

# Генная инженерия

## Лекция4. Эукариотические системы клонирования (бакалавры)

Составитель: проф. М.Р. ШАРИПОВА

# Преимущества эукариотических систем клонирования

Прокариоты не способны синтезировать точные копии эукариотических белков из-за отсутствия адекватных механизмов пост-трансляционных модификаций:

1. Образование дисульфидных связей – неправильно собранный белок неактивен и нестабилен
2. Процессинг с образованием функционально-активного белка
3. Правильное сворачивание белковой молекулы, которое в клетках эукариотов осуществляют шапероны
4. Модификации аминокислот в составе белка – гликозилирование, фосфорилирование, ацетилирование, ацилирование и т. д.

# Эукариотические системы клонирования

**В качестве векторов для переноса ДНК в эукариотические клетки используют :**

- 1) Дрожжевые системы клонирования
- 2) Вирусные системы клонирования (эукариотические ДНК-вирусы, РНК-вирусы)
- 3) Мобильные элементы
- 4) Искусственные хромосомы

# Дрожжи для экспрессии эукариотических генов

- 1) **Дрожжи** – одноклеточные эукариоты, секвенирован геном, можно культивировать в биореакторах
- 2) **В качестве векторов** используют природные плазмиды дрожжей, клонированы сильные дрожжевые промоторы
- 3) **В клетках дрожжей** посттрансляционные модификации осуществляются как у эукариот
- 4) **Дрожжи способны секретировать** гетерологичные белки в среду для облегчения очистки
- 5) **Дрожжи признаны безопасными:** процедура их допуска существенно упрощена. Продукты метаболизма дрожжей признаны нетоксичными для человека
- 6) **Для работы с дрожжами используют бинарные векторы,** которые реплицируются в дрожжах и бактериях

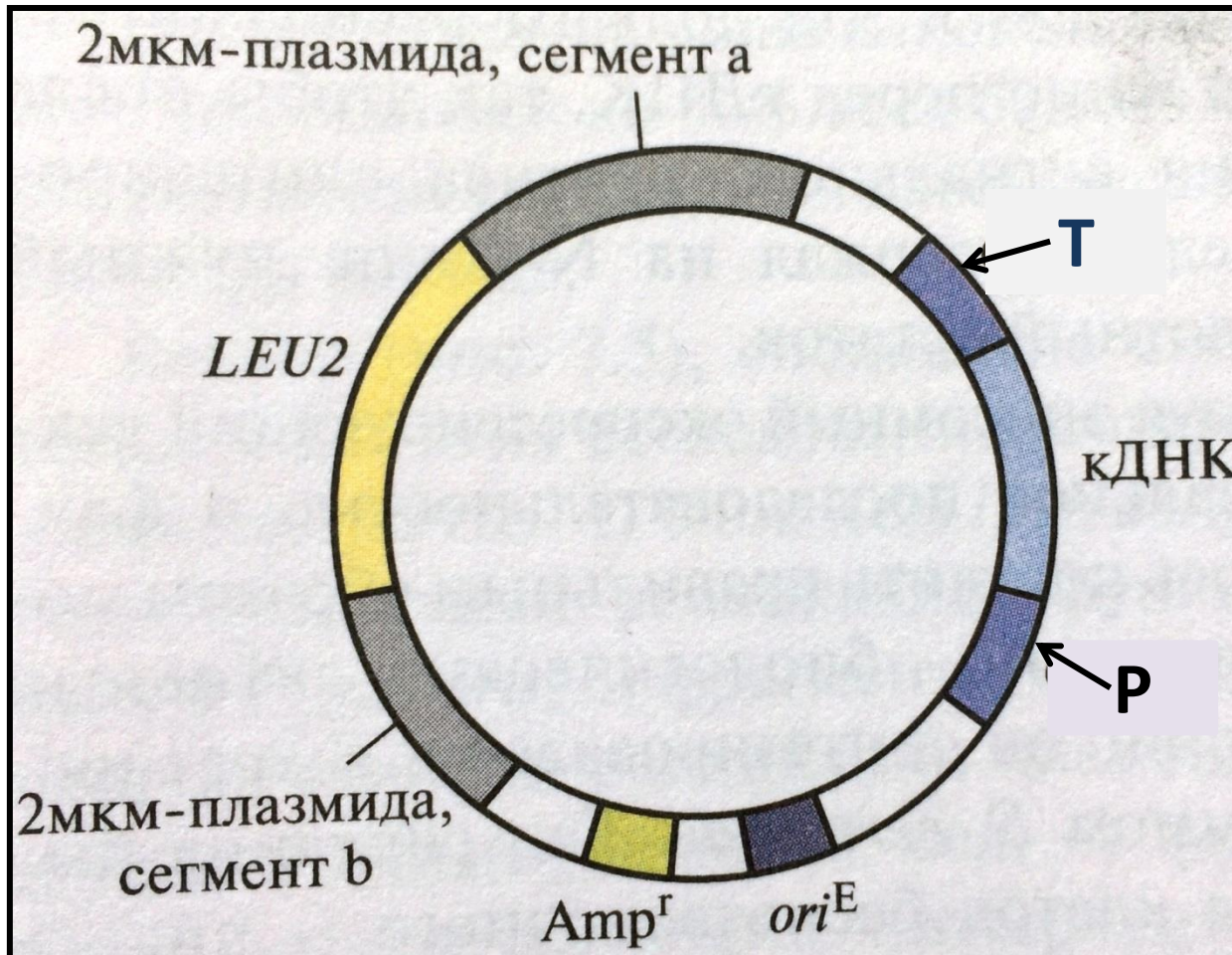
# Посттрансляционные изменения в клетках дрожжей

- **1) Модификации аминокислот:** фосфорилирование, ацетилирование, ацилирование, карбоксилирование и др.
- **2) Гликозилирование:** белки приобретают стабильность, присоединение сахарного остатка к серину/треонину/аспарагину
- **3) Протеолитическое расщепление**
- **4) Образование дисульфидных связей (-S-S-)** катализирует фермент дисульфидизомераза, при их отсутствии белок нестабилен и неактивен

# Природные 2μ-плазмиды дрожжей

- **У большинства штаммов дрожжей** обнаружены природные кольцевые 2 мкм плазмиды (2μ-плазмиды)
- **2μ-плазмиды** имеют дрожжевой *ori*-сайт, размер - 6.3 кб, количество достигает 50-100 копий на клетку
- **Типичный вектор** на основе 2μ-плазмиды – это вектор экспрессии
- **Дрожжевые клетки не могут** эффективно вырезать интроны, поэтому для клонирования в 2μ-плазмиды используют кДНК или ДНК, синтезированную химическим путем
- **ДНК встраивают** между дрожжевыми промотором (P) и терминатором (T)
- **В качестве маркерного гена** дрожжевой вектор экспрессии содержит ген биосинтеза лейцина (**LEU2**)
- **Этим вектором трансформируют** штаммы дрожжей, не синтезируют лейцин (ауксотрофы по лейцину) и высевают на среду без лейцина. Вырастают клетки, содержащие плазмиды

# Вектор дрожжей на основе 2мкм-плазмиды



# Для конструирования проводят оптимизацию экспрессии

Оптимизация  
экспрессии

Кодон-  
оптимизация

Выбор  
промотора

Оптимизация  
трансляции

Секреция

Терминатор



# Кодон-оптимизация

- Частота встречаемости кодонов-синонимов варьирует между организмами
- Применяют стратегию кодон-оптимизации для повышения эффективности трансляции мРНК , при этом аминокислотная последовательность белка не изменяется

## Таблица кодонов

Аминокислоты			Кодоны						
Аланин	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU			
Цистеин	Cys	C	UGC	UGU					
Аспарагиновая кислота	Asp	D	GAC	GAU					
Глутаминовая кислота	Glu	E	GAA	GAG					
Фенилаланин	Phe	F	UUC	UUU					
Глицин	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU			
Гистидин	His	H	CAC	CAU					
Изолейцин	Ile	I	AUA	AUC	AUU				
Лизин	Lys	K	AAA	AAG					
Лейцин	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU	
Метионин	Met	M	AUG						
Аспарагин	Asn	N	AAC	AAU					
Пролин	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU			
Глутамин	Gln	Q	CAA	CAG					
Аргинин	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU	
Серин	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU	
Треонин	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU			
Валин	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU			
Триптофан	Trp	W	UGG						
Тирозин	Tyr	Y	UAC	UAU					

**Предпочтёние кодонов** — явление неравных частот встречаемости кодонов-синонимов в кодирующих областях разных организмов.

**Предпочтение кодонов** варьирует между организмами: в разных организмах выбор частых и редких кодонов-синонимов различен.

# Выбор промотора

- **Дрожжевые промоторы** отличаются от бактериальных: у дрожжей ТАТА-бокс (аналог -10 у *E.coli*) расположен дальше (120 п. о.) от +1 – начала транскрипции.
- **Дрожжевые промоторы** функционируют на расстоянии до 1000 п.о. от сайта инициации транскрипции (+1). Поэтому дрожжевые векторы содержат длинную регуляторную область до 1 кб.
- **В качестве сильных** промоторов у дрожжей используют:
  - **Конститутивные промоторы** дрожжевых генов ферментов гликолиза
  - **Индукцибельные промоторы** генов метаболизма галактозы (pGAL). Эти промоторы активируются галактозой и репрессируются глюкозой.

