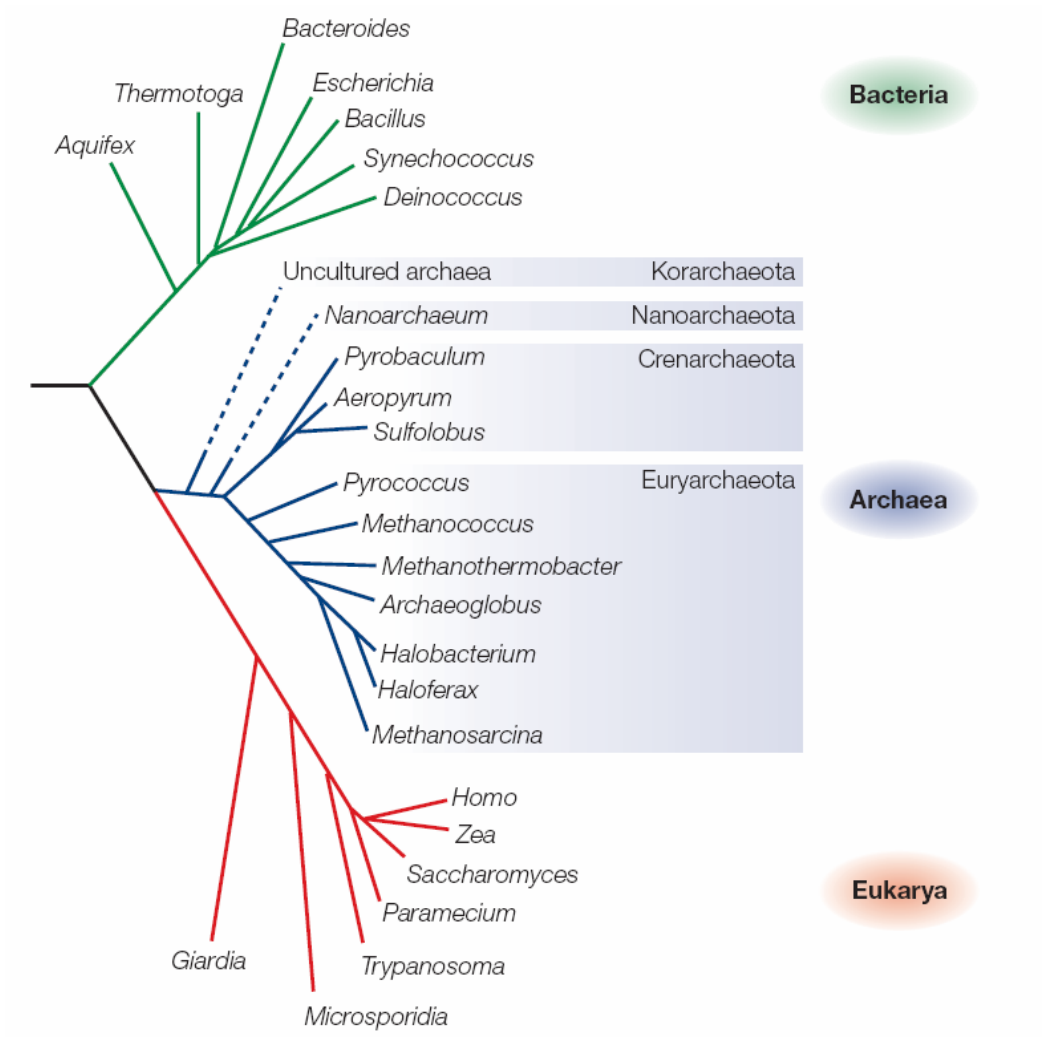


Технологии XXI века для биоиндустрии

Константин Скрябин

Центр "Биоинженерия" РАН

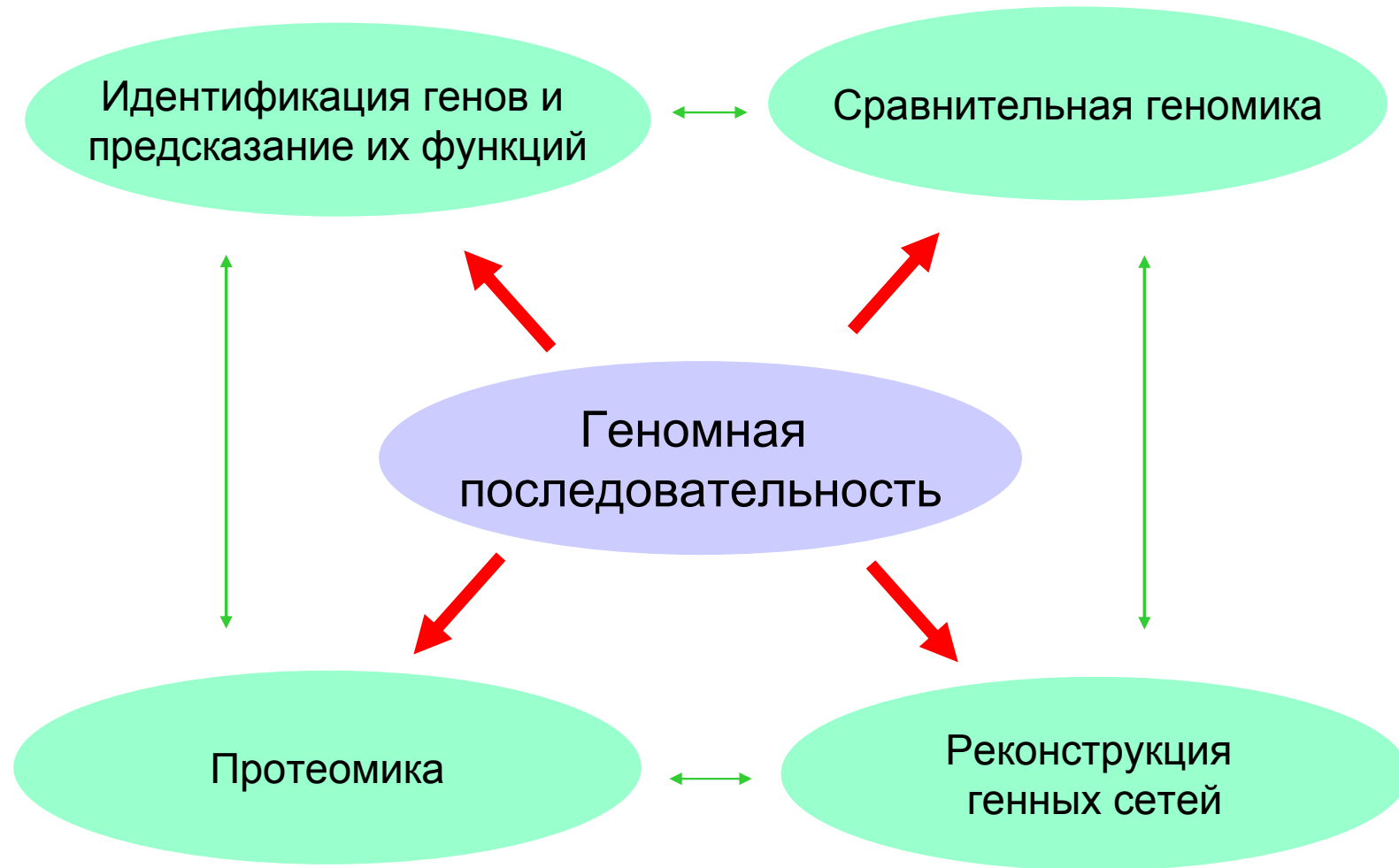


Бактерии:
785 полных геномов

Археи:
53 полных генома

Эукариоты:
~ 50 genomes

Анализ геномной информации



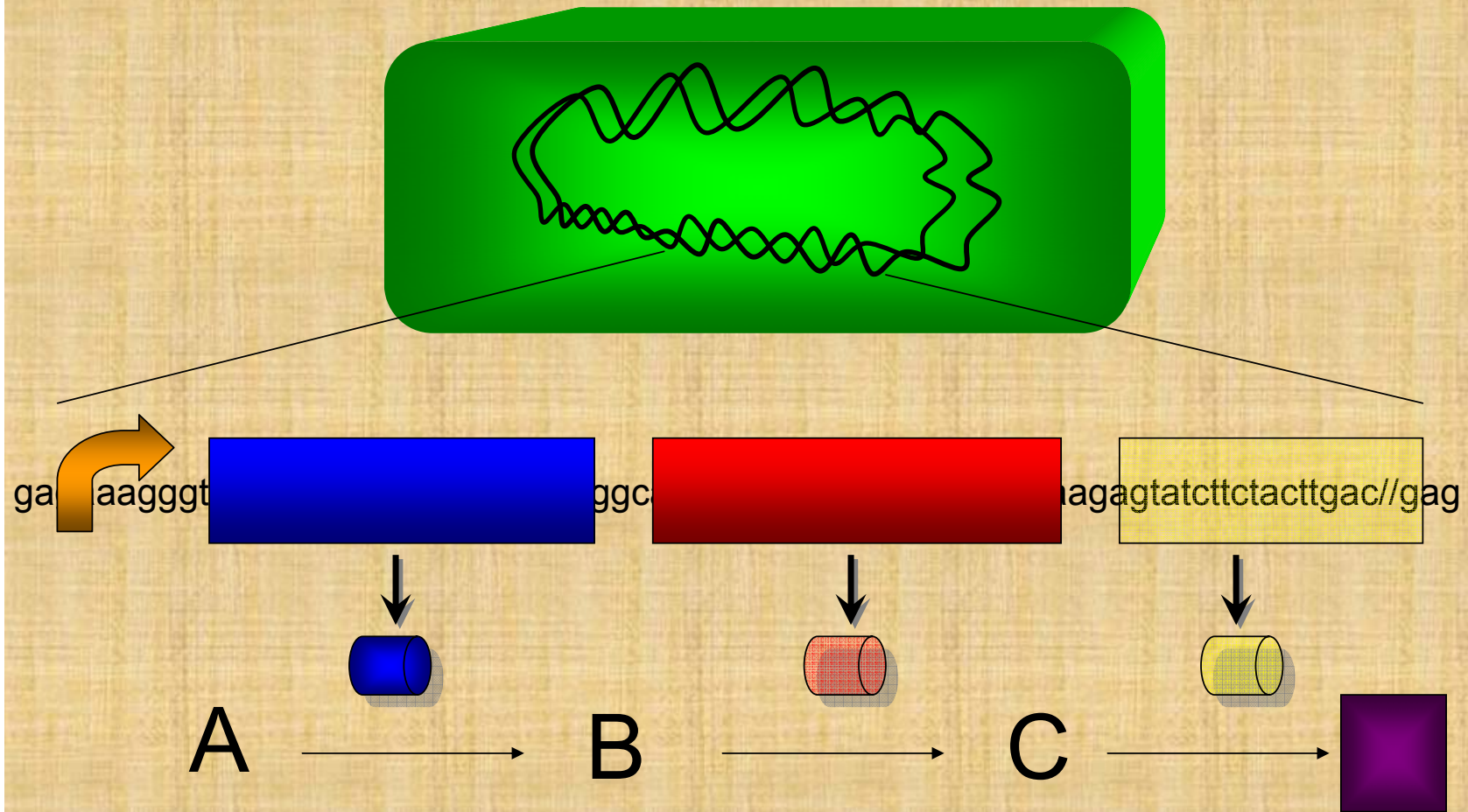
СТОИМОСТЬ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ИНДИВИДУАЛЬНОГО ГЕНОМА ЧЕЛОВЕКА

| технология | цена, (\$) |
|--|--|
| Капиллярный электрофорез (2001) | 3000×10^6 |
| Капиллярный электрофорез (2007) | $10-100 \times 10^6$ |
| Новейшие технологии | $0,1 \times 10^6$ |
| В перспективе | 1000 |

