

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

ЛЕКЦИЯ № 3-5

FOR MORE INFORMATION...

Доцент, к.фармац.н.,
Пархач Маргарита Евгеньевна,
Белорусский государственный университет,
кафедра радиационной химии и ХФТ
parkhach_marg@mail.ru

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ
ИМЕЮЩИХСЯ
И ПОЛУЧЕНИЕ НОВЫХ
БИООБЪЕКТОВ (БО)

СУПЕРПРОДУЦЕНТ

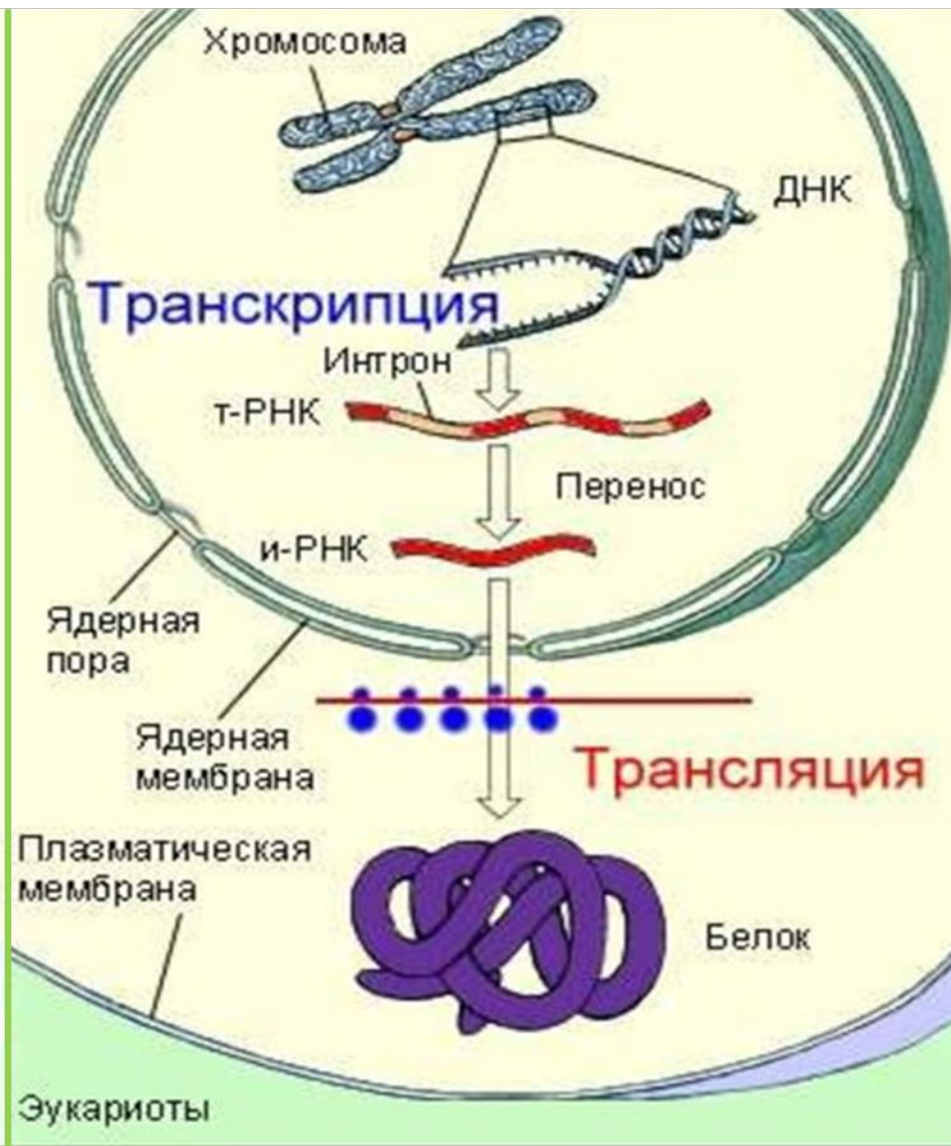
— биообъект отличающийся от исходного «дичка» рядом показателей:

- **высокий выход целевого продукта;**
- **способность расти на относительно дешевых питательных средах;**
- **благоприятные реологические свойства биомассы, обеспечивающие относительно несложное выделение продукта;**
- **устойчивость к вирусам, в т.ч. фагам;**
- **благоприятные экологические показатели процесса (низкое спорообразование, отсутствие неприятного запаха и т.д.).**

Современные методы совершенствования биообъектов

- мутагенез и селекция;**
- клеточная инженерия;**
- генетическая
инженерия**

Центральная парадигма молекулярной биологии



Экспрессия генов

Совершенствование биообъектов методами мутагенеза и селекции

Мутация — изменение структуры ДНК, приводящее (в итоге) к изменению фенотипа биообъекта.

Меняется биосинтетическая способность биообъекта: изменяется либо набор его ферментов, либо активность некоторых из них.

Когда дети спрашивают "Почему у бобра большие передние зубы?" взрослые обычно отвечают "Чтобы было удобнее грызть деревья и складывать из них плотину". Хотя правильный ответ должен быть "Потому что выжили бобры с большими зубами, а бобры с мелкими зубами вымерли. Так уж устроена эволюция — мы видим лишь выжившие виды, а их особенности — это то, что помогло им выжить. Природа не помогает животным, она лишь оставляет в живых тех, кто мутировал удачнее". Так что почти на все вопросы о животных можно не парясь отвечать "Остальные умерли". "Почему у зайчика зимой белая шубка?" — серых зимой сожрали волки. "Почему зебра полосатая?" — зебр без полос сожрали львы. "Почему у слона большие уши?" — слоны с маленькими ушами померли от жары. "А почему у капибары..." — остальные умерли,

будешь задавать много вопросов — выживет твой молчаливый брат.

Классификация мутаций

В зависимости от факторов, вызывающих мутации, их разделяют на спонтанные и индуцированные.

1. Спонтанные мутации возникают самопроизвольно на протяжении всей жизни организма в *нормальных* для него условиях окружающей среды (спонтанные мутации в эукариотических клетках возникают с частотой 10^{-9} – 10^{-12} на нуклеотид за клеточную генерацию).
2. Индуцированные мутации – это наследуемые изменения генома, возникающие в результате тех или иных *мутагенных воздействий* в искусственных (экспериментальных) условиях или при неблагоприятных воздействиях окружающей среды.

Спонтанный мутагенез является источником изменчивости организмов в процессе эволюции.

Пример эффективности **индуцированного** мутагенеза в БТ - создание современных суперпродуцентов пенициллина.

Совершенствование БО путем преднамеренного искусственного мутагенеза и последующей селекции

I стадия. Осуществляется
обработка биообъекта
мутагенами (собственно мутагенез);

II стадия. Отбор и оценка
полезных мутаций (селекция)

По выраженности признака, возникающего в результате мутации, клетки БО в популяции составляют **вариационный ряд**



Большинство клеток имеют среднюю выраженность признака. Отклонения от среднего значения встречаются в популяции тем **реже**, чем **больше** величина отклонения от среднего значения

Индукцированные мутации - разброс мутантов по выраженности признаков больше.

Спонтанные мутации встречаются редко, разброс по степени выраженности признаков невелик.

Классификация мутаций

- **В зависимости от размеров мутируемых сегментов генома:**
 - **Геномные**
 - аллополиплоидизация
 - аутополиплоидизация
 - **Хромосомные** (делеции, дупликации, инверсии, транслокации *участков* хромосом)
 - анеуплоидия (измен. числа отдельных хромосом)
 - хромосомные aberrации (крупные измен. структуры отдельных хромосом)
 - **Генные** (изменение первичной структуры ДНК):
 - ✓ делеции, дупликации, инверсии, транслокации *участков* генов
 - ✓ точковые мутации (изменение 1 нуклеотида)
 - транзиции
 - трансверсии

Геномные мутации

Изменение числа хромосом.

Полиплоидия - увеличение числа хромосом, кратное гаплоидному набору. Появляется в рез. нарушения хода митоза и мейоза. Полиплоиды часто встречаются среди растений. ↑ жизнеспособность и позволяет сохраняться в борьбе за существование.

Типы полиплоидов:

1. Автополиплоидия – формы, возникающие в рез. умножения числа хромосом собственного генома, кратное $2n$. Возникают при:

- выпадении цитокинеза, завершающего процесс митоза;
- при отсутствии редукционного деления во время мейоза,
- при разрушении веретена деления при делении клеток.

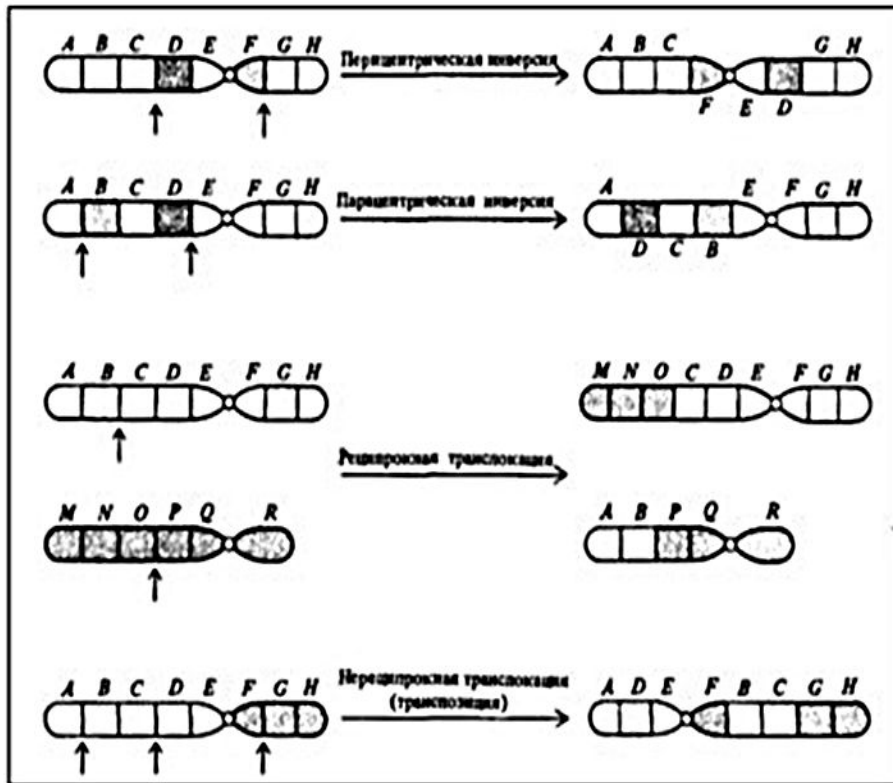
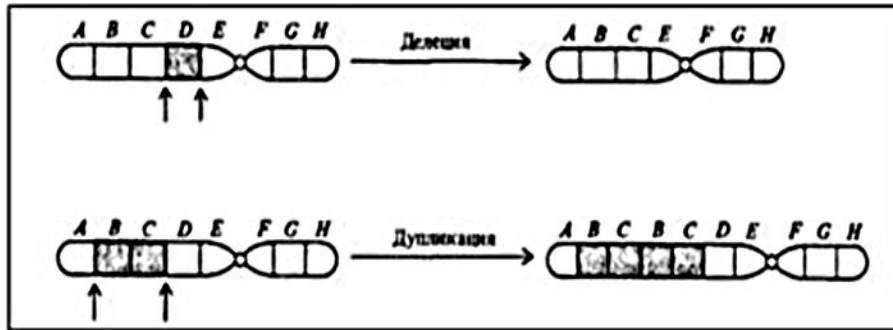
Сопровождается увеличением размеров организма, но понижением его фертильности.

2. Аллополиплоидия – формы, возникающие в результате умножения числа хромосом двух разных ГЕНОМОВ. Возникают при гибридизации целых неродственных геномов

Хромосомные мутации

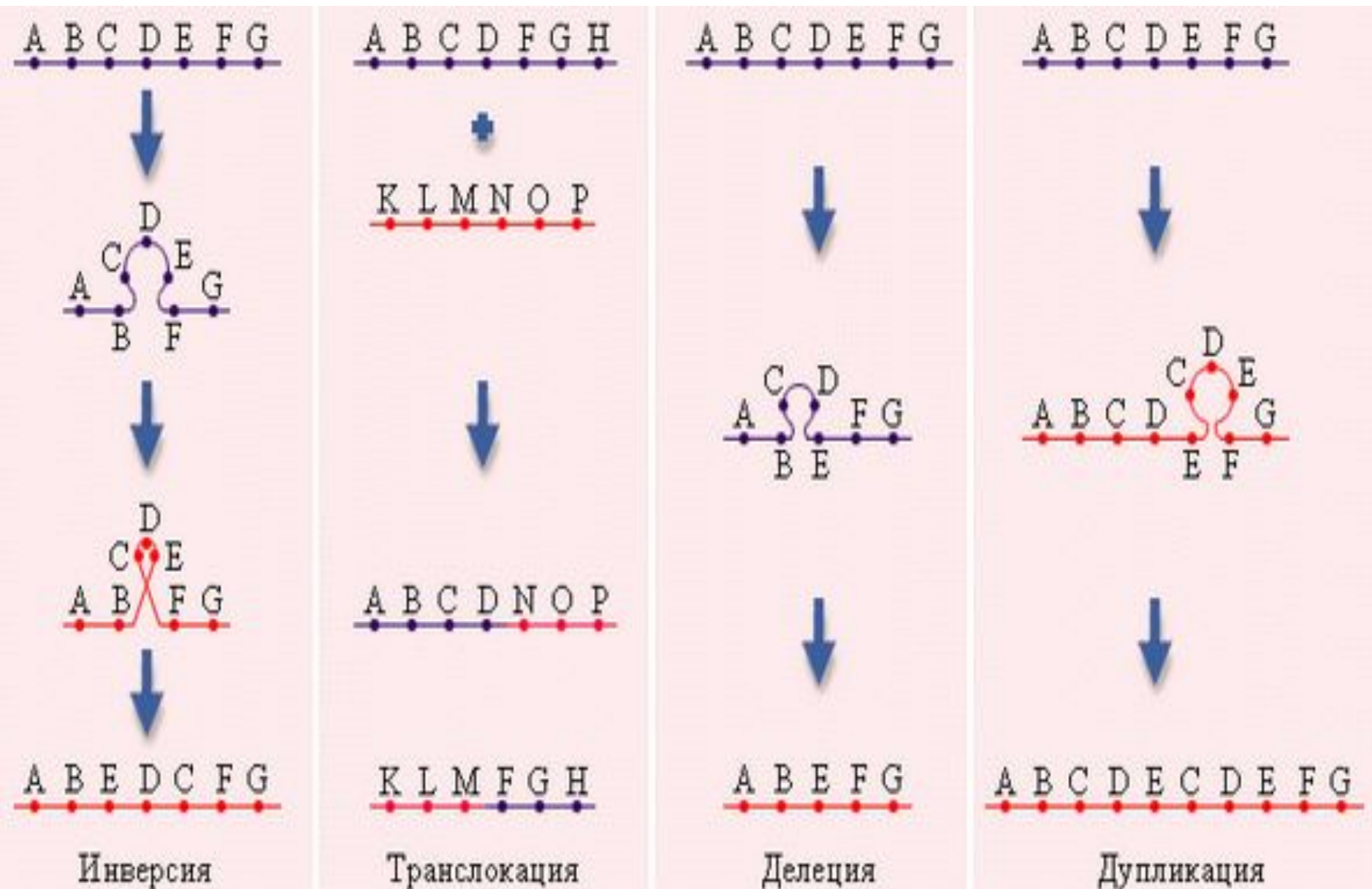
2.

При хромосомных мутациях происходят как изменение числа отдельных хромосом в геноме (анеуплоидия), так и крупные перестройки структуры отдельных хромосом (хромосомные aberrации):



- Делеция - потеря части генетического материала.
- Дупликация - удвоение части генетического материала.
- Инверсия - изменение ориентации сегментов хромосом в отдельных хромосомах.
- Транслокация - перенос части генетического материала с одной хромосомы на другую.

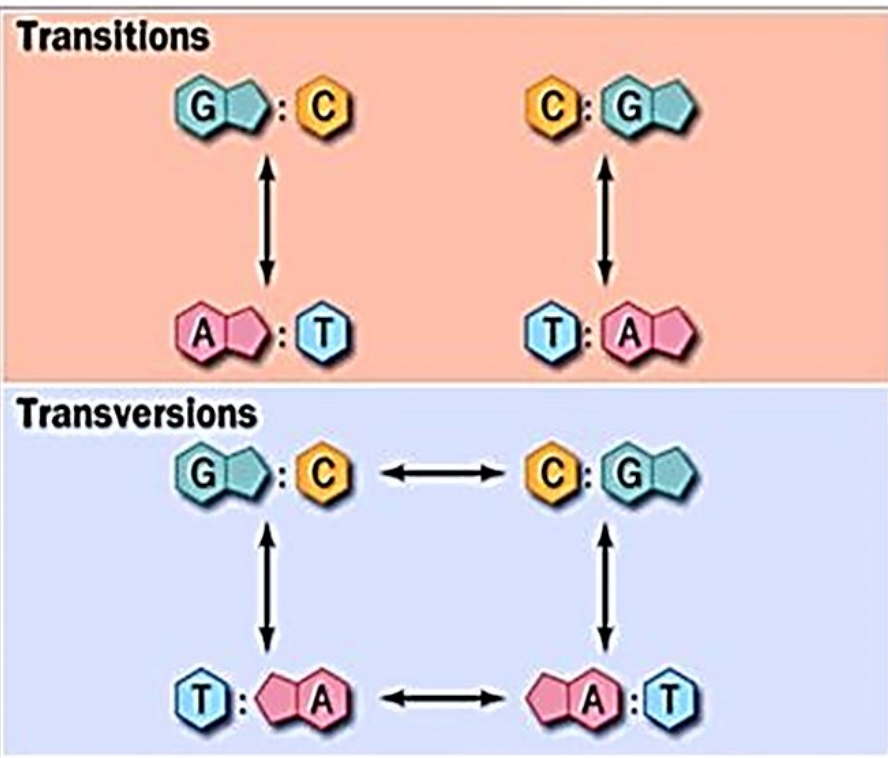
Хромосомные мутации



Генные мутации

3. Генные мутации - изменения первичной структуры ДНК генов под действием мутагенных факторов (встречаются более часто, чем предыдущие два типа мутаций).

а) В результате генных мутаций происходят замены, делеции и вставки одного или нескольких нуклеотидов, транслокации, дупликации и инверсии различных частей гена.