# Выбор терминатора транскрипции

- **У дрожжей сайты** терминации и полиаденилирования максимально сближены, у высших эукариот эти сайты расположены на расстоянии сотен нуклеотидов друг от друга.
- **Для эффективной экспрессии** в дрожжах за чужеродным геном встраивают дрожжевой сайт терминации транскрипции для получения стабильной мРНК.

# Эффективная трансляция

**Для эффективной трансляции** необходимо распознавание участка инициации трансляции AUG-кодона факторами инициации

- У дрожжей в отличие от бактерий нет последовательности Шайно-Дальгарно для связывания с комплементарным участком 16SPHK
- Старт-кодон AUG у дрожжей находится в окружении А и U, присутствие гуанина в этой области влечет остановку инициации трансляции
- Трансляция также ингибируется, если в 5'-нетранслируемой области имеются петлевые структуры

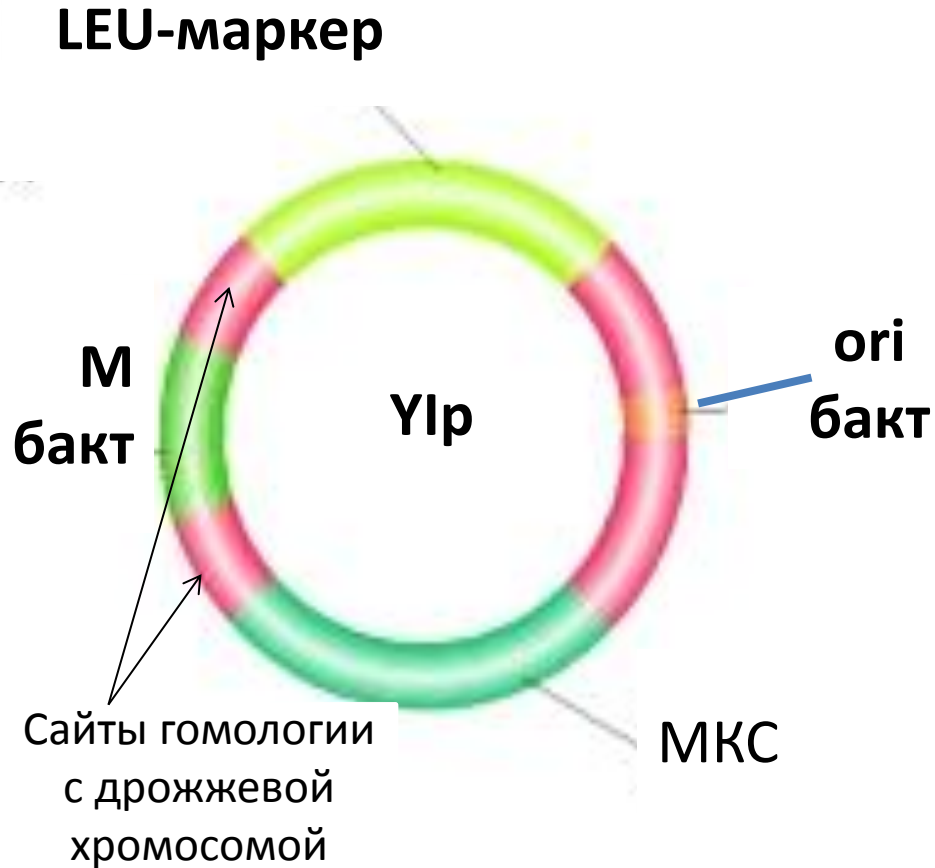
# Оптимизация систем секреции дрожжей

Для повышения эффективности секреции можно варьировать следующие параметры:

- оптимизация условий культивирования
- подбор векторной системы
- тип сигнального пептида
- этапы процессинга и фолдинга

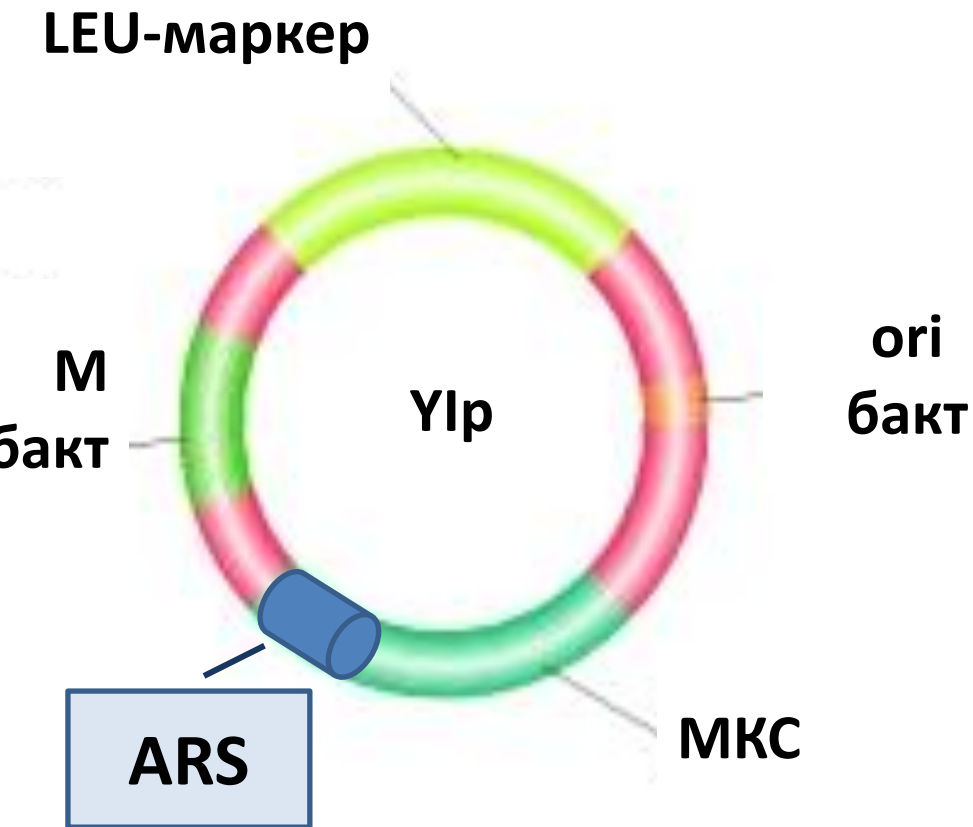
- Считается, что эффективность секреции белков дрожжами в 100-1000 раз ниже теоретического максимума
- Оптимизация секреции нацелена на направленную модификацию всех этапов секреции белка

# Интегративные плазмиды дрожжей YIp



- Не содержат дрожжевой *ori*-сайт, реплицируются при интегрировании в геном
- Содержат участки гомологии с ДНК дрожжей - интеграция происходит за счет рекомбинации
- Содержат маркерные гены (ген биосинтеза лейцина LEU), которые обеспечивают отбор в клетках дрожжей
- Недостаток – низкий уровень экспрессии, поскольку плаزمид наследуется как часть дрожжевого генома.
- Проблему решают встраиванием векторов в область тандемных генов (гены рРНК), такая интеграция позволяет получить множество копий клонированных участков.

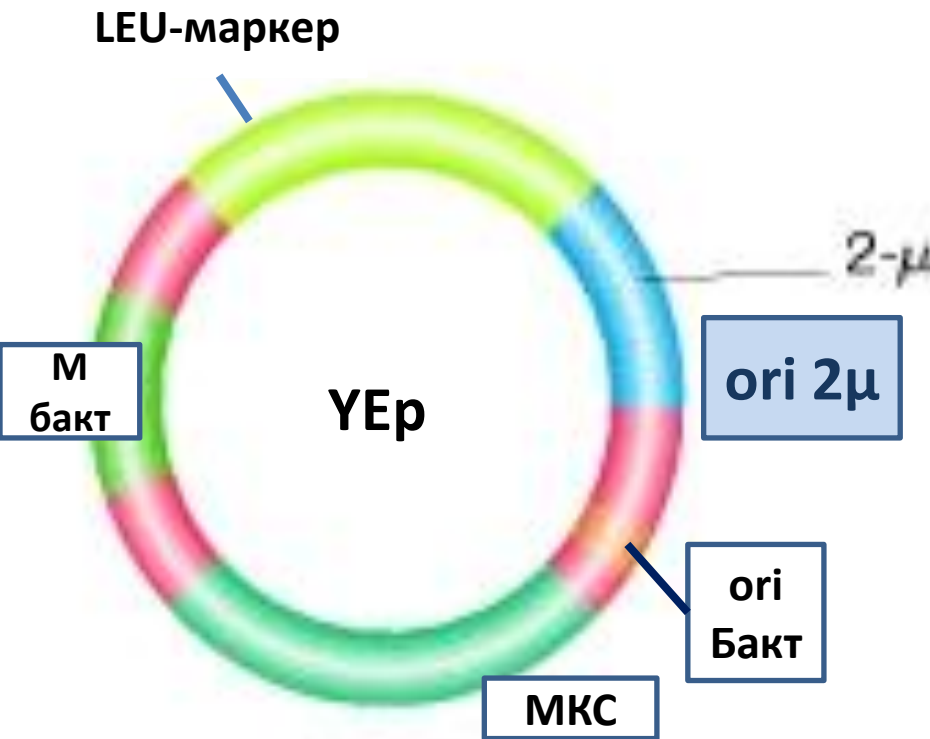
# Репликативные плазмиды дрожжей YRp



- Вектор **YRp** содержит сайт инициации репликации из дрожжевой хромосомы - **ARS** (**A**utonomously **R**eplicating **S**equence), что позволило получить **дрожжевые репликативные плазмиды (YRp)**
- **YRp** может автономно реплицироваться в клетках дрожжей без интеграции в хромосому
- Недостаток **YRp** - при делении плаزمида неравномерно распределяется по дочерним клеткам, часто потомки лишены плазмид