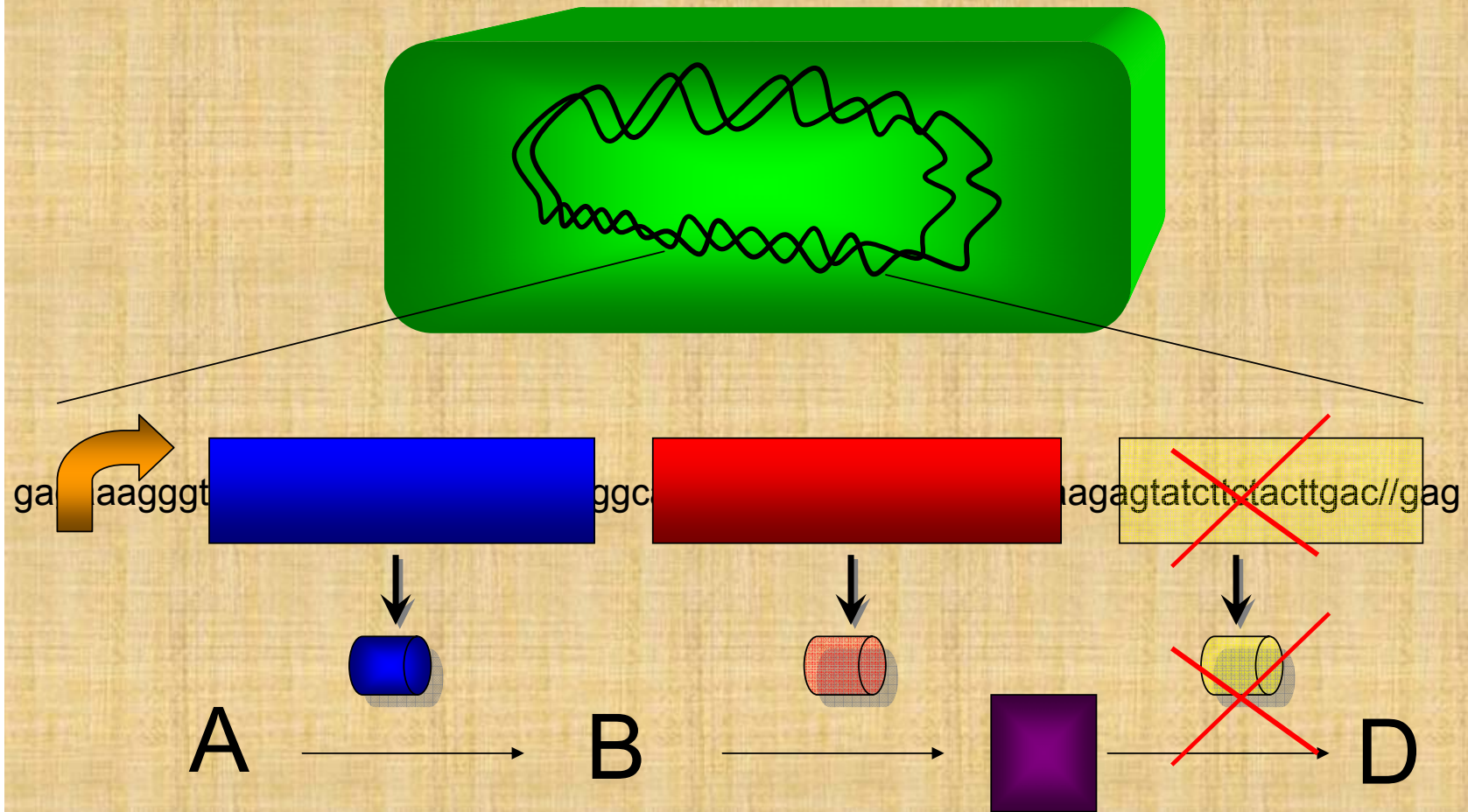
Нанотехнологии позволяют в тысячи раз
снизить стоимость расшифровки геномов

Метаболическая инженерия промышленных микроорганизмов

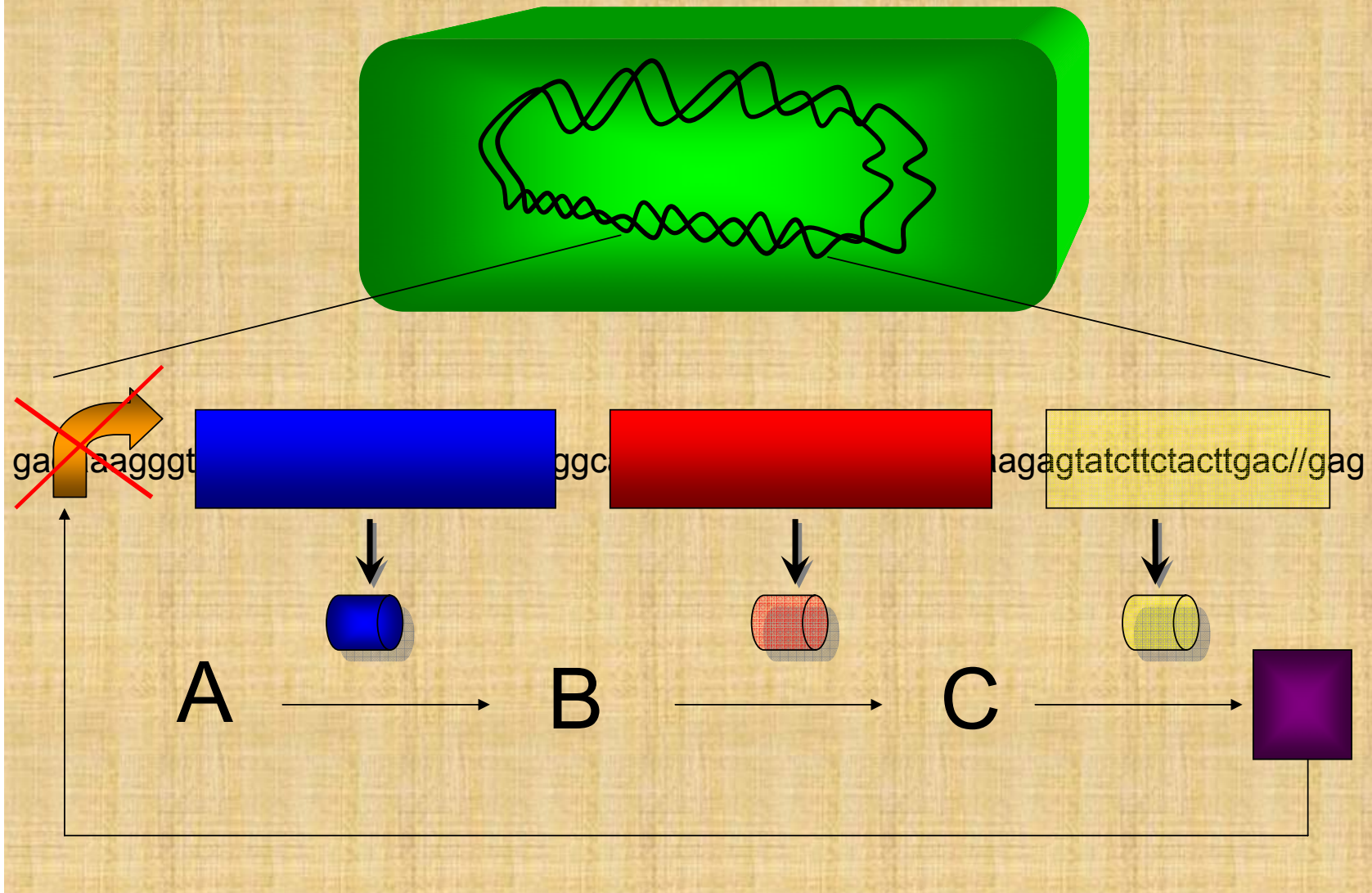
Микроорганизм – мини химический завод



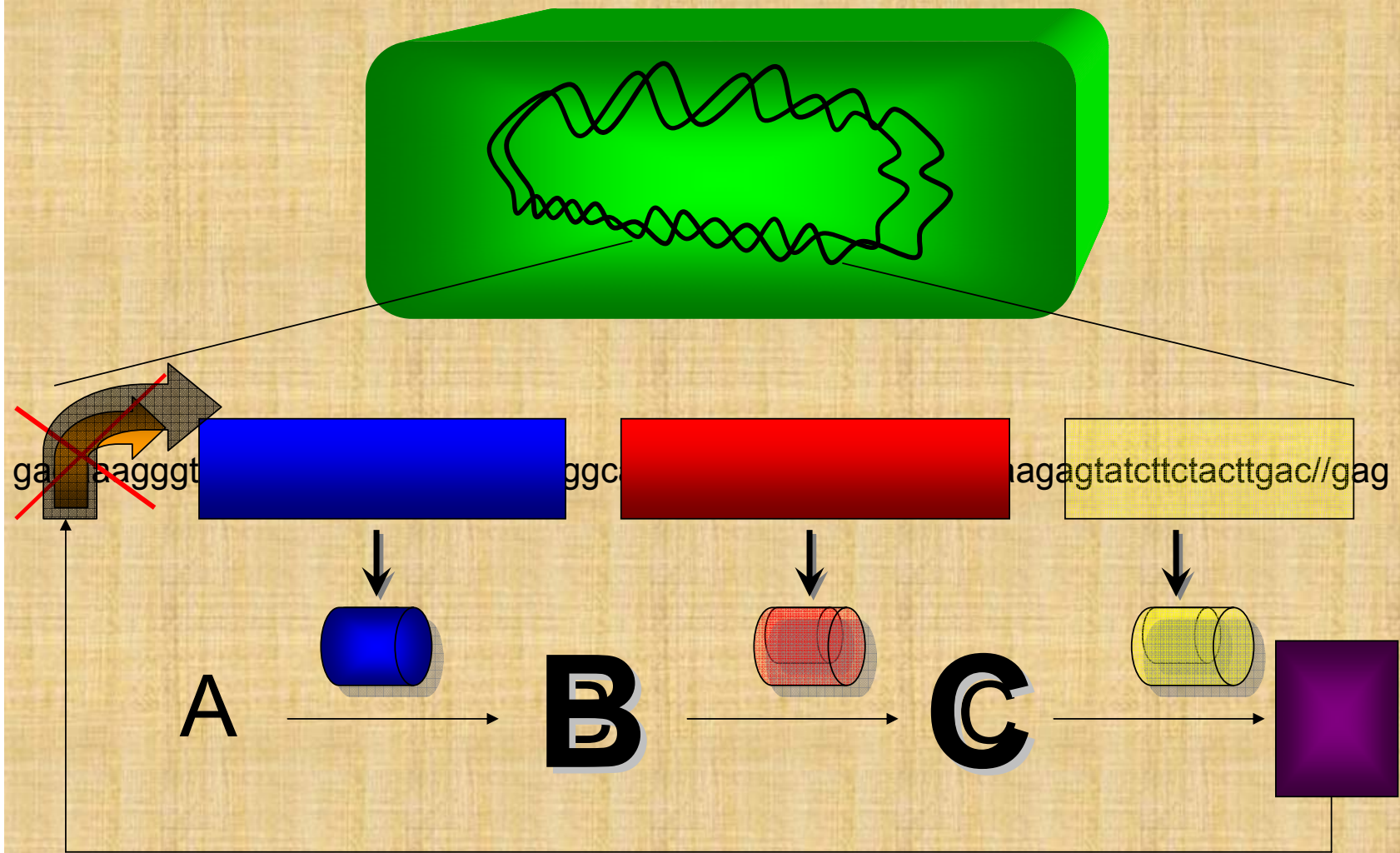
Микроорганизм – мини химический завод



Микроорганизм – мини химический завод



Микроорганизм – мини химический завод



Решение прямой задачи: от структуры к функции

- 1) определение полной структуры
- 2) выключение/ включение гена
- 3) выяснение роли внесённых изменений