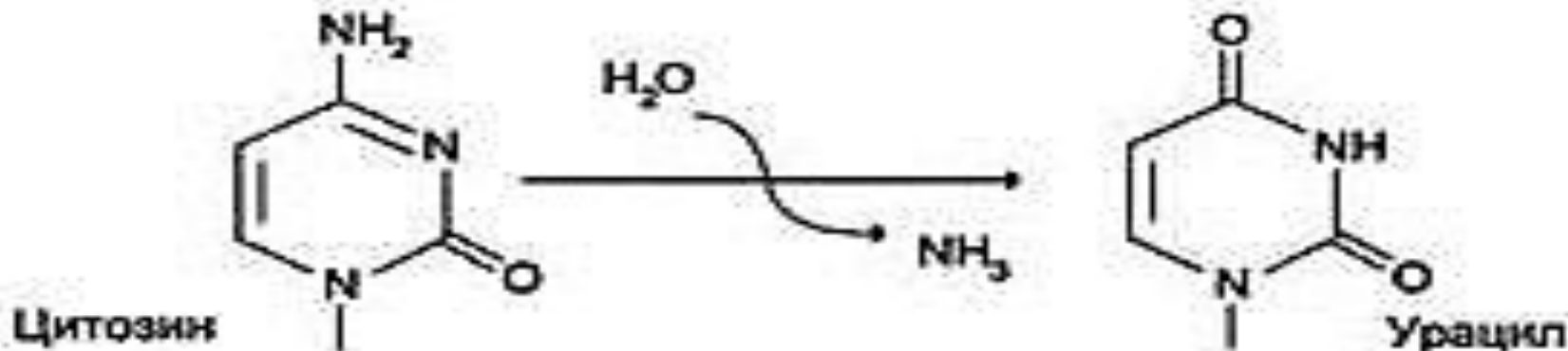


б) Если изменяется лишь один нуклеотид, говорят о точковых мутациях. Точковые мутации с заменой оснований разделяют на два класса:

- транзиции (замена пурина на пурин или пиримидина на пиримидин)
- трансверсии (замена пурина на пиримидин или наоборот).

Генные мутации – замена азотистых оснований в нуклеотидах

В этом случае одна комплементарная нуклеотидная пара молекулы ДНК заменяется в ряду циклов репликации на другую ($\approx 20\%$ всех генных мутаций). Например, в результате дезаминирования (при воздействии мутагена) цитозина образуется урацил:



В ДНК образ. нуклеотидная пара Г-У вместо Г-Ц. Если ошибка не будет репарирована ферм. ДНК-гликолазой, при очередной репликации цепи ДНК разойдутся, против Г будет установлен Ц, а на др. цепи против У встанет А. В результате одна из дочерних молекул ДНК будет содержать аномальную пару У-А. При ее последующей репликации в одной из молекул напротив А встанет Т. В итоге произойдет

Генные мутации – инверсия в пределах гена

Происх. вследствие поворота участка ДНК на 180° , например, при образовании петли в ДНК. В петле репликация идет в обратном направлении. Далее этот участок сшивается с остальной нитью ДНК, но оказывается перевернутым наоборот.

Если инверсия происходит в структурном гене, то при синтезе пептида часть его аминокислот будет иметь обратную последовательность, что вызовет изменение свойств белка.

Генные мутации – сдвиг рамки считывания

Происходит изменение количества нуклеотидных пар в составе гена. Это может быть как выпадение, так и вставка одной или нескольких нуклеотидных пар в ДНК. Если происходит делеция или вставка числа нуклеотидов **не кратного трем, то рамка считывания сдвигается и трансляция генетического кода обесмысливается.**

Если кол-во вставленных или выпавших нуклеотидов кратно трем, то сдвига рамки считывания не происходит, но при трансляции таких генов в пептидную цепь будут включены лишние или утрачены значащие аминокислоты

Генных мутаций по типу сдвига рамки считывания больше всего. Наиболее часто возникают в повторяющихся нуклеотидных последовательностях.

Вставка или выпадение нуклеотидных пар может произойти вследствие воздействия определенных химических веществ, которые деформируют двойную спираль ДНК.

Рентгеновское облучение может приводить к выпадению, т. е. делеции участка с большим количеством пар нуклеотидов.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОД (по мРНК)

НИРЕНБЕРГ М. и С.ОЧОА В 1966 г.

		Вторая буква кодонов							
		У		Ц		А		Г	
У	У	УУ ^У	Phe	УЦ ^У	Ser	УА ^У	Tyr	УГ ^У	Cys
		УУ ^Ц	Phe	УЦ ^Ц	Ser	УА ^Ц	Tyr	УГ ^Ц	Cys
	УУ ^А	Leu	УЦ ^А	Ser	УА ^А	Стоп	УГ ^А	Стоп	
	УУ ^Г	Leu	УЦ ^Г	Ser	УА ^Г	Стоп	УГ ^Г	Trp	
Ц	Ц	ЦУ ^У	Leu	ЦЦ ^У	Pro	ЦА ^У	His	ЦГ ^У	Arg
		ЦУ ^Ц	Leu	ЦЦ ^Ц	Pro	ЦА ^Ц	His	ЦГ ^Ц	Arg
	ЦУ ^А	Leu	ЦЦ ^А	Pro	ЦА ^А	Gln	ЦГ ^А	Arg	
	ЦУ ^Г	Leu	ЦЦ ^Г	Pro	ЦА ^Г	Gln	ЦГ ^Г	Arg	
А	А	АУ ^У	Ile	АЦ ^У	Thr	АА ^У	Asn	АГ ^У	Ser
		АУ ^Ц	Ile	АЦ ^Ц	Thr	АА ^Ц	Asn	АГ ^Ц	Ser
	АУ ^А	Ile	АЦ ^А	Thr	АА ^А	Lys	АГ ^А	Arg	
	АУ ^Г	Met	АЦ ^Г	Thr	АА ^Г	Lys	АГ ^Г	Arg	
Г	Г	ГУ ^У	Val	ГЦ ^У	Ala	ГА ^У	Asp	ГГ ^У	Gly
		ГУ ^Ц	Val	ГЦ ^Ц	Ala	ГА ^Ц	Asp	ГГ ^Ц	Gly
	ГУ ^А	Val	ГЦ ^А	Ala	ГА ^А	Glu	ГГ ^А	Gly	
	ГУ ^Г	Val	ГЦ ^Г	Ala	ГА ^Г	Glu	ГГ ^Г	Gly	

Первая
буква
кодонов

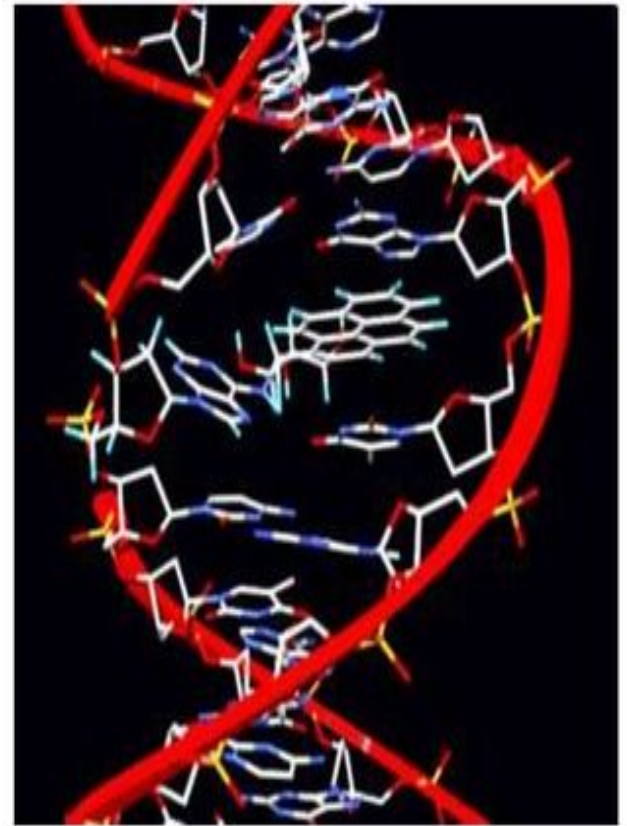
Словарь для перевода генетической информации с языка нуклеотидов на язык аминокислот - **биологический код**

Триплеты нуклеотидов (кодоны) mRNA кодируют каждый одну аминокислоту

Интеркаляция

Встраивание плоской гетероциклической молекулы мутагена между основаниями ДНК, что приводит к **сдвигу рамки считывания**, а также к снижению плавучей плотности ДНК и ингибированию процессов репликации и транскрипции.

Акридиновые красители,
Бромистый этидий (ethidium bromide) и др. вещества.



Интеркаляция
ДНК молекулой
канцерогена

Как можно объяснить
отсутствие генетических
последствий в результате
некоторых мутаций?

ЗАДАЧА 1

Как изменится структура белка, если в участке гена $3' - \text{АЦАТТТАААГТЦ} - 5'$ – смысловая

НИТЬ

в результате точковой мутации девятый слева нуклеотид был заменен на гуанин?

ОТВЕТ 1

		Вторая буква кодонов							
		У		Ц		А		Г	
Первая буква кодонов	У	УУ У	Phe	УЦ У	Ser	УА У	Tyr	УГ У	Cys
		УУ Ц	Phe	УЦ Ц	Ser	УА Ц	Tyr	УГ Ц	Cys
	УУ А	Leu	УЦ А	Ser	УА А	Стоп	УГ А	Стоп	
	УУ Г	Leu	УЦ Г	Ser	УА Г	Стоп	УГ Г	Trp	
	Ц	ЦУ У	Leu	ЦЦ У	Pro	ЦА У	His	ЦГ У	Arg
ЦУ Ц		Leu	ЦЦ Ц	Pro	ЦА Ц	His	ЦГ Ц	Arg	
А	ЦУ А	Leu	ЦЦ А	Pro	ЦА А	Gln	ЦГ А	Arg	
	ЦУ Г	Leu	ЦЦ Г	Pro	ЦА Г	Gln	ЦГ Г	Arg	
А	АУ У	Ile	АЦ У	Thr	АА У	Asn	АГ У	Ser	
	АУ Ц	Ile	АЦ Ц	Thr	АА Ц	Asn	АГ Ц	Ser	
Г	АУ А	Ile	АЦ А	Thr	АА А	Lys	АГ А	Arg	
	АУ Г	Met	АЦ Г	Thr	АА Г	Lys	АГ Г	Arg	
Г	ГУ У	Val	ГЦ У	Ala	ГА У	Asp	ГГ У	Gly	
	ГУ Ц	Val	ГЦ Ц	Ala	ГА Ц	Asp	ГГ Ц	Gly	
Г	ГУ А	Val	ГЦ А	Ala	ГА А	Glu	ГГ А	Gly	
	ГУ Г	Val	ГЦ Г	Ala	ГА Г	Glu	ГГ Г	Gly	

3'- АЦА ТТТ ААА ГТЦ -3'

- иРНК: 5'- УГУ ААА УУУ ЦАГ-3'

Пептид: цис-лиз-фен-глин

**участок ДНК после замены
нуклеотида**

3'- АЦА ТТТ ААГ ГТЦ -3

иРНК: 5'- УГУ ААА УУЦ ЦАГ-3'

**Синонимическая
замена**

ЗАДАЧА 2

Как изменится структура белка, если из участка гена 3'- АЦАТТТАААГТЦ - 5' (смысловая нить)

в результате точковой мутации были deletированы второй и десятый слева нуклеотиды?

ОТВЕТ 2

		Вторая буква кодонов							
		У		Ц		А		Г	
Первая буква кодонов	У	УУ У	Phe	УЦ У	Ser	УА У	Tyr	УГ У	Cys
		УУ Ц	Phe	УЦ Ц	Ser	УА Ц	Tyr	УГ Ц	Cys
	УУ А	Leu	УЦ А	Ser	УА А	Стоп	УГ А	Стоп	
	УУ Г	Leu	УЦ Г	Ser	УА Г	Стоп	УГ Г	Trp	
	Ц	ЦУ У	Leu	ЦЦ У	Pro	ЦА У	His	ЦГ У	Arg
ЦУ Ц		Leu	ЦЦ Ц	Pro	ЦА Ц	His	ЦГ Ц	Arg	
А	ЦУ А	Leu	ЦЦ А	Pro	ЦА А	Gln	ЦГ А	Arg	
	ЦУ Г	Leu	ЦЦ Г	Pro	ЦА Г	Gln	ЦГ Г	Arg	
Г	АУ У	Ile	АЦ У	Thr	АА У	Asn	АГ У	Ser	
	АУ Ц	Ile	АЦ Ц	Thr	АА Ц	Asn	АГ Ц	Ser	
Г	АУ А	Ile	АЦ А	Thr	АА А	Lys	АГ А	Arg	
	АУ Г	Met	АЦ Г	Thr	АА Г	Lys	АГ Г	Arg	
Г	ГУ У	Val	ГЦ У	Ala	ГА У	Asp	ГГ У	Gly	
	ГУ Ц	Val	ГЦ Ц	Ala	ГА Ц	Asp	ГГ Ц	Gly	
Г	ГУ А	Val	ГЦ А	Ala	ГА А	Glu	ГГ А	Gly	
	ГУ Г	Val	ГЦ Г	Ala	ГА Г	Glu	ГГ Г	Gly	

3'- АЦА ТТТ ААА ГТЦ -5'

- иРНК: 5'- УГУ ААА УУУ ЦАГ-3'

Пептид: цис-лиз-фен-глин

**участок ДНК после делеции
нуклеотидов**

3'-ААТ ТТА ААТ Ц-5'

иРНК: 5'- УУА ААУ УУА Г-3'

**Миссенс-
мутация**

ЗАДАЧА 3

Как изменится структура белка, если в участке гена 3' - АЦАТТТАААГТЦ - 5' смысловая

НИТЬ

в результате точковой мутации третий слева нуклеотид был заменен на тимин?

ОТВЕТ 3

		Вторая буква кодонов							
		У		Ц		А		Г	
Первая буква кодонов	У	УУ У	Phe	УЦ У	Ser	УА У	Tyr	УГ У	Cys
		УУ Ц	Phe	УЦ Ц	Ser	УА Ц	Tyr	УГ Ц	Cys
	УУ А	Leu	УЦ А	Ser	УА А	Стоп	УГ А	Стоп	
	УУ Г	Leu	УЦ Г	Ser	УА Г	Стоп	УГ Г	Trp	
	Ц	ЦУ У	Leu	ЦЦ У	Pro	ЦА У	His	ЦГ У	Arg
ЦУ Ц		Leu	ЦЦ Ц	Pro	ЦА Ц	His	ЦГ Ц	Arg	
А	ЦУ А	Leu	ЦЦ А	Pro	ЦА А	Gln	ЦГ А	Arg	
	ЦУ Г	Leu	ЦЦ Г	Pro	ЦА Г	Gln	ЦГ Г	Arg	
А	АУ У	Ile	АЦ У	Thr	АА У	Asn	АГ У	Ser	
	АУ Ц	Ile	АЦ Ц	Thr	АА Ц	Asn	АГ Ц	Ser	
Г	АУ А	Ile	АЦ А	Thr	АА А	Lys	АГ А	Arg	
	АУ Г	Met	АЦ Г	Thr	АА Г	Lys	АГ Г	Arg	
Г	ГУ У	Val	ГЦ У	Ala	ГА У	Asp	ГГ У	Gly	
	ГУ Ц	Val	ГЦ Ц	Ala	ГА Ц	Asp	ГГ Ц	Gly	
Г	ГУ А	Val	ГЦ А	Ala	ГА А	Glu	ГГ А	Gly	
	ГУ Г	Val	ГЦ Г	Ala	ГА Г	Glu	ГГ Г	Gly	

3'- АЦА ТТТ ААА ГТЦ -3'

- иРНК: 5'- УГУ ААА УУУ ЦАГ-3'

Пептид: цис-лиз-фен-глин

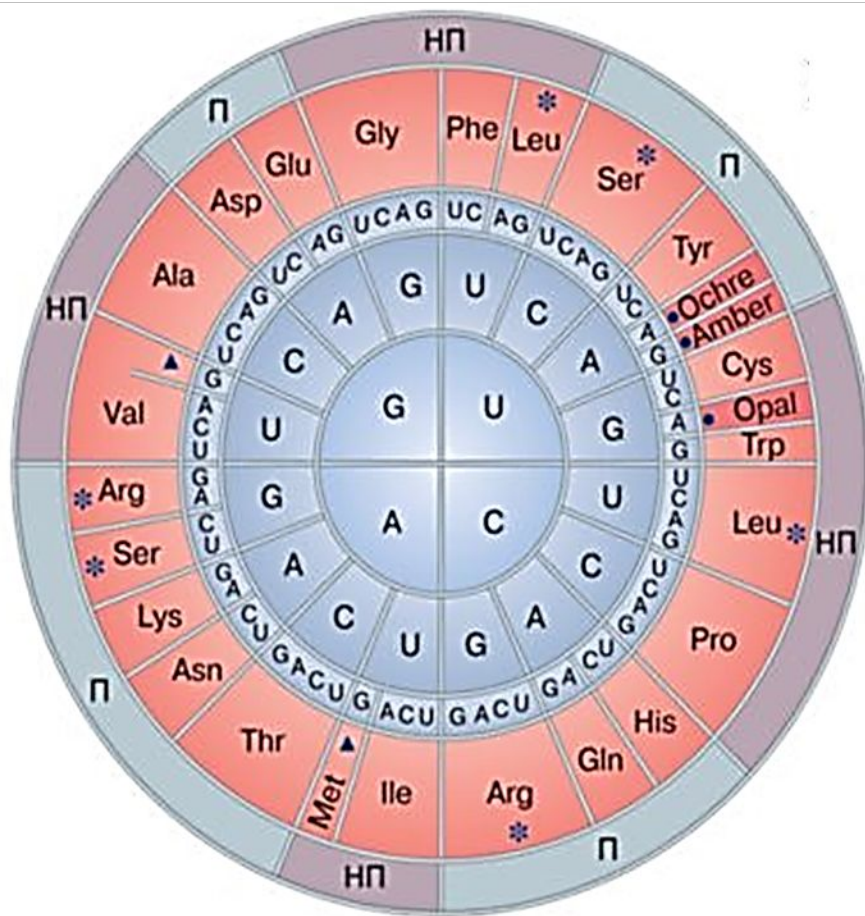
**участок ДНК после замены
нуклеотида**

3'- АЦТ ТТТ ААА ГТЦ -3

иРНК: 5'- УГА ААА УУУ ЦАГ-3'

**Нонсенс
мутация**

Классификация точечных



Из-за вырожденности генетического кода могут быть три генетических последствия точечных мутаций:

- Синонимическая замена нуклеотида с сохранением смысла кодона.
- Миссенс-мутация - изменение смысла кодона, приводящее к замене аминокислоты в соответствующем месте полипептидной цепи.
- Нонсенс-мутация - образование бессмысленного кодона с преждевременной терминацией трансляции.