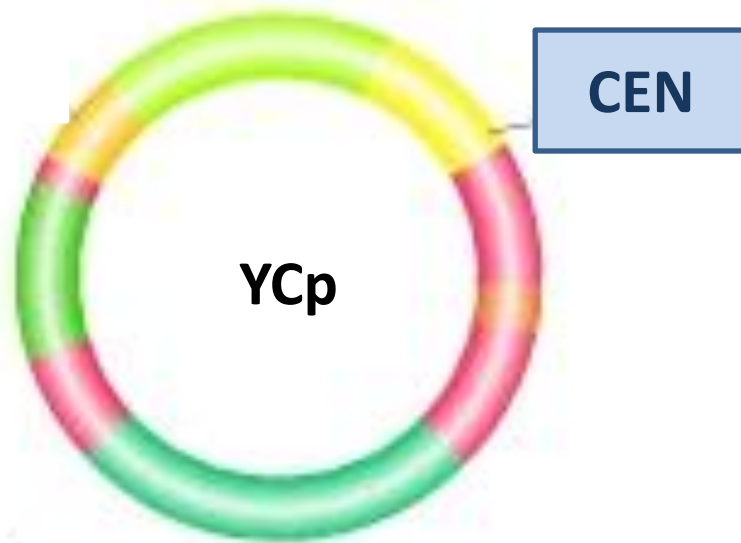
# Эписомные плазмиды дрожжей - YEp



Эписома – это генетический элемент, который может существовать в свободном и интегрированном в хромосому состоянии

- **Эписомные плазмиды** - это интегративные плазмиды дрожжей + ori-сайт 2μ-плазмиды
- **Эписомные плазмиды** являются многокопийными - до 50 копий на клетку
- **YEp** неравномерно передаются дочерним клеткам, но стабильно поддерживаются за счет высокой копийности
- **Эписомные плазмиды** применяются для получения высокого уровня экспрессии гетерологичных генов и используются для получения генно-инженерных продуктов дрожжей

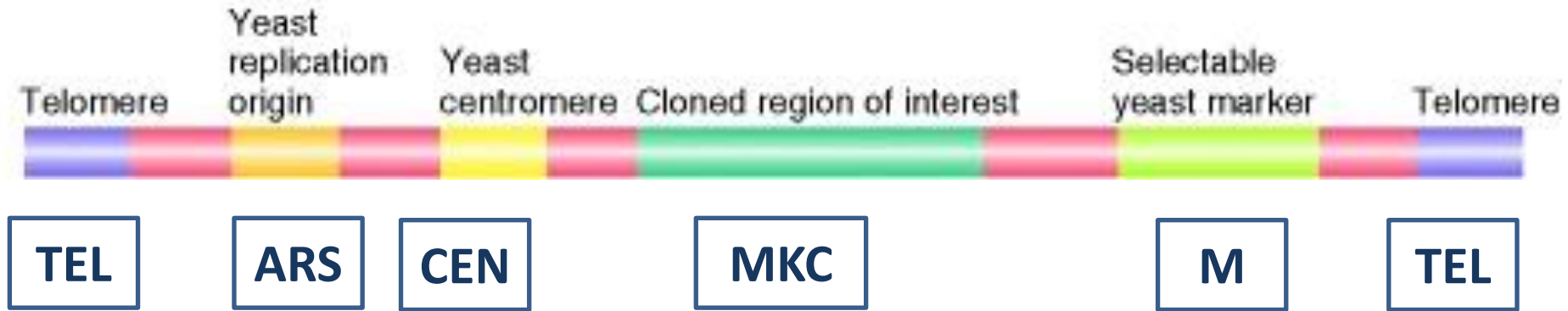
# Центромерные плазмиды дрожжей - YCr



- **Центромерные плазмиды** получают из интегративных или эписомных вставкой дрожжевой центромеры - **CEN**
- **CEN** - последовательность позволяет плазмидам правильно расходиться при делении, подобно хромосомам
- **YCr** очень стабильны, так как успешно распределяются между дочерними клетками
- Их недостаток в хромосомноподобном поведении, что обуславливает низкую копийность (1-3 копии на клетку)

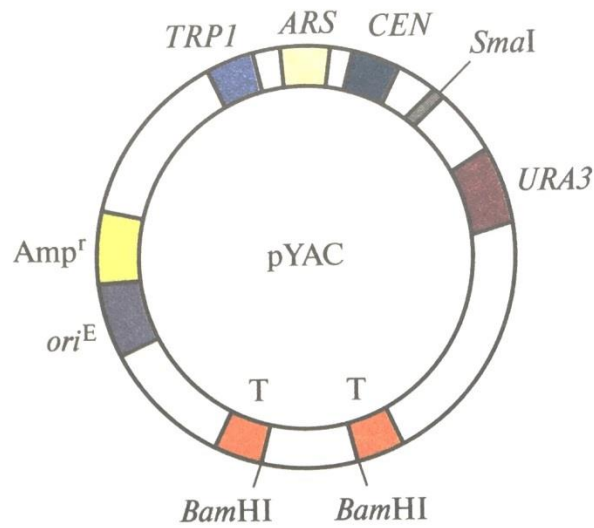
# Искусственные дрожжевые хромосомы

## YAC - Yeast artificial chromosome

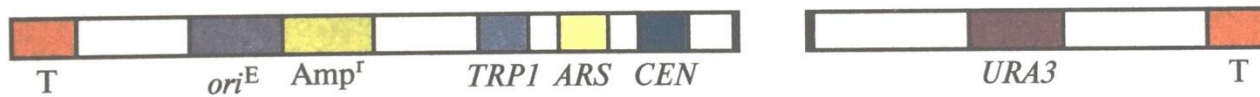


- **YAC** предназначены для клонирования больших фрагментов генома - **300 kb**. Такой вектор содержит:
- **ARS** - сайт инициации репликации дрожжевой хромосомы
- **CEN** - сегмент центромерной области дрожжевой хромосомы
- **TEL** - теломерные последовательности дрожжевой хромосомы
- YAC-системы стабильны, их использовали при физическом картировании генома человека, при анализе больших транскриптов, при создании геномных библиотек.

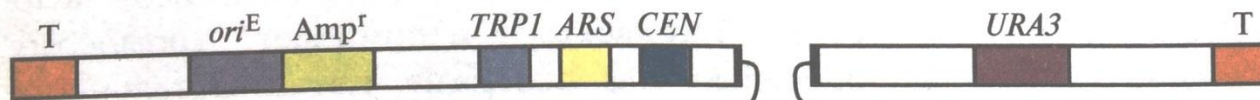
# Клонирование в YAC-систему



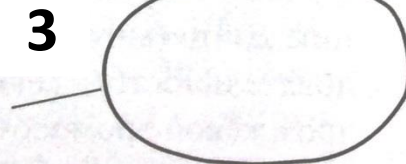
**1** ↓  
*Bam*HI  
*Sma*I  
Щелочная фосфатаза



**2** ↓  
Встраивание 300 кб  
лигирование



**3**  
Встроенный  
фрагмент ДНК



- 1) pYAC обрабатывают ***Bam*HI** с образованием линейной формы
- 2) ***Sma*I** –сайт по которому осуществляют клонирование ДНК
- 3) конструкция содержит клонированную ДНК и стабильно поддерживается в дрожжевых клетках

***URA3*** –ген биосинтеза урацила

***TRP1*** - ген биосинтеза триптофана

# Белки, синтезируемые в системах экспрессии дрожжей

## Вакцины

- Поверхностный антиген вируса гепатита В
- Белок оболочки HIV-1
- Белок малярийного плазмодия

## Диагностика

- Белок вируса гепатита С
- Антигены HIV-1

## Лекарственные вещества

- Инсулин
- Фактор роста эпидемиса
- Фактор роста фибробластов
- $\alpha$ -Антитрипсин
- Фактор системы свертывания крови XIIIa
- Проинсулин

Из 211 биофармацевтиков, разрешенных к применению в 2011 года, 31 получены в клетках дрожжей

