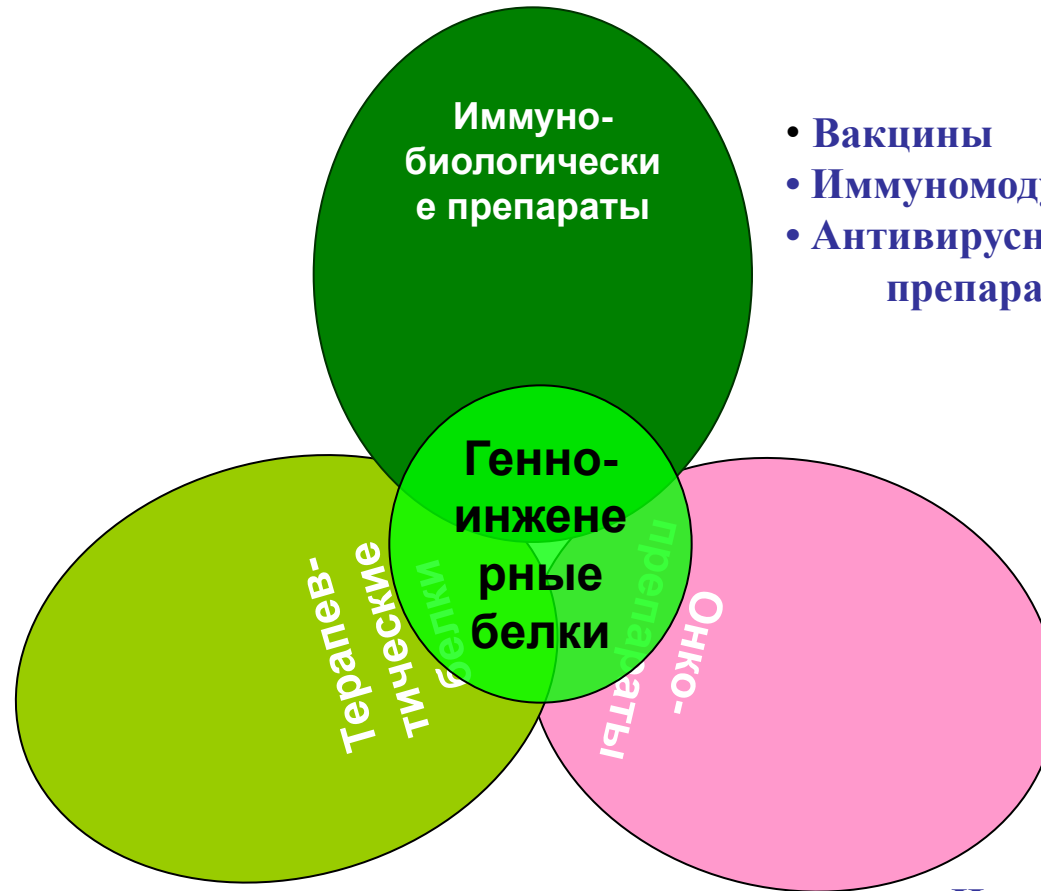
Векторы должны обладать свойствами:

- **обеспечить проникновение гена в клетку;**
- **обеспечить репликацию рекомбинантной ДНК;**
- **защищать рекомбинантную ДНК от рестриктаз клетки;**
- **кодировать один или несколько признаков, которые позволяют отобрать клетки, получившие рекомбинантную ДНК.**

Способы введения рекомбинантной ДНК в клетку:

- **трансформация;**
- **трансдукция;**
- **инфекция вирусами;**
- **с помощью липосом или микроинъекций;**
- **слияние протопластов;**
- **слияние клеток животных.**

Перспективные направления медицинской биотехнологии



- Вакцины
- Иммуномодуляторы
- Антивирусные препараты

- Факторы роста
- Кардиорегуляторы
- Гематорегуляторы

- Иммуномодуляторы
- Гуманизированные антитела

Наномедицина

«Наука и технология диагностики, лечения и предупреждения болезни и травматического повреждения, облегчения боли и сохранения и улучшения здоровья человека, использующие **молекулярные инструменты и молекулярные знания о теле человека**»

«*Forward Look on Nanomedicine*», The European Science Foundation (ESF) 2005

Наномедицина

включает в себя пять перекрывающихся субтем:

1. аналитические методики и инструменты для диагностики *ex vivo*, использующие нанонауку;
2. визуализация нанообъектов (от субмолекулярных событий до болезней пациентов);
3. нанолекарства для лечения болезней, включая биологически активные вещества и системы доставки лекарств;
4. поддержка химии и технологии, которые создают наноматериалы и наномашинны;
5. перенос от лаборатории к клинике, включая промышленное масштабирование, аттестацию, регуляцию и оценку безопасности и эффективности.

