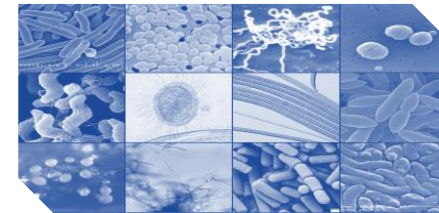


ИНДУЦИРОВАННАЯ РЕКОНСТРУКЦИЯ ГЕНОМА И РАЗВИТИЕ ПРОМЫШЛЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

Яненко Александр Степанови

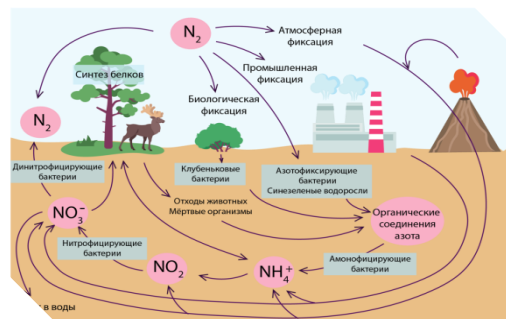
МИКРООРГАНИЗМЫ И ИХ РОЛЬ В ПРИРОДЕ И ХОЗЯЙСТВЕННОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

Микроорганизмы – древнейшая и самая многочисленная часть биоты на Земле



ЭФФЕКТЫ ОТ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Глобальный уровень
(планетарный масштаб) -
Круговорот веществ



Организменный уровень -
симбиоз



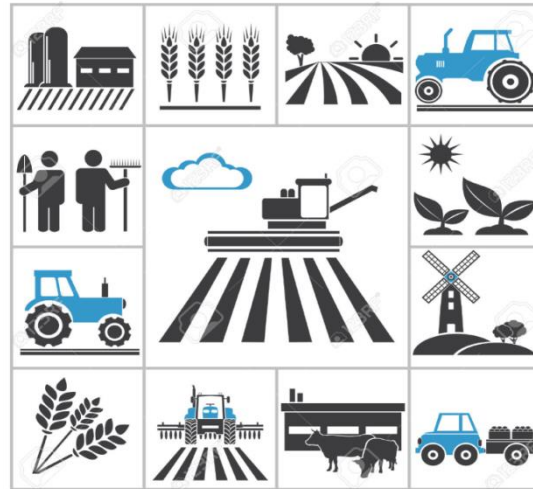
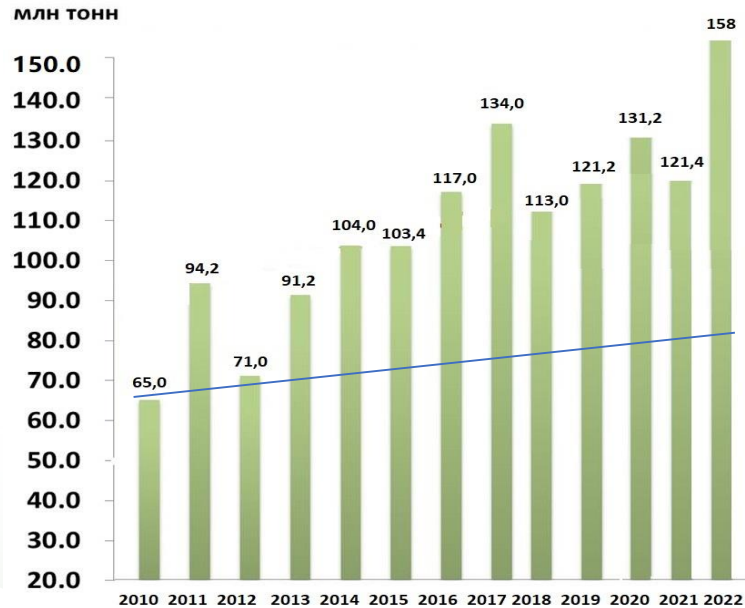
Локальный уровень -
хозяйственная деятельность
человека



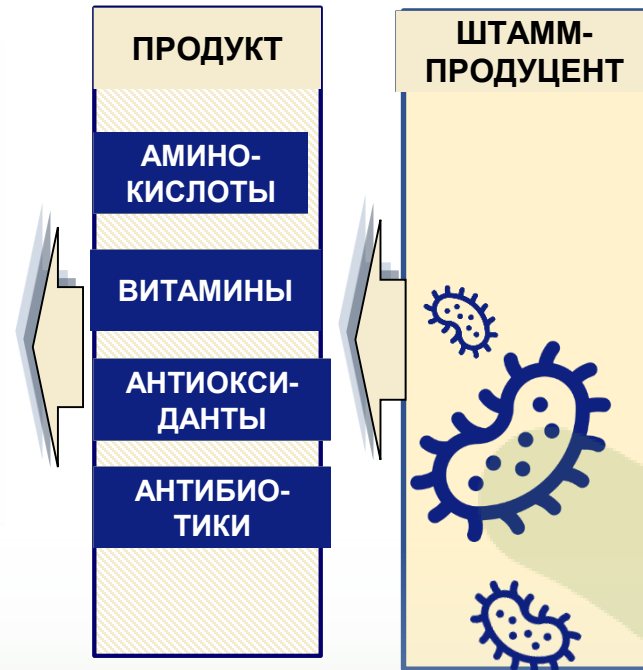
**ЗНАНИЯ О МИКРООРГАНИЗМАХ ВСЕ ЕЩЕ ОГРАНИЧЕНЫ,
УРОВЕНЬ ИХ ИЗУЧЕННОСТИ – НЕ БОЛЕЕ 5%**

СЕЛЬСКОЕ ХОЗЯЙСТВО И ПРОМЫШЛЕННАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ: ВЗАИМОЗАВИСИМОЕ РАЗВИТИЕ

Сбор зерна в России: тенденции роста



Сырьевая база



ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ КАК СПОСОБ СМЕНЫ СТРАТЕГИИ РАЗВИТИЯ МИКРОБНОЙ КЛЕТКИ

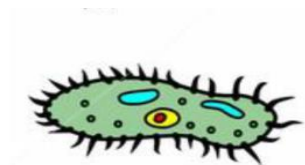
Природный штамм

ГЛЮКОЗА

CO₂

CH₄

Источники энергии и питания



Максимальный рост и размножение

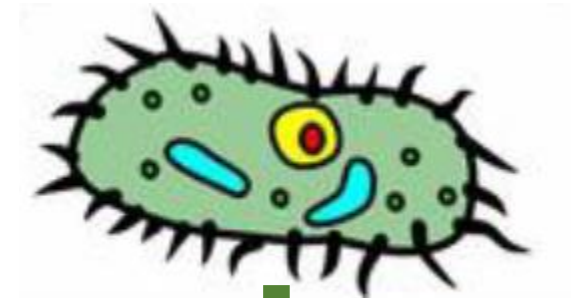
Генетически измененный штамм

ГЛЮКОЗА

CO₂

CH₄

Источники энергии и питания



Оптимальный синтез целевого продукта

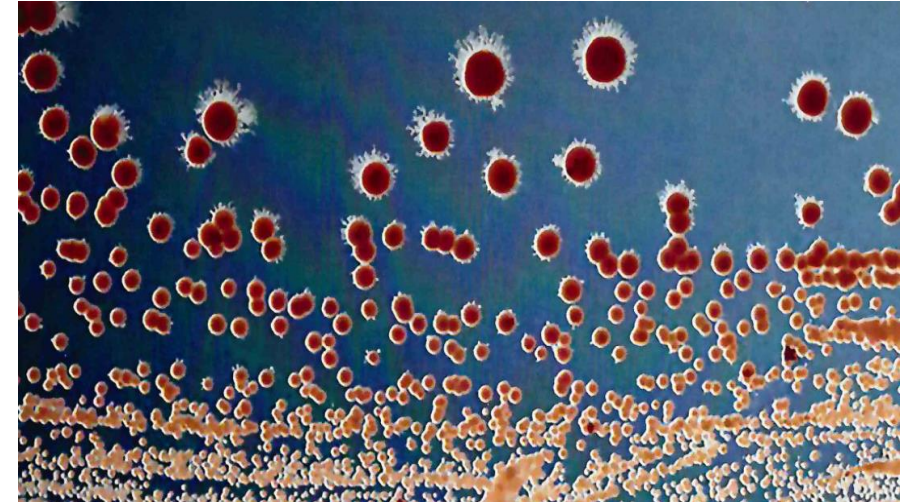
ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ



ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ В СЕЛЕКЦИИ НОВЫХ ОРГАНИЗМОВ С УЛУЧШЕННЫМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ