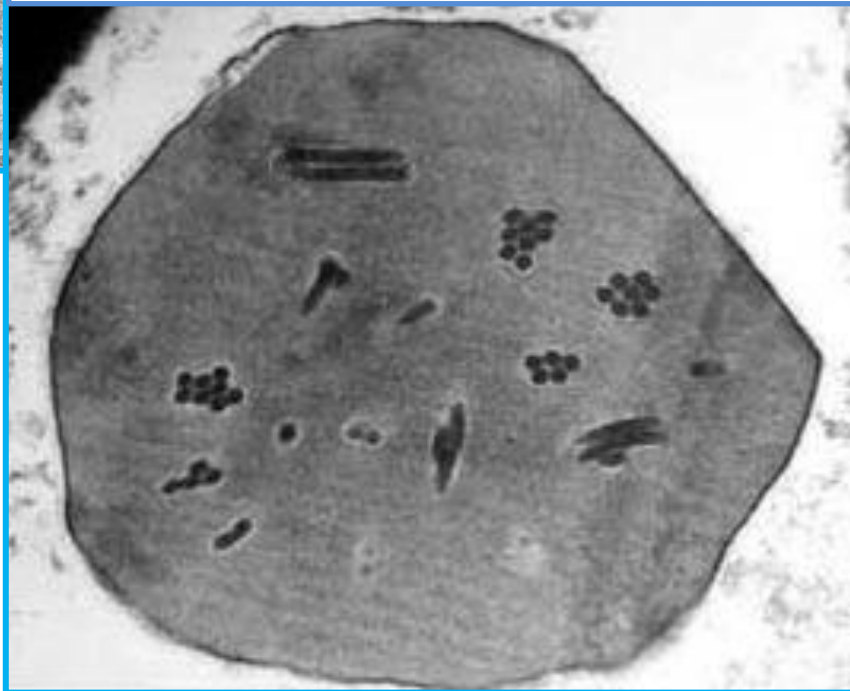
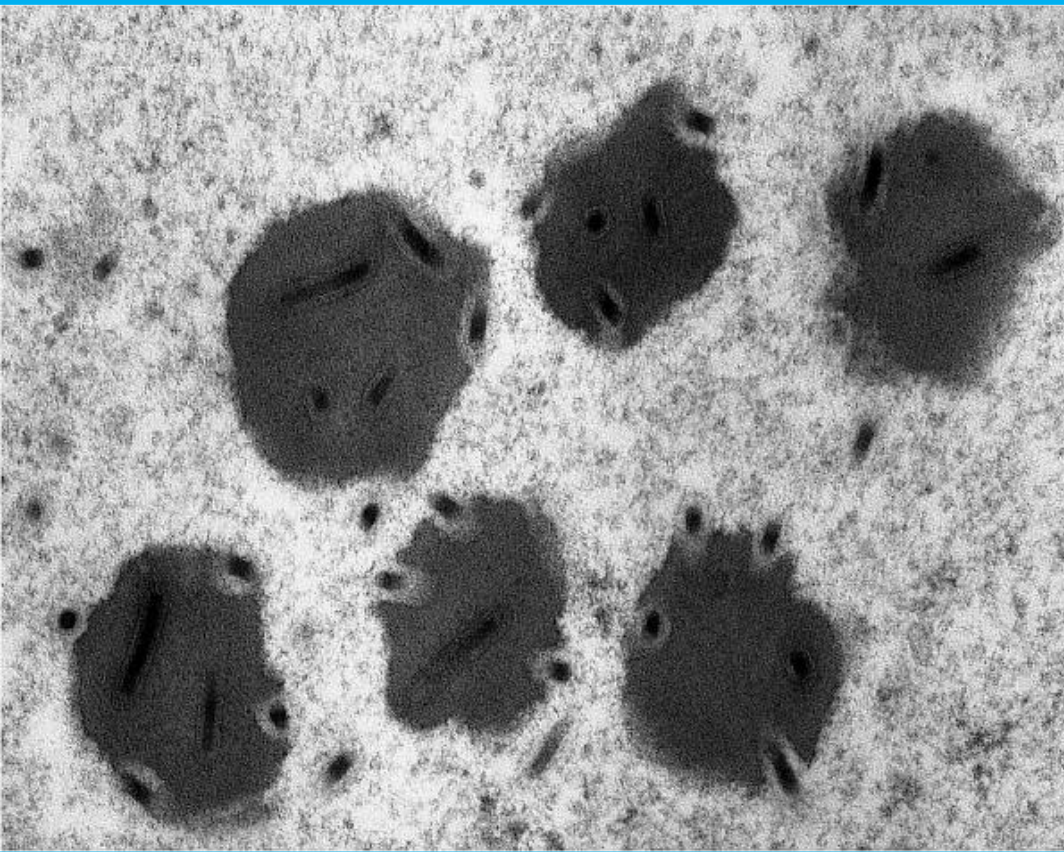
# Системы экспрессии на основе бакуловирусов

- **Бакуловирусы** – вирусы насекомых с оболочечным белком полиэдрином, ген которого имеет сильный промотор
- **Суть идеи:**
  1. Заменить кодирующую часть вирусного гена полиэдрина на гетерологичную
  2. Инфицировать рекомбинантными вирусами клетки культуры ткани
  3. Получить высокую экспрессию рекомбинантного белка в эукариотических клетках



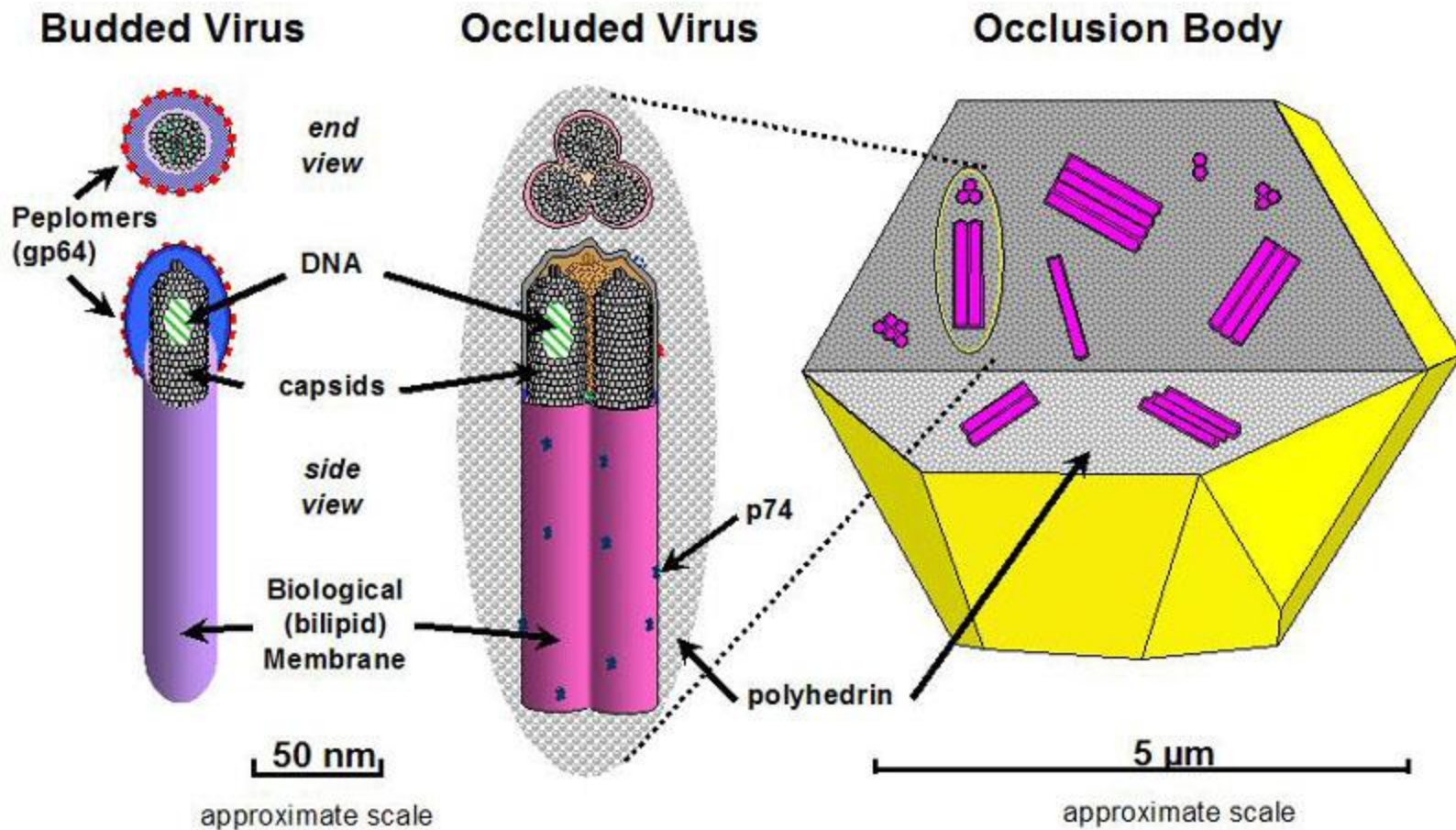
# Бакуловирусы

семейство ДНК-вирусов,  
геном представлен в виде  
кольцевой замкнутой  
дцДНК длиной 220 кб



- Бакуловирусы - палочковидные вирусы, получили название за палочковидную форму вирионов (от лат. *baculum* — палка, посох)