Декларируемая «конечная цель» наномедицины:

- создание **нанороботов-лекарей** для адресной доставки:
 - лекарственной субстанции,
 - устройств для манипуляций над молекулами, над клетками;
- создание **нанороботов-чистильщиков.**

Программа действий нанороботов-лекарей.

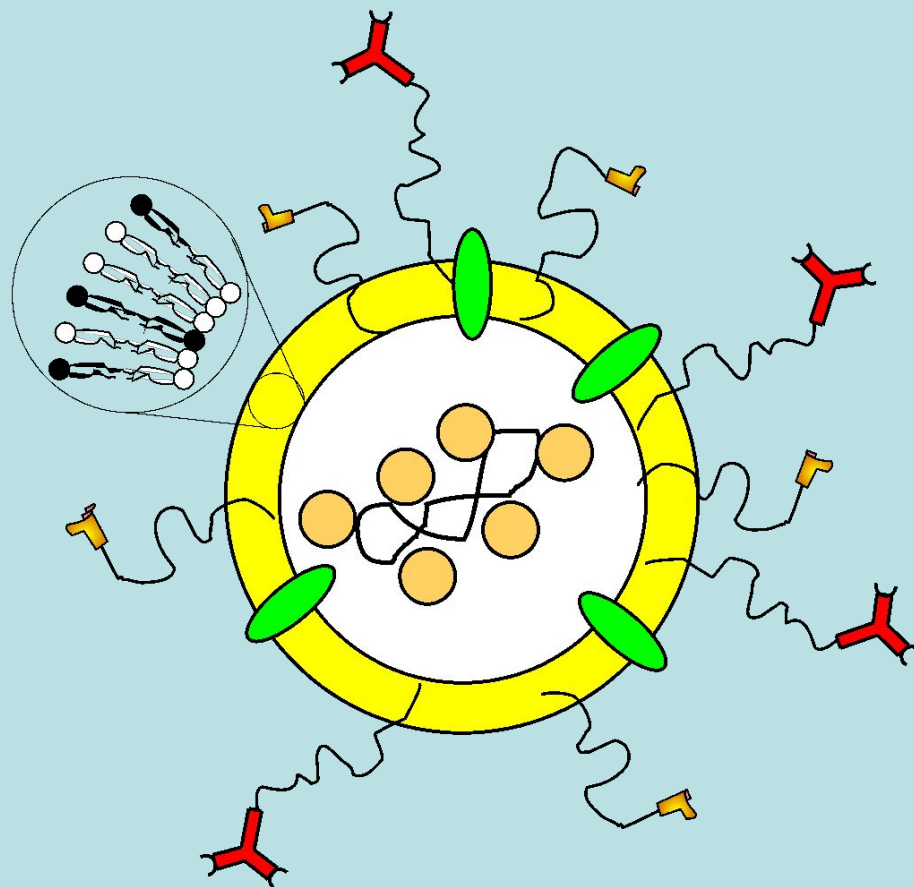
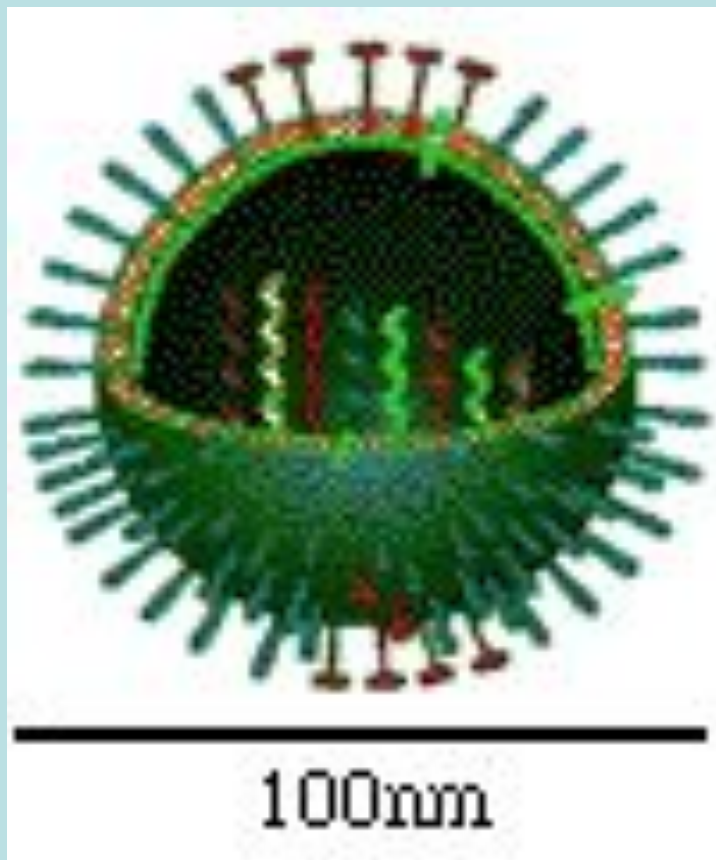
- **Поиск клеток-мишеней.**
- **Доставки к ним субстанции для лечения или обнаружения (диагностика).**
- **Проникновение в клетки-мишени.**
- **Выгрузка содержимого.**
- **Разборка на безвредные части.**

Часто требуется, чтобы доставка происходила в определённые компартменты клетки (ядро, митохондрии и др.).