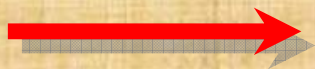
Решение обратной задачи: от функции к структуре

- 1) выключение/ включение функций методами классической генетики
- 2) определение полной структуры
- 3) обнаружение измененных генов



**Предобработка:
расщепление
целлюлозы**

**✓ фитостерин
✓ сахара**



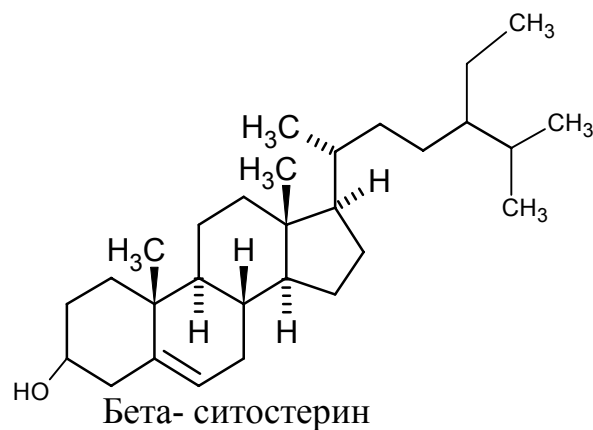
АД

- ✓ Преднизолон
- ✓ Гидрокортизон
- ✓ Метилпреднизолон
- ✓ Спиринолактон



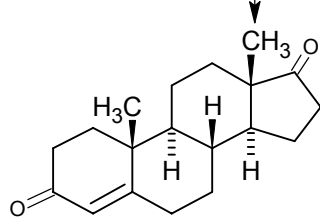
АДД

- ✓ Феноболин
- ✓ Силаболин
- ✓ Норэтистерон

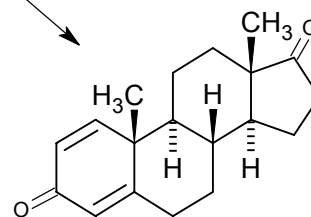


Mycobacterium neoaurum ВКПМ Ас-1634

Mycobacterium neoaurum ВКПМ Ас-1656



Андростендион (АД)

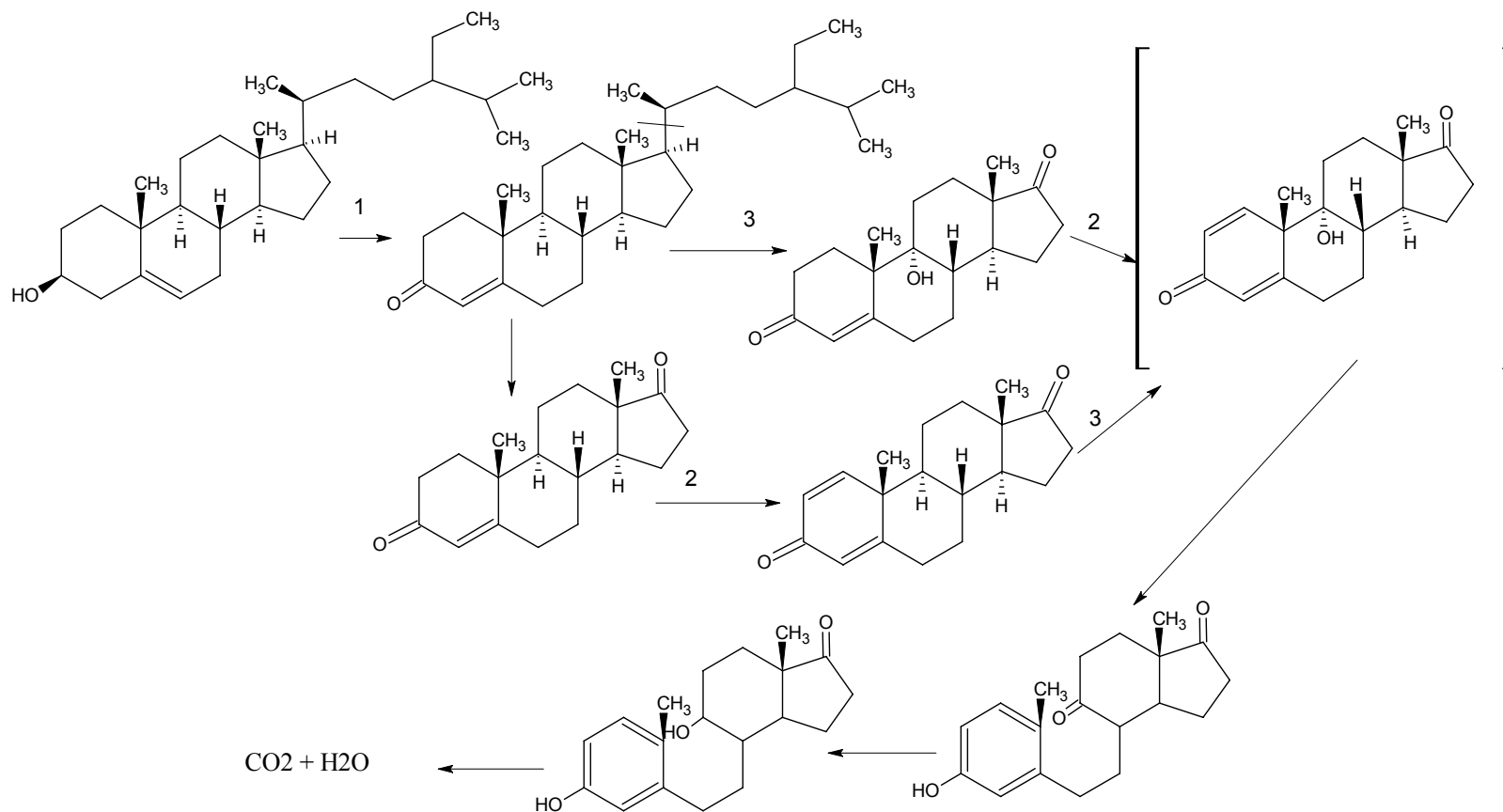


Андростадиендион (АДД)

Гидрокортизон, преднизолон,
метилпреднизолон, спиронолактон
ацетомепрегенол и др.

Этинилэстрадиол,
силаболин, феноболин,
норэтистеронор и др.

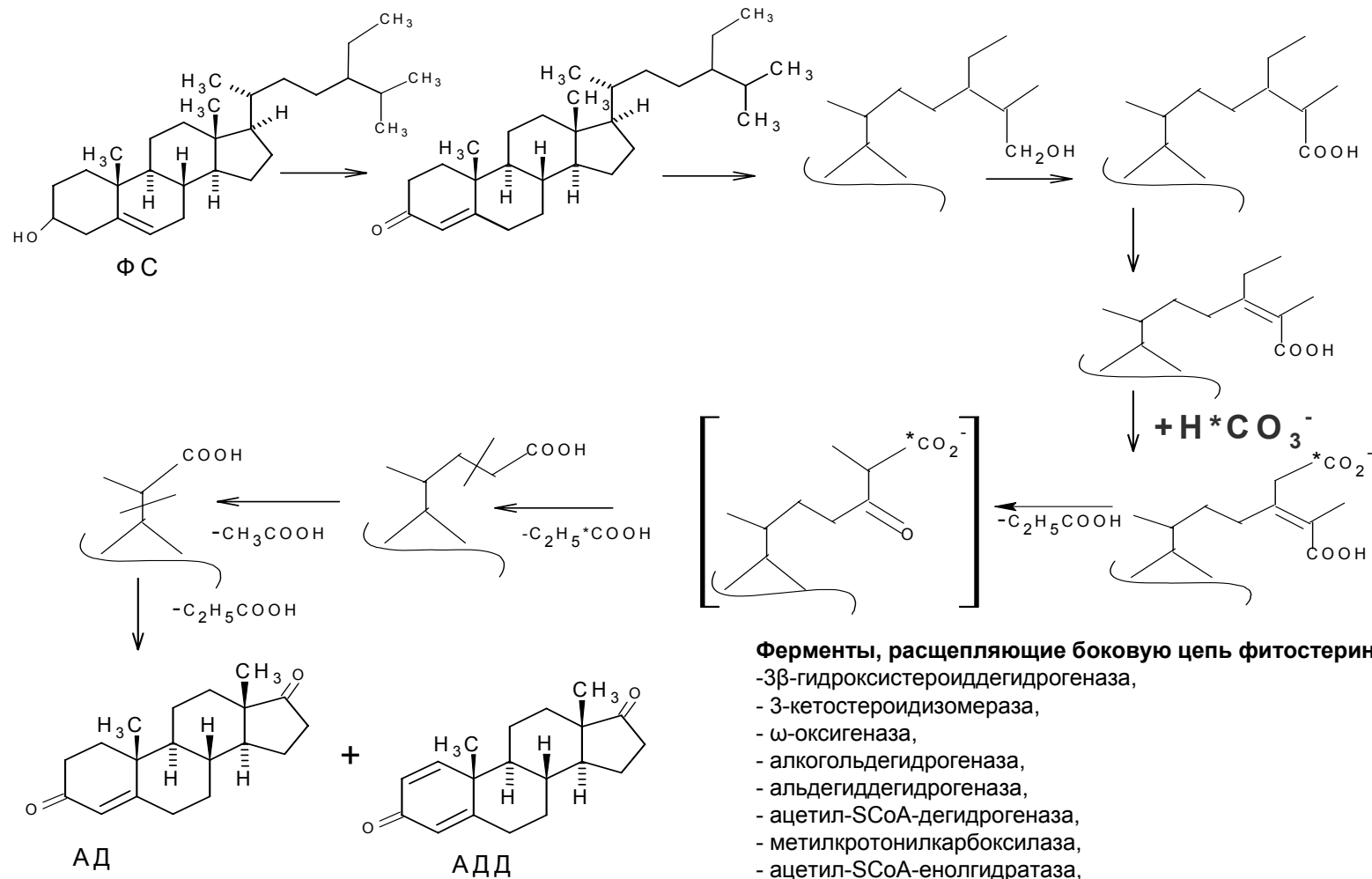
Схема 1. Расщепление стероидного ядра фитостеринов дикими штаммами бактерий