# Бакуловирусы



палочка

строма

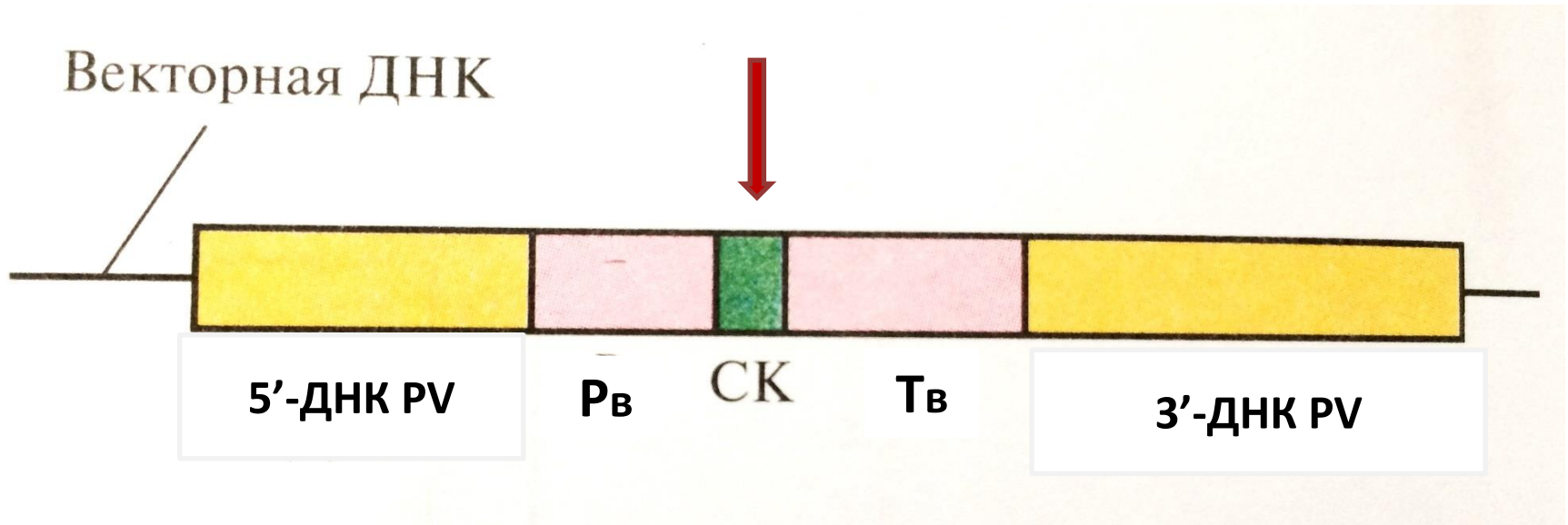
полиэдры



# Рекомбинантные бакуловirusы

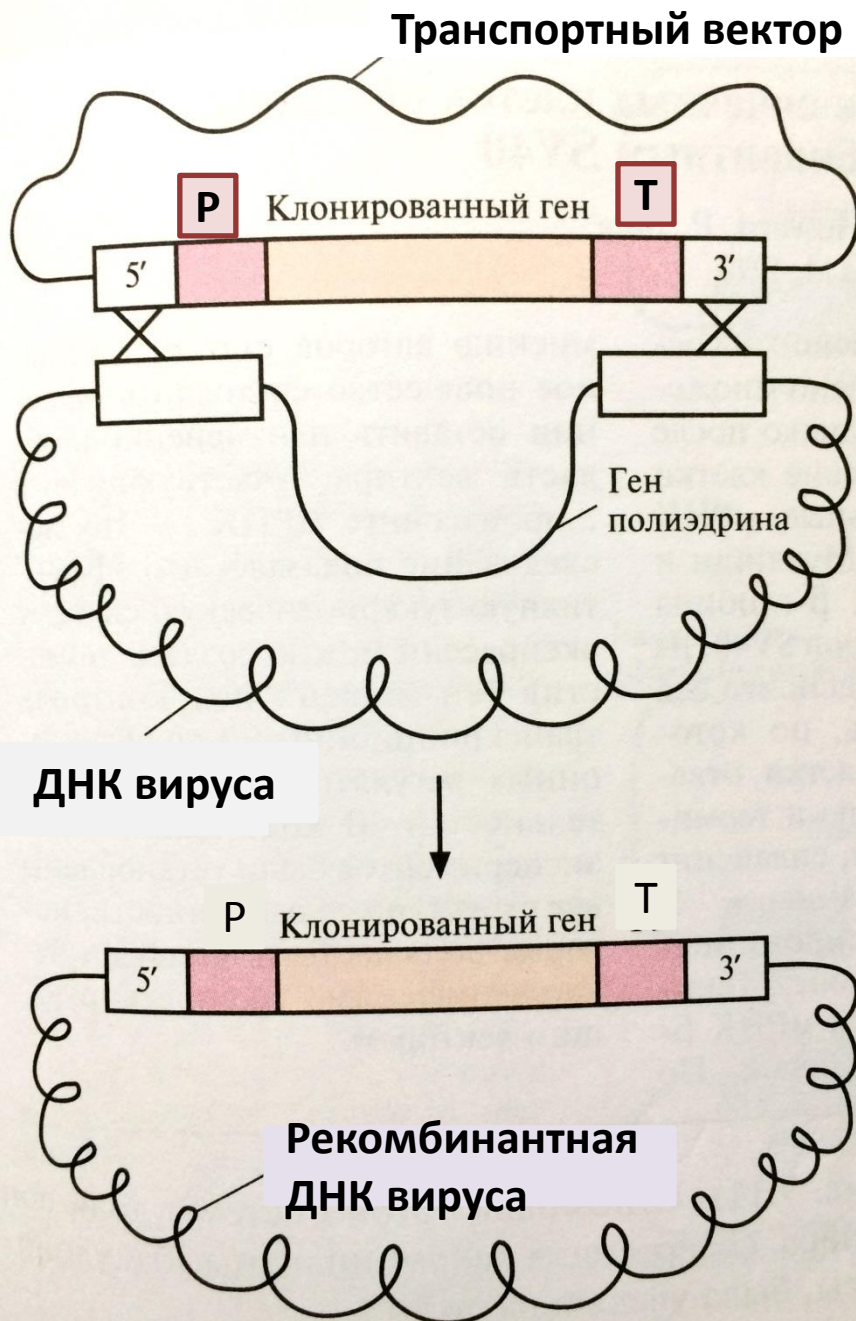
- Чтобы доставить генетические конструкции в вирусный геном используют транспортные векторы:
  - 1 этап – конструирование транспортного вектора
  - 2 этап – трансфекция транспортного вектора в культуру инфицированных клеток насекомых
- **Транспортный вектор** – плаزمида с единицей экспрессии на основе вирусного гена полиэдрина, ограниченной с 2-х сторон последовательностями вирусного генома
- Кодирующую последовательность гена заменяют на чужеродную (между промотором и терминатором)

# Схема единицы экспрессии



- Целевой ген встраивают в сайт клонирования (СК) между промотором (P<sub>B</sub>) и терминатором (T<sub>B</sub>)
- Перед промотором и после терминатора расположены фрагменты вирусного генома (PV) для интеграции единицы экспрессии в ДНК вируса путем гомологичной рекомбинации внутри клеток насекомых

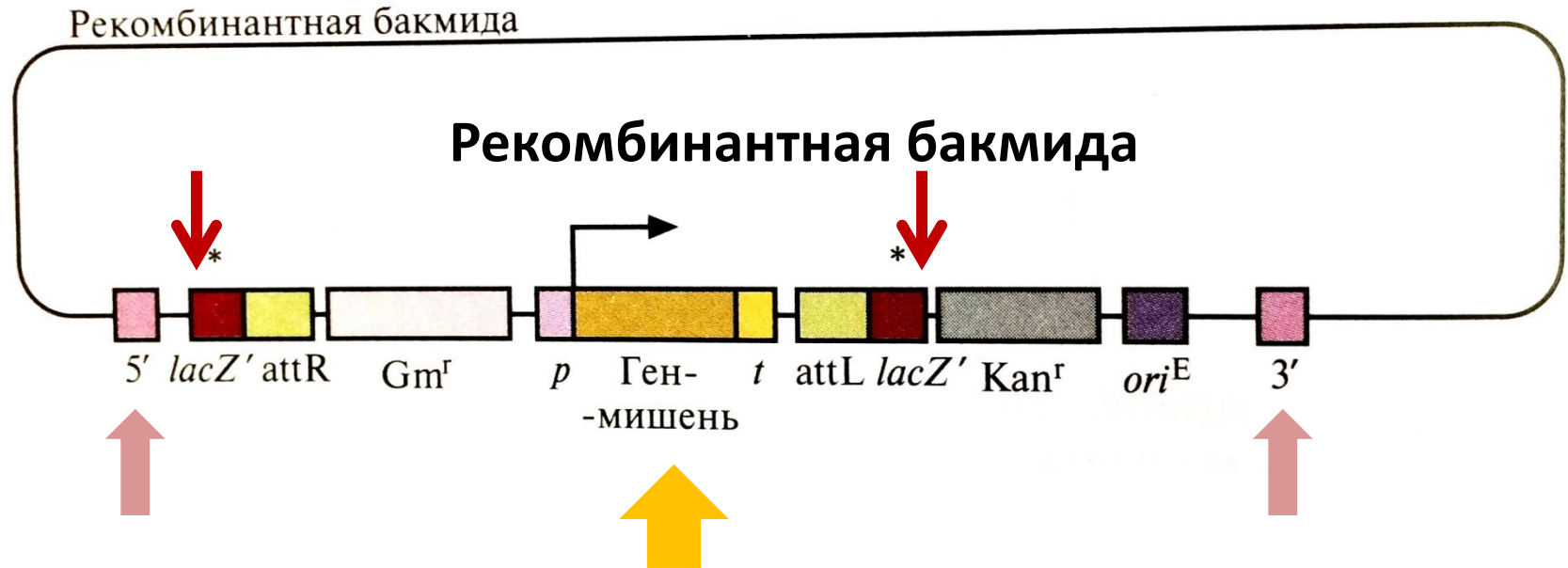
## Замещение гена полиэдрина в геноме вируса



- 1-** Культуру клеток гусениц инфицируют вирусом
- 2-** Инфицированную культуру трансфецируют транспортным вектором с клонированным геном
- 3-** В клетках происходит гомологичная рекомбинация между вирусной ДНК и транспортной плазмидой
- 4-** Получают рекомбинантные вирусы с заменой гена полиэдрина на гетерологичный