**В наибольшей степени к нанороботам
продвинулись в генной терапии.**

- **Вирусные векторы** - реальное воплощение нанороботов (но с некоторыми существенными недостатками: вирулентность, иммунные реакции, не перенастраиваемость).
- Эти недостатки стимулируют разработку **невирусных векторов.**

Вирусная частица и невирусный вектор



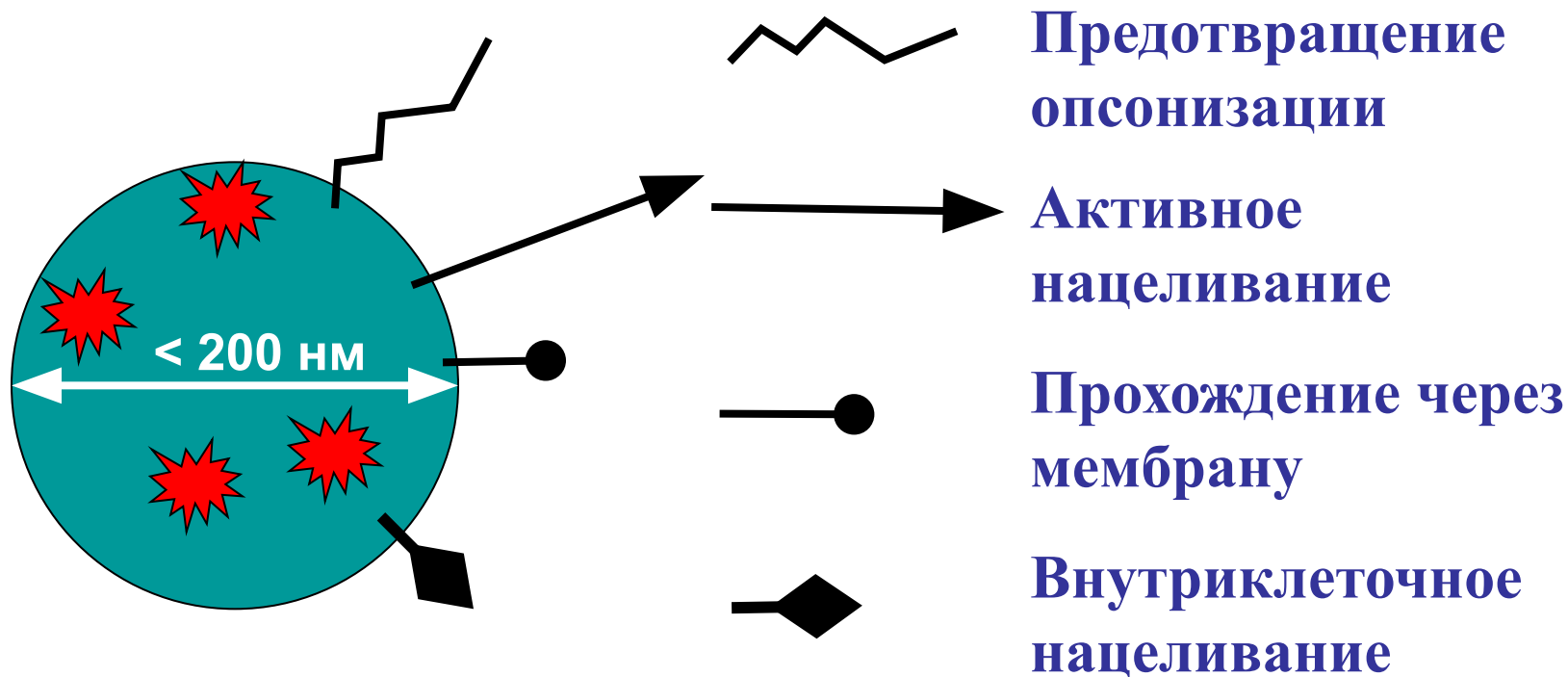
Проблемы вирусных векторов.