Точковые мутации

Точечная мутация может не вызывать никаких последствий из-за вырожденности генетического кода, когда несколько кодонов-триплетов кодируют одну и ту же аминокислоту. Т. е. в результате замены одного нуклеотида может образоваться другой кодон, но кодирующий ту же аминокислоту, что и старый – **синонимическая замена (25 % всех замен)**.

Если же смысл кодона меняется, он стал кодировать другую аминокислоту, то замена называется **мисенс-мутацией**. Их частота около **70 %**. При трансляции в пептид будет включена не та аминокислота, в результате чего его свойства изменятся.

Точковая мутация может быть такой, что на месте кодирующей аминокислоты кодона возникает стоп-кодон (УАГ, УАА, УГА), прерывающий (терминирующий) трансляцию. Это **нонсенс-мутации**. Иногда бывают и обратные замены, когда на месте стоп-кодона возникает смысловой. При любой подобной генной мутации функциональный белок уже не может быть синтезирован.



Не всякая мутация сопровождается генетическими последствиями:

- Синонимические замены
- Реверсии (обратные мутации)
- Супрессорные мутации

В процессе совершенствования биообъекта путем индуцированного мутагенеза их стараются избегать или ликвидировать при возникновении

Классификация мутаций

Реверсивная мутация, обратная мутация (reverse mutation, back mutation) — мутация, восстанавливающая дикий тип гена, поврежденного другой мутацией.

Супрессорная мутация — мутация, восстанавливающая дикий **фенотип** (изменённый предшествующей мутацией) **без восстановления** исходного **генотипа**.

Возврат к исходному фенотипу происх. вследствие мутации в другой части того же самого гена или даже другого гена. Механизмы супрессии разнообразны.

Этим супрессорные мутации отличаются от обратных мутаций, которые точно восстанавливают исходный генотип.

Супрессорные и обратные мутации приводят к появлению ревертантов.

Не выгодны для биотехнологии

Репарация

Репарация генетических повреждений – свойство живых организмов восстанавливать нарушения и повреждения, возникшие в ДНК в результате ошибок репликации, а также при воздействии разнообразных эндогенных и внешних мутагенных факторов.

- У бактерии кишечной палочки *E.coli* известно более 50 генов, контролирующих процессы репарации.
 - В среднем в процессе репликации генома млекопитающего длиной 3 млрд нуклеотидов возникает не более 3 ошибок
 - Ежедневно в молекулах ДНК каждой клетки человеческого тела около 100000 звеньев повреждаются за счет разнообразных эндогенных процессов и экзогенных генотоксичных воздействий.
 - Менее 1 повреждения ДНК из 1000 превращается в мутацию.
-

- В основе мутаций на молекулярном уровне лежат две основные причины:
 - Ошибки репликации
 - Мутагенные воздействия различной природы.

Совершенствование биообъектов методами **преднамеренного мутагенеза** и селекции

I стадия – обработка БО мутагенами

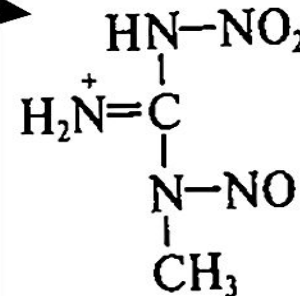
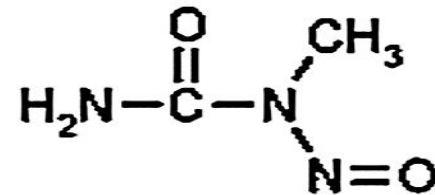
Мутагены

физические

- у/ф лучи;
- гамма – лучи;
- рентгеновские лучи;

химические

- нитрозометилмочевина;
- нитрозогуанидин **и его производные**;
- акридиновые красители;
- некоторые природные в-ва (ДНК-тропные а/б не применяемые в клинике в связи с токсичностью)



Механизм активности мутагенов обусловлен непосредственным воздействием на ДНК (прежде всего на азотистые основания ДНК, что выражается в сшивках, димеризации, алкилировании димеров, интеркаляции).

Биологические – вирусы; транспозоны (переносят уч-ки ДНК в хромосомах)

Повреждения ДНК не должны приводить к гибели БО

Для справки: **интеркаляция** - встраивание плоских ароматических колец между стопками пар азотистых оснований ДНК (обратимое включение м-лы или группы между другими молекулами или группами)



МУТАГЕНЫ

Ионизирующее излучение

Ярко выраженным мутагенным действием обладают:

1. Коротковолновое электромагнитное излучение (УФ-свет, рентгеновские лучи)
2. Элементарные частицы, образующиеся в процессе радиоактивного распада вещества.

Механизм воздействия:

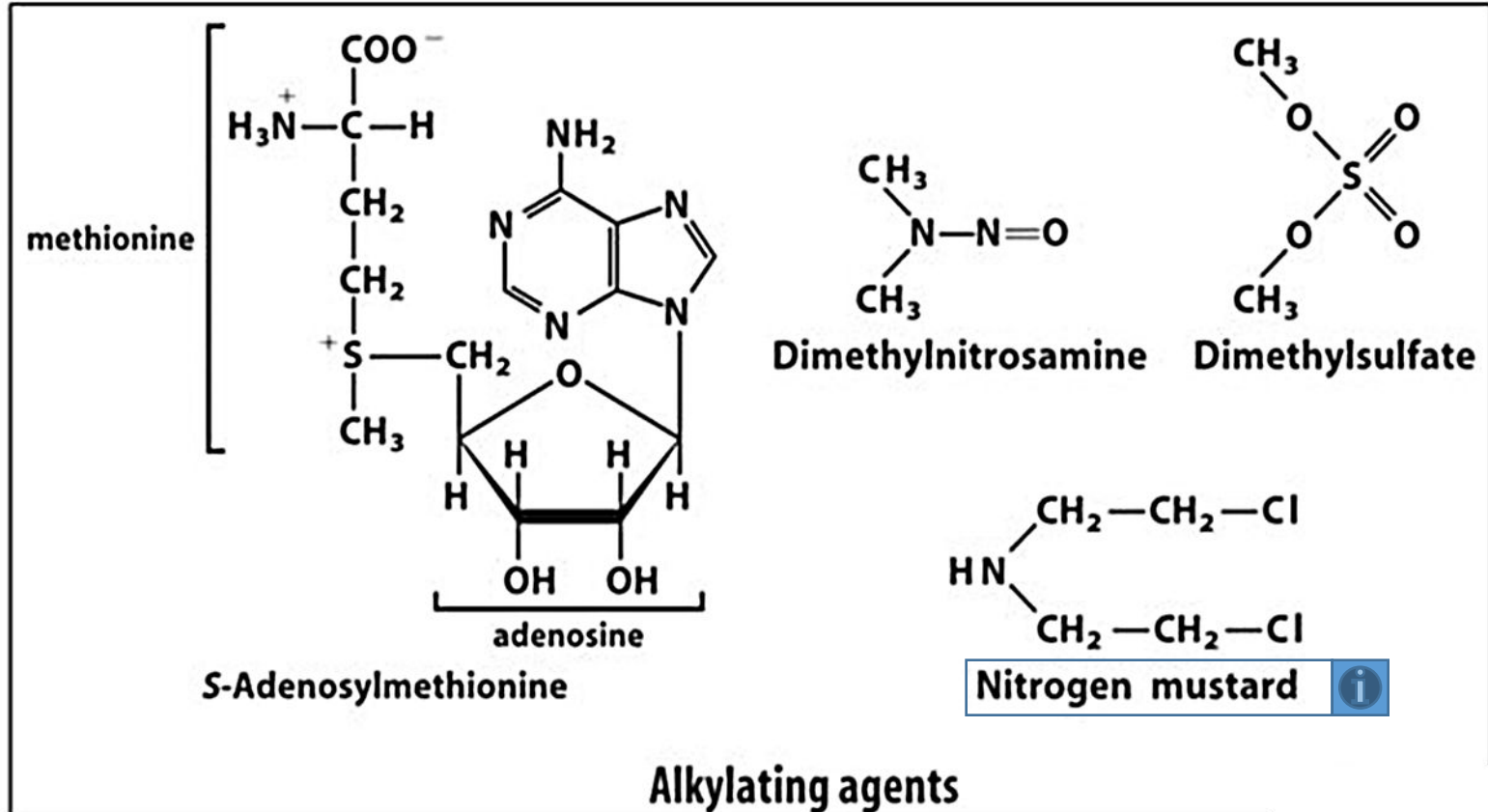
1. Электромагнитное излучение или элементарные частицы, проходя через вещество передают свою энергию атомам в процессе первичного столкновения.
2. В результате первичного столкновения из атома вещества выбиваются электроны, превращая его в положительно заряженный ион.
3. Вторично освобожденные электроны вызывают образование ионов на своем пути до тех пор, пока их энергия не понизится и они не утратят свою ионизирующую способность.

Химические мутагены

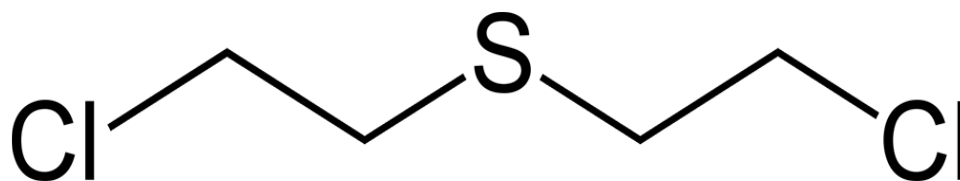
- Многие химические соединения обладают способностью взаимодействовать с ДНК или с ее низкомолекулярными предшественниками и вызывать мутации. Химические мутагены можно разделить на две большие группы
 1. “Явные мутагены” - химические соединения изначально являются реакционноспособными мутагенами, способными непосредственно взаимодействовать с ДНК и изменять ее химическую структуру. в т.ч. простр
 2. “Скрытые мутагены” или промутагены – исходные химические соединения для превращения в мутагены сначала претерпевают *метаболическую активацию* под действием ферментативных систем организма.

Алкилирующие агенты

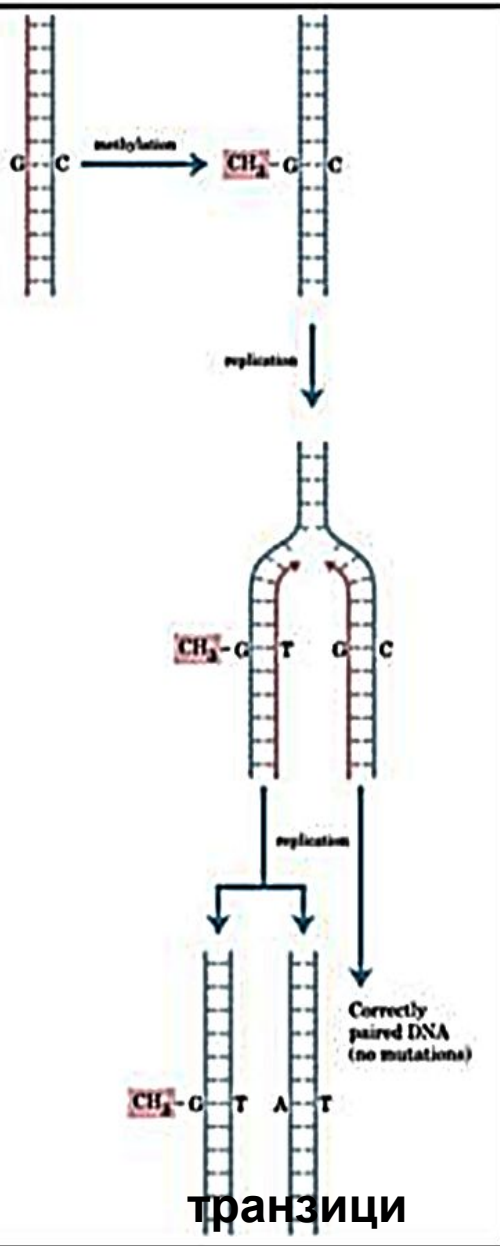
- Наиболее обширным классом химических мутагенов экзогенного происхождения являются алкилирующие агенты.
- Механизм повреждающего воздействия заключается в спонтанном (без участия ферментативных систем организма) переносе алкильных групп этих химических соединений на биологические макромолекулы, в том числе и ДНК.



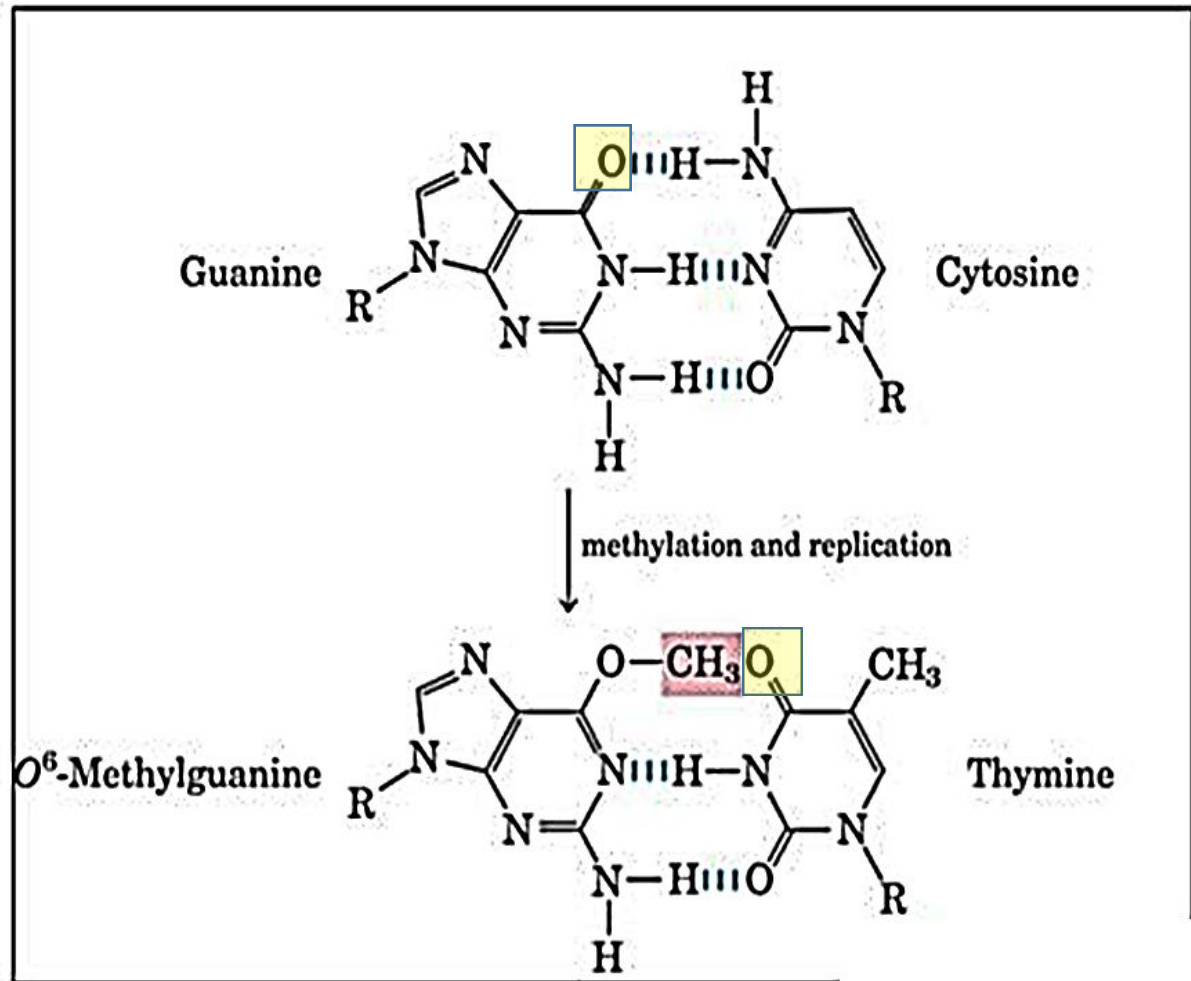
**Nitrogen mustard - азотная горчица —
термин, принятый в США для
обозначения ряда веществ, близких по
строению к горчичному газу — иприту**

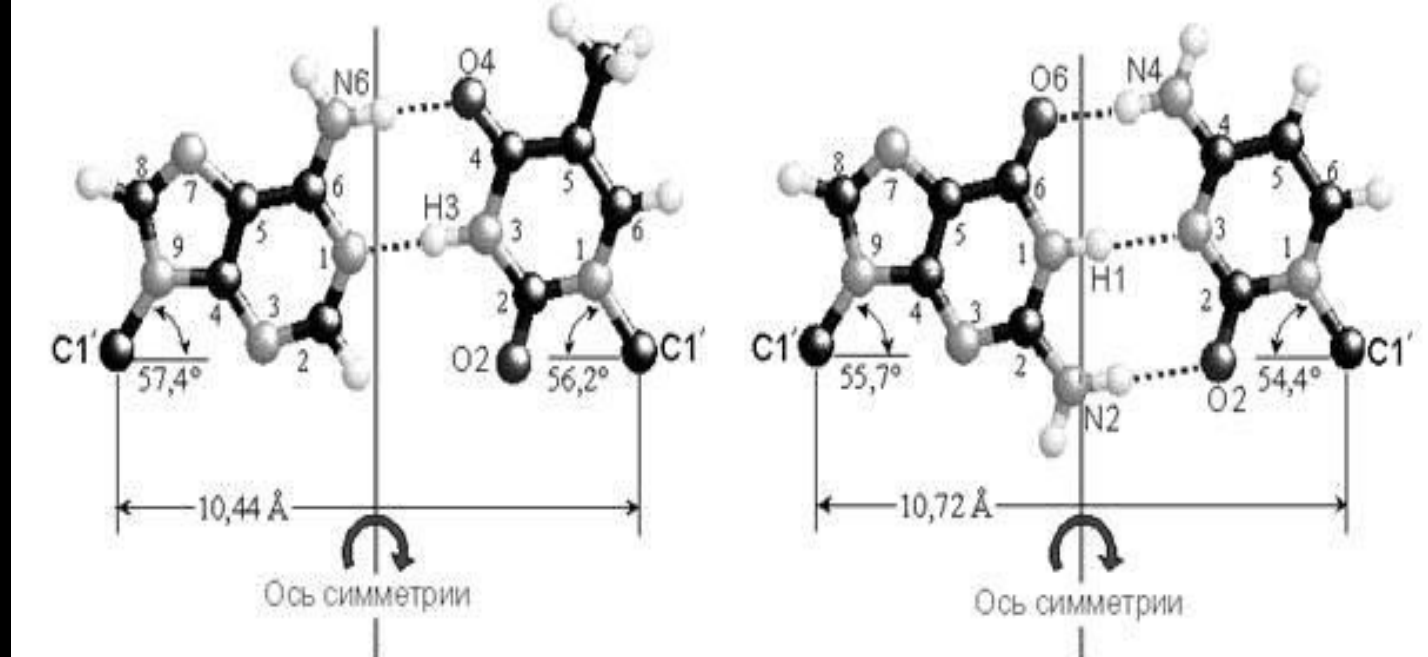


Алкилирующие агенты



- Главным источником мутаций, возникающих под действием алкилирующих агентов, является алкилирование O-6 в гуанине и O-4 в тимине ДНК.