Этапы развития генетических технологий

- Отбор природных организмов и их мутантных вариантов, полученных в результате ненаправленного воздействия на их геном
- Создание организмов, содержащих рекомбинантную ДНК из разных источников, с помощью генной инженерии (трансгенные организмы)
- Создание организмов, содержащих редактированный геном с помощью систем направленной модификации генома
- Создание с помощью синтетической биологии ОРГАНИЗМОВ de novo с набором свойств, не существующим в природе



1. Классическая селекция-ненаправленный отбор

Исходная информация:

- Сведения о геноме отсутствуют
- Метаболические пути не известны
- Гены и ферменты не идентифицированы

ДИЗАЙН ОТБОРА

Обнаружен микроб с интересной активностью



Многочисленные раунды мутагенеза и отбора
(годы работы)



Штамм- продуцент



Промышленное использование

2. Современная селекция – направленная реконструкция генома

Исходная информация:

- Полное знание структуры генома
- Метаболические пути изучены
- Гены и ферменты идентифицированы

ДИЗАЙН ОТБОРА

Проектирование штамма
Выбор базового штамма и генетических ресурсов



Генетические технологии конструирования



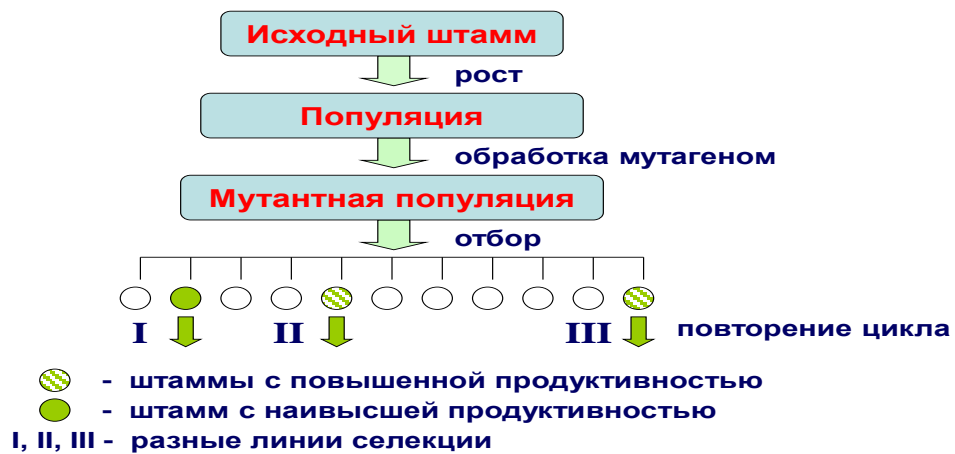
Штамм-продуцент



Промышленное использование

Схема традиционной ступенчатой селекции

CSI - classical strain improvement / CSS - classical strain selection



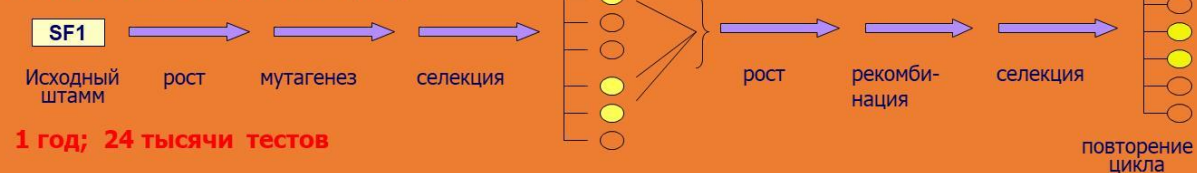
Селекция продуцентов антибиотика тилозина *Streptomyces fradie*

CSS - метод (20 циклов мутагенеза и отбора)



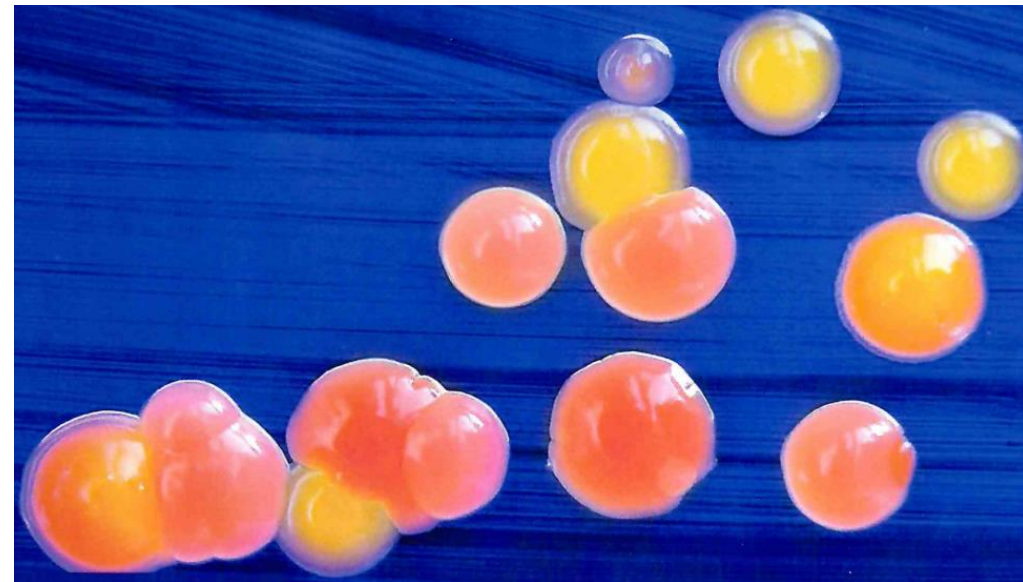
20 лет; 1 миллион тестов

Геномный шафлинг (GS)



1 год; 24 тысячи тестов

□ Результат: GS1: 8,1 ± 1,2 г/л



ЛАБОРАТОРНАЯ ЭВОЛЮЦИЯ ДЛЯ МОДИФИКАЦИИ ШТАММОВ RHODOCOCUS

Изменения в геноме *R. rhodochrous*, восстанавливающие рост на ацетамиде

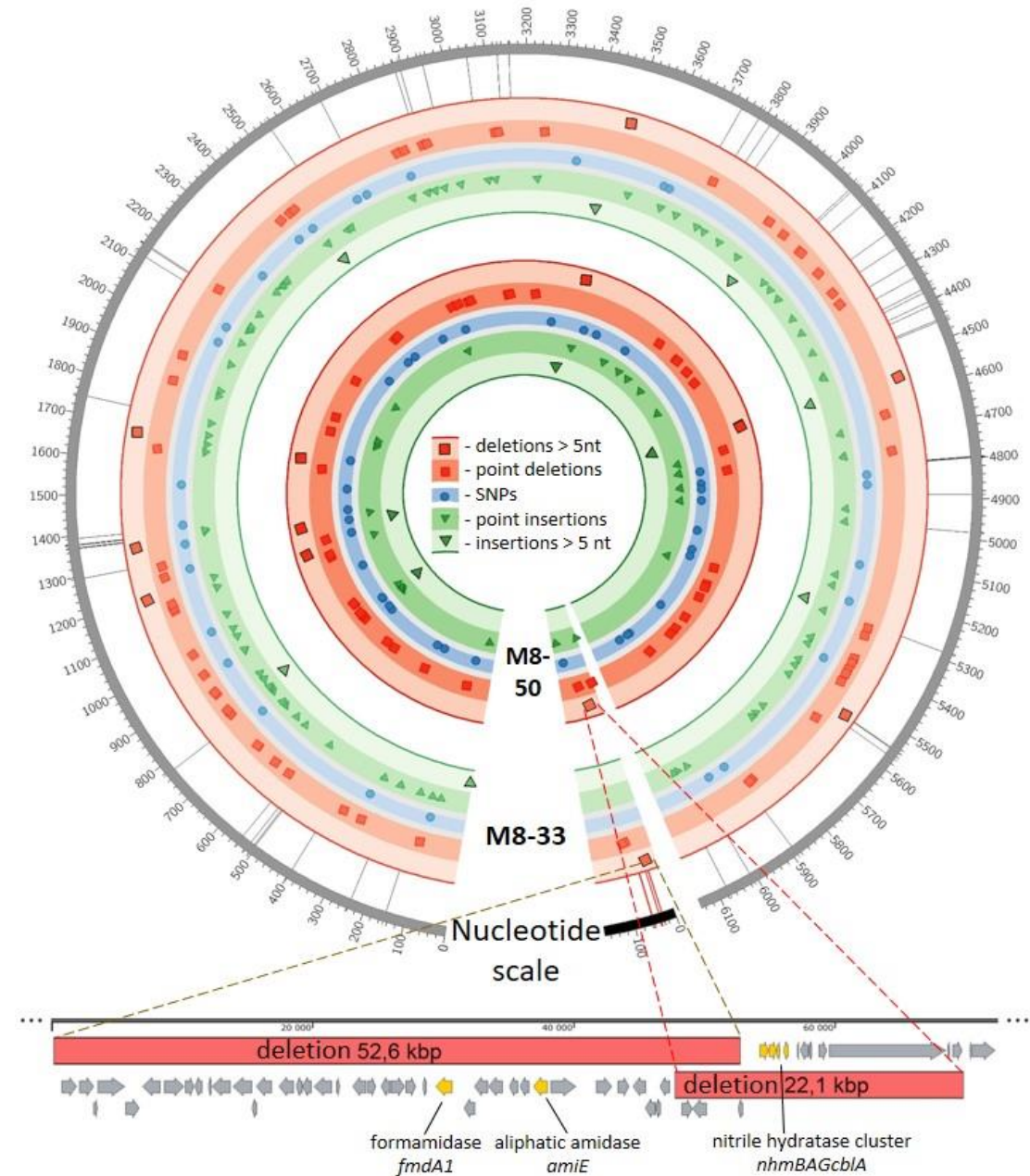
Крупные перестройки (п.н.):