- **5-** Распознают рекомбинантные бакуловирусы ДНК-зондами, ПЦР или с помощью маркерных генов
- **6-** Рекомбинантными бакуловирусами заражают культуры клеток гусениц
- **7-** Из лизатов клеток выделяют белок
- **8-** Получено более 500 рекомбинантных белков с правильными посттрансляционными модификациями
- **9-** На основе бакуловирусов созданы челночные векторы – **бакмиды** (*E.coli*/бакуловирусы, дрожжи/бакуловирусы): все манипуляции проводят в клетках микроорганизмов, а продукты получают в клетках культуры тканей насекомых

# Бакмида



- Выделение рекомбинантного белка из лизатов клеток насекомых проводят с помощью аффинной хроматографии
- Роль аффинной метки выполняет (His)<sub>6</sub>

# Рекомбинантные белки, полученные с помощью векторов на основе рекомбинантных бакуловирусов

Интерфероны (альфа- и бета-)

Эритропоэтин

Интерлейкин

Активатор плазминогена

Предшественник бета-амилоида

Антиген вируса сибирской язвы

Белок оболочки вируса иммунодефицита человека

Белки капсида вируса герпеса

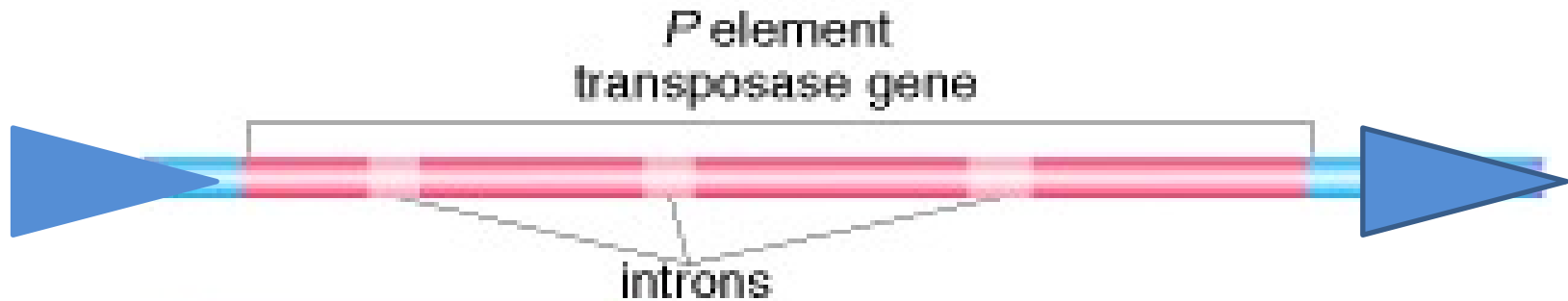
Белки вируса малярии

Мышиные моноклональные антитела

# Клонирование с помощью мобильных элементов

- Осуществляют с помощью транспозонов
- P-транспозон используют для клонирования у дрозофил
- P-транспозон встраивают в плазмиду, меняют ген транспозазы на гетерологичный
- Модифицированные P-элементы не способны к транспозиции, но эффективно встраиваются в геном с помощью векторов-помощников
- Рекомбинантные транспозоны дают стабильное потомство

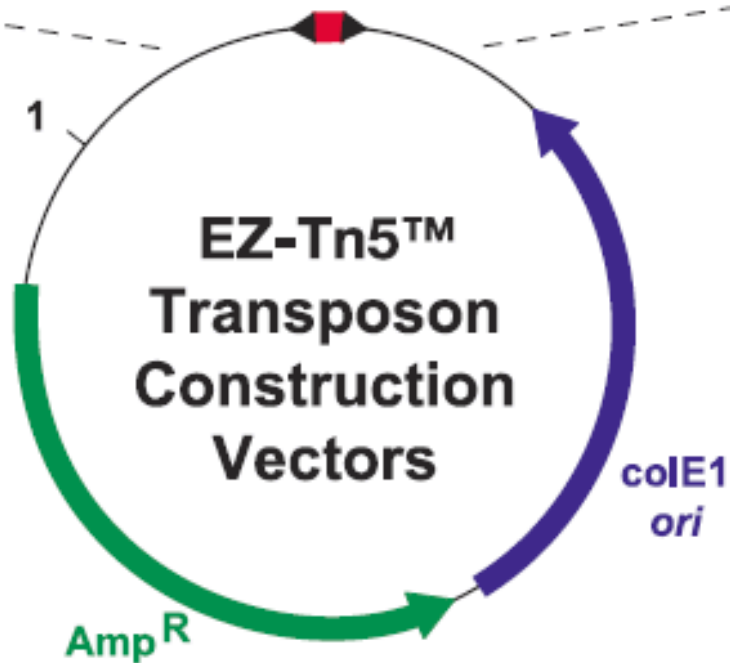
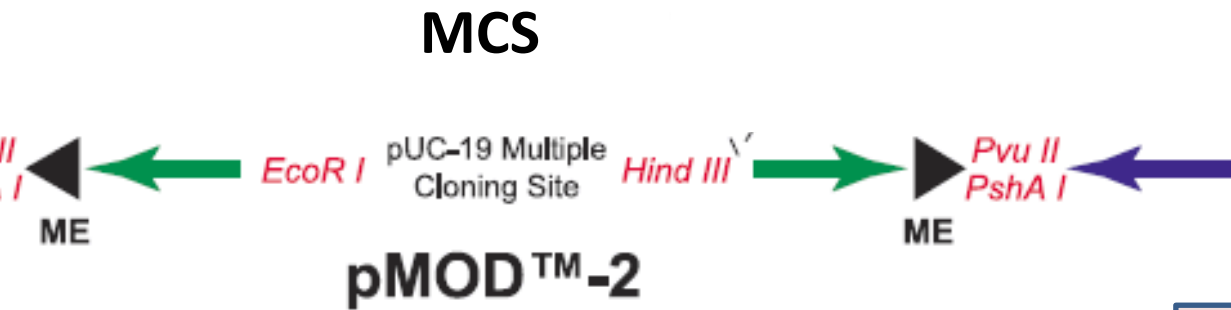
# Структура Р-элемента



- **Структура Р-элемента** дрозофилы. Единица транскрипции состоит из 4 экзонов. Синие стрелки - прямые повторы длиной 8 пн – это сайты узнавания
- **Р-элемент** функционирует как транспозон . Половина всех спонтанных мутаций в дрозофиле соответствует включению в гены мобильных элементов. Получение всех трансгенных дрозофил основано на использовании **Р-элемента**.

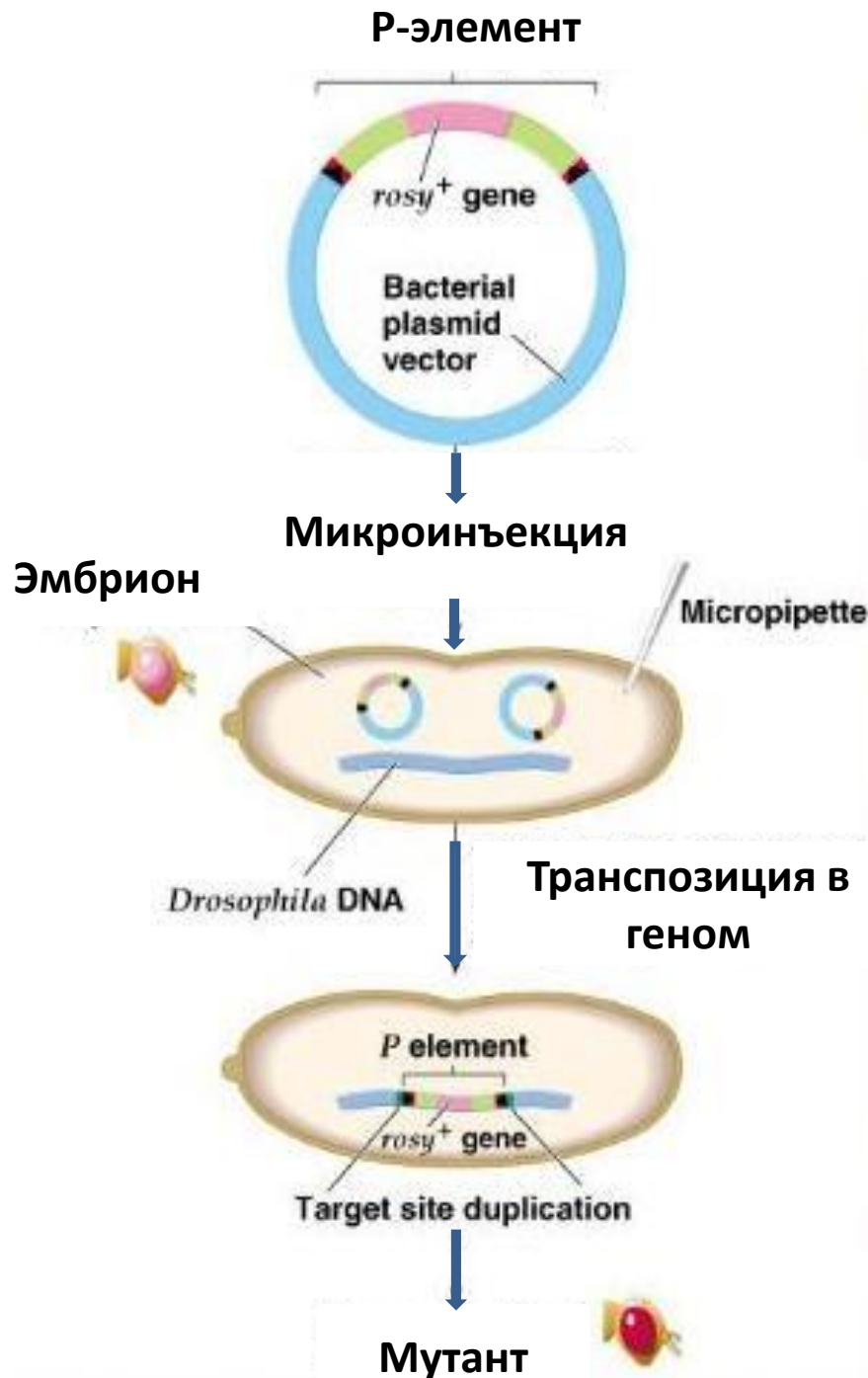


Клонирование с  
помощью  
транспозонов



- 1 – транспозон встраивают в плазмиду
- 2 – меняют ген транспозазы на гетерологичный
- 3 – модифицированные транспозоны встраиваются в геном с помощью транспозонов-помощников