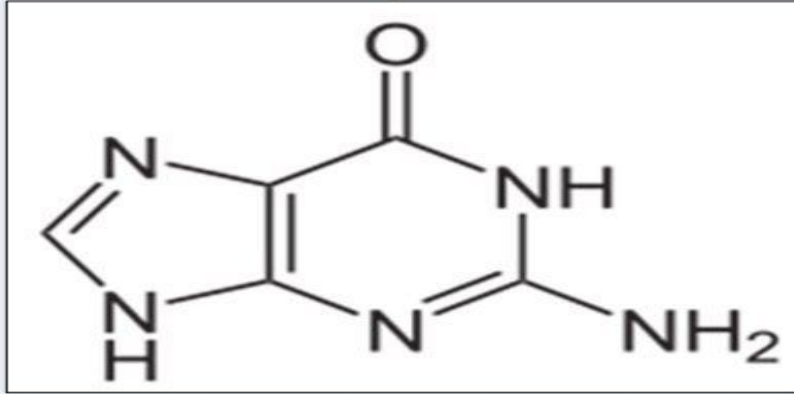
Пара оснований А = Т стабилизируется двумя водородными связями;

Пара С ≡ G – тремя, является более прочной.

Нуклеотиды способны образовывать пары как угодно. Но в **структуре ДНК** они соединяются только так, и никак иначе. Причина заключается в том, что угол между «хвостиками», которые идут к сахарам, совпадает только в этих парах, и, кроме того, совпадают их размеры. Никакая другая пара не образует такой пространственной конфигурации.

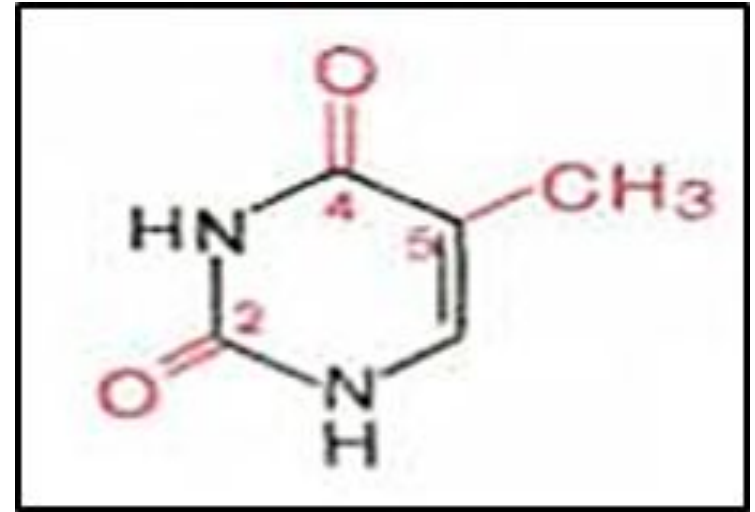
А поскольку они совпадают, то их через сахаро-фосфатный остов можно связать друг с другом

Я – гуанин. Я не хочу
ничего решать.

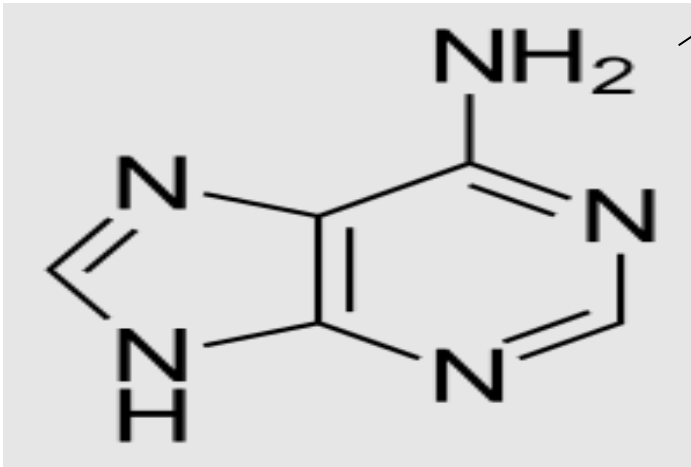


Я хочу быть
комплементарным цитозину

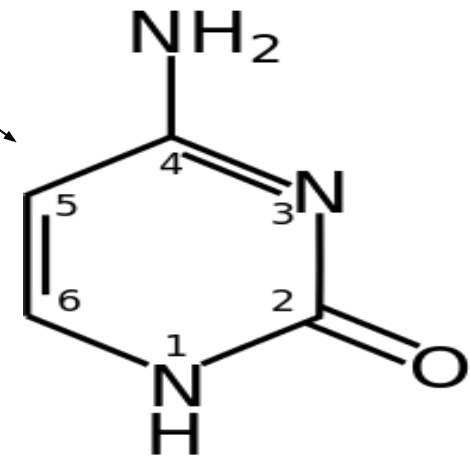
pikabu.ru



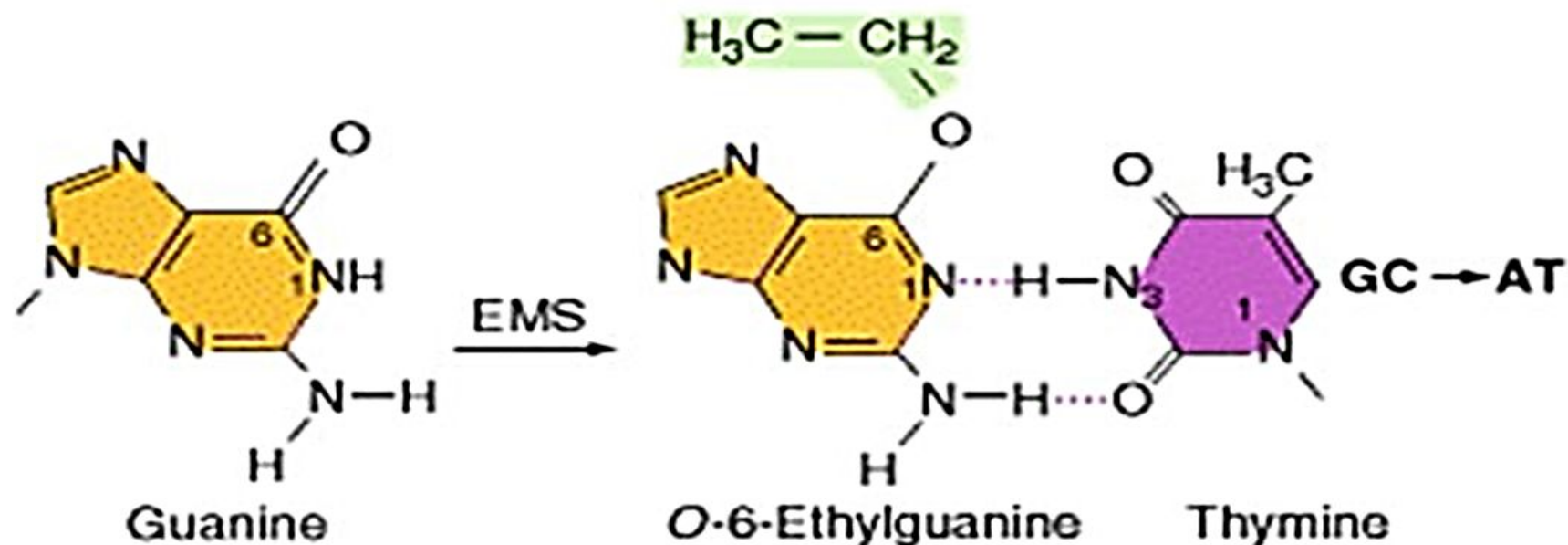
ТИМИН



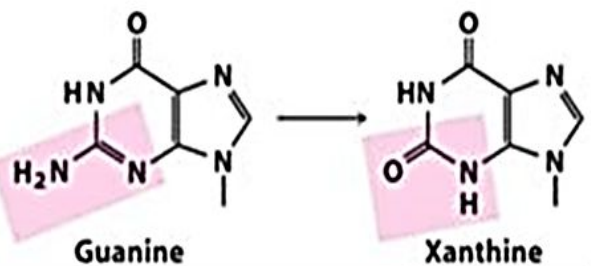
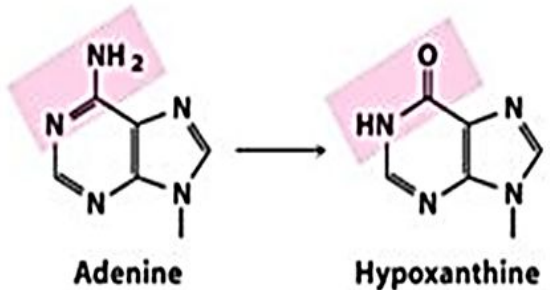
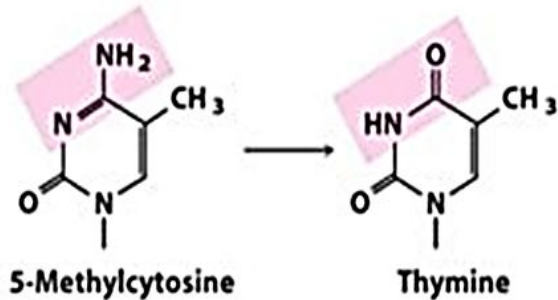
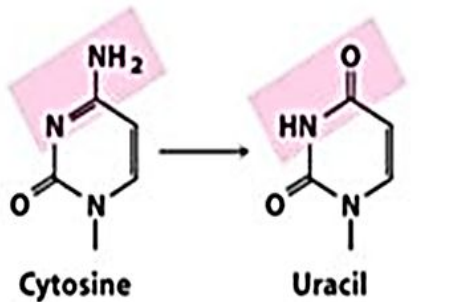
аденин



ЦИТОЗИН



Азотистая кислота как мутаген



Азотистая кислота образуется из нитритов (NaNO_2 и KNO_2) в водных растворах при низких значениях pH.

- Механизм повреждающего действия заключается в дезаминировании азотистых оснований нуклеиновых кислот.

В результате:

1. Спаривание урацила с аденином приводит к транзициям GC→AT.
2. Гипоксантин вызывает обратную транзицию AT→GC.
3. Ксантин не спаривается ни с одним из пиримидинов и его включение оказывается летальным для клетки.

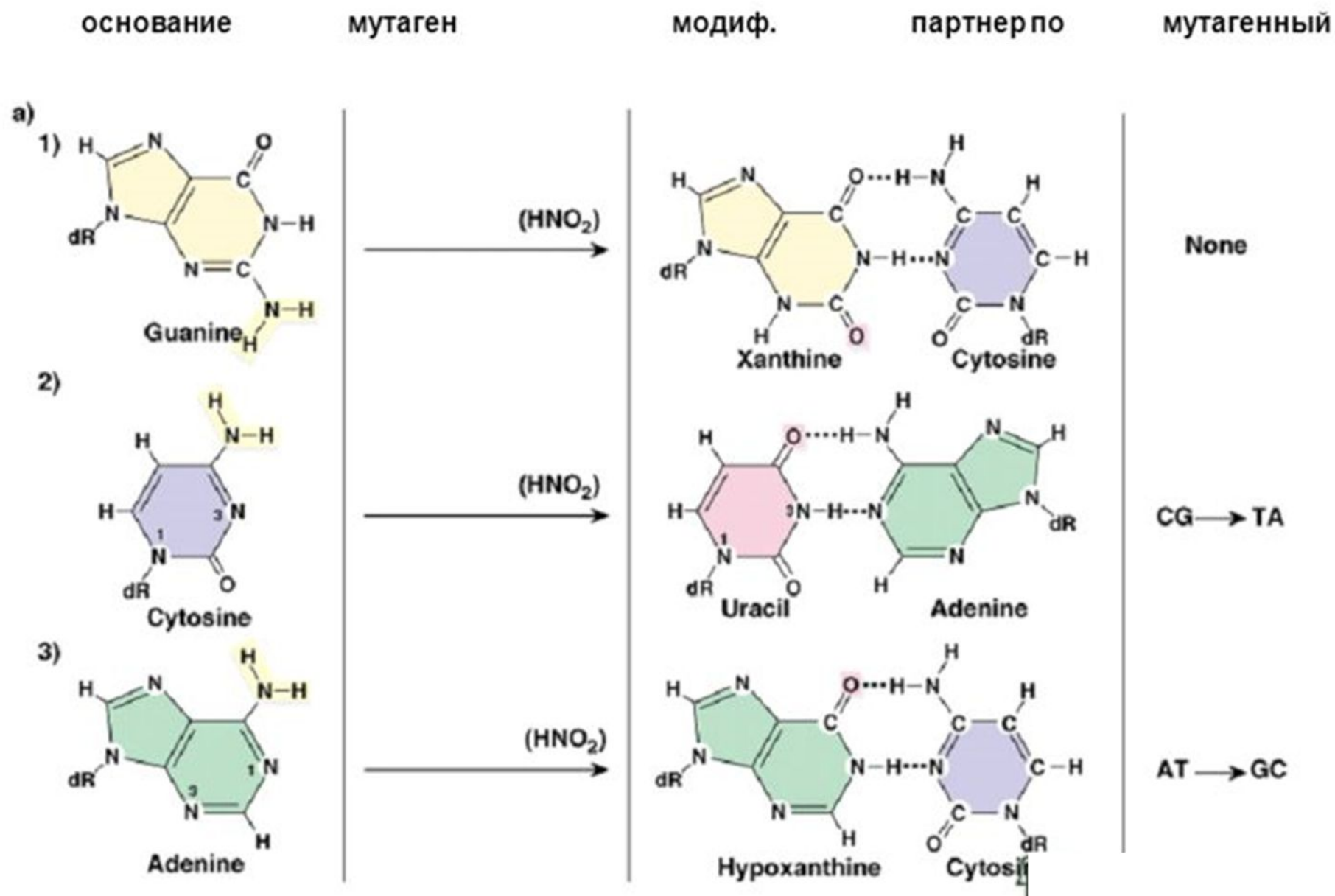
Азотистая кислота как мутаген

Азотистая кислота индуцирует транзиции в обоих направлениях, поэтому вызываемые ею мутации способны ревертировать при повторной обработке этим же мутагеном.

Помимо замен оснований, азотистая кислота индуцирует делеции, что обусловлено ее способностью к поперечному сшиванию цепей ДНК.

У эукариот вызывает сшивки ДНК с гистонами.

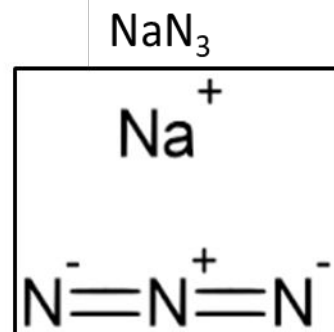
Дезаминирование



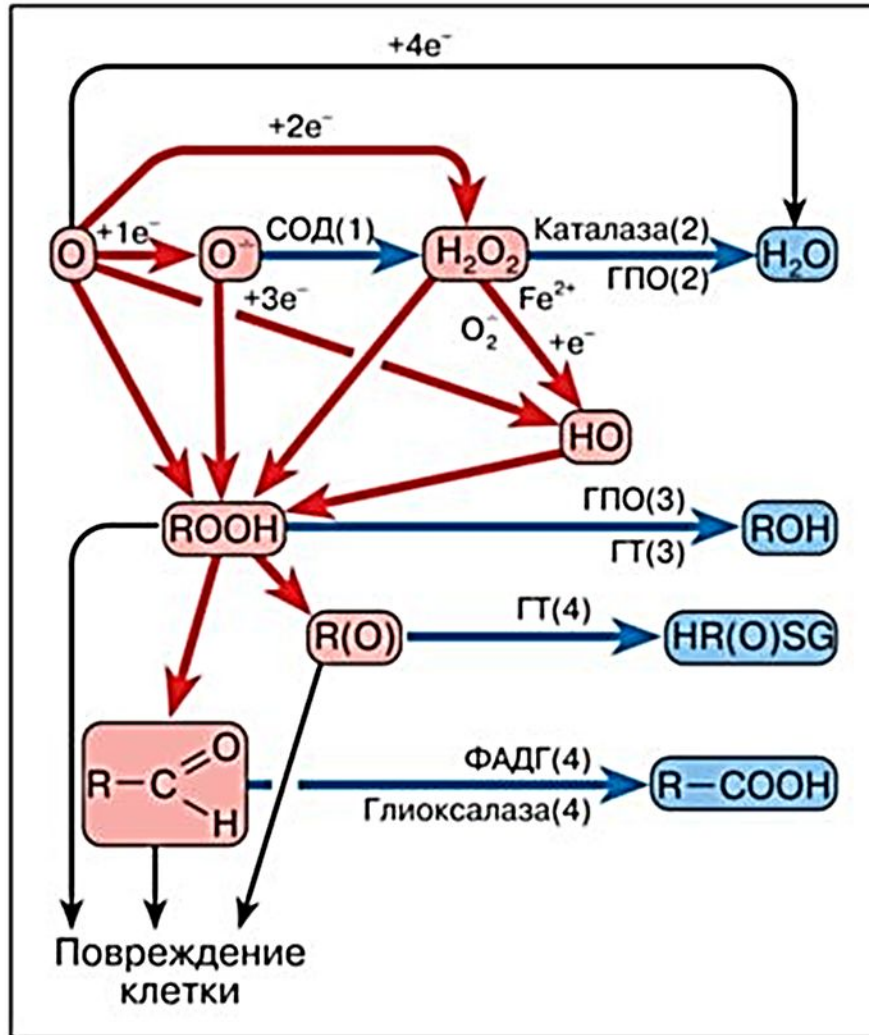
Органические перекиси как мутагены

- Мутагенным действием обладают различные органические перекиси.
- Азид натрия – мощный ингибитор дыхания, также обладает мутагенным действием, что связывают с накоплением при этом ингибировании мутагенных перекисей.