Большие делеции: 52 600, 22 100, 4 947
 Малые делеции: всего 5 от 100 до 1000
 Инсерции: всего 7 от 15 до 5000

Малые перестройки и мутации (от 1 до 15 п.н.):

Точковые мутации всего 160
 вставки и делеции

БАКТЕРИИ *R. rhodochrous* ДЕМОНСТРИРУЮТ ВЫСОКУЮ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ВЗРЫВНОГО ХАРАКТЕРА И СПОСОБНОСТЬ АДАПТИРОВАТЬСЯ К ИСТОЧНИКАМ ПИТАНИЯ С ПОМОЩЬЮ МНОЖЕСТВЕННЫХ МОДИФИКАЦИЙ ГЕНОМА



1. Классическая селекция- ненаправленный отбор

Исходная информация:

- Сведения о геноме отсутствуют
- Метаболические пути не известны
- Гены и ферменты не идентифицированы

ДИЗАЙН ОТБОРА

Обнаружен микроб с интересной активностью



Многочисленные раунды мутагенеза и отбора
(годы работы)



Штамм- продуцент



Промышленное использование

2. Современная селекция – направленная реконструкция генома

Исходная информация:

- Полное знание структуры генома
- Метаболические пути изучены
- Гены и ферменты идентифицированы

ДИЗАЙН ОТБОРА

Проектирование штамма
Выбор базового штамма и генетических ресурсов



Генетические технологии
конструирования



Штамм-продуцент



Промышленное использование

СОВРЕМЕННЫЕ ТРЕБОВАНИЯ К ГЕНЕТИЧЕСКИ ИЗМЕНЕННЫМ ШТАММАМ



Важнейшие требования

- Создаваемые штаммы не должны содержать плазмиды и гены устойчивости к антибиотикам. Безмаркерное конструирование
- Модификации допускаются только в составе хромосомы
- Конструирование без трансгенов не должно приводить к появлению ГМО статуса штамма



Новые технологии редактирования, основанные на естественных клеточных процессах должны обеспечить ускоренное развитие промышленной биотехнологии и современный уровень безопасности

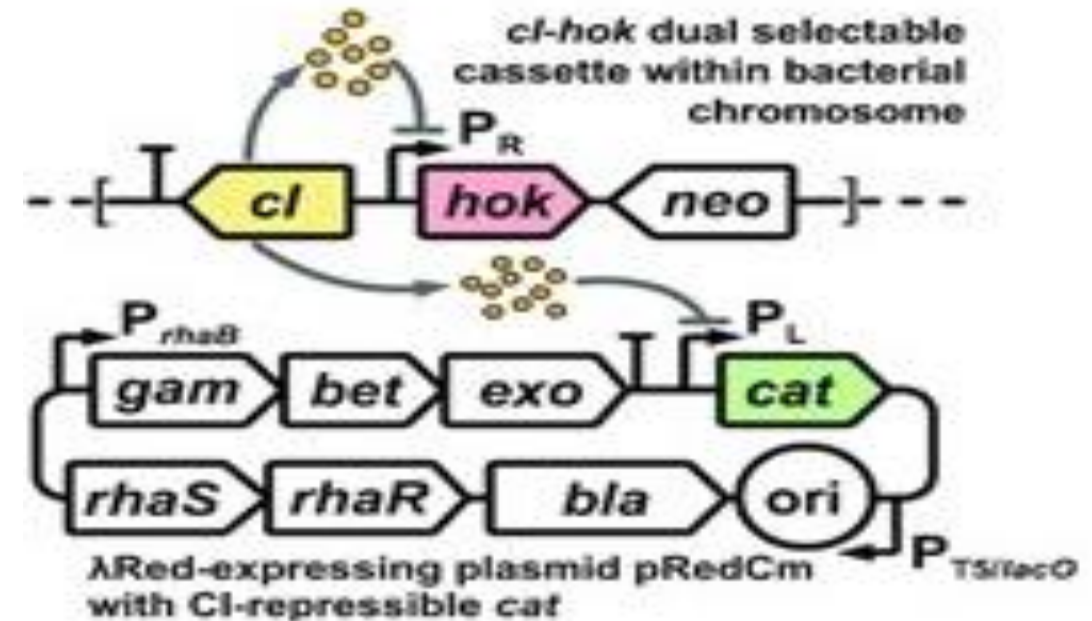
БАЗОВЫЕ ПРОМЫШЛЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ: ОБЛАСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ И РАЗРАБОТАННЫЕ СИСТЕМЫ РЕДАКТИРОВАНИЯ

Группы микроорганизмов	Использование	Системы редактирования
Энтеробактерии (<i>E.coli</i> , <i>Pantoea</i>)	Универсальный реципиент, продуцент аминокислот и других метаболитов	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Рекомбинирование на основе λ-red ❖ CRISPR-Cas
Коринебактерии (<i>Corynebacterium glutamicum</i>)	Продуценты аминокислот	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Обмен локусами с помощью гомологичной рекомбинации ❖ CRISPR-Cas
Родококки (<i>Rhodococcus rhodochrous</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i>)	Биокатализаторы для органического синтеза	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Обмен локусами с помощью гомологичной рекомбинации ❖ CRISPR-Cas
Бациллы (<i>Bacillus subtilis</i>)	Продуценты витаминов, ферментов	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Обмен локусами с помощью гомологичной рекомбинации ❖ Негомологичное соединения ❖ CRISPR-Cas
Дрожжи <ul style="list-style-type: none"> ➤ <i>Yarrowia lipolytica</i> ➤ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ➤ <i>Pichia pastoris</i> ➤ <i>Komagataella kurtzmanii</i> ➤ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> 	Продуценты: <ul style="list-style-type: none"> - Каротиноидов - Ферментов - Органических кислот 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ CRISPR-Cas ❖ Лох-система P1 ❖ Мегануклеаза I-SceI для множественной интеграции

РЕКОМБИНИРИНГ: УНИВЕРСАЛЬНЫЙ МЕТОД ИНТЕГРАЦИИ БОЛЬШИХ ФРАГМЕНТОВ С ПОМОЩЬЮ СИСТЕМЫ λ red

Рекомбинириг с *ci-hok* контрселекцией

- Безмаркерная интеграция целых метаболических путей
- Система контрселекции позволяет повысить частоту отбора до максимально возможной ($4-9 \times 10^{-10}$)
- Использование *Osc* (ген антирестрикции фага T7) повышает на 3 порядка эффективность интеграции неметелированной ДНК
- Применима для *E.coli*, *Pantoea*, *Salmonella* и *Citrobacter*.



