Биология растений сегодня

С.С. Медведев
заведующий кафедрой,
проф., д.б.н.

Сентябрь 2021

- Пост-геномный период развития биологии
- Системная биология
- Транскриптомика
- Протеомика
- Метаболомика
- Феномика
- Эпигенетика
- Визуализация биологических процессов
- Конвергенция и интеграция в системе биологических наук
- Питание человека 21 века
- Биофортификация
- Направленная эволюция

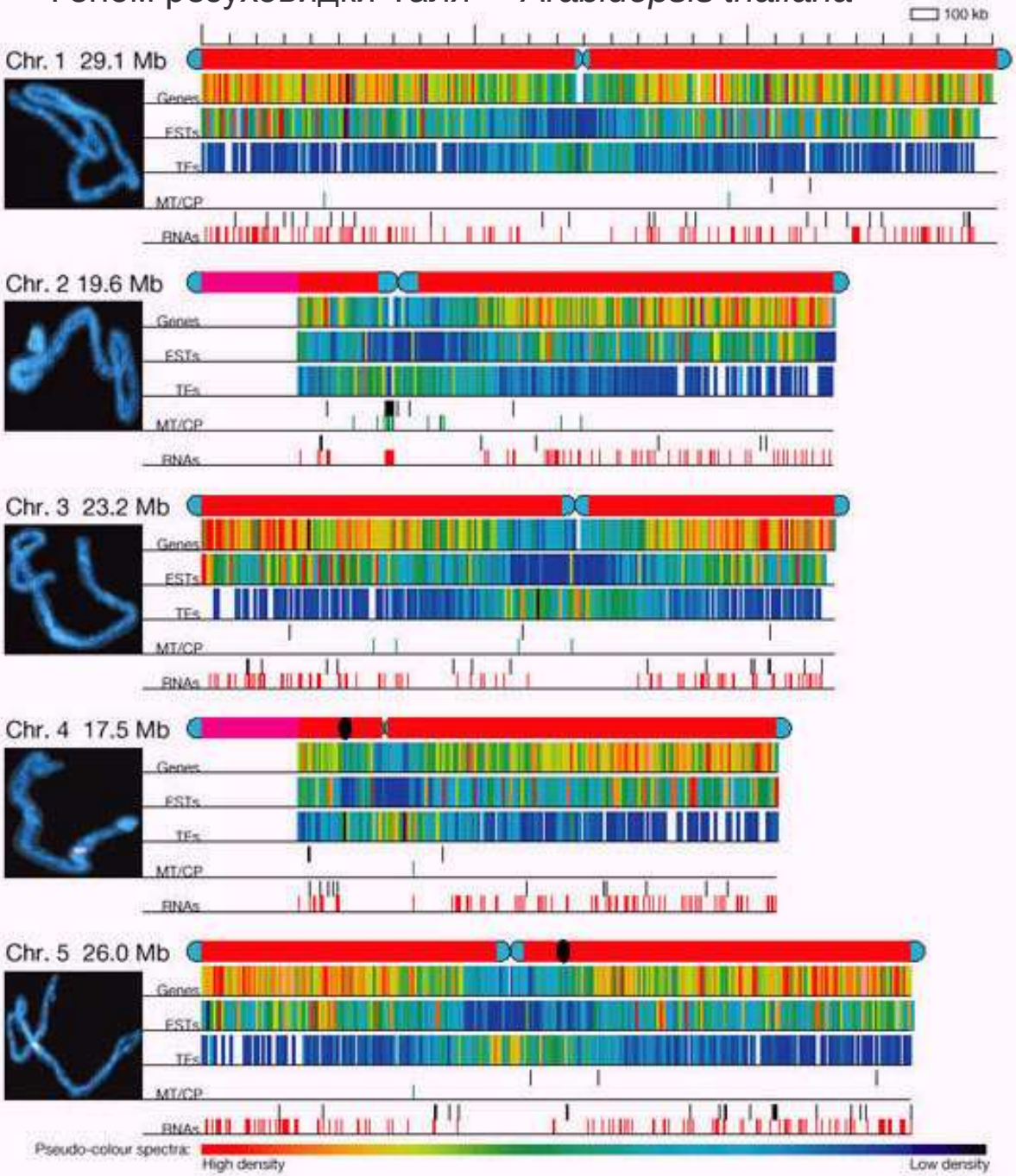
Арабидопсис – резуховидка Таля
Arabidópsis thaliána (L.)