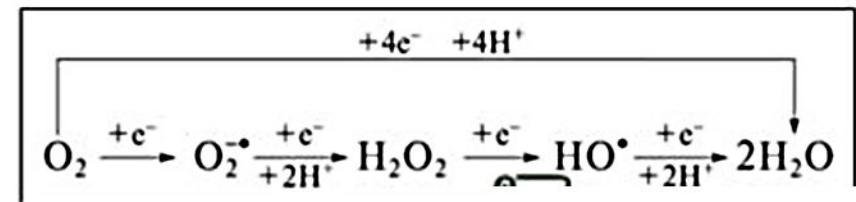
- Механизм повреждающего действия перекисей заключается в индукции образования различных реакционноспособных радикалов – активных форм кислорода (имитируют мутагенное действие рентгеновских лучей) в результате образуются мутации и разрывы хромосом.



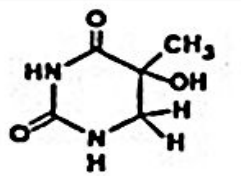
Активные формы кислорода



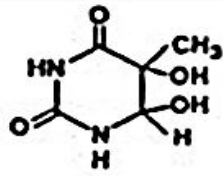
- В клетках активные формы кислорода (АФК) возникают в реакциях восстановления, в результате которых появляются чрезвычайно реакционноспособные промежуточные соединения.
- Наибольшую опасность для ДНК представляют **радикалы гидроксила, супероксид и синглетный кислород**, которые образуются в процессе дыхания, фагоцитоза и при повреждении клеток.
- Ежедневно в каждой клетке человека возникает ~ 10000 таких модифицированных АФК нуклеотидов.



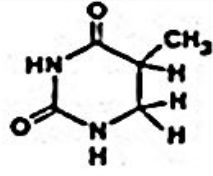
Активные формы кислорода



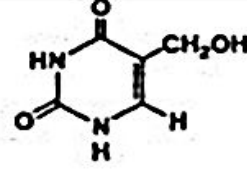
5-hydroxy-6-hydroxythymine



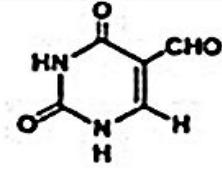
thymine glycol



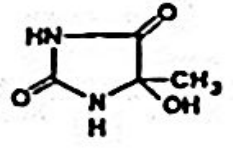
5,6-dihydrothymine



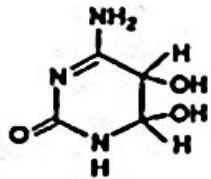
5-hydroxymethyluracil



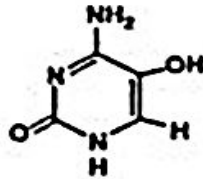
5-formyluracil



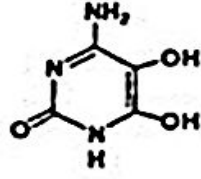
5-hydroxy-5-methylhydantoin



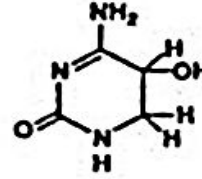
cytosine glycol



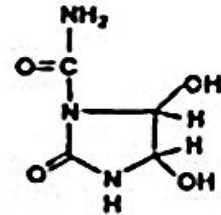
5-hydroxycytosine



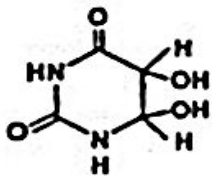
5,6-dihydroxycytosine



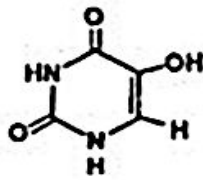
5-hydroxy-6-hydroxycytosine



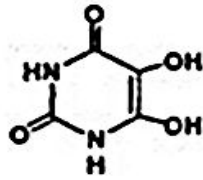
trans-1-carbamoyl-2-oxo-4,5-dihydroimidazo[4,5-d]pyridine



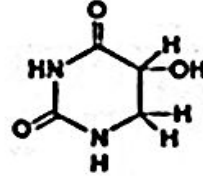
uracil glycol



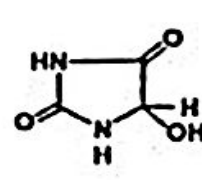
5-hydroxyuracil



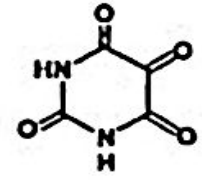
5,6-dihydroxyuracil



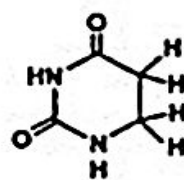
5-hydroxy-6-hydroxyuracil



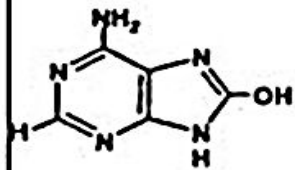
5-hydroxyhydantoin



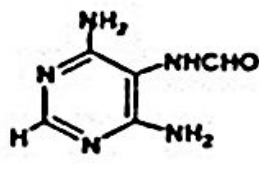
alloxan



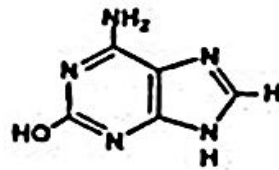
5,6-dihydrouracil



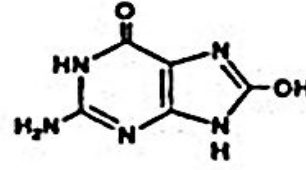
8-hydroxyadenine



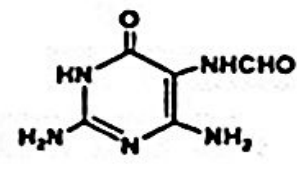
4,6-diamino-5-formamidopyrimidine



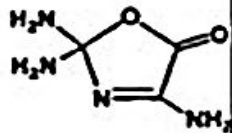
2-hydroxyadenine



8-hydroxyguanine



2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine



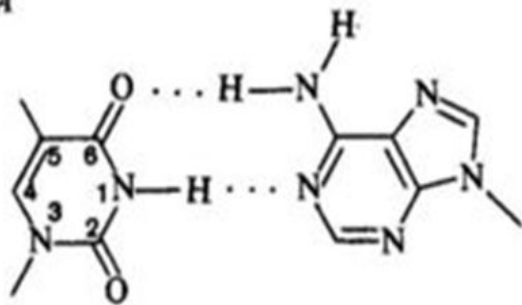
adenosine

Аналоги нуклеозидов и оснований

Аналоги нуклеозидов и оснований: 5-бромдезокситуридин и 2-аминопурин, так же являются сильными мутагенами.

- **5-бромдезокситуридин** обычно включается в ДНК вместо цитозина и спаривается с аденином, что приводит к образованию транзиций GC→AT.
- **2-аминопурин** включается вместо аденина и спаривается с цитозином, в результате чего возникают обратные транзиции AT→GC.

А



Вместо
цитозина
Обычная кетоформа
5-бром урацила (5-BU)

Аденин

Б



Вместо
аденина

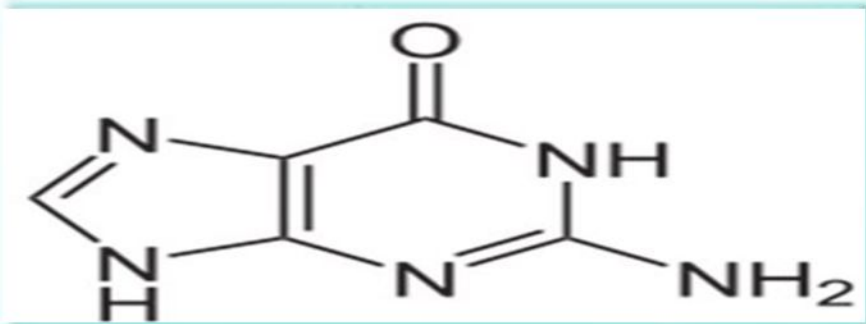
Редкая енольная форма
5-бром урацила (5-BU*)

Гуанин

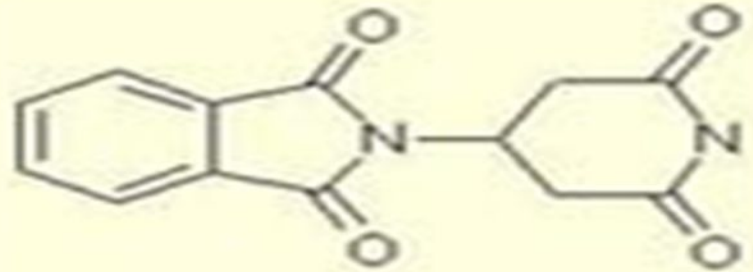
2-аминопурин

Цитозин

Пуриновое основание ДНК гуанин



Талидомид



D-изомер обеспечивает терапевтический эффект талидомида, S-изомер вклинивается в клеточную [ДНК](#) на участках, богатых G-C связями, и препятствует нормальному процессу [репликации](#) ДНК. В организме [энантиомеры](#) способны переходить друг в друга

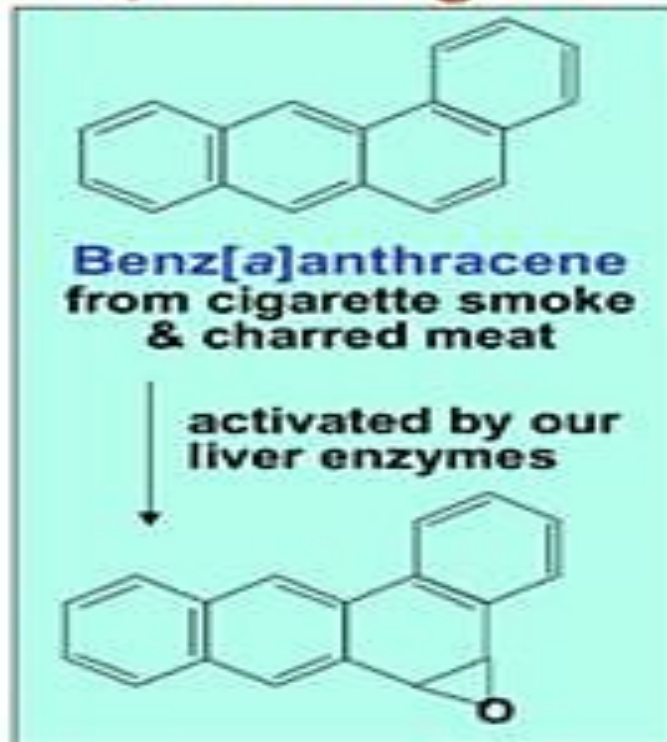
Интеркалирующие соединения

- Красители нуклеиновых кислот, обладающие способностью интеркалировать между основаниями ДНК, вызывают мутации со сдвигом рамки считывания.
- Примерами таких красителей являются широко используемые в лабораторной практике бромистый этидий и производные акридина.

Deletion/insertion: INTERCALATING AGENTS

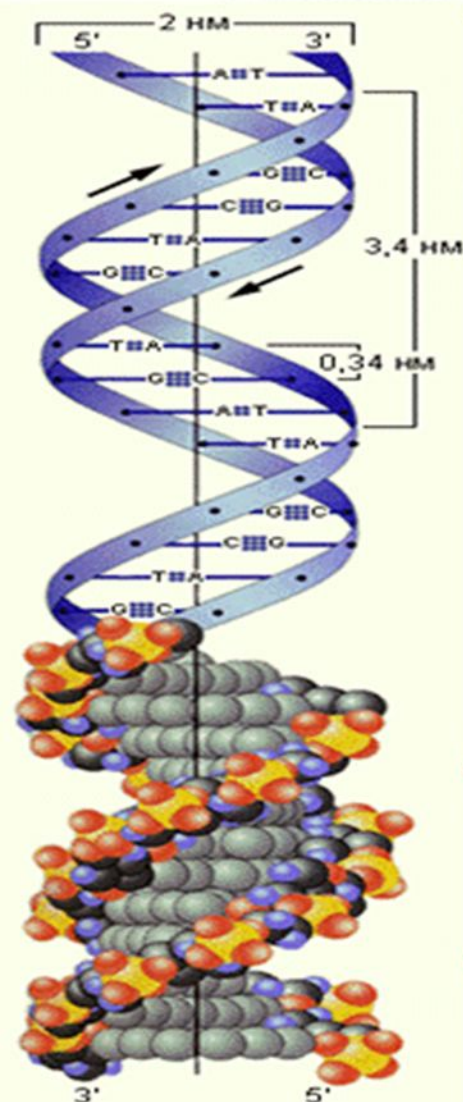
Intercalating agents: flat, multi-ring aromatic molecules

For example:

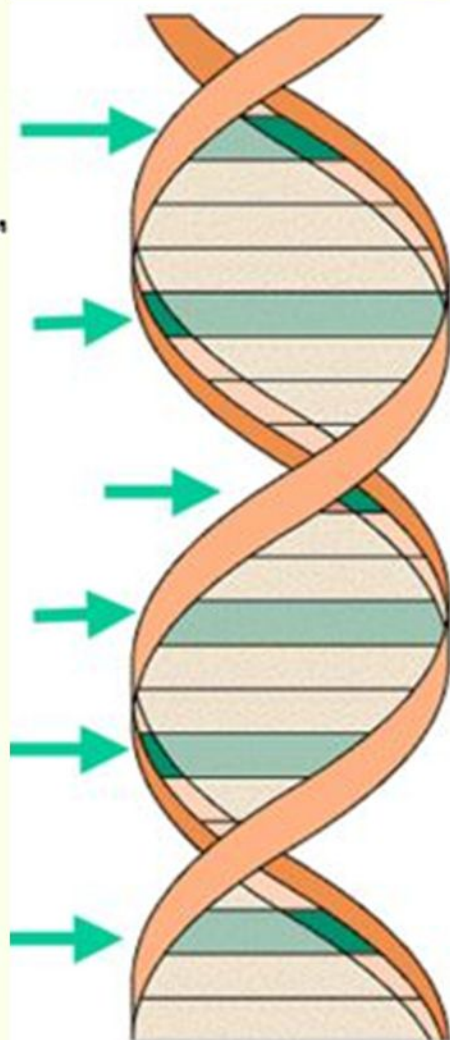


Aflatoxin:
from mouldy peanuts

Deletion/insertion: **INTERCALATING AGENTS**



**Original
DNA**



**DNA stretched by
intercalated ligands**

Stretching changes the frame needed by DNA Polymerase during replication.

Extra nucleotides are added during replication

The **DNA reading frame** for RNA synthesis is changed:
amino acid changes
altered protein

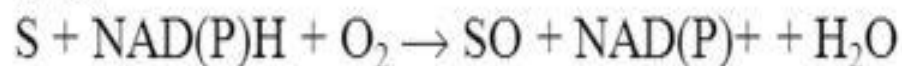
Метаболическая активация проканцерогенов

- Для защиты от накопления экзогенных чужеродных химических соединений (ксенобиотиков) у каждого живого организма имеются эффективные ферментативные механизмы.
- Многие опасные для здоровья ксенобиотики гидрофобны и могут накапливаться в липидах клеточных мембран. Для того, чтобы их вывести из организма необходимо повысить их растворимость в воде, т.е. сделать гидрофильными.
- Процесс метаболической инактивации ксенобиотиков и повышения их гидрофильности проходят в два этапа:
 1. Ферментативное введение в их молекулы небольших полярных групп (например гидроксильных).
 2. Конъюгация преобразованных молекул ксенобиотиков с еще более полярными химическими группировками, в частности с остатками глюкуроновой кислоты, сульфатов или глицина.

Цитохромы P-450

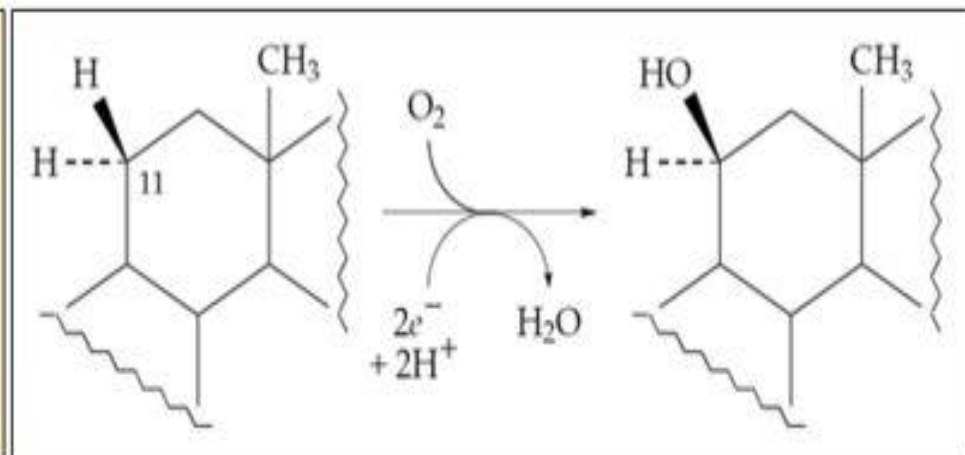
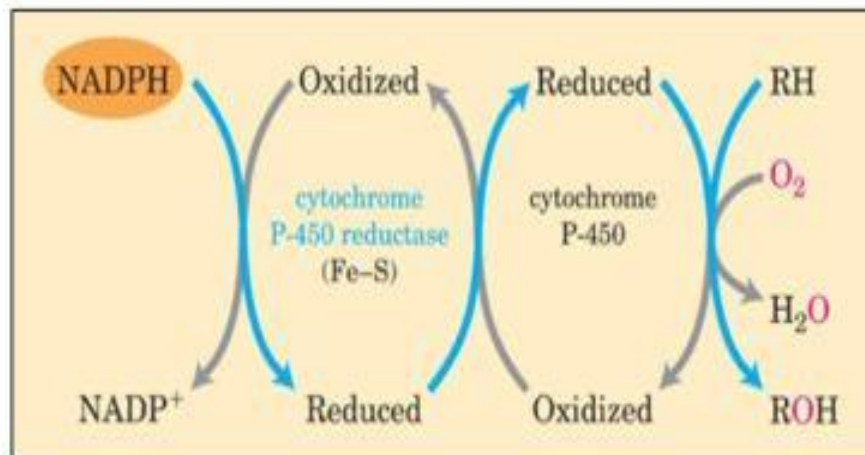
В первой фазе метаболизма ксенобиотиков принимают участие **цитохромы группы P-450**. Эти ферменты в организме представлены большим числом (>20) изоформ, каждая из которых, как правило, обладает широкой субстратной специфичностью.