Метод был использован для конструирования штаммов – продуцентов треонина и триптофана путем множественной интеграции оперонов в геном

НАБОР ИНСТРУМЕНТОВ ДЛЯ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ ДРОЖЖЕЙ YARROWIA LIPOLYTICA - YaliCraft

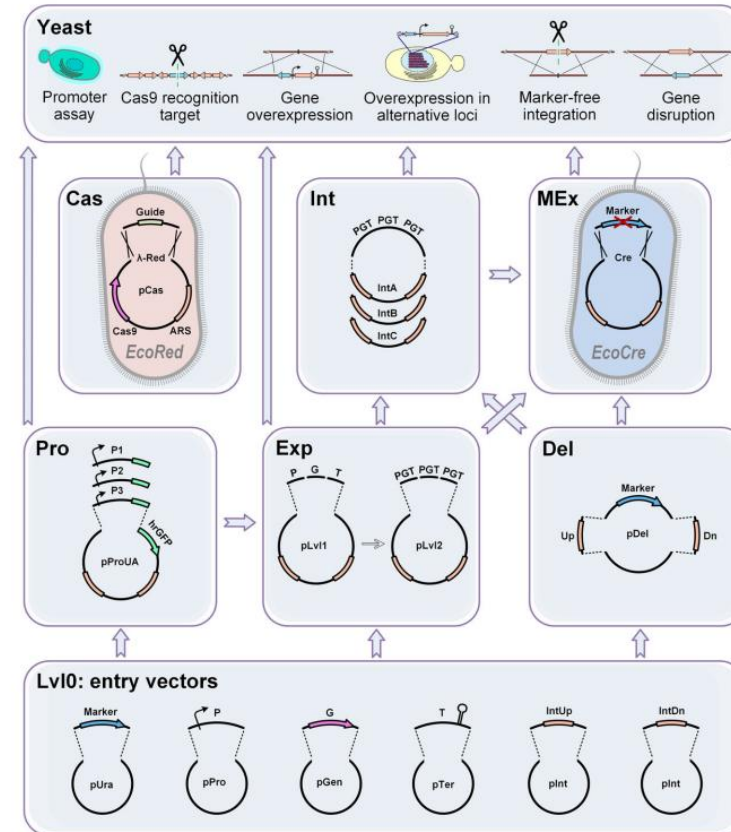
СОСТАВ

Содержит 7 модулей для быстрой сборки конструкций, в т.ч.:

- Модуль базовых плазмид (147 ед.) для конструирования
- Набор (137 ед.) новых промоторов разной силы
- Модули для сверхэкспрессии генов, накаута генов, интеграции локусов по плечам гомологии

НАЗНАЧЕНИЕ

- 1) Обеспечивает быстрое переключение между безмаркерной интеграцией (Cas9) и интеграцией на основе обмена маркеров с использованием как Cre-и red-лямбда систем
- 2) 2) позволяет перенаправлять мультигенные интеграционные кассеты в альтернативные геномные локусы по плечам гомологии
- 3) 3) быстрый и простой метод *in vivo* сборки гидРНК посредством рекомбинации с использованием Cas9-хелперными плазмид и одноцепочечных олигонуклеотидов



Tigran V. Yuzbashev et al.

A DNA assembly toolkit to unlock the CRISPR/ Cas9 potential for metabolic engineering

COMMUNICATIONS BIOLOGY | (2023) 6:858

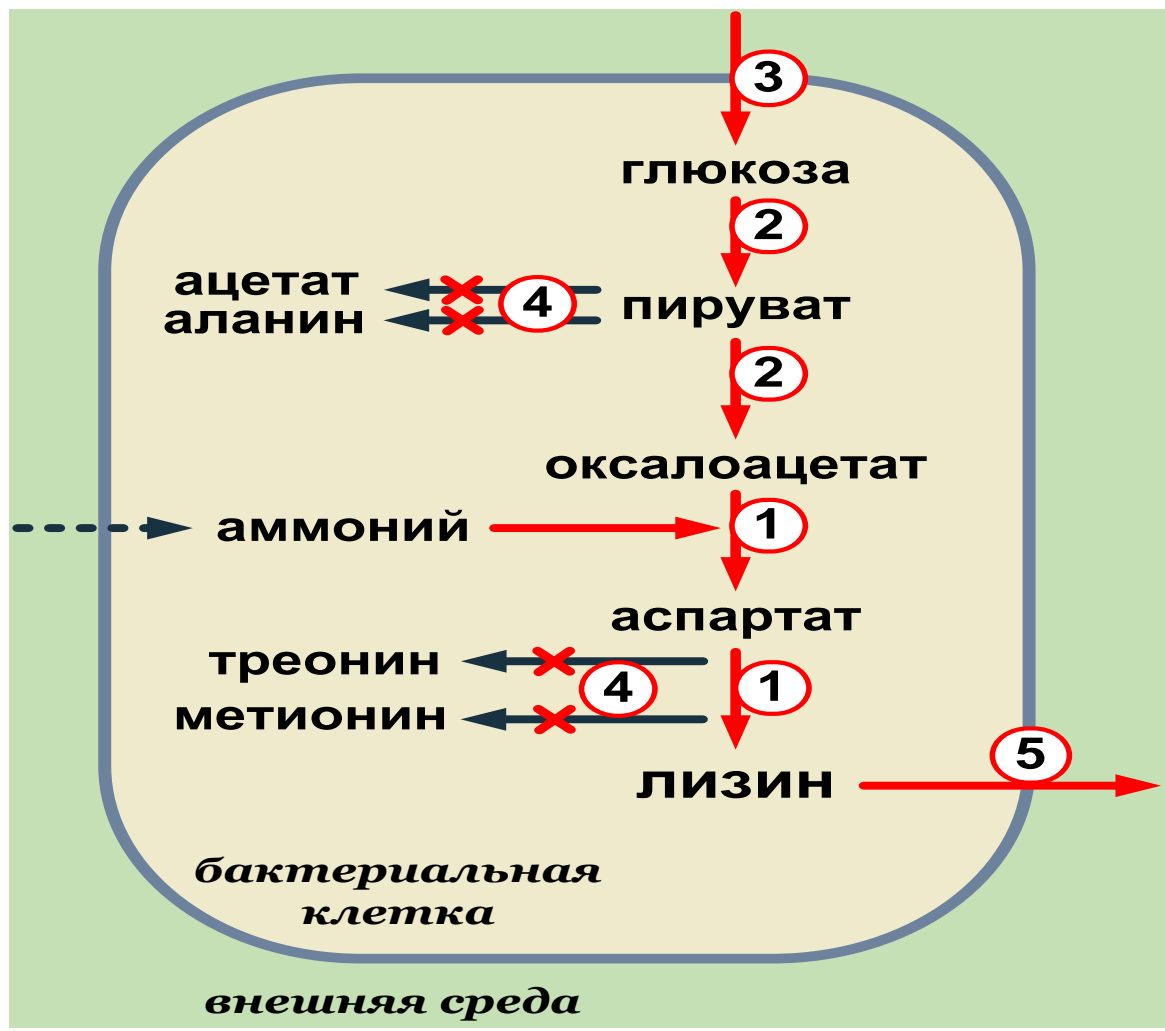
<https://doi.org/10.1038/s42003-023-05202-5>

АМИНОКИСЛОТЫ: МИРОВОЙ РЫНОК И ПРИМЕНЕНИЕ

К 2027 ожидается рост до 13.8 млн.т,
на 7,4 % в год



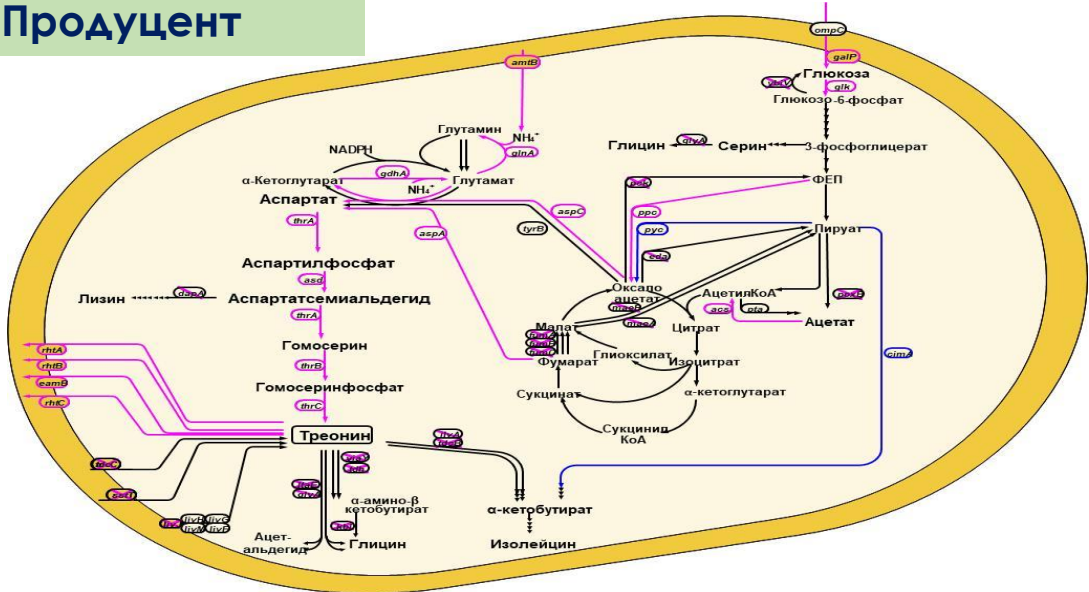
СХЕМА КОНСТРУИРОВАНИЯ ПРОДУЦЕНТОВ АМИНОКИСЛОТ



- ### ВАЖНЕЙШИЕ ЭТАПЫ
1. Усиление путей биосинтеза;
 2. Усиление синтеза предшественника;
 3. Усиление транспорта сахаров в клетку;
 4. Блокирование боковых метаболических путей;
 5. Усиление транспорта продукта из клетки