- **Наработка вирусных частиц.**
- **Загрузка вирионов лекарственной субстанцией.**
- **Модификация генов поверхностных белков вирусов для изменения тропности.**
- **Принципы безопасного конструирования.**

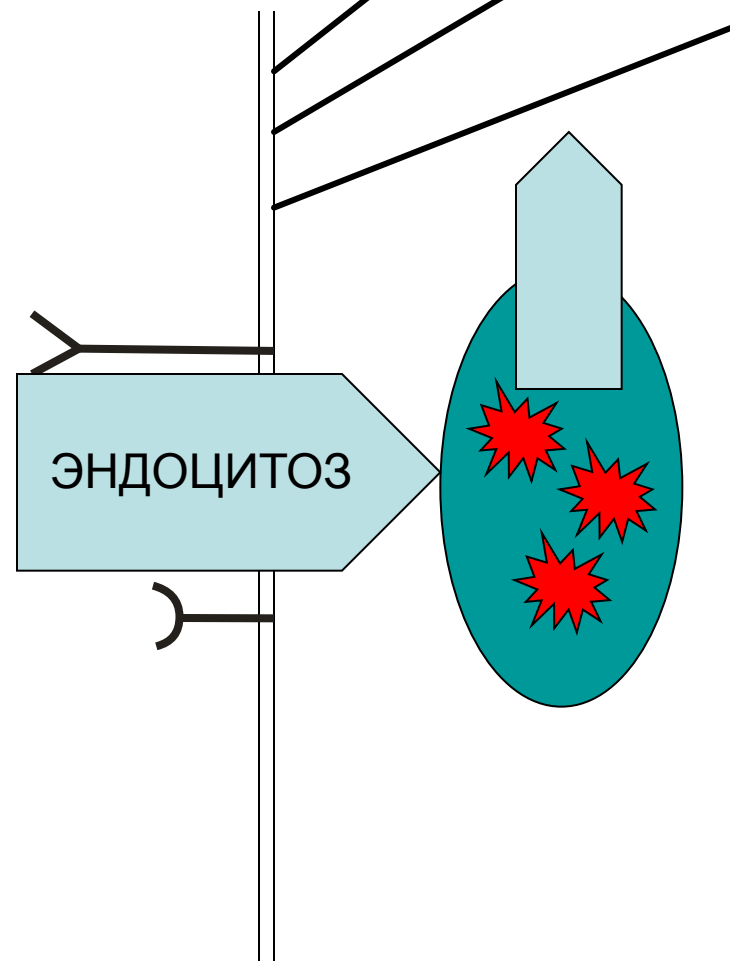
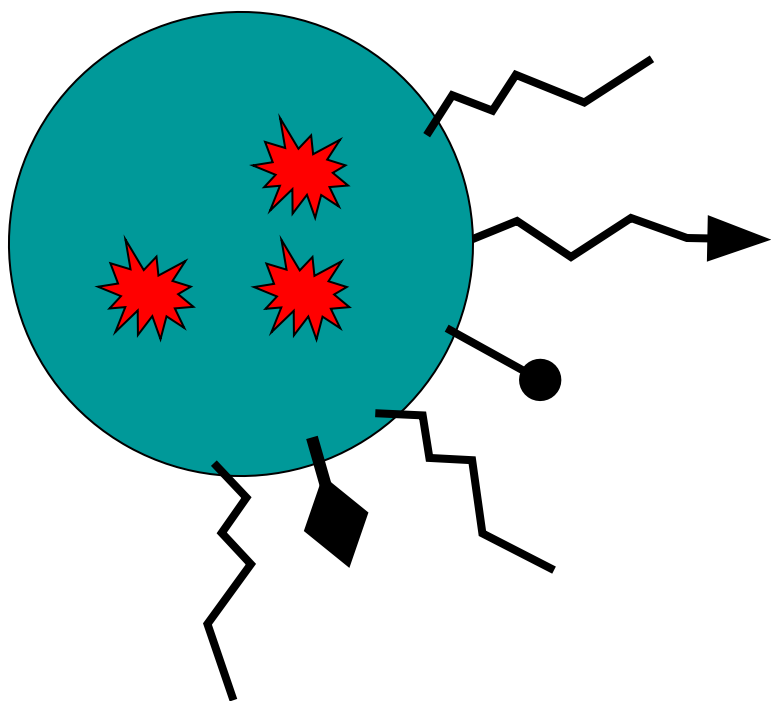
Проблемы невирусных векторов.

- **Механизмы эффективной загрузки.**
- **Присоединение к поверхности:**
 - ПЭГ;
 - молекулярного адреса;
 - ТАТ-пептида;
 - ядерного (митохондриального) сигнала.
- **Сигнал для высвобождения.**

Схема нанолекарства недалекого будущего



Нанолечение, близкое к идеалу



- **Реализованный уровень современной наномедицины** - контейнерная доставка лекарственных и диагностических субстанций в нужное место лучше, чем в среднем:
 - вирусные векторы для генной терапии;
 - продвинутые нанокапсулы (стелс-липосомы).
- **Более скромная, но востребованная сегодня цель** - солюбилизация плохо растворимых субстанций.