Имеет относительно короткий цикл развития – может пройти полный цикл развития очень быстро (1-2 месяца) и дает много семян.
Геном арабидопсиса является одним из наименьших геномов цветковых растений и первым секвенированным геномом растения.
Арабидопсис легко выращивать в лаборатории, в том числе, в стерильных условиях.
Биохимические и сигнальные пути, открытые у арабидопсиса, как правило, оказываются такими же у других высших растений.

Основной модельный организм
современных молекулярно-биологических, генетических и физиологических исследований.

Наиболее полная информация об арабидопсисе сведена в огромную базу данных —
The **A**rabidopsis **I**nformation **R**esource (TAIR).

Геном резуховидки Таля – *Arabidopsis thaliana*

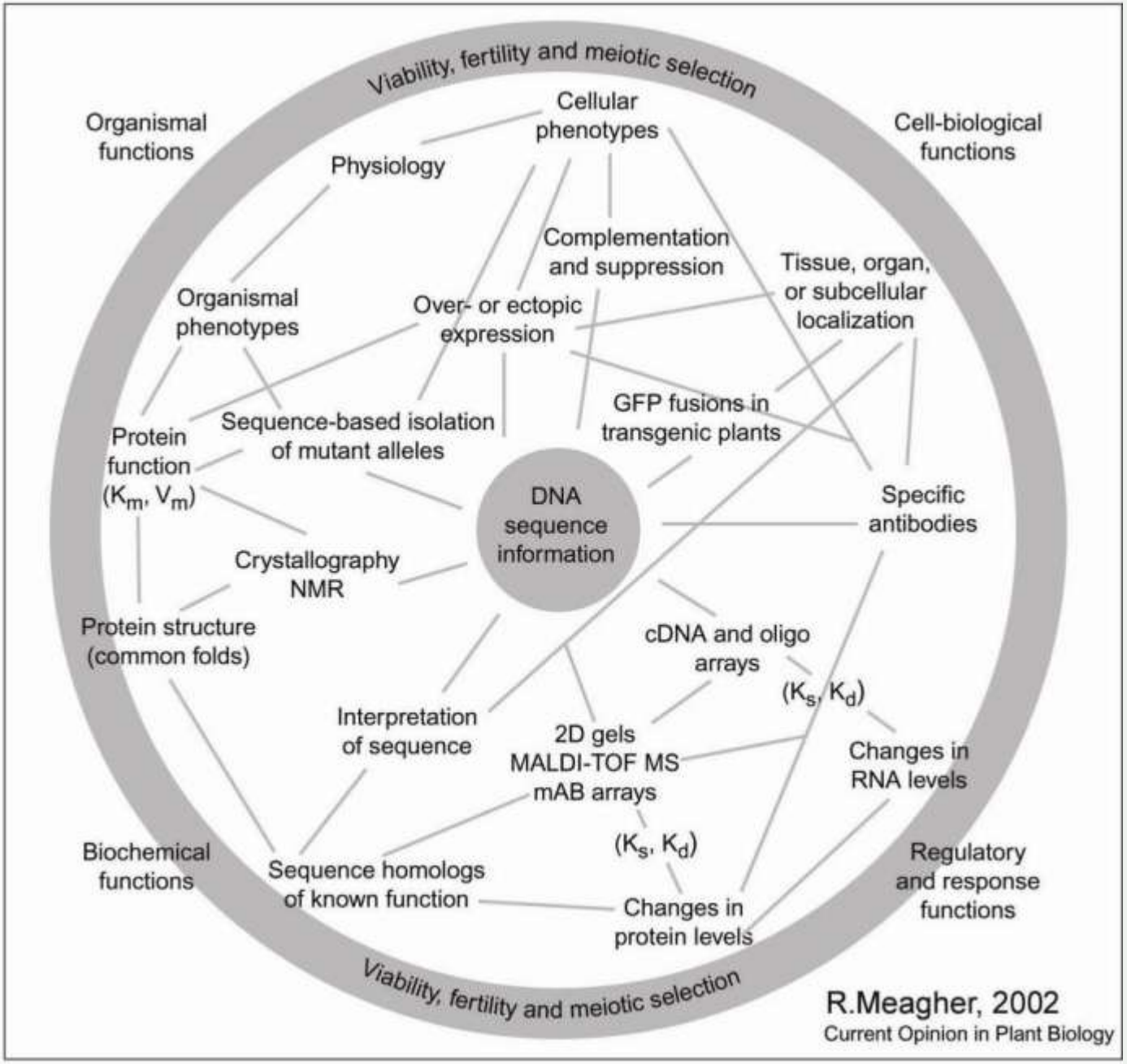


Секвенирования генома арабидопсиса

14 декабря 2000 г.

Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. Nature 408, 796–815 (2000). https://doi.org/10.1038/35048692.

Post-genomics world of science



Центром исследований является информация о сиквенсе генома (*центральный круг*).

Эта информация дает основу для анализа процессов *на разных уровнях:*
-Биохимическом;
-Генетическом;
-Регуляторном;
- Клеточном;
- Организменном;
- Эволюционном.

Методы, применяемые для этих целей показаны между кругами.

Одна из доступных баз данных по генам и геномам –

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG; http://www.genome.ad.jg/kegg)

В пост-геномный период начинают доминировать исследования, которые начинаются с сиквенирования генома и белков, а завершаются выявлением функций отдельных генов и белков, также их эволюционного происхождения.