КОНСТРУИРОВАНИЕ ШТАММА E.COLI - ПРОДУЦЕНТА ТРЕОНИНА – НЕЗАМЕНИМОЙ АМИНОКИСЛОТЫ

Продуцент



1. Модификация генов гликолиза и центрального метаболизма:
 ↑ *galP, glk, ppc / puc,*
 ↓ *eda, maeA, maeB*
 × *ybiV, pck, fumA, fumB, fumC*

2. Оверэкспрессия генов транспорта аммония и аминирования:
 ↑ *aspC, aspA, gdhA, glnA, amtB*

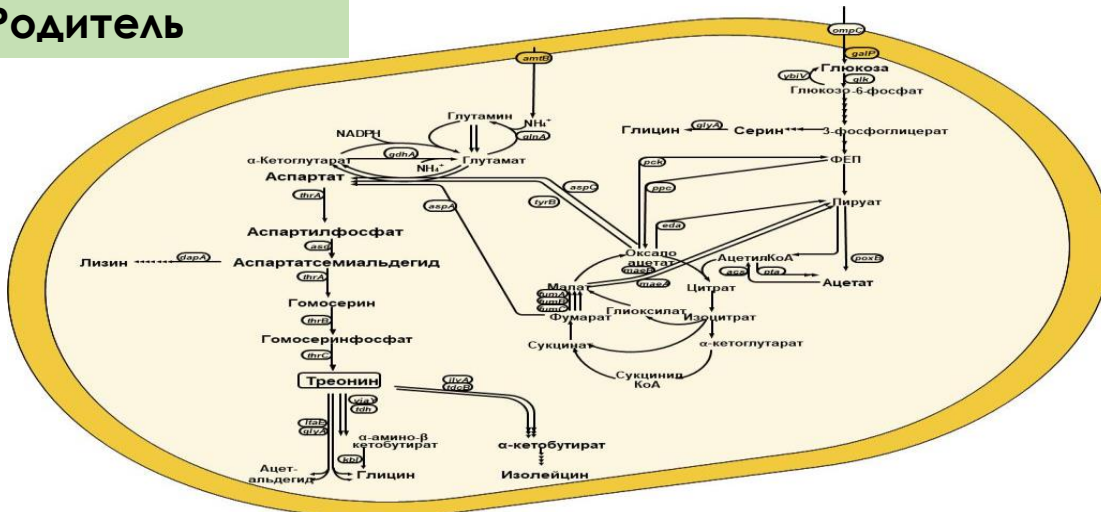
3. Оверэкспрессия генов биосинтеза треонина:
 ↑ *thrA^{mut}BC, asd*

4. Блокирование путей деградации треонина:
 × *ilvA, tdcB, yiaY, tdh, ltaE, kbl, poxB*
 ↓ *dapA, glyA*

5. Усиление транспорта треонина:
 ↑ *rhtA, rhtB, rhtC, eamB*

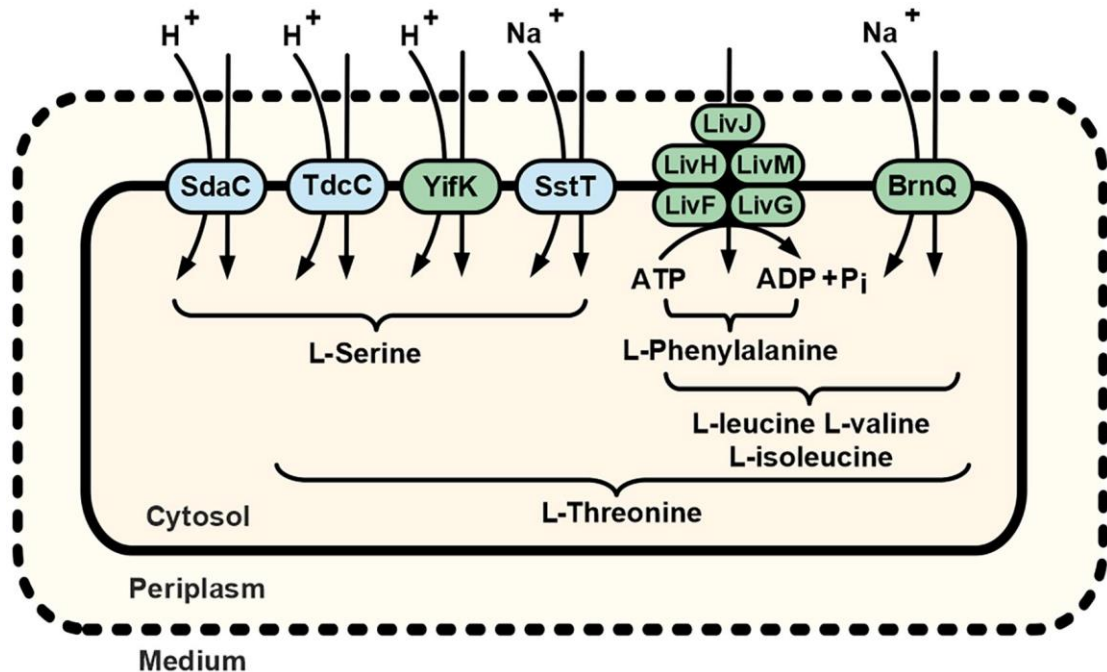
6. Блокирование транспорта треонина в клетку:
 × *tdcC, sstT, livJ, yifK*

Родитель

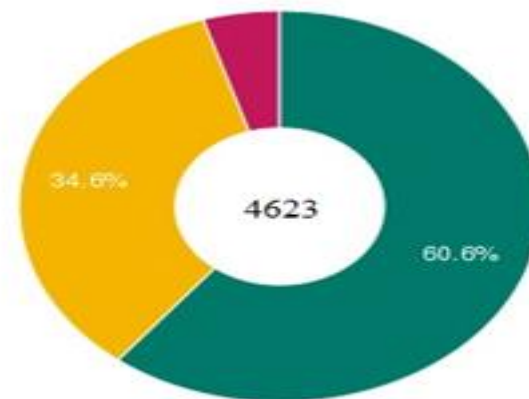


ПРОДУКТИВНОСТЬ ШТАММА: СВЫШЕ 110 г\л ТРЕОНИНА

ИДЕНТИФИЦИРОВАНЫ НОВЫЕ ГЕНЫ В E.COLI – ГЕНЫ ТРАНСПОРТЕРОВ АМИНОКИСЛОТ- НОВЫЕ МИШЕНИ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ПРОДУКТИВНОСТИ