Ферменты, расщепляющие стероидное ядро:

- 1- 1,3β-гидрокси-Δ⁵-стероиддегидрогеназа, стероид-Δ-изомераза
- 2- 3-кетостероид-1(2)-дегидрогеназа
- 3-стероид-9α-монооксигеназа

Схема 2. Расщепление боковой цепи



Ферменты, расщепляющие боковую цепь фитостеринов:

- 3 β -гидроксистероиддегидрогеназа,
- 3-кетостероидизомераза,
- ω -оксигеназа,
- алкогольдегидрогеназа,
- альдегиддегидрогеназа,
- ацетил-S-CoA-дегидрогеназа,
- метилкротонилкарбоксилаза,
- ацетил-S-CoA-енолгидратаза,
- ацетил-S-CoA-тиоффераза,
- β -кетотиолаза,
- β -гидроксиацетил-S-CoA-дегидрогеназа

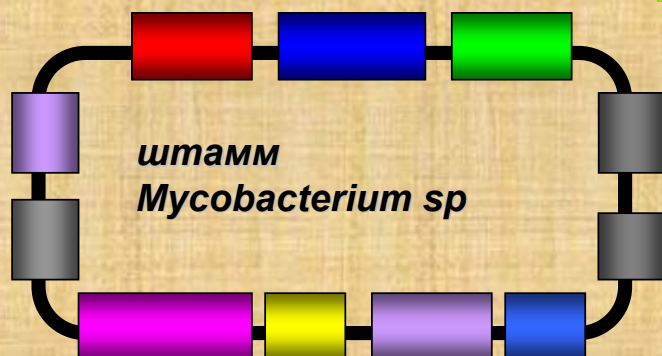
Микробиологический синтез стероидов: защита интеллектуальной собственности



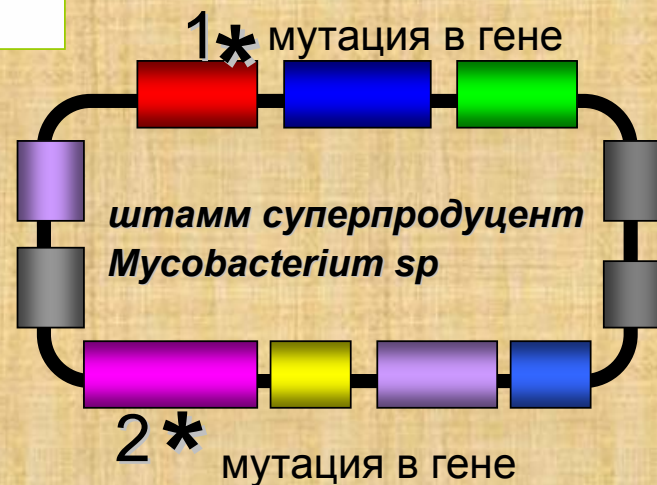
9 патентов, 2 заявки на патент

Решение обратной задачи: от функции к структуре

фитостерин



штамм
Mycobacterium sp

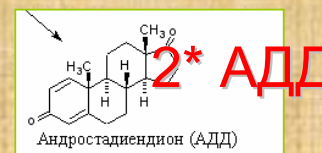
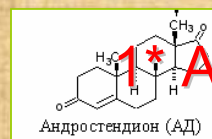
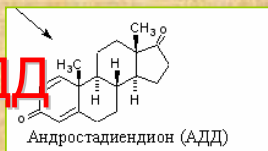


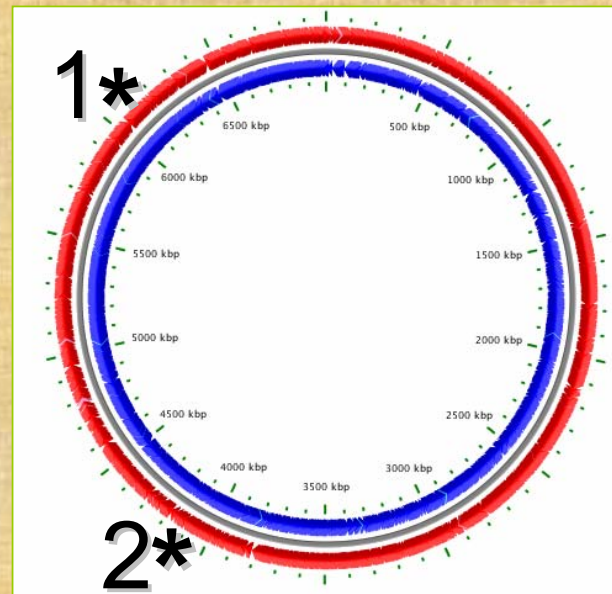
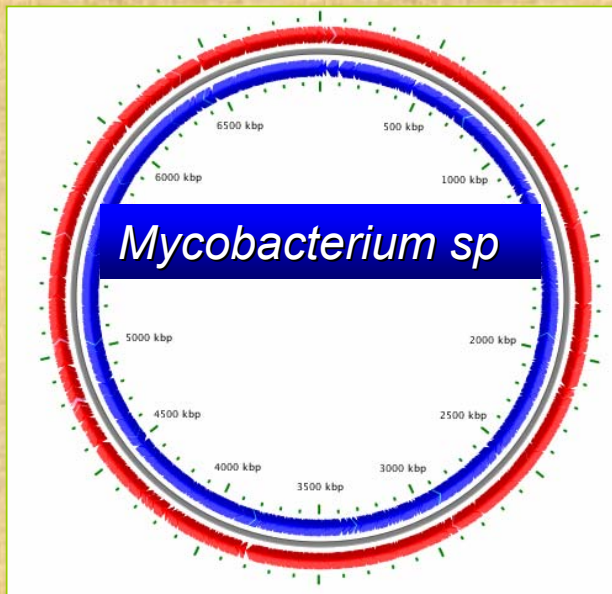
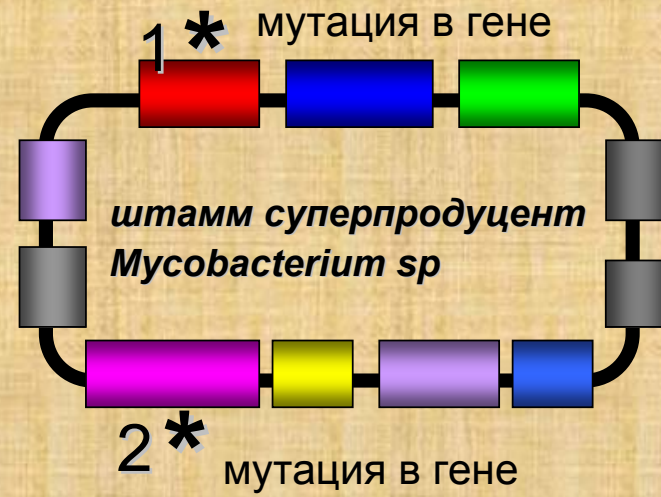
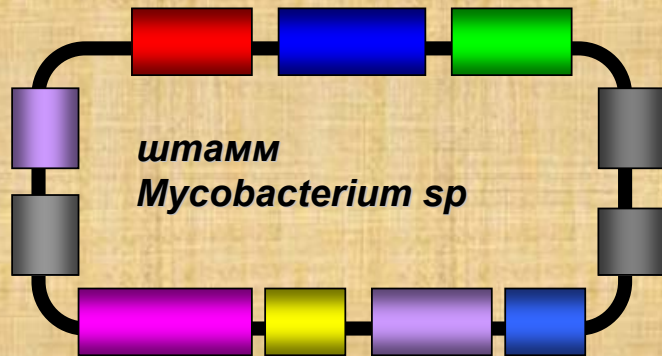
1* мутация в гене