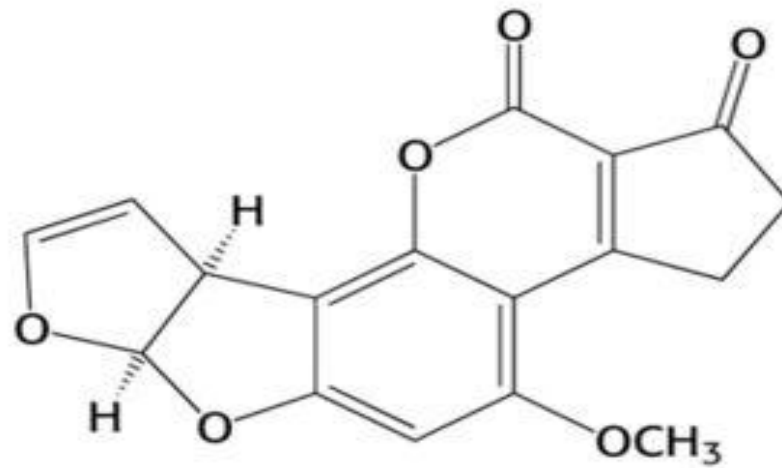
- Обобщенное уравнение химической реакции, осуществляемой цитохромами P-450:



(S – молекула субстрата, а SO – ее окисленная форма)

- Молекулы цитохрома P-450 интегрированы в мембраны гладкого ЭР, которые так же содержат небольшую электронтранспортную цепь.

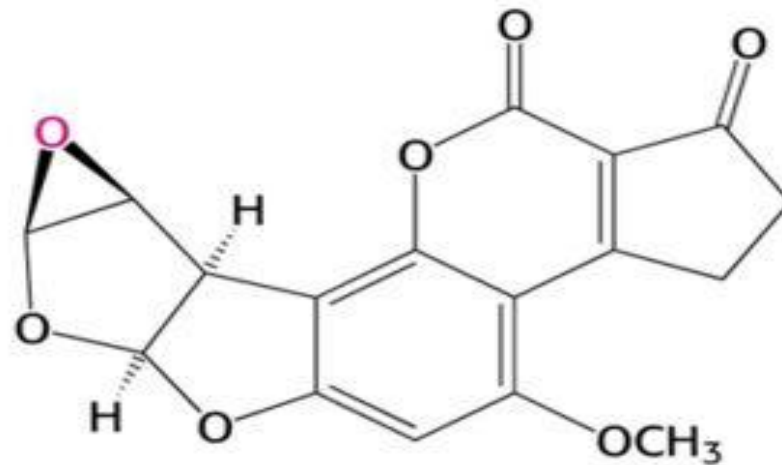




Aflatoxin B₁



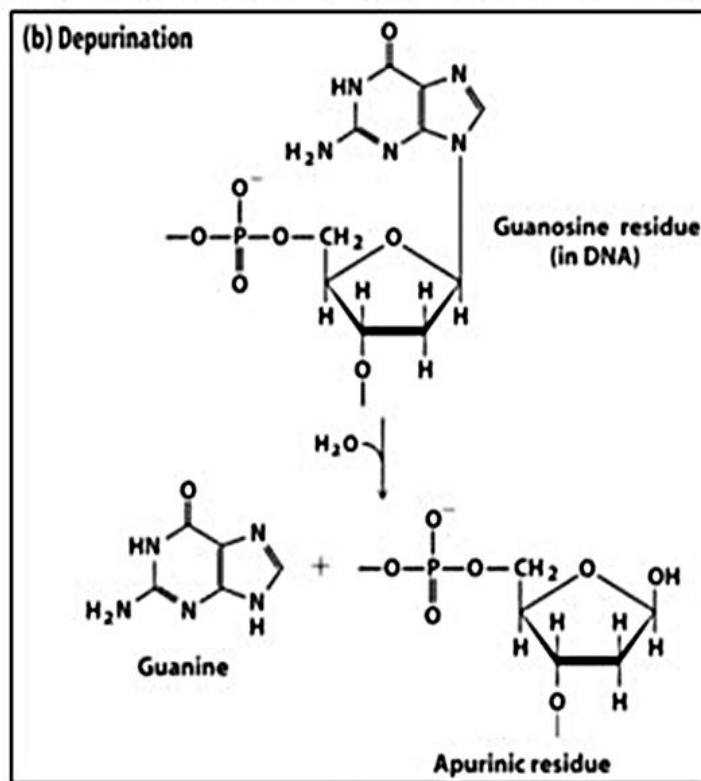
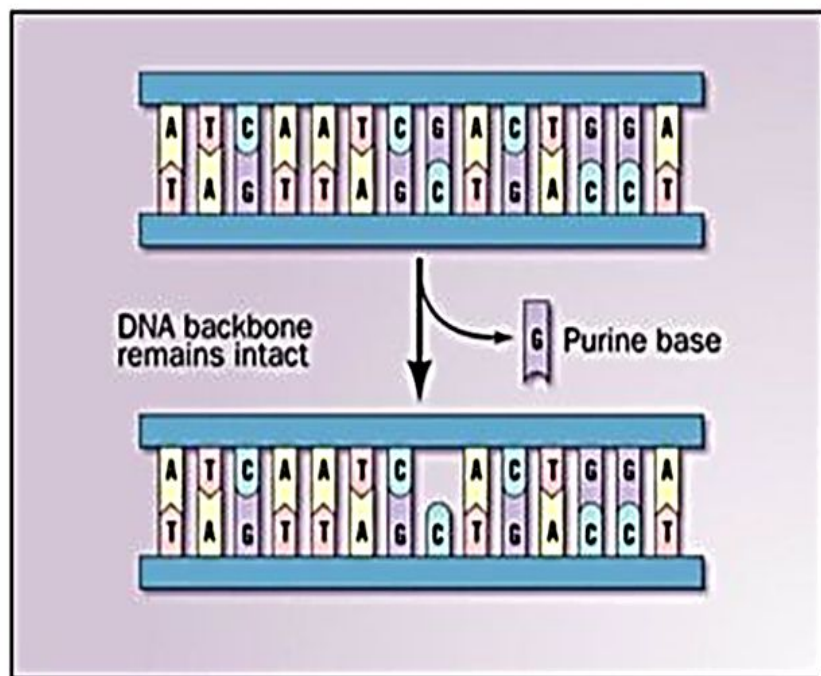
Cytochrome P450



Active DNA-modifying agent

Эндогенные мутагены

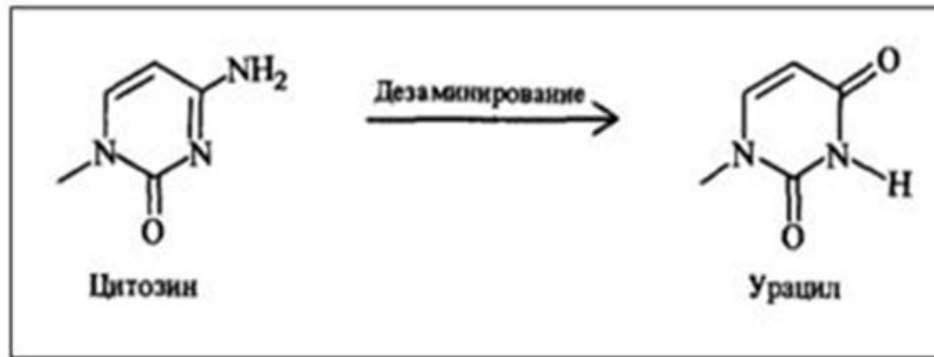
1. Молекулы ДНК часто претерпевают *in vivo* тепловую депуринизацию, которая может быть спонтанным внутренним источником измененных нуклеотидов.



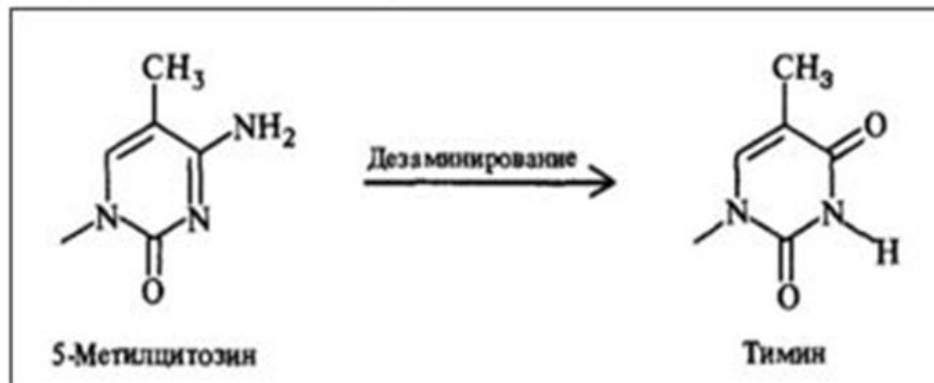
При тепловой депуринизации происходит разрыв лабильной β -N-гликозидной связи (между основанием и рибозой). Наиболее легко это происходит для пуриновых нуклеотидов, для пиримидинов более трудно. В результате в молекуле ДНК на месте этих оснований образуется брешь, названная АП-сайтом (разрыв фосфодиэфирного остова: не происходит)

Эндогенные мутагены

2. Источником эндогенных мутаций служит самопроизвольное дезаминирование цитозина в составе ДНК с образованием урацила.



5-Метилцитозин — одно из модифицированных оснований ДНК, представляет собой "горячую точку" возникновения мутаций путем спонтанного дезаминирования, так как в результате удаления его аминогруппы образуется нормальное основание Т, не распознаваемое системами репарации как мутантное.



Репарация (восстановление) — способность клеток исправлять повреждения и разрывы в ДНК.

Основной принцип репарации

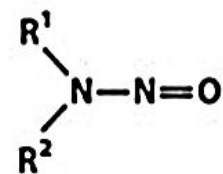
- Основан на двуспиральном строении ДНК.
- В большинстве случаев поврежденной оказывается только одна цепь ДНК, вторая же цепь сохраняется в нативном состоянии и служит матрицей, по которой осуществляется коррекция повреждения. Таким образом задача сводится к детекции повреждения и дальнейшей его коррекции либо напрямую, либо путем удаления поврежденного участка и застройкой по матрице неповрежденной цепи.
- Существует опасность повреждения обеих цепей дуплекса, для репарации в этом случае необходимы особые ферментные системы.

Эндогенные мутагены

Источником эндогенных мутагенов в организме является метаболизм нормальной микрофлоры.

Некоторые промежуточные соединения, возникающие при метаболизме аминокислот, желчных кислот и холестерина под действием бактерий организма человека обладают мутагенной и канцерогенной активностью.

В результате метаболизма в бактериальных клетках происходит активация нитратов с образованием мутагенных и канцерогенных N-нитрозаминов в кишечнике, желудке и ротовой полости человека.



Nitrosamine

Соединение	Метаболит	акт
Метioniн	Этиониn	К
Тирозин	Фенол p-Крезол 4-Этилфенол	П П П
Триптофан	Индол Индолпилюксусная кислота 3-Гидроксикинуренин 3-Гидроксиантраниловая к-та 8-Гидроксикинальдиковая к-та Хинальдиковая кислота Ксантуреновая кислота	П П П, М П, М П П П
Желчные к-ты	Дезоксихолевая кислота Литохолевая кислота бис-Нор-5-холеновая кислота Апохолевая кислота	М, П П К К
Холестерин	Эпоксиды метаболитов: 5β-холестерин-3β-ола, 5β-холестерин-3-она, 4-холестерин-3-она и др.	М, К
Примечание. К – канцероген, П – промотор, М – мутаген.		

Какие мутации, увеличивают образование целевого продукта:

- ✓ дупликации (удвоение) или амплификации (умножение) структурных генов, включенных в систему синтеза целевого продукта
- ✓ нарушающие системы *ретроингибирования*;
- ✓ изменяющие (интенсифицирующие) системы транспорта предшественников целевого продукта в клетку;
- ✓ повышающие резистентность продуцента к образуемому им же веществу. Необходимо для получения суперпродуцентов антибиотиков

2 стадия. Оценка и отбор полезных мутаций в процессе естественной эволюции

❖ селекционная часть работы - отбор и оценка мутаций

Обработанную культуру рассеивают на ТПС и выращивают отдельные колонии (клоны)

(Для высевания клонов с разными особенностями метаболизма используют т. н. «метод отпечатков», разработанный Дж. Ледербергом и Э. Ледербергером)

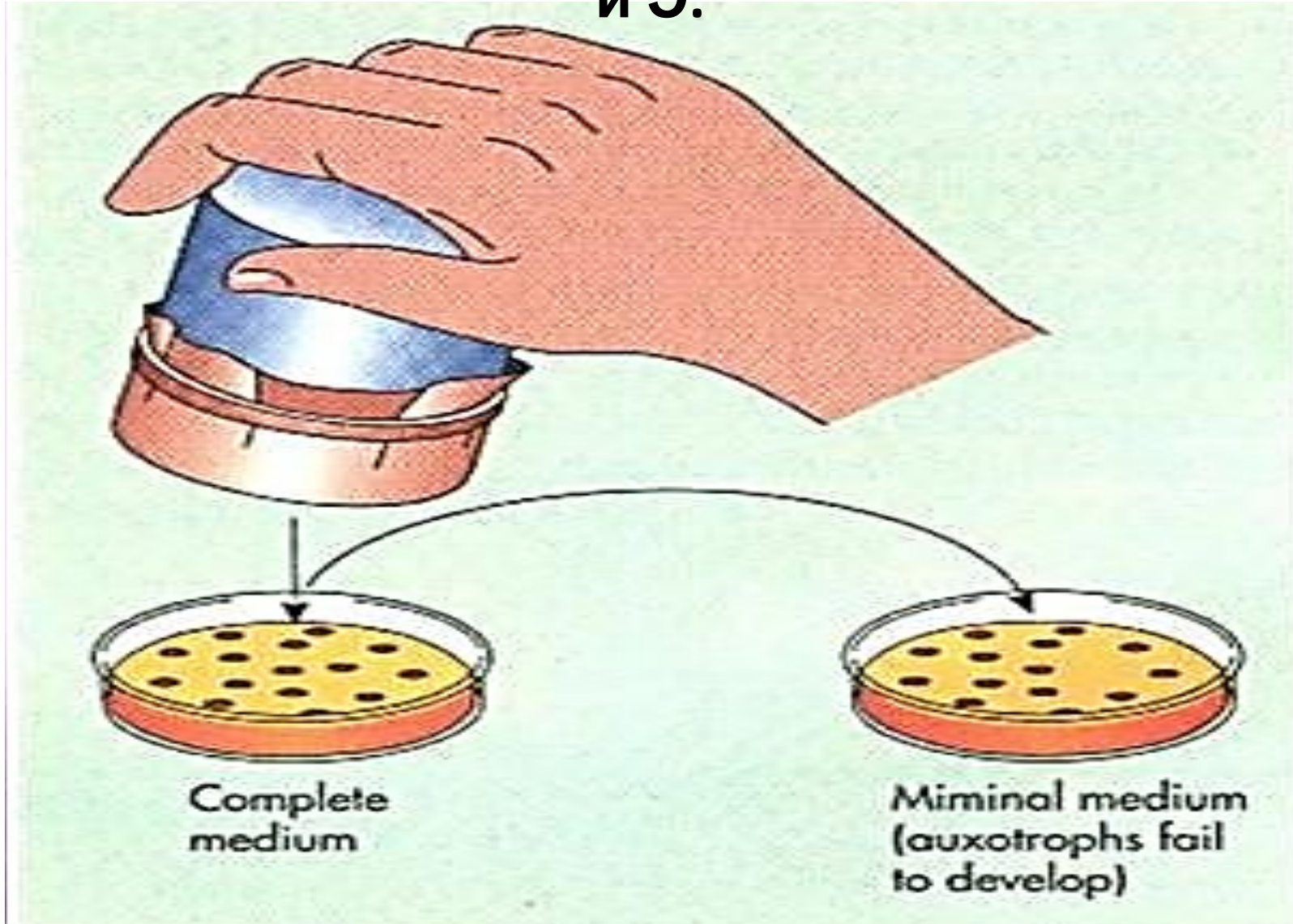
клоны сравнивают с исходной колонией по разным признакам:

мутанты, нуждающиеся в конкретном витамине, или аминокислоте;

мутанты, синтезирующие фермент расщепляющий определенный субстрат;

антибиотикорезистентные мутанты

Метод «отпечатков» (реплик) Ледербергов Дж. и Э.



Проблемы суперпродуцентов

Высокопродуктивные штаммы продуцентов крайне нестабильны и менее жизнеспособны в сравнении с дикими по причине многочисленных искусственных изменений в геноме.

Мутантные штаммы могут ревертировать.

Для предотвращения реверсии клетки суперпродуцентов иммобилизируют – связывают с нерастворимыми носителями и используют в технологическом процессе, не прибегая в течение длительного времени (от нескольких недель до нескольких месяцев) к пересевам

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ
БИООБЪЕКТОВ
МЕТОДАМИ КЛЕТОЧНОЙ
ИНЖЕНЕРИИ**

Совершенствование биообъектов методами клеточной инженерии

Клеточная инженерия — «насильственный» обмен участками хромосом или целыми хромосомами (у эукариот) между клетками с отличающимися геномами. Осуществляется в клетке (*in vivo*)

Конструирование клеток нового типа. Включает объединение двух целых клеток, принадлежащих различным видам (и даже относящихся к разным царствам: растениям и животным), с образованием новых клеток, несущих генетический материал исходных клеток. Предполагает реконструкцию жизнеспособной клетк



Лигр —гибрид льва и тигра



**Волкос
об**



ль

Возможно получение **межвидовых и межродовых** гибридных культур микроорганизмов, а также гибридных клеток между отдаленными в эволюционном отношении многоклеточными организмами.