L.W. Sumner et al. / Phytochemistry 62 (2003) 817–836

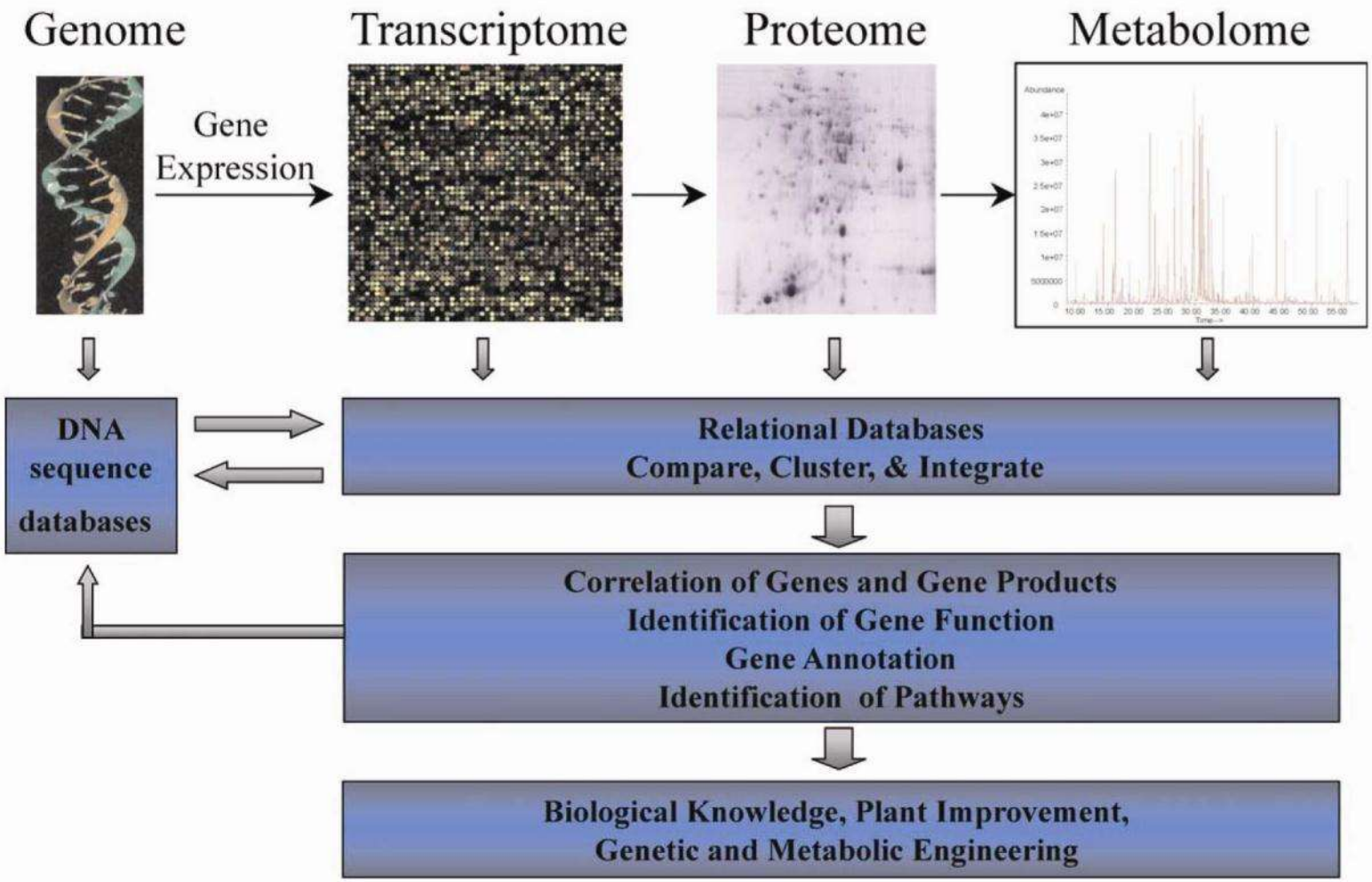


Fig. 1. Integrated functional genomics. The effects of gene perturbations are evaluated at multiple levels including the transcriptome, proteome, and metabolome. Changes in the metabolome occur as a consequence of those changes in the transcriptome that result in changes in the levels or catalytic activities of enzymes. Therefore, metabolome analysis is a valuable tool for inferring gene function.

Post-genomics world of science

Возникает новая наука – **геномика**, которая включает:

- **Структурную геномику** - изучает содержание и организация геномной информации.
- **Функциональную геномику** — анализирует реализацию информации, записанной в геноме, от гена — к признаку. Изучает принципы функционирования отдельных генов и их комплексов.
- **Сравнительную (эволюционную) геномику** — сравнительные исследования геномов разных организмов.

Появляются новые понятия и новые биологические науки: **транскриптом(ика), протеом(ика), метаболом(ика) и биоинформатика.**

Омиксной дисциплиной, возникшей на стыке биологии, физики, инженерии и компьютерных технологий является также **феномика**.

Функциональная геномика и феномика интегрируют данных транскриптомики, протеомики и метаболомики для получения целостного представления о функционировании живых организмов.

Системная биология

Системная биология — это основанное на биологии междисциплинарное научное направление, которое фокусируется на изучении сложных взаимодействиях внутри биологических систем.

Системная биология — это компьютерное и математическое моделирование сложных биологических систем на всех уровнях организации живой природы.

Системная биология использует *целостный* (holistic) *подход* для анализа биологических процессов вместо более традиционного *редукционизма*. *Холи́зм* (от др.-греч. целый, цельный) — изучает проблему соотношения части и целого, исходящая из качественного своеобразия и приоритета целого по отношению к его частям.

Об этом в своей «Метафизике» писал еще Аристотель: «*целое больше, чем сумма его частей*».

Т.о. методологическая основа системной биологии заключается в том, что любой биологический объект рассматривается как *система*, т.е. *целостный комплекс* взаимосвязанных и взаимодействующих *элементов*.