2* мутация в гене

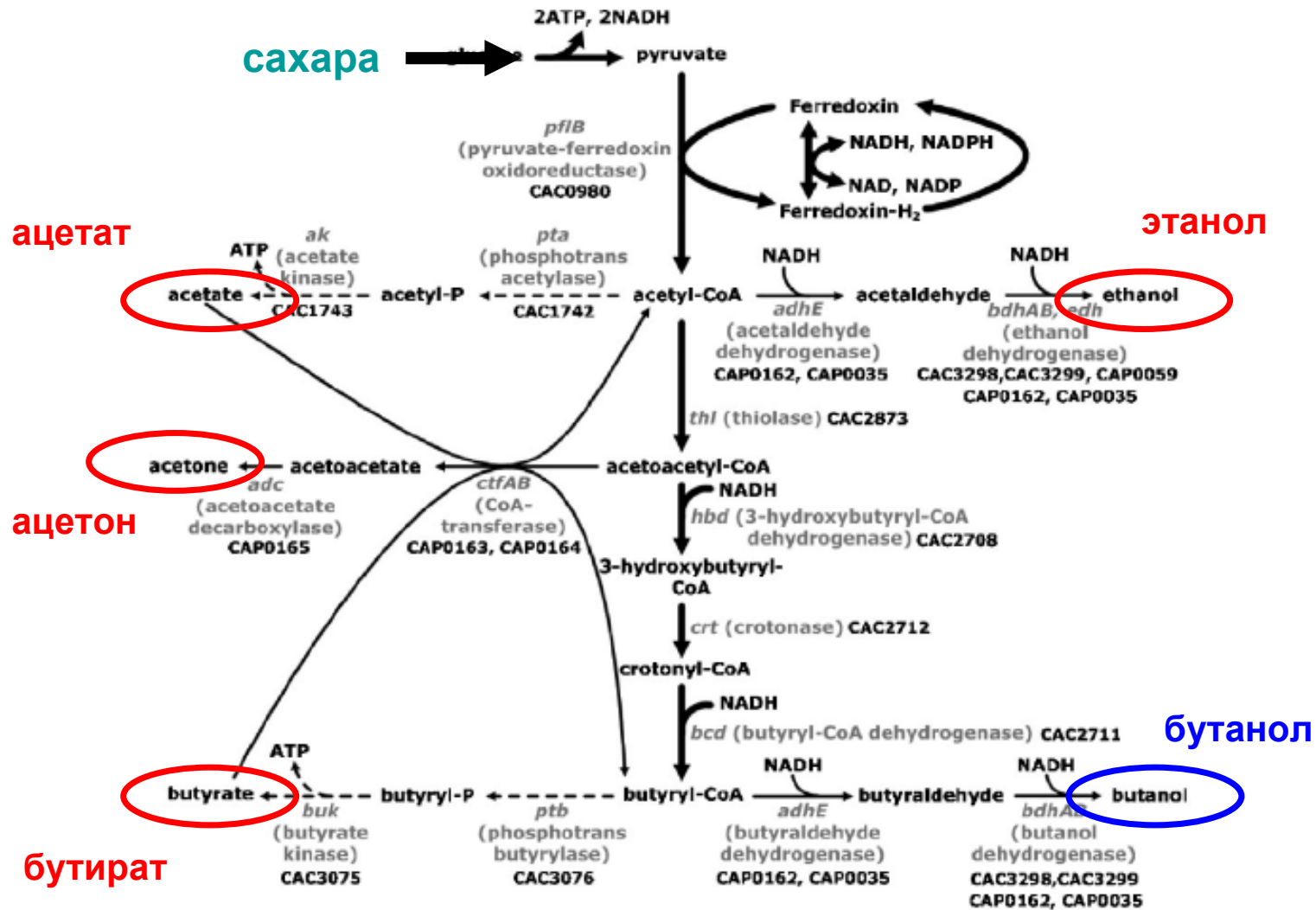


АД + АДД

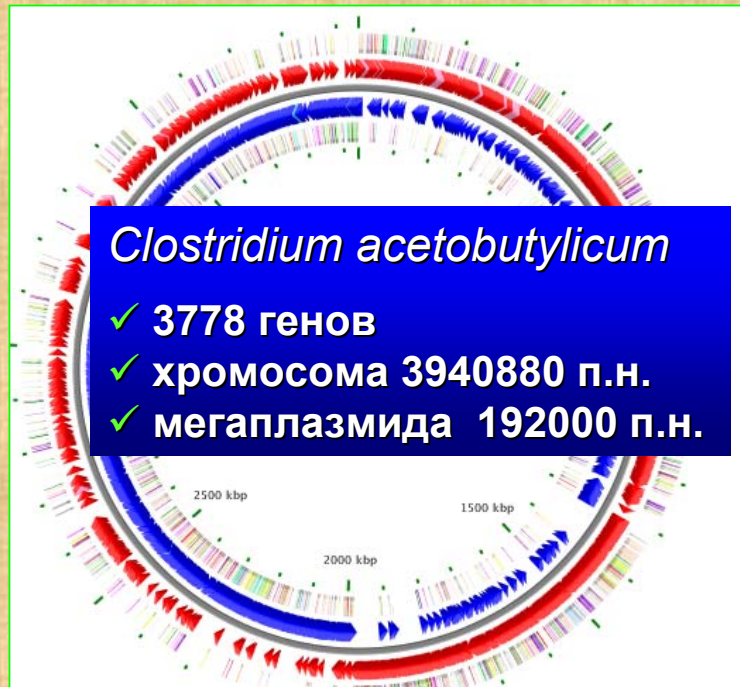
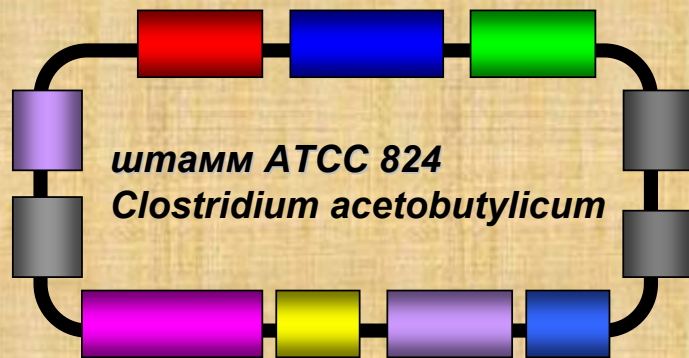




Биосинтез бутанола из сахаров



Производство бутанола: метаболическая инженерия клостридий

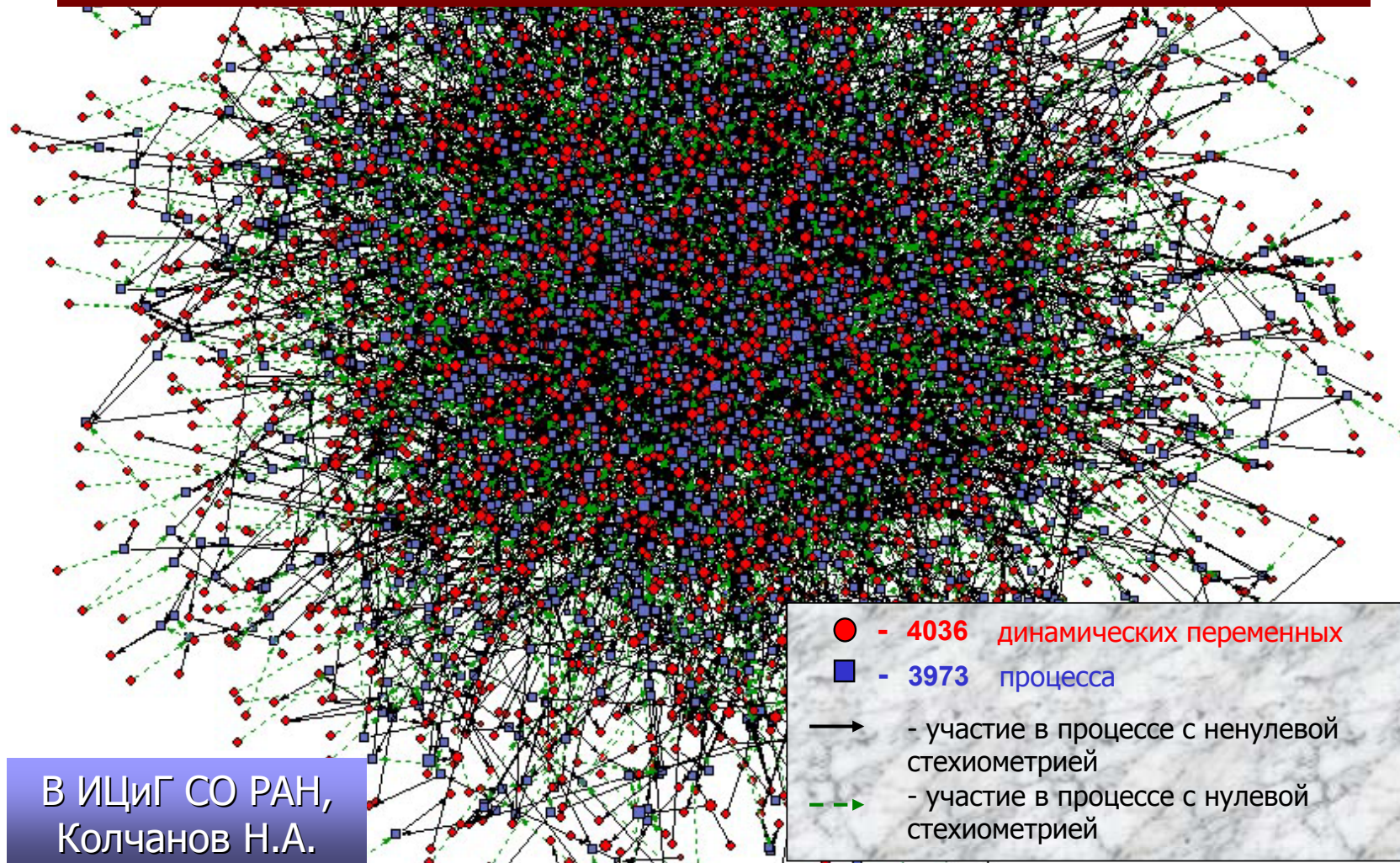


Clostridium acetobutylicum
Корпорация «Биотехнологии»

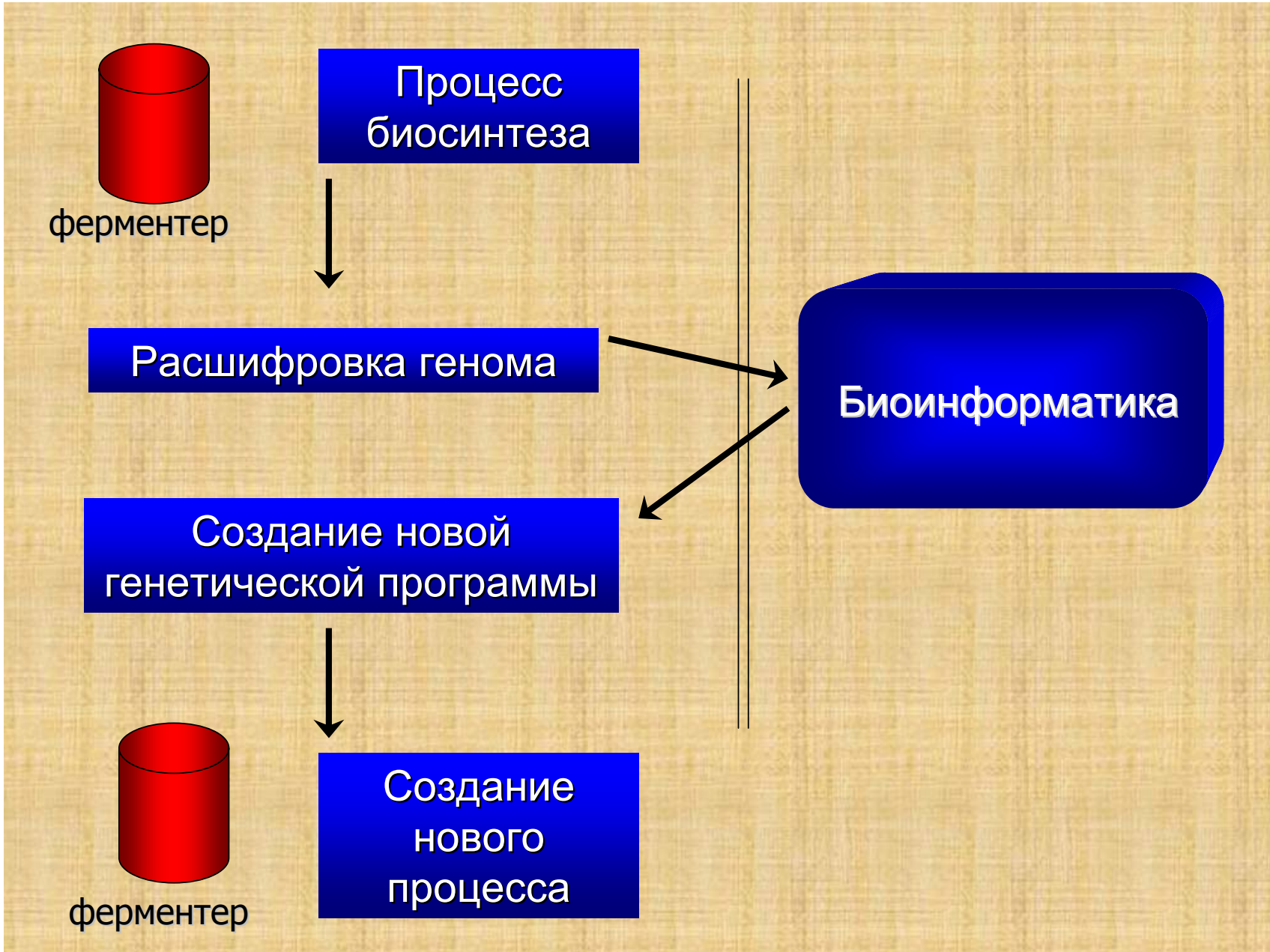


234 точечные мутации
новая плазида 11136 нт
«новый» генетический
материал: около 15500 нт