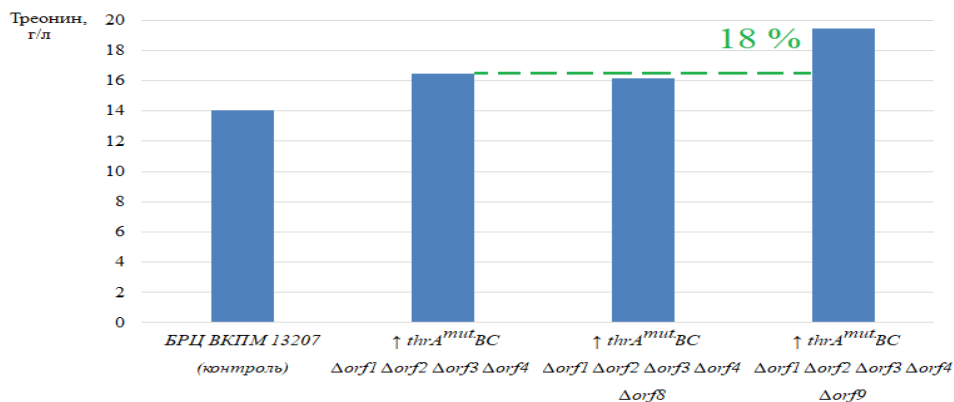
Гены E.coli



- Аннотированные гены
- Псевдогены
- Неизвестные гены

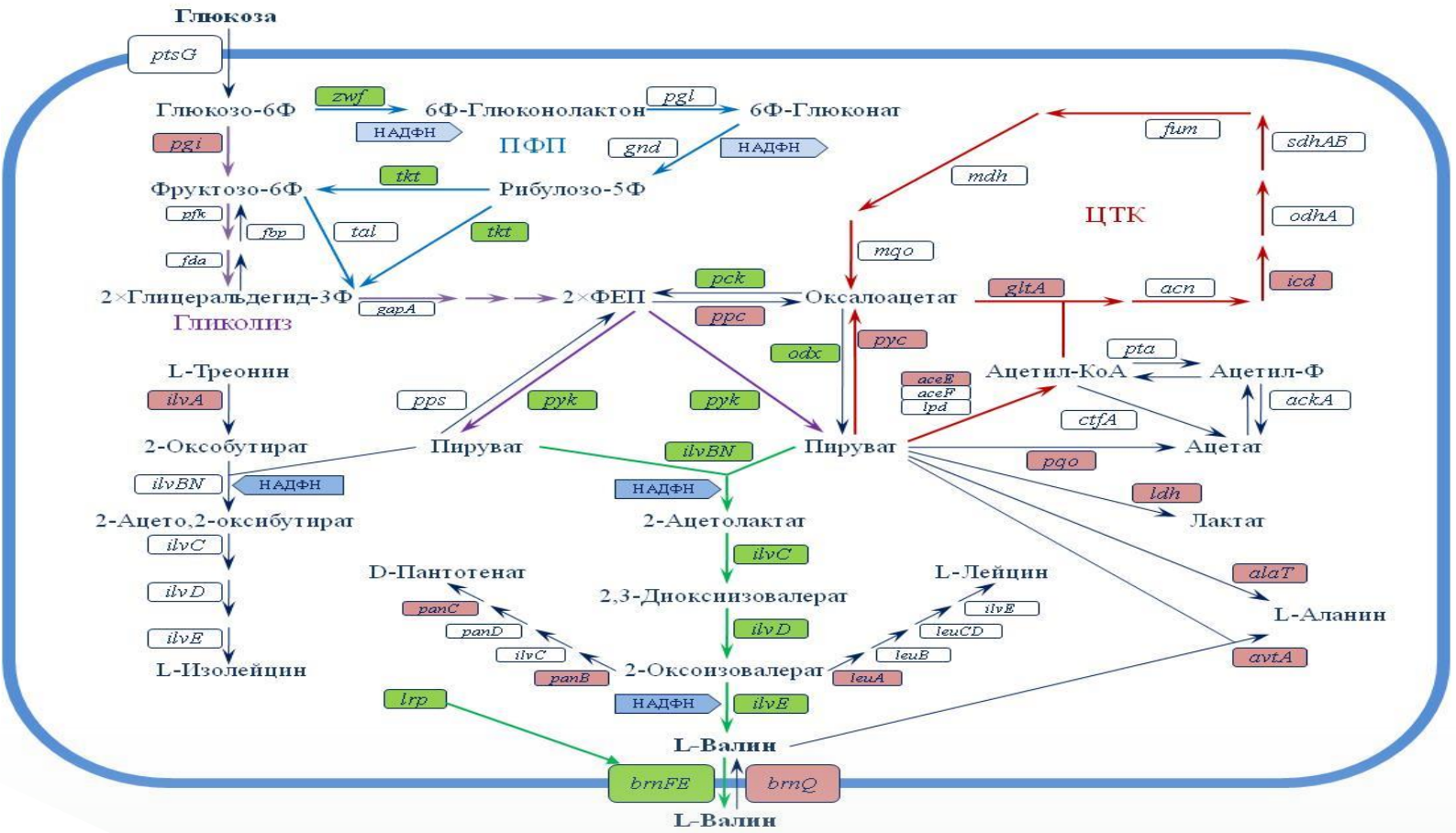
- Доказана функция гена *yifK* как переносчика L-треонина и L-серина
- LIV-I и *BrnQ* способны транспортировать L-треонина в клетку

Влияние делеции транспортеров на продукцию треонина



Khozov, A., et al. "A study on L-threonine and L-serine uptake in Escherichia coli K-12." *Frontiers in Microbiology* 14 (2023).

КОНСТРУИРОВАНИЕ ШТАММА *S. glutamicum* – ПРОДУЦЕНТА ВАЛИНА – НЕЗАМЕНИМОЙ АМИНОКИСЛОТЫ



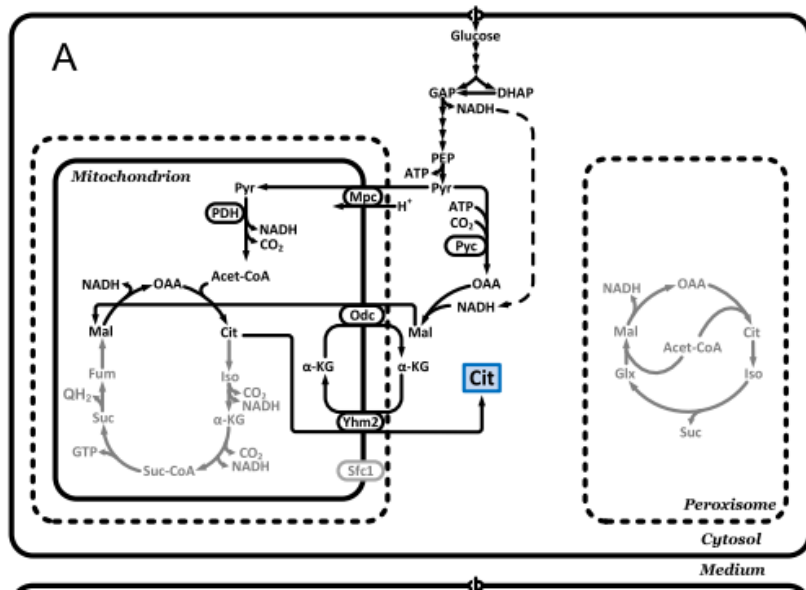
1. Усиление экспрессии генов биосинтеза валина:
 ↑ *ilvBNC, ilvD, ilvE*
2. Усиление синтеза предшественника – пирувата:
 ↓ *prc, pyr, aceE,*
3. Усиление синтеза НАДФН:
 ↑ *zwf, tkt*
4. Блокирование боковых метаболических путей:
 ↓ *avtA, ldh, panBC, ilvA*
5. Усиление транспорта продукта из клетки: *brnFE* ↑

Технологии редактирования позволили создать новое поколение штаммов, способных продуцировать свыше 100 г/л валина за 50 час и соответствуют высоким стандартам безопасности

Дрожжи *Yarrowia lipolytica* - НОВАЯ ПЛАТФОРМА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ КЛЕТОЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ

ПРЕИМУЩЕСТВА

- Простые пищевые потребности
- Отличаются быстрым ростом
- Разработаны методы управляемого культивирования
- Набор инструментов для метаболической инженерии (**YaliCraft**)



РАЗРАБАТЫВАЕМЫЕ ШТАММЫ

- **Продуценты органических кислот**
Лимонная кислота
Изолимонная кислота
Янтарная кислота
- **Продуценты каротиноидов**
Бета-каротин
Астаксантин
- **Продуценты терпенов**
Линалоол

КАРОТИНОИДЫ: ПРИРОДНЫЕ ПИГМЕНТЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ



Каротиноиды – природные органические пигменты, окрашены в желтый, оранжевый или красный цвет

Каротиноиды – мощные антиоксиданты, защищающие от свободных радикалов

Каротиноиды - метаболические предшественники витамина А

ОСНОВНЫЕ ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ

КАРОТИНОИДЫ В ЖИВОТНОВОДСТВЕ

- Для улучшения потребительской ценности продуктов, привлекательный внешний вид
- Как антиоксиданты, повышающие репродуктивные функции
- В качестве провитамина А

КАРОТИНОИДЫ В МЕДИЦИНЕ

- Для профилактики и лечения раковых заболеваний
- Как антиоксиданты при заболеваниях сердца и артерий, повышающие «полезного холестерина» ЛПВП
- Для профилактики катаракты