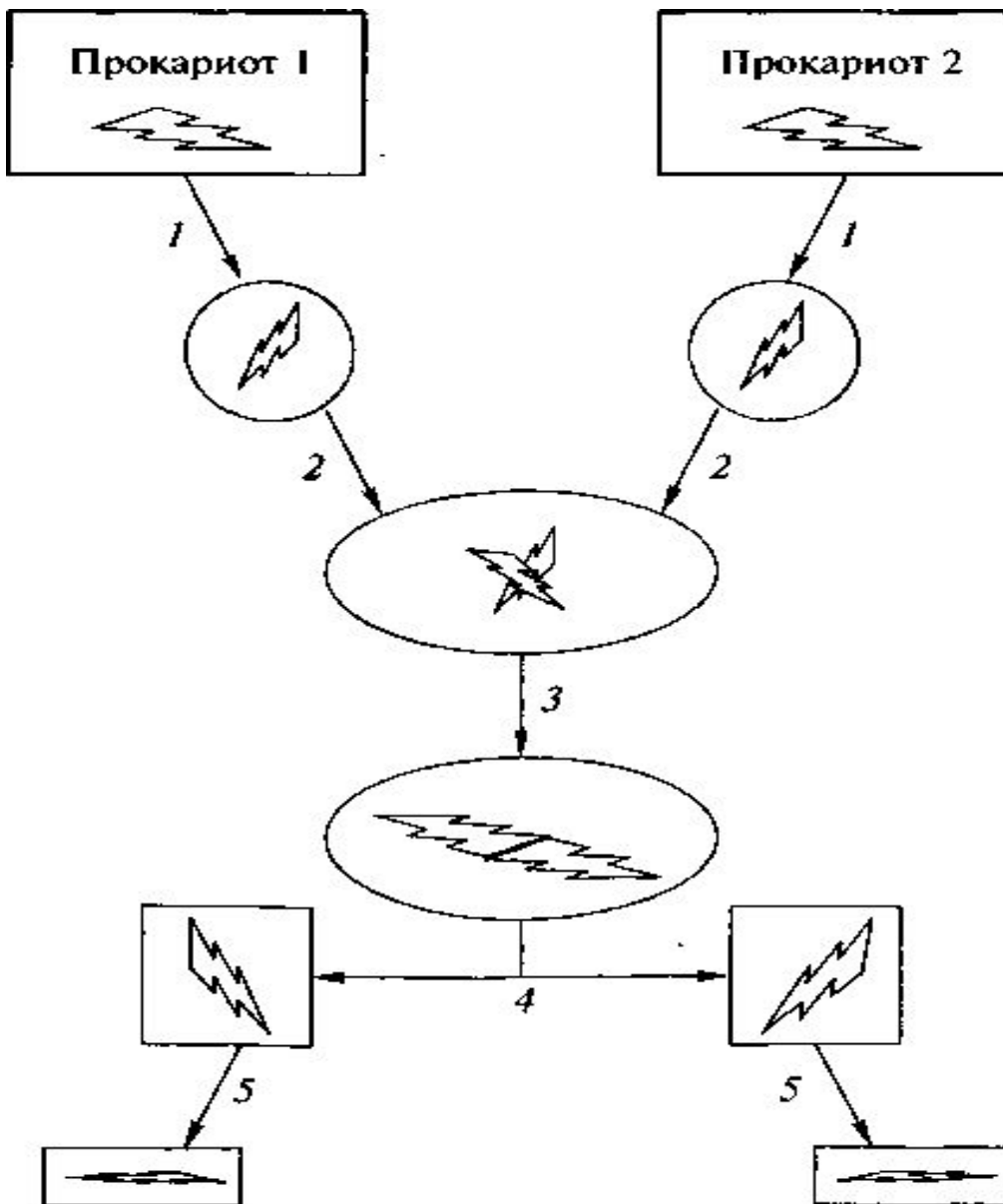
Гибридные антибиотики

Макролидный агликон эритромицина связан с углеводной частью антрациклина;

Антрациклиновый агликон связан с сахарами эритромицина.

Продуценты их получены с помощью клеточной инженерии

Схема формирования гибридных клеток (на примере прокариотов)



1. — ферментативная деградация клеточной стенки;
2. — слияние (фузия) протопластов → образование диплоидов;
3. — инкубирование для регенерации клеточной стенки и воссоединения ДНК, «ломки» (рекомбинации хромосом);
4. → на плотную ПС и **редукционное деление** клетки с образованием гаплоидов с рекомбинантной хромосомой;

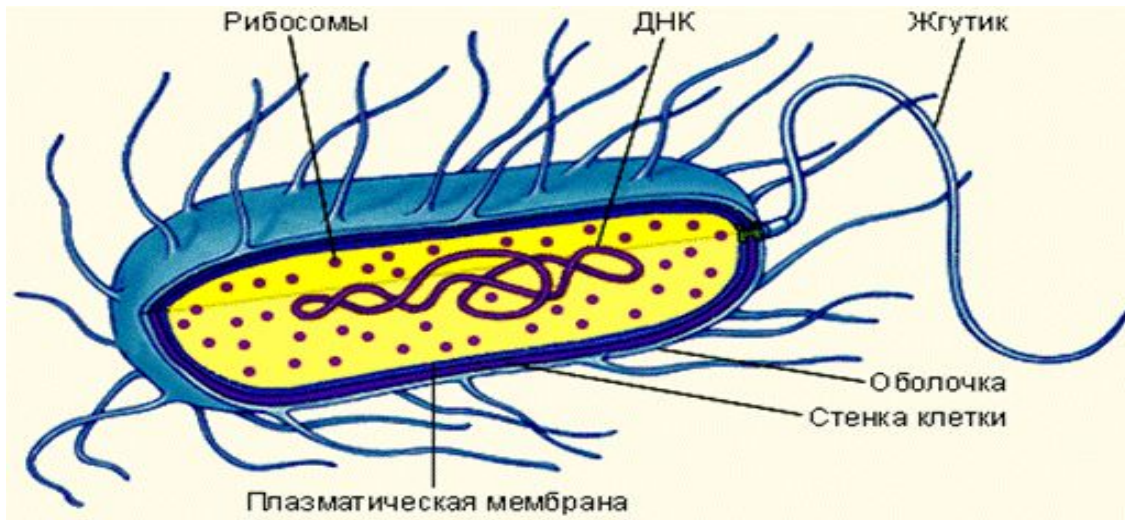
1

Стадия

Клеточную стенку можно разрушить механически или с помощью ферментов. Ферментативный способ менее травматичен. Для разрушения клеточных оболочек используют специальные ферменты, лизирующие структурный материал оболочек:

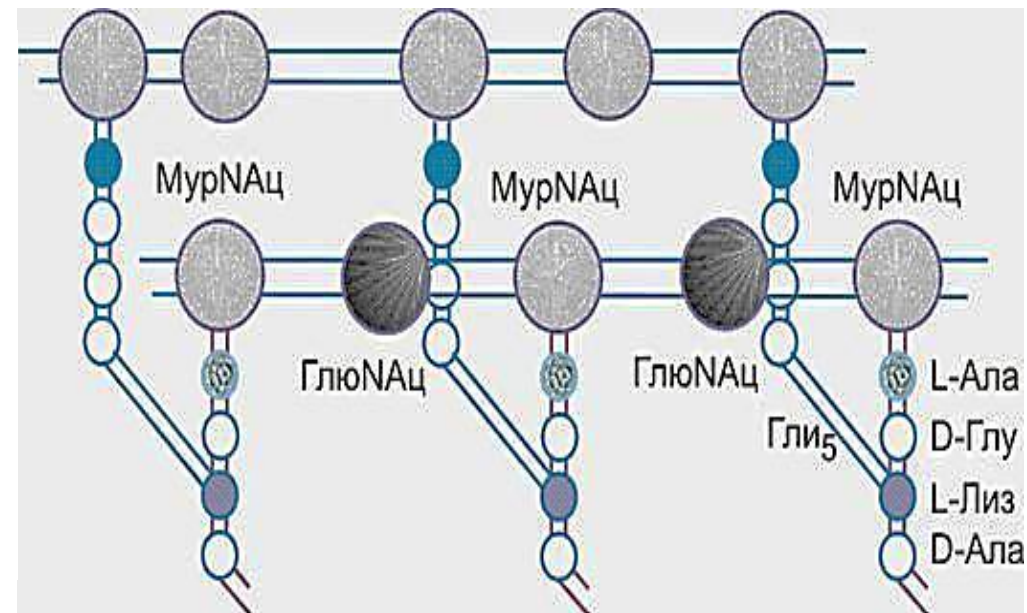
- у прокариотов гидролазы пептидогликана - **лизоцим** куриного яйца – расщепляет полисахаридные цепи пептидогликана;
- у плесневых и дрожжевых грибов - хитиназа, глюканаза, маннопротеиназа;
- у растительных клеток **пектиназы и целлюлазы** или сложные смеси ферментов;

Схема строения пептидогликана бактерий (муреина)



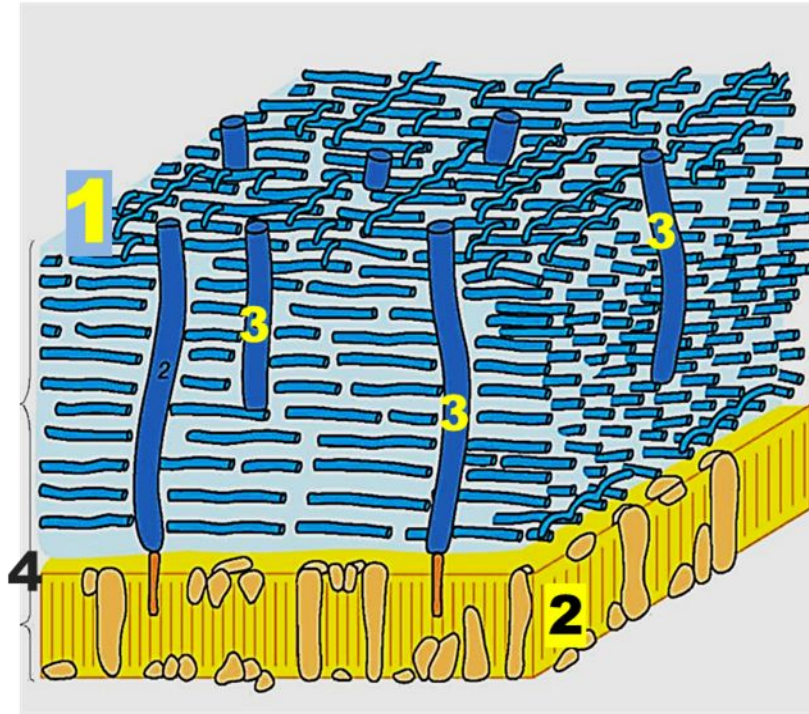
Клеточные стенки бактерий состоят из пептидогликана (муреина)

Структура пептидогликана: остов из N-ацетилмурамовой кислоты (MurNAc) и N-ацетилглюкозамина (ГлюNAc); боковые пептиды, состоящие из L-аланина (L-Ала), D-глутамата (D-Глу), L-лизина (L-Лиз) и D-аланина (D-Ала); пептидные (Гли5) поперечные мостики.

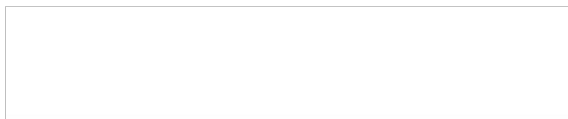


Структура клеточной стенки бактерий (схема)

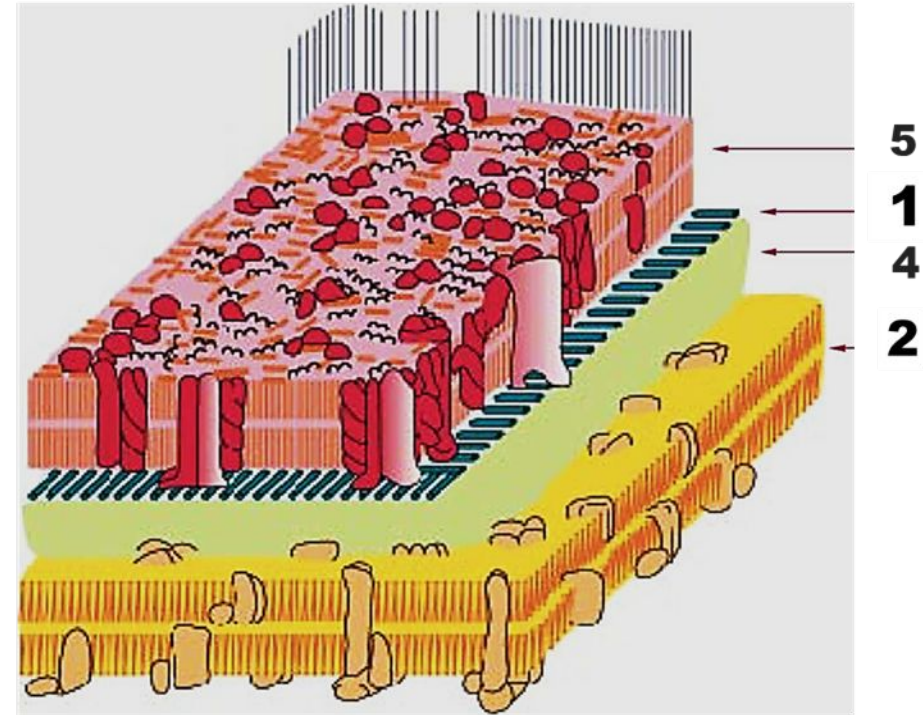
Грамположительных (Gr+)



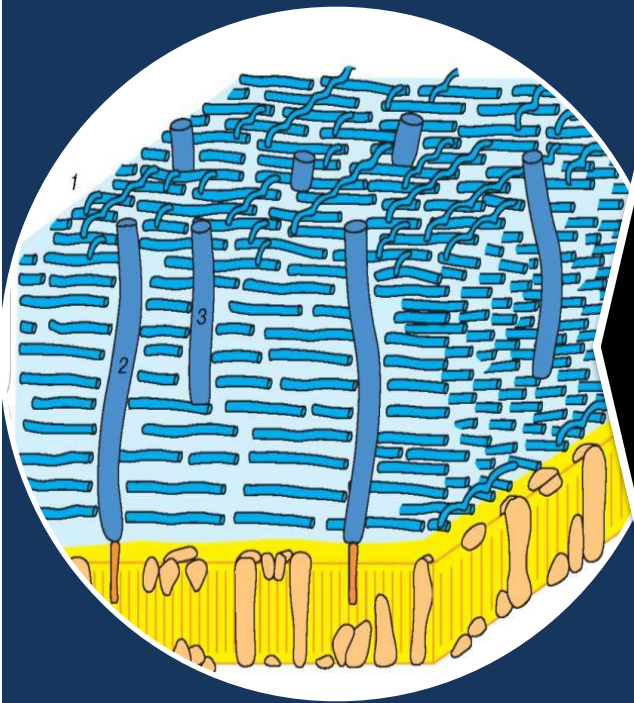
- 1 – пептидогликановый слой;
- 2 – плазматическая (клеточная) мембрана;
- 3 – тейхоевые и липотейхоевые кислоты;



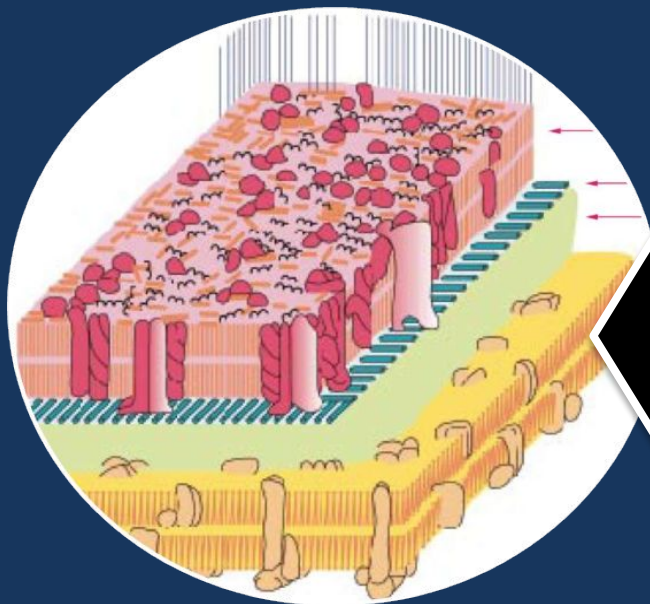
Грамотрицательных (Gr-)



- 1 – пептидогликановый слой;
- 2 – плазматическая (клеточная) мембрана;
- 4 – периплазматическое пространство;
- 5 – слой фосфолипополисахарида (пирогенный эндотоксин)



Реорганизация структуры КС
грамположительных бактерий легко
протекает под воздействием фермента
лизоцима яичного белка (мурамидаза) –
гидролизует β -1,4-гликозидные связи
между N-ацетилмурамовой к. и N-
ацетилглюкозамином пептидогликанов, а
также разрушает пептидные связи между
аминокислотами в мостиках, соединяющих
слои пептидогликана



Клеточная стенка грамотрицательных
бактерий покрыта слоем липидов. Для
реорганизации структуры используют
лизоцим в сочетании с ЭДТА,
растворяющей липополисахариды
наружной мембраны клеточной стенки

У дрожжей клеточные стенки состоят из β -глюканов и частично фосфорилированных маннатов

фотография клеточной стенки дрожжевой клетки

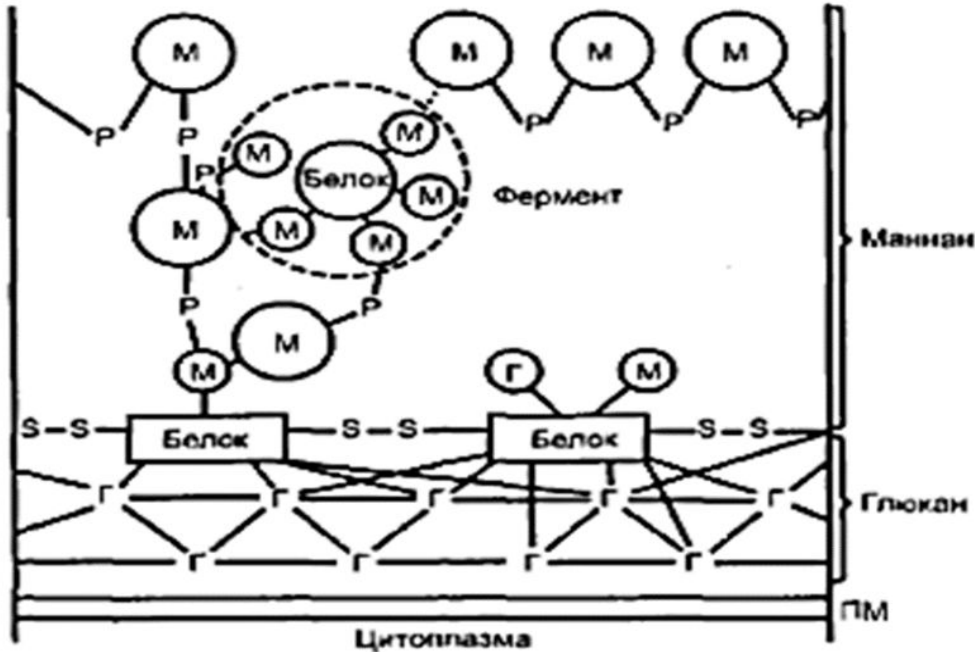


Схема строения клеточной стенки дрожжей (по Котык А., Яначек К.)