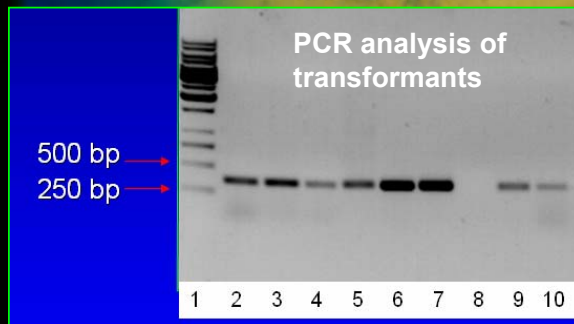
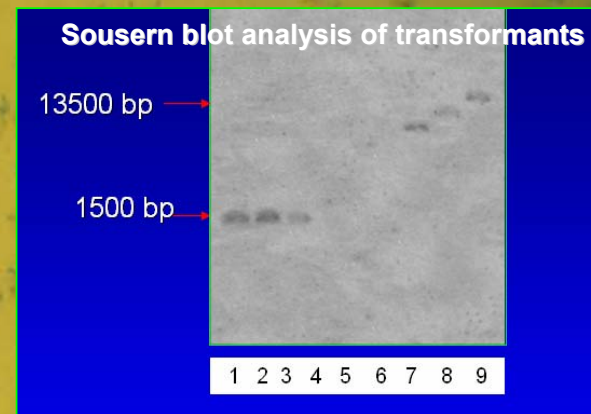
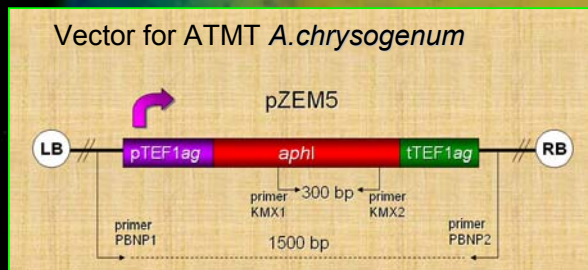
ГРАФ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ ESCHERICHIA COLI K-12



В ИЦиГ СО РАН,
Колчанов Н.А.



Агробактериальная трансформация *Acremonium chrysogenum*



10 mkm

A.tumefaciens AGL0/pZEM5

mycelium of *A.chrysogenum*
№26/8 with pZEM5

**Термофильные
микроорганизмы как источник
новых ферментов для
биотехнологии**

Примеры использования термостабильных ферментов

Bioconversion reactions and applications of thermostable enzymes

| Enzyme | Temperature range (°C) | Bioconversions | Applications |
|-------------------------------|-------------------------|---|--|
| α -Amylase (bacterial) | 90–100 | Starch → dextrose syrups | Starch hydrolysis, brewing, baking, detergents |
| α -Amylase (fungal) | 50–60 | Starch → dextrose syrups | Production of maltose |
| Pullulanase | 50–60 | Starch → dextrose syrups | Production of glucose syrups |
| Xylanase | 45–65, 105 ^a | Craft pulp → xylan + lignin | Pulp and paper industry |
| Chitinase | 65–75 ^b | Chitin → chitobiose | Food, cosmetics, pharmaceuticals, agrochemicals |
| | | Chitin → <i>N</i> -acetyl glucosamine (chitinase) | |
| | | <i>N</i> -acetyl glucosamine → glucosamine (deacetylation) | |
| | | Chitin → chitosan (deacetylase) | |
| Cellulase | 45–55, 95 ^c | Cellulose → glucose | Cellulose hydrolysis, polymer degradation in detergents |
| Protease | 65–85 | Protein → amino acids and peptides | Baking, brewing, detergents, leather industry |
| Lipase | 30–70 | Fat removal, hydrolysis, interesterification, alcoholysis, aminolysis | Dairy, oleo chemical, detergent, pulp, pharmaceuticals, cosmetics and leather industry |
| DNA polymerase | 90–95 | DNA amplification | Genetic engineering/PCR |

«Классический» путь поиска новых ферментов

Выделение чистой культуры

Выделение
геномной ДНК,
приготовление
геномной
библиотеки

Идентификация фермента

Очистка фермента и секвенирование
с N-конца

Получение ДНК-зонда исходя из информации о N-
концевой последовательности белка,
скрининг библиотеки при помощи гибридизации

Идентификация клона, выделение и секвенирование гена, экспрессия

«Геномный» путь поиска новых ферментов

Выделение чистой культуры или метагеномного образца

Секвенирование
(мета)генома



Идентификация гена, кодирующего нужный фермент



Клонирование и экспрессия



Характеристика фермента

**Секвенирование геномов
экстремофильных
микроорганизмов
- получение генетической
информации**

Термофильные археи в природе

- Наземные вулканические районы



Т 50-102°C
pH 1.5-9.5

- Прибрежные морские гидротермы



глубина 0.1- 40 м
Т 60-95°C pH 6.5-7.0

Е.А. Бонч-Осмоловская, Институт микробиологии РАН

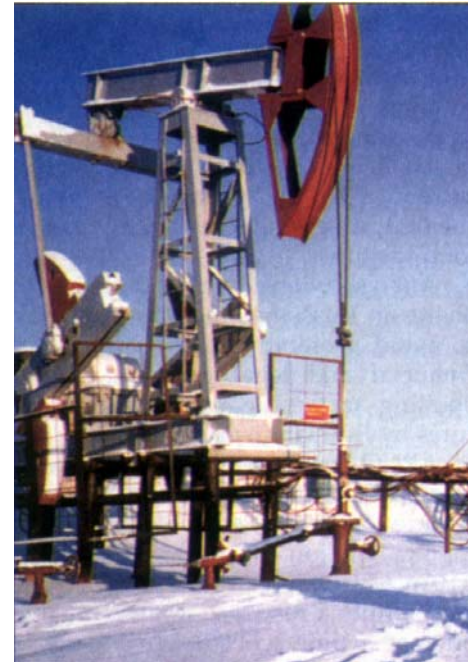
Термофильные археи в природе

- Глубоководные гидротермы



T 50-350°C pH 3.5-6.5

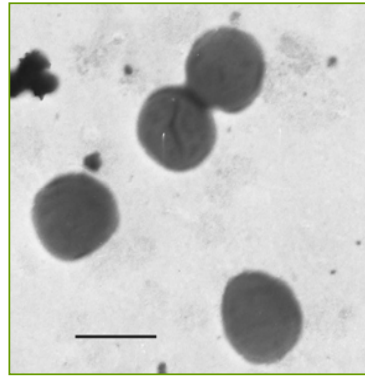
- подземные термальные экологические ниши



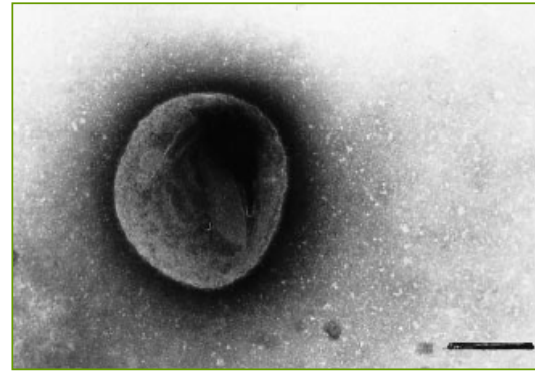
T 65-85°C pH 6.8-7.8

Е.А. Бонч-Осмоловская, Институт микробиологии РАН

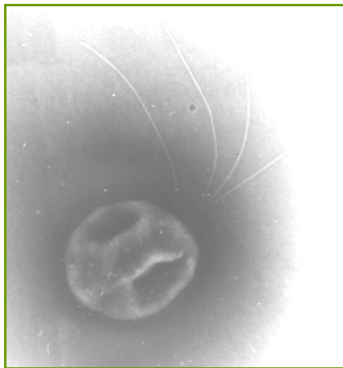
Термофильные археи – геномы расшифрованы (30/10/2008)