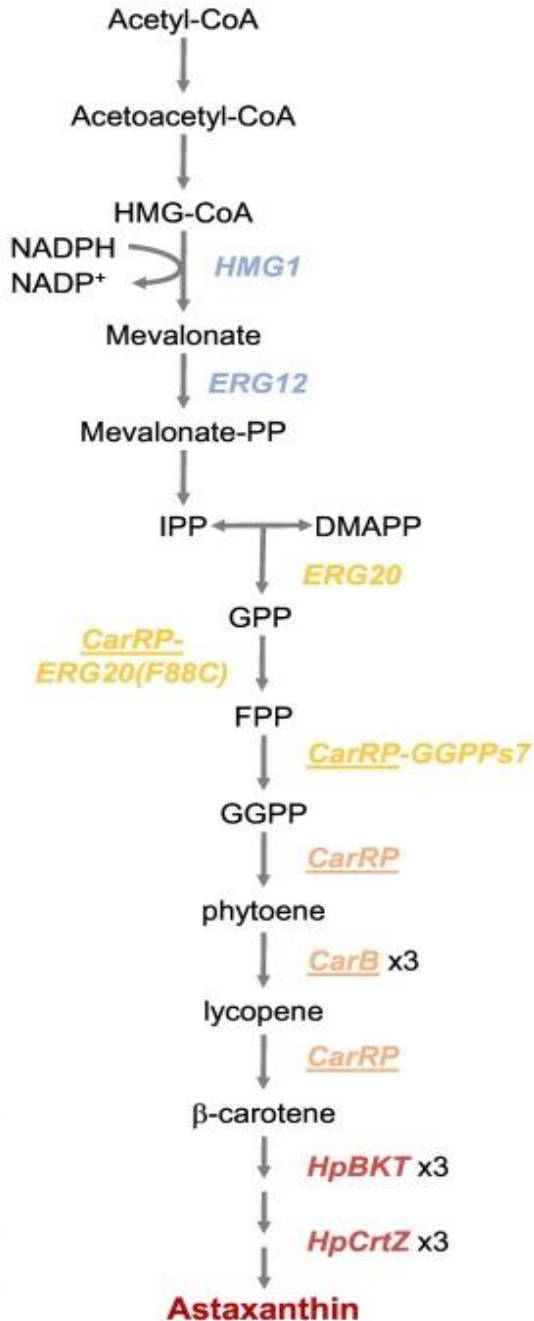
КОНСТРУИРОВАНИЕ ШТАММОВ *Yarrowia lipolytica* – ПРОДУЦЕНТОВ КАРОТИНОИДОВ

Mevalonate synthesis

Terpene synthesis

β -carotene synthesis

Astaxanthin synthesis



1) Для повышения доступности предшественников терпеноидов:
+ копия генов *HMG1*, *ERG12*, *ERG20*

2) Для повышения синтеза β -каротина:
+ химерный ген *CarRP-GGPPs7* (из *M. Circinelloides* и из *Synechococcus* sp.)
+ *CarRP-ERG20^{F88C}*
+ a mutated version of *Y. lipolytica*,
+ 2 копии *CarB* из *M. circinelloides*

3) Для усиления продукции астаксантина:
+ 3 копии из генов *HpBKT* и *HpCrtZ* из *H. pluvialis*

Формирование пути биосинтеза путем передачи генов из водорослей *Haematococcus pluvialis* (гематококк дождевой), гриба *Mucor circinelloides* и цианобактерий *Synechococcus* с помощью Cas9



AX11
До 1 г/л
АСТАКСАНТИН



Y930
До 5 г/л
 β -КАРОТИН

ПРОДУКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ, РАЗРАБАТЫВАЕМЫЕ В НИЦ «КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ»



ДЛЯ СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА

- Незаменимые аминокислоты
- Витамины
- Каротиноиды
- Ферментные препараты
- Биопрепараты для повышения урожайности и защиты растений
- Винные дрожжи



> 80 ТЫС. ТОНН ЛИЗИНА В ГОД
> 60% ПОТРЕБНОСТЕЙ РФ



ДЛЯ ХИМИЧЕСКОЙ ИНДУСТРИИ

- Органические кислоты для биodeградируемых полимеров
- Акриловые мономеры для очистки воды и нефтедобычи



ДЛЯ ФАРМИНДУСТРИИ

- Биоматериалы на основе паутины
- Вакцины на основе наночастиц
- Полусинтетические антибиотики
- Рекомбинантные белки

Природоподобные технологии НИЦ «Курчатовский институт» обладают значительным потенциалом для коммерциализации

ПРИОРИТЕТНЫЕ ЗАДАЧИ ДЛЯ РАЗВИТИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ



1) Повышение доступности генетических ресурсов для конструирования и использования в биотехнологиях

- создание НацБРЦ и развитие нормативной базы



2) Совершенствование методов направленной реконструкции геномов и создания штаммов с заданными свойствами

- развитие инженерии *in vivo*

- развитие методов лабораторной эволюции

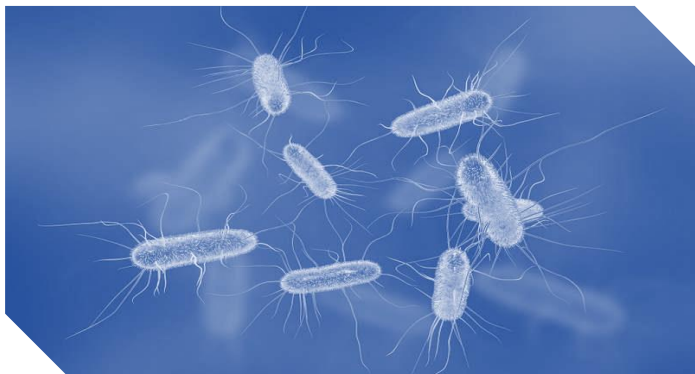


3) Ревизия метаболических путей. Новая биохимия.

(альтернативные пути метаболизма. Формирование новых путей в ходе лабораторной эволюции)



4) Развитие методов синтетической биологии



СИНТЕТИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ. СИНТЕЗ ЦЕЛЫХ ГЕНОМОВ

From genome reading and editing to genome writing

ВАЖНЕЙШИЕ ЭТАПЫ РАЗВИТИЯ

2002-2008 Вирусы гриппа, SARS

2010 *Mycoplasma genitalium*, свыше 500 т.п.о

2019 *Escherichia coli*, около 4 млн.п.о.

2023 *Saccharomyces cerevisiae*, Syn 7.5, 12 млн.

- содержит 7,5 хромосом из 16

- делетированы все мобильные элементы, интроны,

- перемещены все тРНК гены

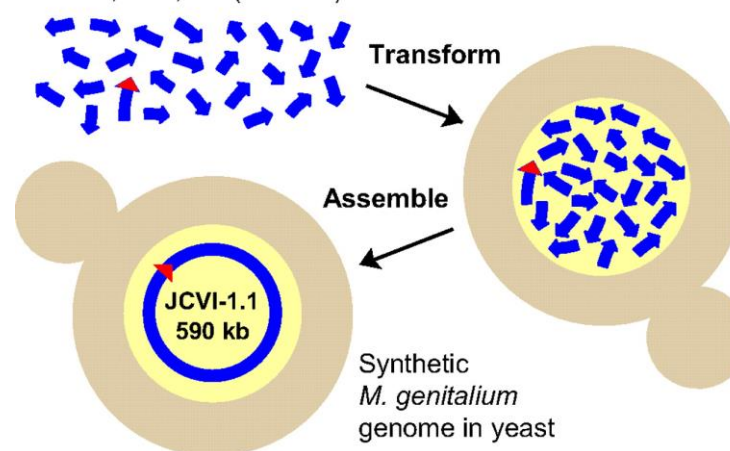
- введены lox –сайты для Cre рекомбиназы для геномного шафлинга

Снижена жизнеспособность

ЦЕЛИ

- Идентификация минимального генома для развития клетки
- Рекодирование аминокислот. Синтез белков с новыми свойствами
- Создание продуцентов с требуемыми свойствами
- Генетическая изоляция