М – маннан; Г – глюкан; Р – фосфат; ПМ – плазматическая мембрана

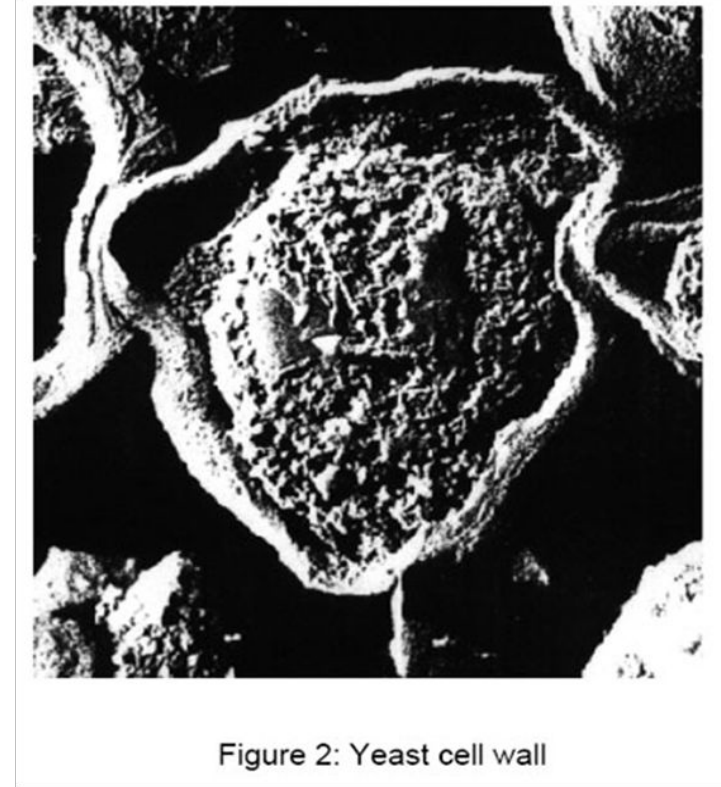
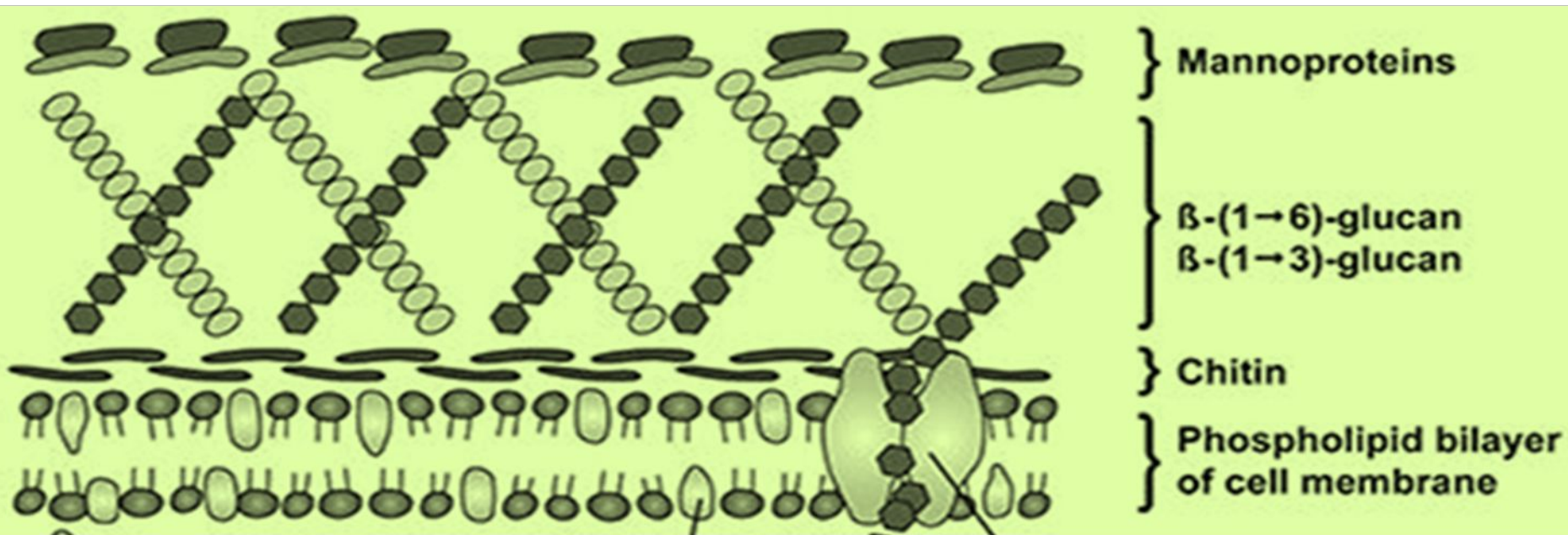


Figure 2: Yeast cell wall

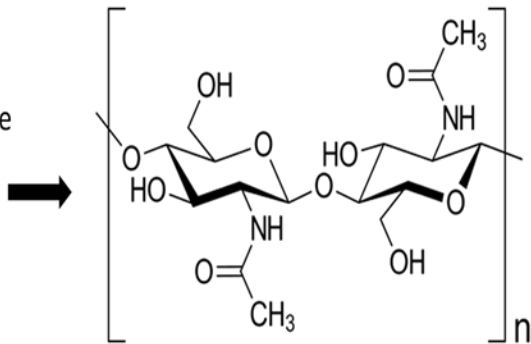
Для реорганизации используются ферменты фосфоманназа, β -глюканаза-1,3 (комплексный дрожжелитический препарат)

Плесневые (низшие) грибы

клеточная стенка состоит из:
 α - и β -глюканов, гликопротеидов и хитина



Хитин — природное
соединение из
группы
азотсодержащих
полисахаридов

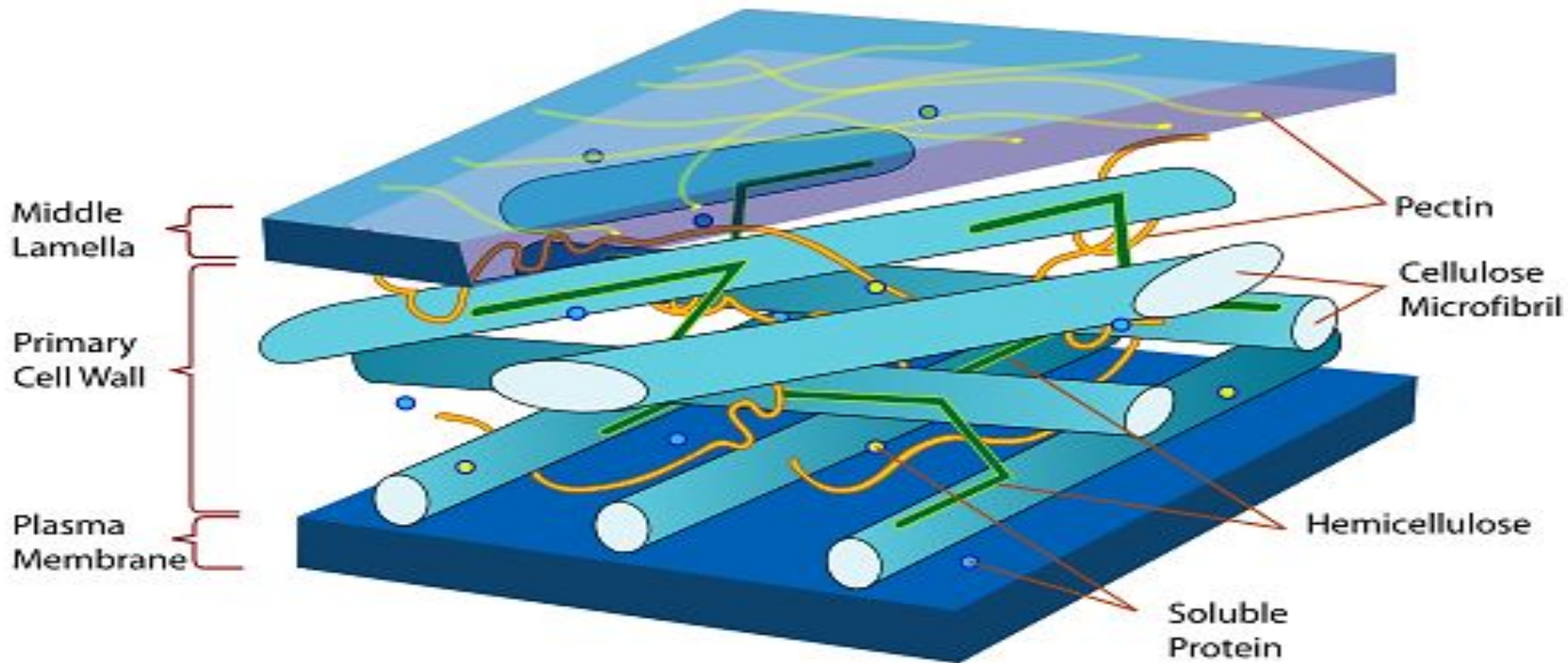


Для их разрушения используют комплексный
дрожжелитический препарат, содержащий ферменты:
фосфоманназу, β -глюканазу-1,3 или -1,6, хитиназу

Клеточные стенки высших растений

Отличаются у разных видов.

Основные компоненты: целлюлоза, пектиновые вещества



Для реорганизации применяют ферменты:
целлюлазу, пектиназу

В результате реорганизации клеточной стенки образуются протопласты.

Протопласт (др.-греч. πρῶτος — «первый» + πλαστός — образованный, вылепленный и др.) – содержимое клетки, оставшееся после разрушения внешней клеточной стенки, но с сохранившейся клеточной плазматической мембраной (клетка, лишенная клеточной стенки).

Протопласт включает:

- ✓ цитоплазму
- ✓ ядро
- ✓ все органеллы
- ✓ клеточную плазматическую мембрану

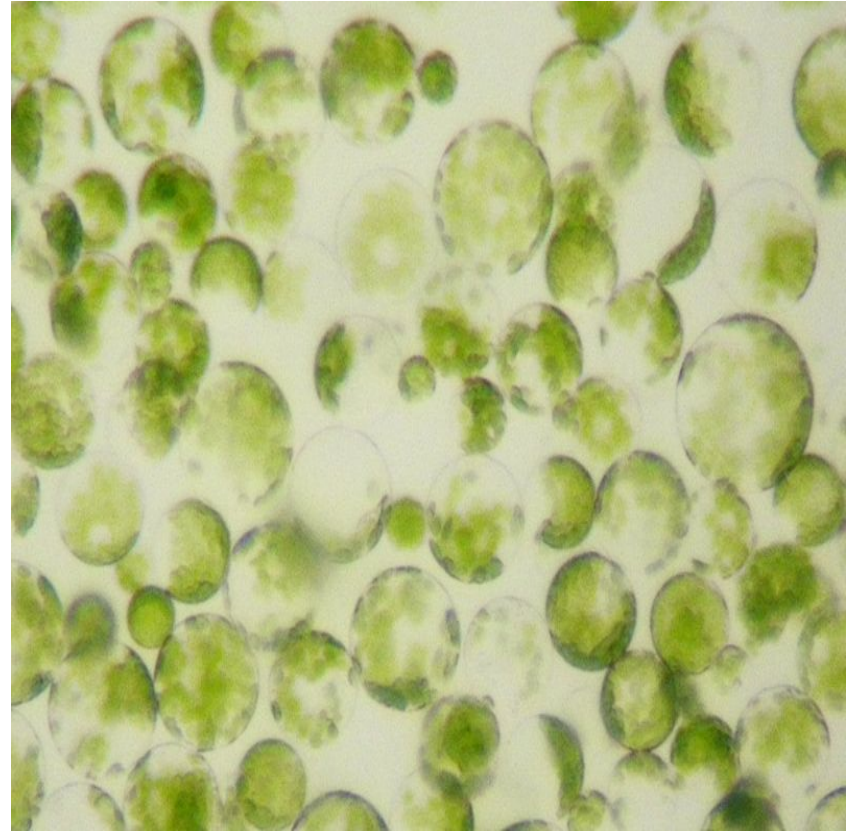
То есть протоплазму и мембрану.

«Голая» клетка потенциально способна образовывать новую оболочку, способна делиться.

Отсутствие клеточной стенки облегчает реконструирование генома при слиянии клеток

Для предотвращения лизиса образующихся протопластов клеточную стенку удаляют ферментативной обработкой в гипертонической среде (20 % раствор сахарозы, маннита, 10 % раствор натрия хлорида и т.д.)

После разрушения клеточных стенок суспензию протопластов отделяют от остатков клеток и тканей фильтрованием, ферменты отделяют центрифугированием с последующим промыванием в культуральной среде. Очищенные протопласты ресуспендируют в ПС



Протопласты клеток листа петунии, полученные обработкой клеток целлюлазами и пектиназами

2 стадия

Слияние протопластов, принадлежащих разным видам (штаммам, родам) организмов

Проблема:

Поверхности протопластов имеют отрицательный электрический заряд, что существенно осложняет процесс их соединения. Заряд нейтрализуют обработкой ПЭГ. ПЭГ индуцирует слияние протопластов. Аналогичный эффект м.б. получен под воздействием растворов ПВС, декстрана и электрического поля.

После слияния протопластов происходит регенерация клеточной стенки (менее чем за 1 сутки), после чего клетки начинают делиться.

При слиянии протопластов возникает два вида новых клеток:

- гомокариоциды (гомокарионы) – образуются при слиянии клеток одного родителя;
- гетерокариоциды (гетерокарионы) – образуются при слиянии клеток разных родителей.

NB!

Наибольший интерес представляют **гетерокарионы**. Но как их отличить от гомокарионов?

Для отбора гетерокарионов исходные протопласты окрашивают флуоресцентными красителями различных цветов. При их слиянии гетерокарионы будут окрашены пестро, в отличие от гомокарионов. Окраску наблюдают и осуществляют отбор под микроскопом

3 стадия

Образование диплоидов, ломка и рекомбинация хромосом

Гетерокарионы содержат два ядра (у прокариот - две кольцевых молекулы ДНК) разных клеток в одной цитоплазме. В них происходит «ломка» (причины до конца неясны) и воссоединение хромосомных нитей, при котором в одну хромосому может включиться фрагмент другой – происходит природная **рекомбинация хромосом**.

Свою целостность протопласты сохраняют в гипертонической среде

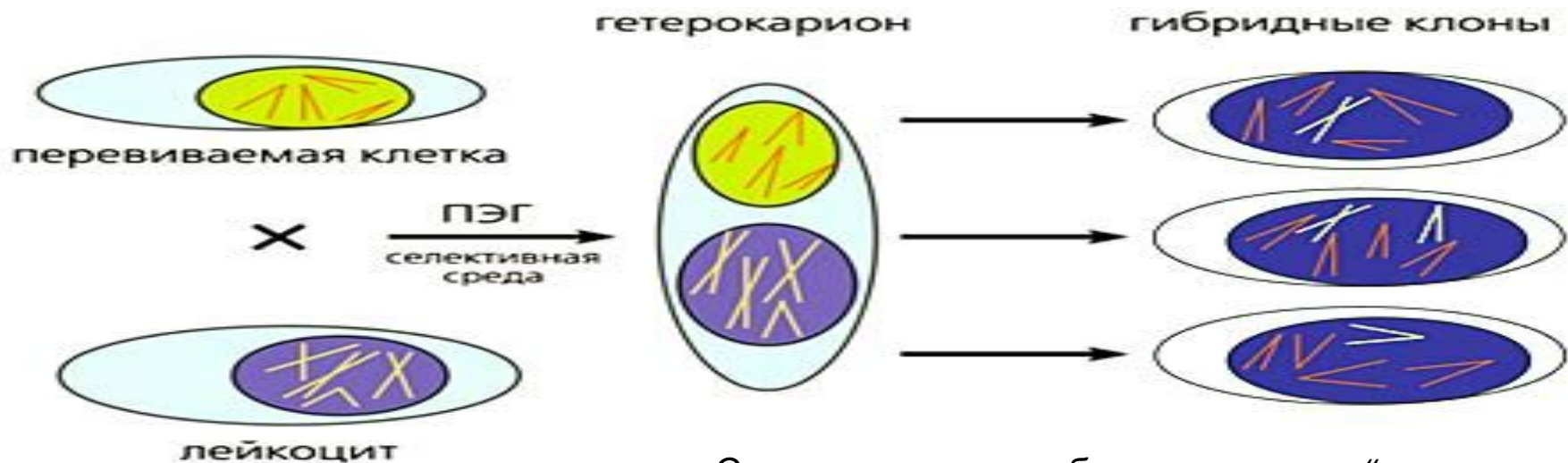


Схема получения гибридных клонов «человек-мышь»

Словарь

РЕКОМБИНАЦИЯ –

процесс реорганизации генома, обмен участками ДНК

Рекомбинация может быть:

- **Гомологичная**

- основана на спаривании комплементарных цепей ДНК. Требуется общая (по всей длине молекулы) гомология между рекомбинирующими участками

- **Сайт-специфическая**

- происходит между последовательностями ДНК в пределах очень коротких участков гомологии, обычно 15 – 30 п.н.

- **Незаконная**

- рекомбинация происходит без гомологии между молекулами ДНК (причины разнообразны, например

4 стадия

Образование клеток с рекомбинантными хромосомами

- После промывания протопласты помещают в питательную среду.
- При этом у определенной части протопластов наблюдается регенерация клеточной стенки, в результате образуются клетки, способные к размножению.
- После митоза из двухъядерного гетерокариона образуются две одноядерные клетки, каждая из которых представляет собой **синкарион** – гибридную клетку, содержащую хромосомы обеих исходных клеток (образуются в результате объединения двух геномов) и гибридные хромосомы
- Культуры таких клеток обладают новыми свойствами

Гомокарионы также представляют интерес, т.к. гены, кодирующие целевой продукт, могут оказаться в одном гаплоиде в удвоенном состоянии (от двух одинаковых родительских протопластов), что резко увеличит биосинтетический потенциал культуры применительно к целевому продукту.

В наст. время слиянием протопластов получены гибриды некоторых лекарственных растений:

- **дурмана индейского и белладонны,**
- **гибрид двух видов дурмана,** сод. на 25% больше тропановых алкалоидов, чем родительские растения;
- и др. биообъекты