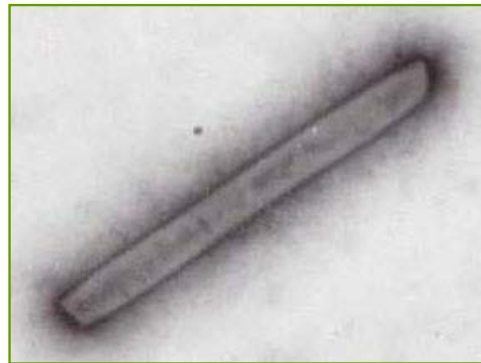
Desulfurococcus kamchatkensis



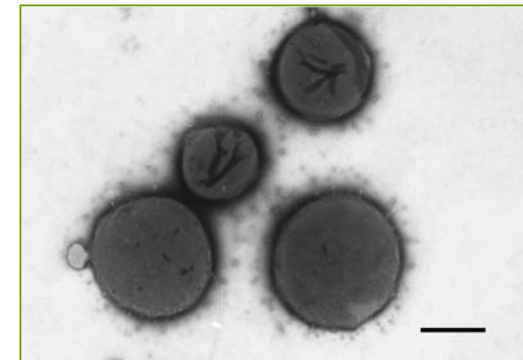
Thermococcus sibiricus



*Acidilobus
saccharovorans*



Vulcanisaeta moutnovskya

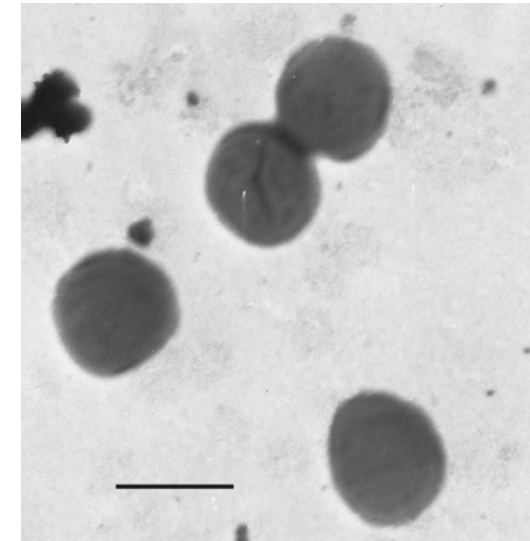


Fervidococcus fontis

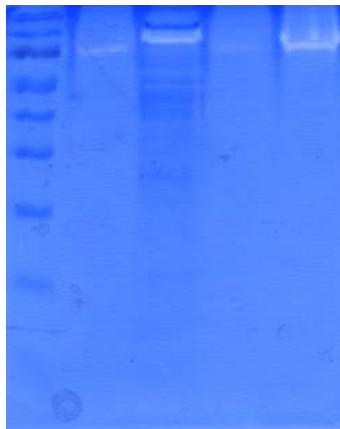
Desulfurococcus kamchatkensis



Анаэроб, органотроф, растущий на белковых субстратах и некоторых сахарах



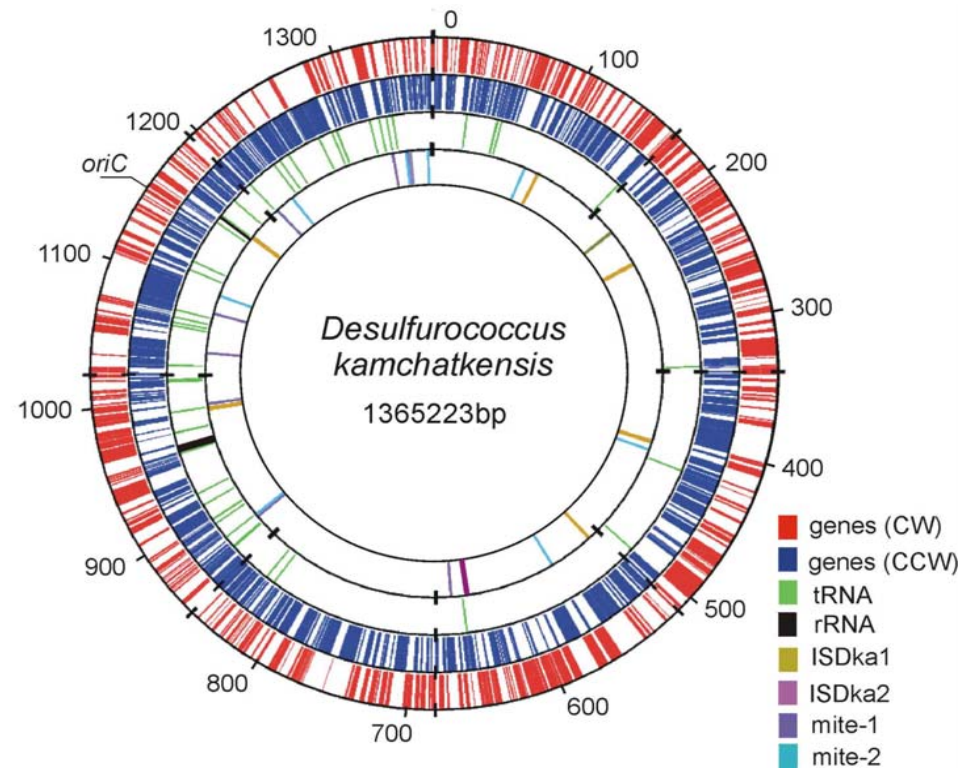
температура 65-87С
рН 5.5 - 7.5



Рост на различных белках, включая трудногидролизуемые (кератины)

Протеолитическая активность *D. kamchatkensis*: зимограмма при 90°C и рН 9.0 (Bonch-Osmolovskaya, 2008)
Имеются внеклеточные протеазы

Основные характеристики генома



| | |
|---------------------------------|-------------------------------|
| Ribosomal RNA genes: | single copy of 16S-23S and 5S |
| Transfer RNA genes: | 47 |
| Potential protein-coding genes: | 1474 |
| Mobile elements: | 7 intact transposons |
| CRISPR: | 1 |

Протеолитические ферменты

В геноме было найдено более 30 различных внутри и вне-клеточных пептидаз, относящихся к различным семействам

Пять возможных внеклеточных протеаз:

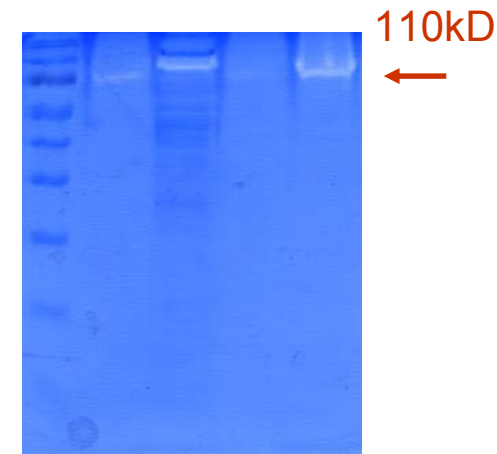
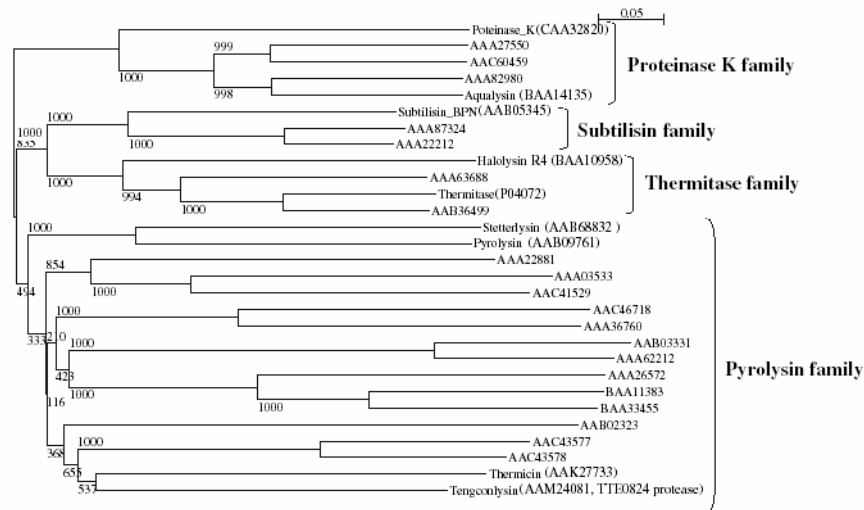
70 kD серин подобная протеаза Dkam_0467,

49 kD возможная мембран связанная протеаза Dkam_0583,

17 kD пептидаза Dkam_0835,

141 kD субтилизин-подобная протеаза Dkam 1032

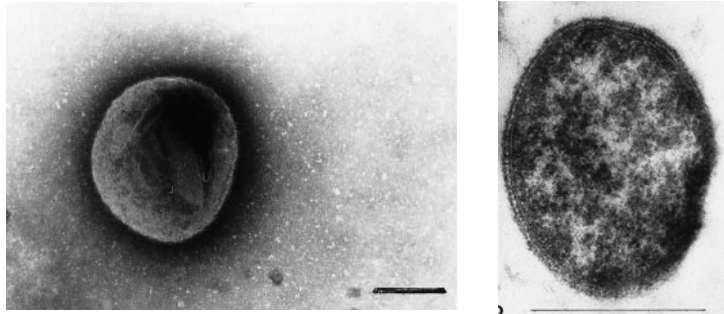
44 kD Субтилизин подобная протеаза Dkam_1199



Ферменты, деградирующие сахара

| Фермент | Всего | с сигнальным пептидом |
|---|-------|-----------------------|
| Alpha-amylases | 4 | 0 |
| Pullulanases | 2 | 2 |
| Amylopullulanase | 1 | 1 |
| Arabinogalactan endo-1,4-beta-galactosidase | 1 | 1 |
| Alpha-glucosidase | 1 | 0 |
| Endoglucanase | 1 | 0 |
| Beta-glucosidase | 1 | 0 |

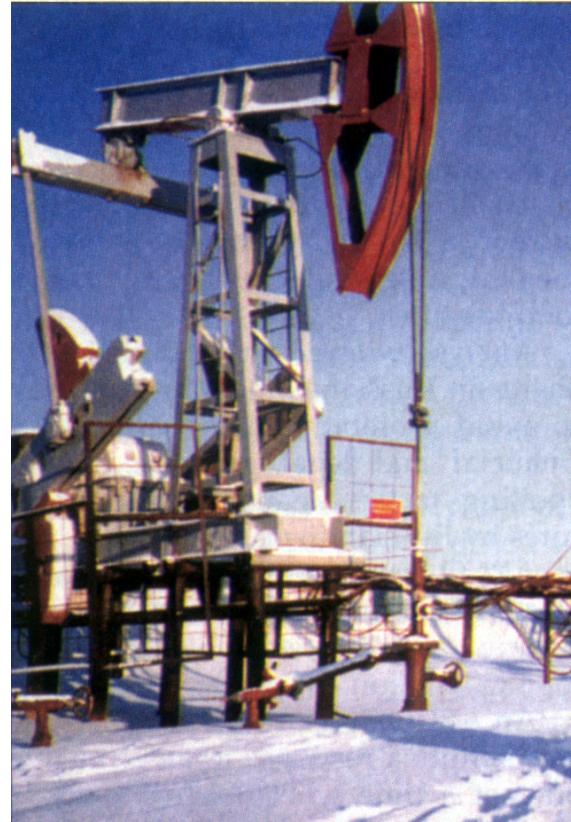
Thermococcus sibiricus



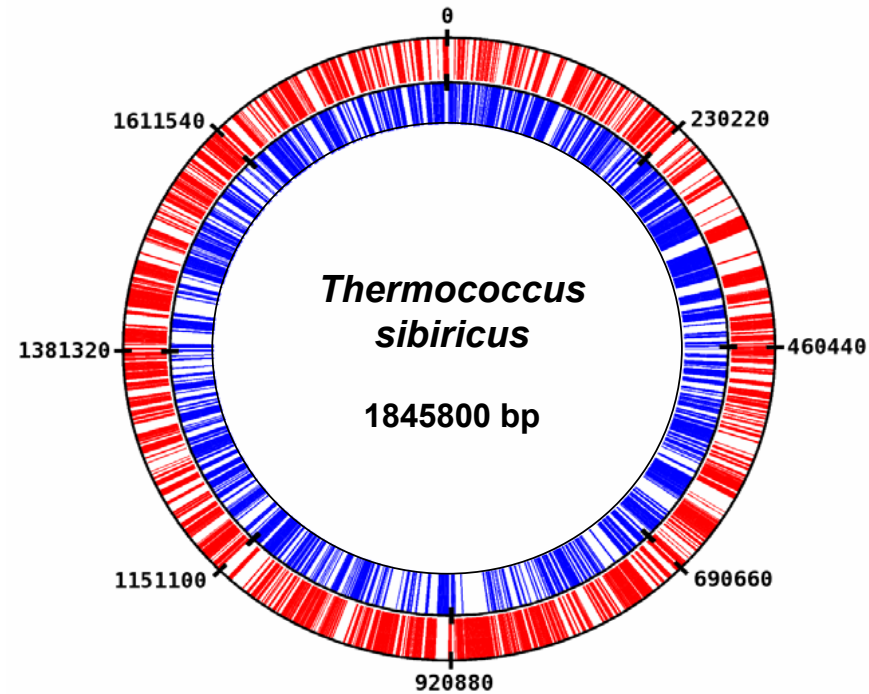
Новая гипертермофильная эуархейя, выделенная из высокотемпературного нефтяного источника Самотлор в Западной Сибири