## Клонирование с помощью транспозонов



- 1) Рекомбинантную плазмиду инъецируют в эмбриональные клетки дрозофил
- 2) Происходит транспозиция Р-элемента в геном
- 3) По сайтам узнавания происходит дупликация Р-элемента
- 4) Получают трансгенных дрозофил

## Транспозонный мутагенез

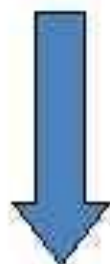
интеграция  
транспозона



изменение структуры  
одного из генов....



....изменение  
фенотипа



Возможность клонировать  
ген, «вытянув» его за  
транспозон

# Искусственная хромосома млекопитающих

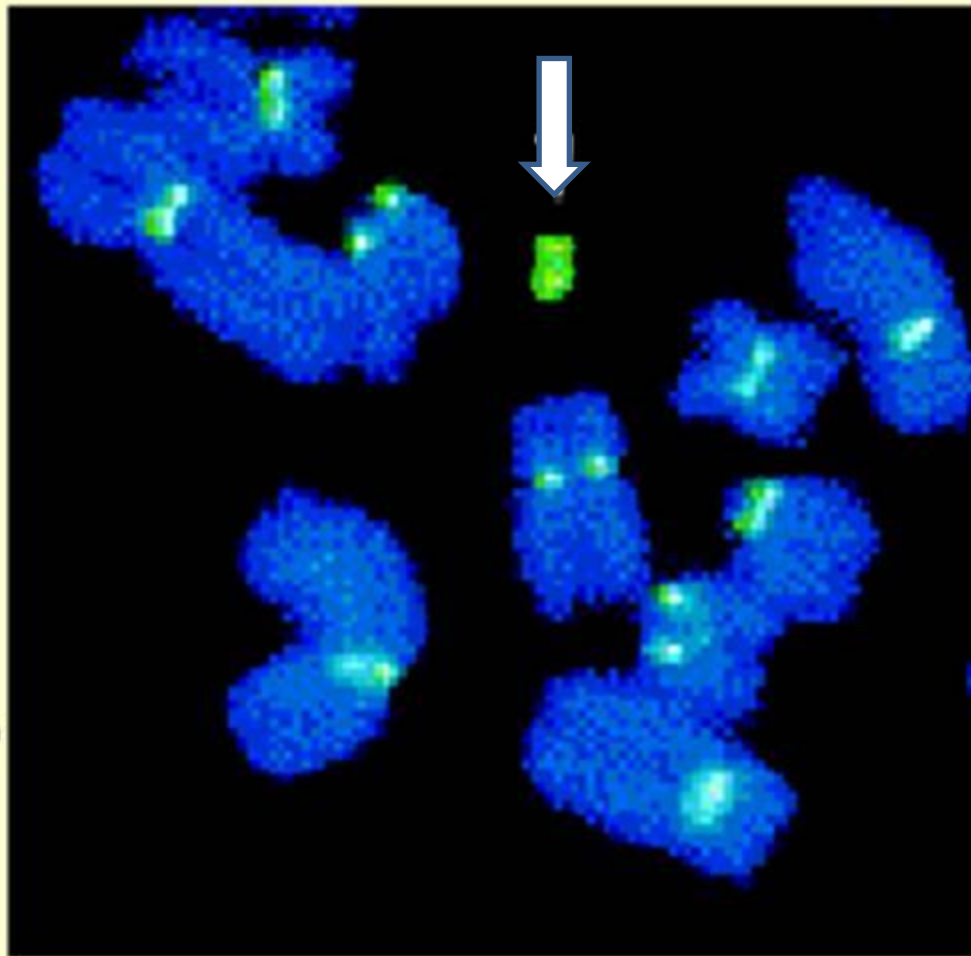
---

Два основных подхода к конструированию:

первый основан на самосборке из :  
функциональных нуклеотидных  
последовательностей (CEN, TEL, ARS)

второй предполагает модификацию  
нормальных хромосом путем  
контролируемой редукции и, как следствие,  
создание так называемых мини-хромосом.

# Искусственная мини-хромосома

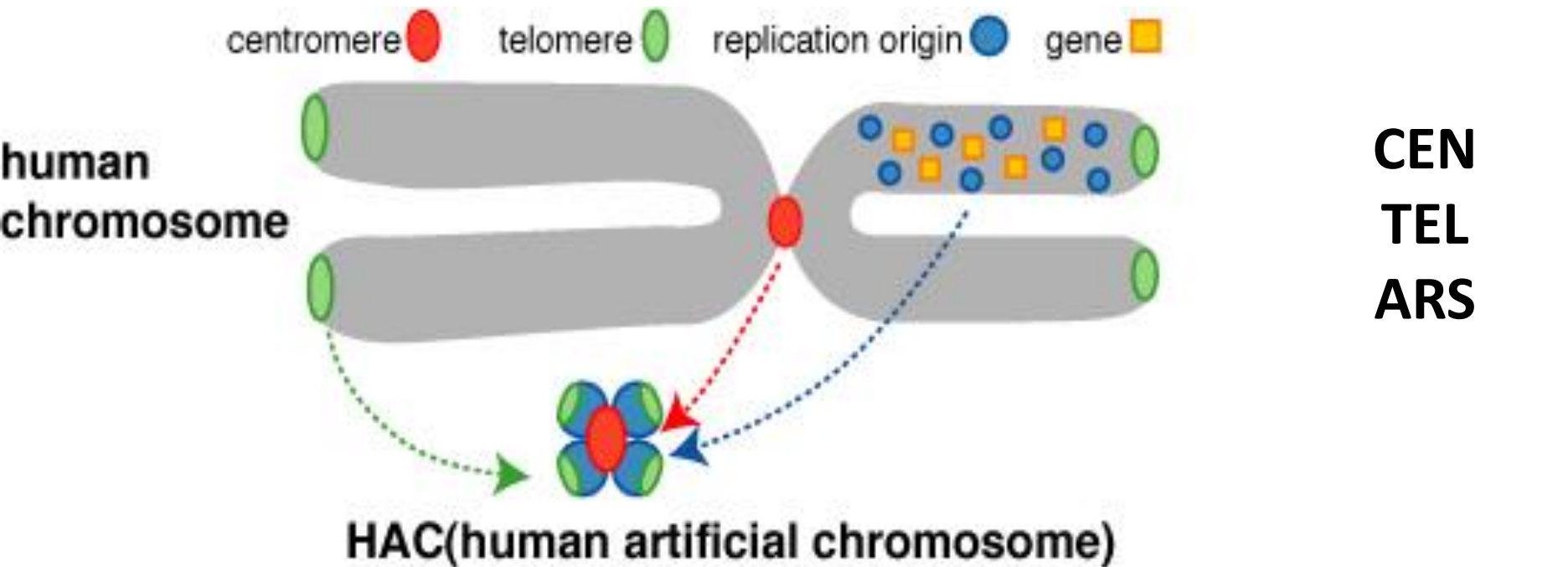


Стрелка показывает  
на искусственную  
мини-хромосому,  
которая  
функционирует  
как натуральная

Может служить  
мега-вектором  
для клонирования  
ДНК



# НАС-искусственная хромосома человека



- Constructed artificially in cultured human cells.
- Constructed by minimum DNA elements for the maintenance of chromosome function
- Enable gene introduction of desired sequences

# AC – artificial chromosomes

## YAC

Yeast

Artificial Chromosomes –

дрожжевые  
искусственно созданные  
хромосомы

**300 kb**

## BAC

Bacterial

Artificial Chromosomes –

искусственные  
хромосомы бактерий

**100 kb**

## PAC-P1

Phage-derived

Artificial Chromosomes –

искусственно  
полученные мини-  
хромосомы  
бактериофагов,

и «сверхдлинные»:

## MAC

Mammalian

Artificial Chromosomes –

искусственные  
хромосомы животных

## HAC

Human

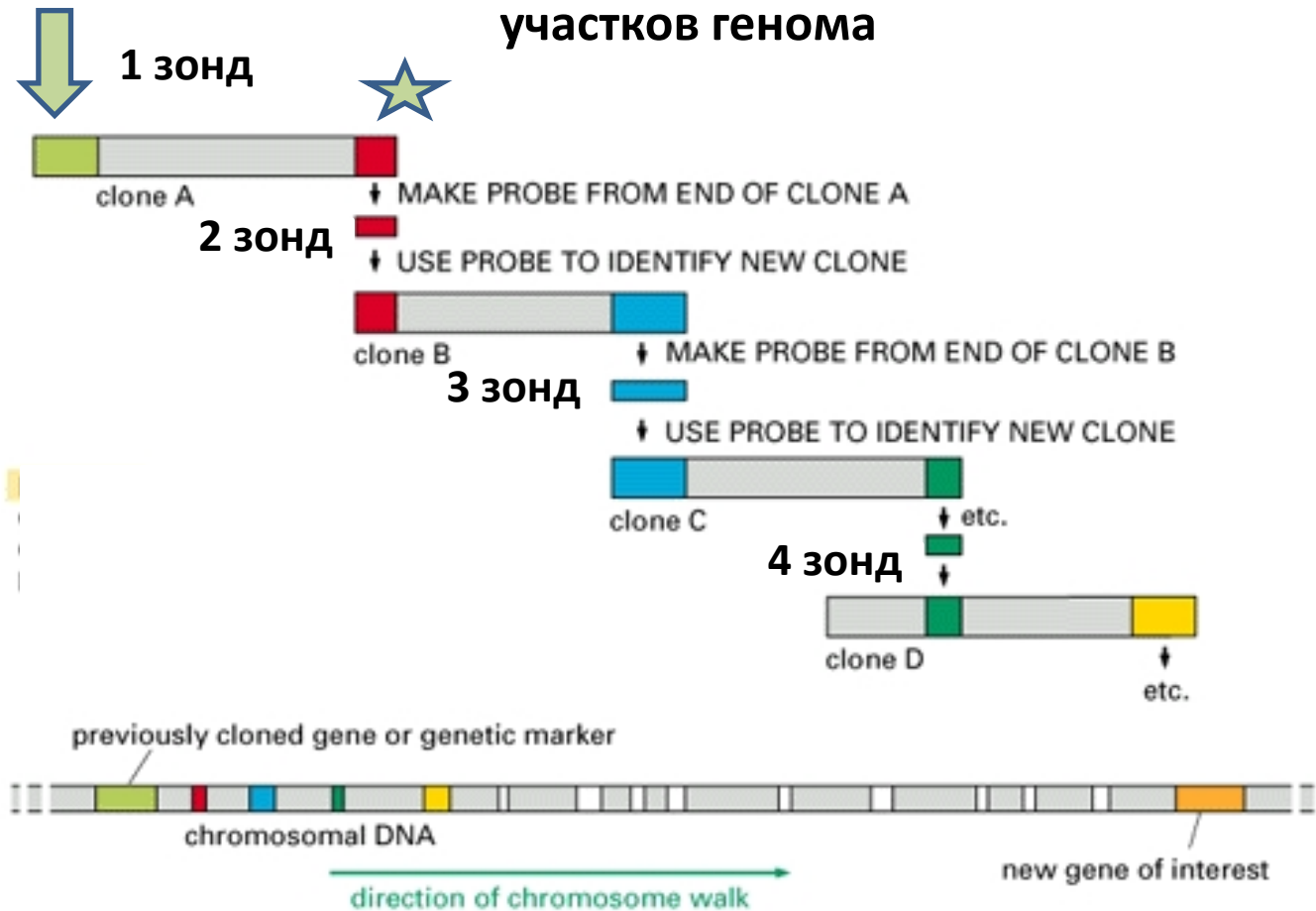
Artificial Chromosomes –

искусственно  
полученные хромосомы  
человека

**несколько Mb**

# Прогулка по хромосоме

метод анализа протяженных последовательностей вокруг секвенированных участков генома



Отбор перекрывающихся клонов ДНК:

1- применяют меченый зонд к известной последовательности и гибридизуют с ДНК

2- изолируют клон с меткой (стартовый клон)

3- концевой фрагмент 1-го клона используют как зонд для отбора следующего клона

4- получают серию перекрывающихся клонов (контиг), один из них с искомым геном

**1 шаг – 20 кб**

**Стратегия - Концевой фрагмент используют как гибридизационный зонд для следующего шага**



# Прогулка по хромосоме

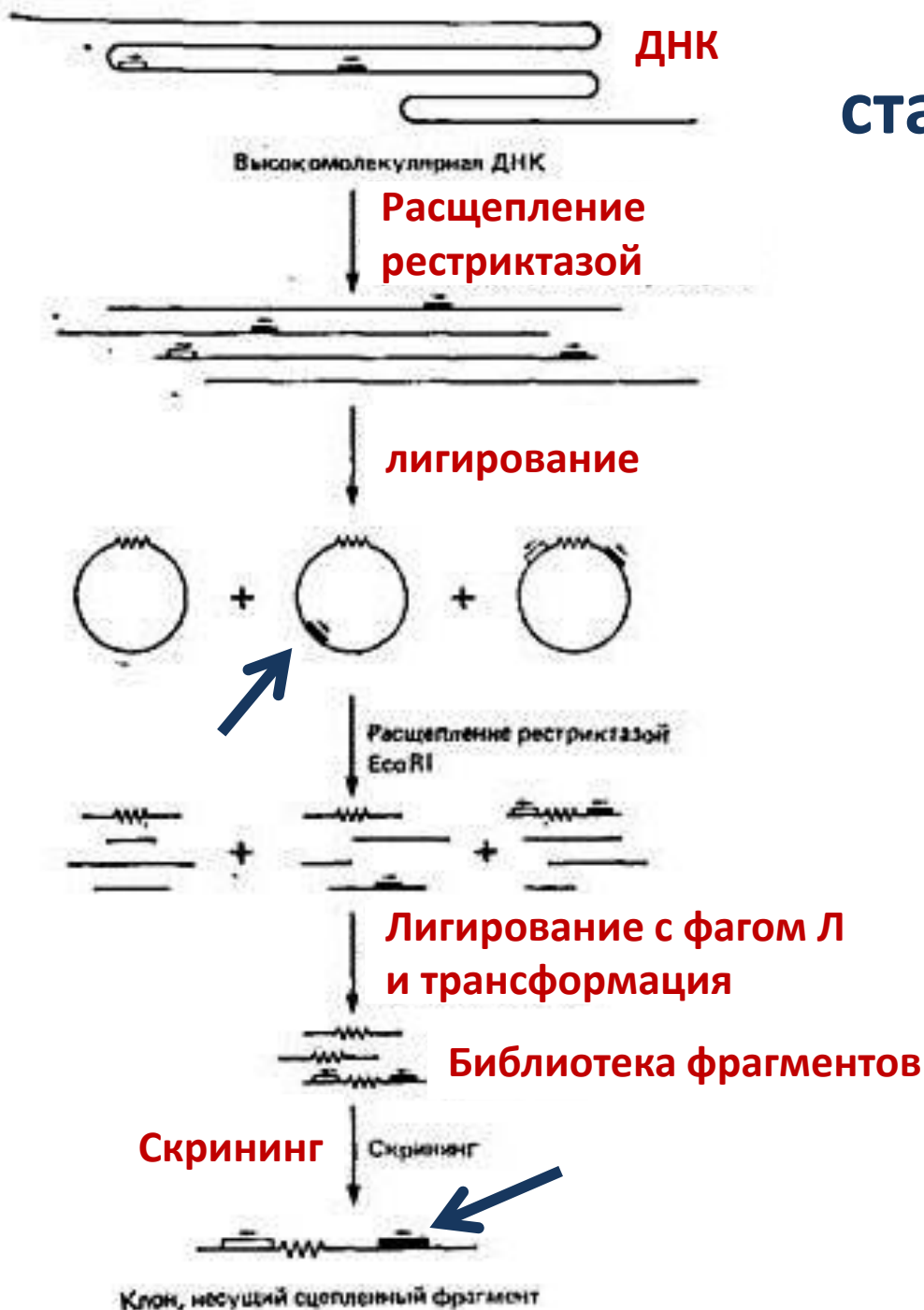
- **Прогулка по хромосоме** заключается в последовательном отборе клонов, содержащих частично перекрывающиеся фрагменты ДНК из определенного района генома
- На первом этапе проводят скрининг библиотеки генов с помощью ДНК-зонда, сцепленного с определенным геном
- После нахождения положительных клонов последние сами служат зондами для изоляции следующих клонов
- Каждый отобранный фрагмент используют в качестве ДНК-зонда для последующего поиска
- В результате получают набор клонированных фрагментов ДНК с областью перекрывания
- Группа таких клонов носит название контиг
- С помощью перекрывающихся последовательностей анализируют неизвестные протяженные участки генома, прилегающие друг к другу.



# Принцип создания библиотек прыжков

- Основная стратегия метода «прыжков по хромосоме» состоит в получении кольцевых очень крупных фрагментов ДНК путем их лигирования.
- Образование колец позволяет физически сблизить участки ДНК, расположенные в геноме на значительном расстоянии друг от друга.
- Клонирование таких соединенных фрагментов в стандартные векторы позволяет затем получить геномную библиотеку клонов – «прыжков».

# Принцип создания стандартной библиотеки прыжков



- С его помощью можно клонировать последовательности ДНК, значительно удаленные на генетической карте путем лигирования стартовой и конечной точки прыжка
- Фрагмент переклонируют в плазмиду, чтобы упростить работу
- Субклоны идентифицируют благодаря наличию маркера