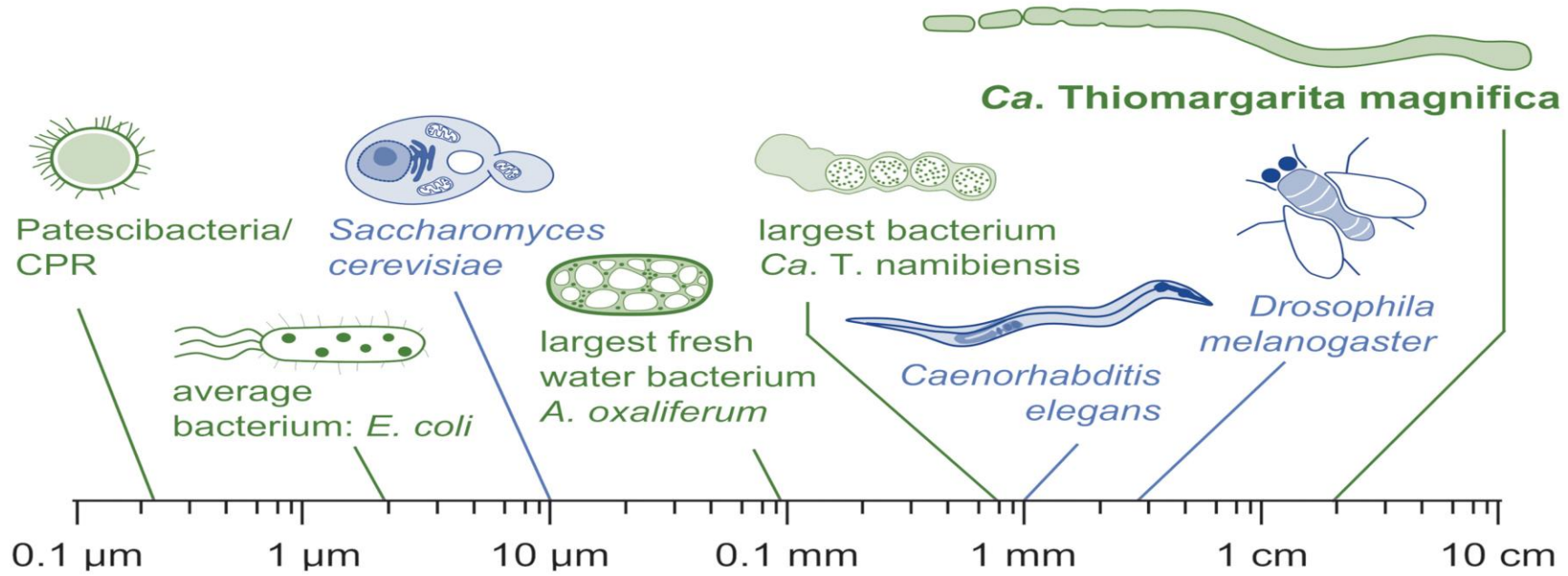
25 overlapping DNA fragments
A1-4, A5-8, etc. (17-35 kb)



Thiomargarita magnifica - самая крупная бактерия до 2 сантиметров в длину



Относится к группе анаэробных сероокисляющих Грам-отрицательных бактерий



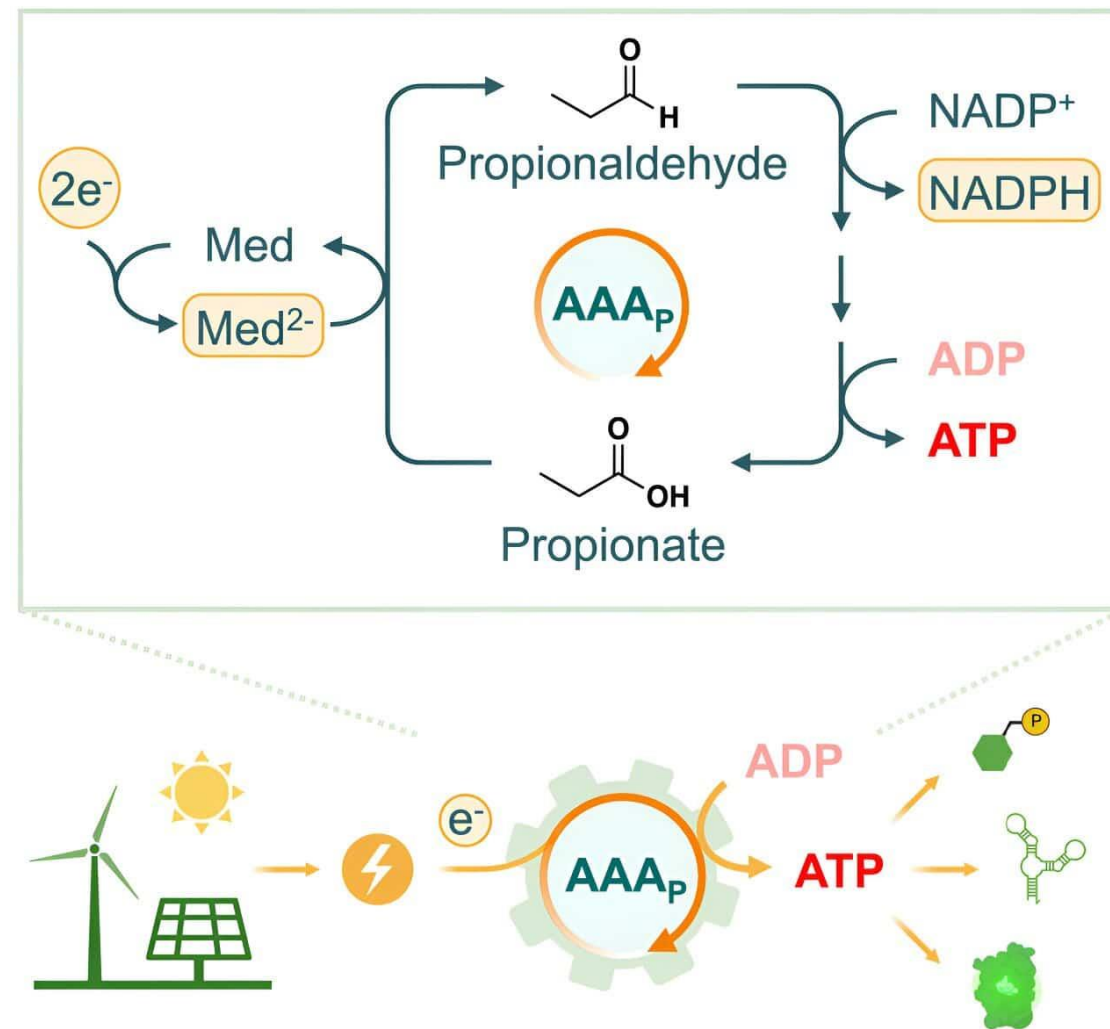
Thiomargarita magnifica нарушает каноны устройства бактериальной клетки

- Огромный геном в 11 миллионов п.н.
- Каждая клетка содержит миллионы копий геномной ДНК
- ДНК и рибосомы содержатся в структурах, окруженных мембраной, в которых происходит транскрипция и трансляция

A centimeter-long bacterium with DNA contained in metabolically active, membrane-bound organelles
SCIENCE, 2022, Vol 376, Issue 6600, pp. 1453-1458
[DOI: 10.1126/science.abb363](https://doi.org/10.1126/science.abb363)

СИНТЕТИЧЕСКИЙ ФЕРМЕНТНЫЙ КАСКАД ДЛЯ ПРЕОБРАЗОВАНИЯ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ ЭНЕРГИИ В АТФ

- Электробиологический модуль — кислотно-альдегидный цикл АТФ (цикл ААА) для прямого преобразования электрической энергии в АТФ.
- Цикл ААА содержит минимальный набор ферментов и не требует мембранного разделения зарядов.
- цикл ААА совместим со сложными бесклеточными системами, такими как *in vitro* транскрипция/трансляция, обеспечивающая обработку биологической информации непосредственно за счет электричества.
- Эта новая связь между техническим и биологическим мирами открывает новые возможности для будущих приложений в синтетической биологии, электробиотехнологии и биоэлектрокатализе.





НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ



КУРЧАТОВСКИЙ
ГЕНОМНЫЙ ЦЕНТР

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ



ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ МИКРОБЫ – УНИВЕРСАЛЬНЫЕ БИОФАБРИКИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОДУКТОВ, ВОСТРЕБОВАННЫХ РЕАЛЬНЫМ СЕКТОРОМ

МИКРООРГАНИЗМЫ ДЛЯ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ НЕЗАВИСИМОСТИ И ОБЕСПЕЧЕНИЯ БИОБЕЗОПАСНОСТИ



Формирование нового технологического уклада

- Природоподобные технологии
- Переход на возобновляемые источники
- Снижение углеродного следа



Обеспечение продовольственной безопасности

- Микробные технологии для пищи
- Повышение плодородия почв
- Формирование кормовой базы для животноводства



Обеспечение биобезопасности

- Производители лекарственных средств и вакцин
- Пробиотические препараты
- Контроль безопасности пищи и окружающей среды

БИОЭКОНОМИКА МОЖЕТ ОБЕСПЕЧИТЬ ДОСТИЖЕНИЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ НЕЗАВИСИМОСТИ И ПРОДОВОЛЬСТВЕННОЙ БЕЗОПАСНОСТИ