Анаэроб, органотроф, растущий на пептидах и сахарах

температура: 40° - 88°C, оптимум 78°C
pH: 5.8 - 9.0, оптимум 7.3



Основные характеристики генома



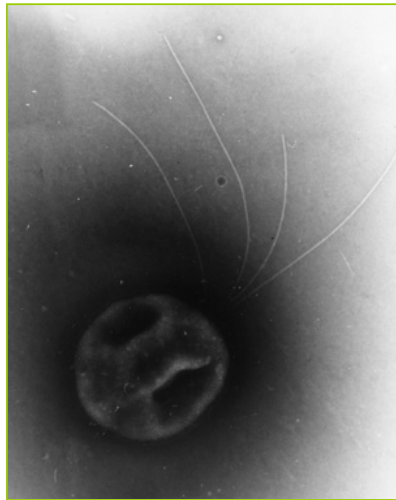
| | |
|--|-------------------------------|
| Ribosomal RNA genes: | single copy of 16S-23S |
| Transfer RNA genes: | 46 |
| Potential protein-coding genes: | 2084 |
| Mobile elements: | 2 intact transposons |
| CRISPR: | 1 |

Новые ферменты *Thermococcus sibiricus*

| Ферменты | гены |
|-------------------|------|
| Proteases | 21 |
| Alpha-amylases | 1 |
| Pullulanases | 0 |
| Amylopullulanase | 1 |
| Alpha-glucosidase | 1 |
| Endoglucanase | 1 |
| Beta-glucosidase | 2 |
| Xylanase | 0 |
| Chitinase | 0 |

Гипертермофильные археи: *Acidilobus*

Представляет новый
порядок Кренархей



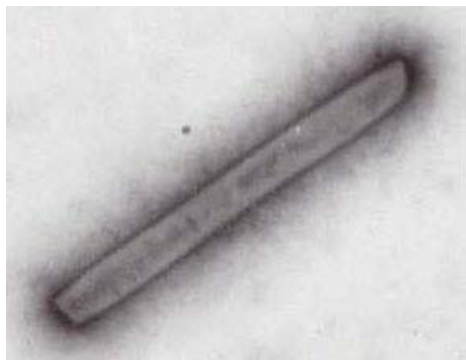
Acidilobus saccharovorans



Анаэроб, растущий при
82-92°C и pH 3.0-4.0 на
белковых субстратах и
различных карбогидратах,
включая крахмал

Различные сахаролитические ферменты

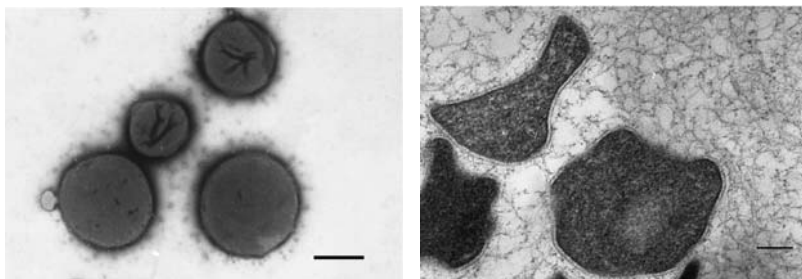
Гипертермофильные археи



Vulcanisaeta moutnovskya

Анаэроб растущий при 102°C

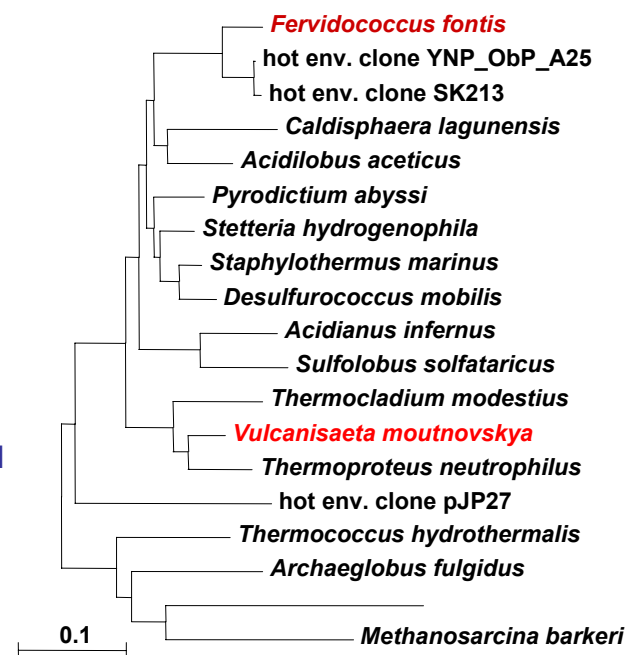
Fervidococcus fontis



Филогенетически удален от других кренархей

Используемые субстраты: пептон, крахмал

T_{opt} 80°C, T_{max} 85°C pH_{opt} 6.0-6.5



Последовательность генома



Экспрессия фермента



Функциональная характеристика фермента

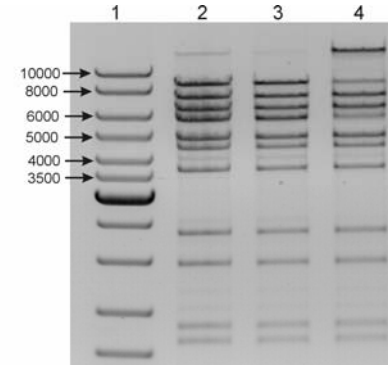
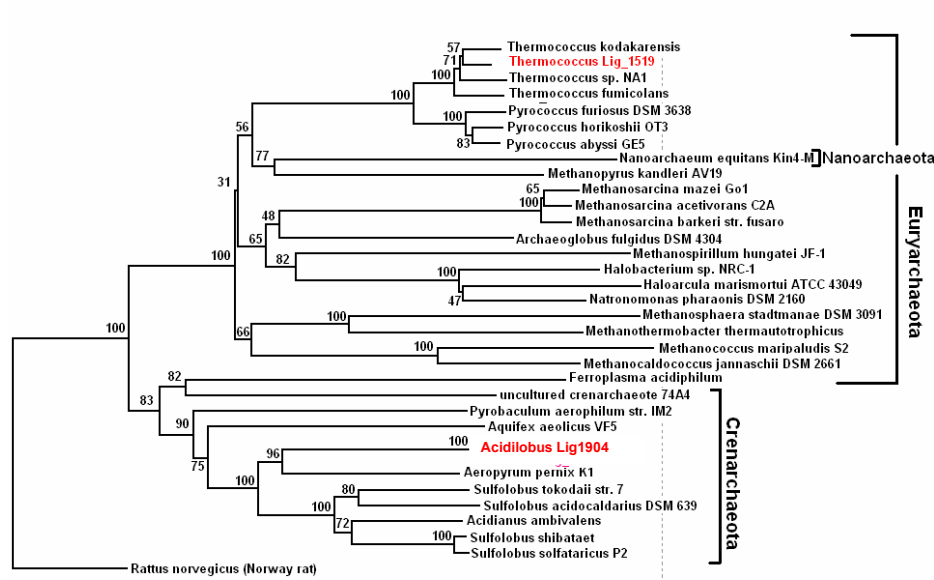


Кристаллизация и расшифровка структуры

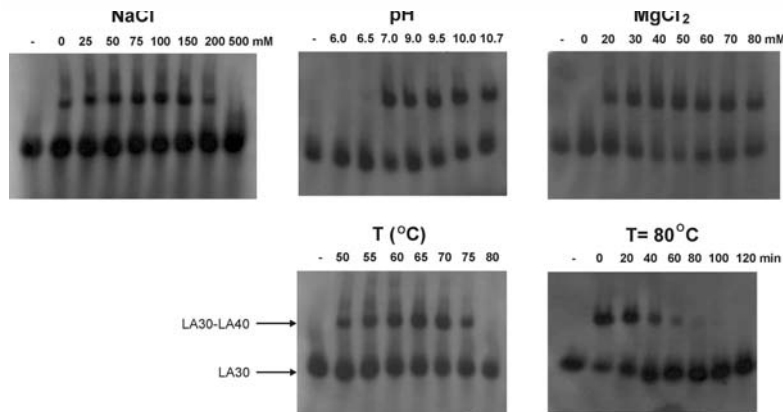


**Направленная модификация для
улучшения характеристик фермента**

Пример: две новые термостабильные ДНК лигазы из архей *Thermococcus* и *Acidilobus*

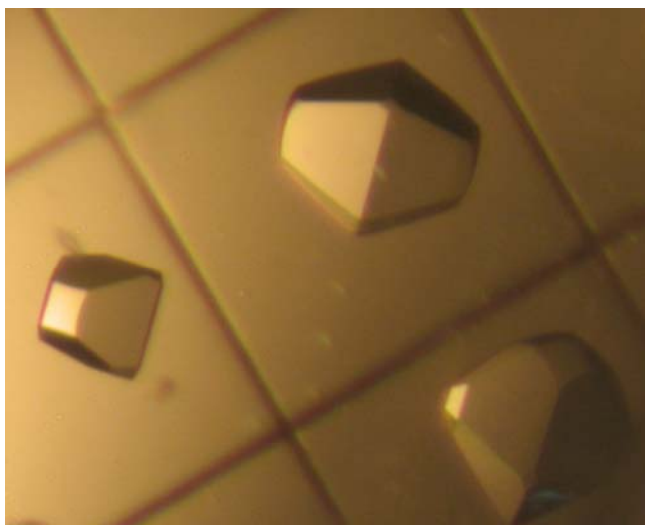


- 1 – markers
- 2– λ BstEII no ligation
- 3– λ BstEII ligation w/o ATP
- 4 – λ BstEII ligation with ATP

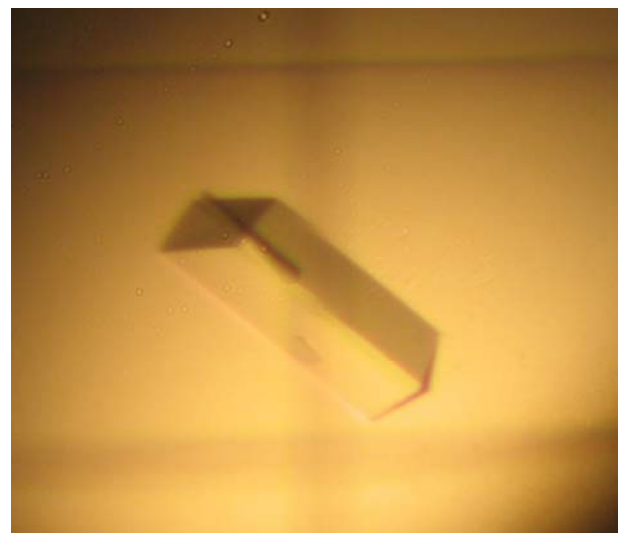


термостабильность:
 Lig 1519: 10 мин при 94C
 Lig 1904: 60 мин при 94C
 (50% инактивация)

Кристаллы новых ДНК-лигаз



Themococcus Lig1519



Acidilobus Lig1904

Экстремофильные археи - основа конструирования искусственной клетки для применения в биотехнологии