“То, что описывают в морфологии как органические формы и структуры, является в действительности моментальными срезами через пространственно-временной феномен; то, что называют структурой, является медленным процессом большой продолжительности, то, что называют функцией, есть быстрый процесс короткой продолжительности”

Пионером системной биологии является Людвиг Фон Берталанфи - создатель общей теорией систем и автор книги «**Общая теория систем в физике и биологии**», опубликованной в 1950 году.

Впервые **термин «*системная биология»*** был использован в 1993 г Вальтером Циглинсбергом и Томасом Тилле (Walter Zieglginsberger and Thomas R. Tiille «The pharmacology of pain signaling». Curr Opin Neurobiol. 1993 Aug;3(4):611-618. Max Planck Institute of Psychiatry, Munich, Germany.

Системная биология, используя компьтерные и «омиковые» технологии, изучает **ВСЁ** о взаимосвязях (networks) на **ВСЕХ** уровнях организации живой материи.

Основное внимание в системной биологии уделяется так называемым ***эмерджентным свойствам*** биологических объектов (систем), то есть свойствам, которые невозможно объяснить с точки зрения свойств только их компонентов (элементов). Цвет-свет, нейроны-сознание.

Эмерджéнтность (от англ. Emergent, — возникающий, неожиданно появляющийся) — это наличие у какой-либо системы особых свойств, не присущих её элементам или несводимость свойств системы к сумме свойств её компонентов;

Синоним «эмерджентности» (emergence) — «системный эффект».

Древняя индийская притча

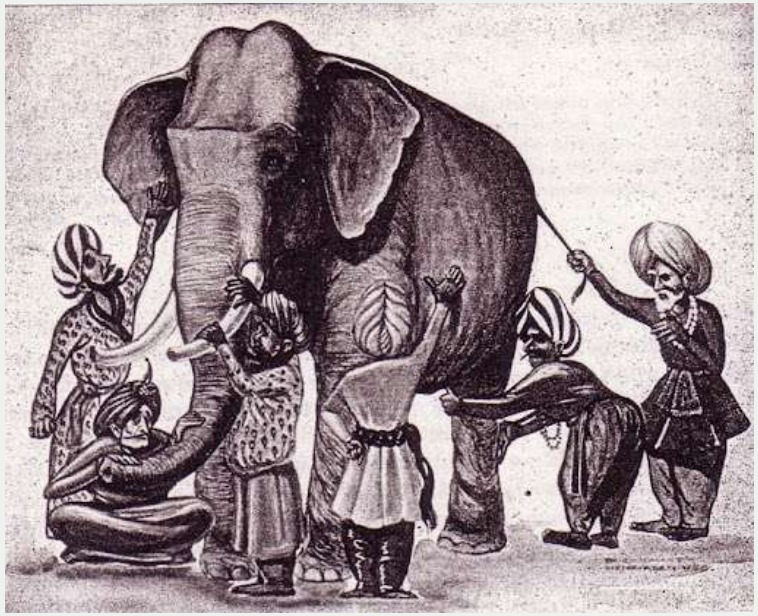
о шестерых слепых, которые приходят во дворец раджи и там впервые в жизни встречаются со слоном.

Каждый из них ощупывает животное руками и рассказывает о своих впечатлениях:

«Первый слепой протянул руку и коснулся бока слона: «Слон похож на стену».
Второй протянул руку и коснулся хобота слона: «Слон похож на змею».
Третий протянул руку и коснулся бивня слона: «Слон похож на копье».
Четвертый слепой протянул руку и коснулся ноги слона: «Слон похож на дерево».
Пятый протянул руку и коснулся уха слона: «Слон похож на опахало».
Шестой слепой протянул руку и коснулся хвоста слона: «Слон похож на веревку».

Завязался спор, поскольку каждый слепой считал свое описание слона правильным. Раджа, разбуженный шумом, вышел на балкон. «Слон — это большое животное», — сказал он. — «Каждый из вас прикоснулся лишь к одной его части. Вам придется сложить все части вместе, чтобы узнать, на что похож слон».

Т.о. чтобы найти истину целиком, мы должны сложить все части вместе.



Aristotle: «*The whole is more than the sum of its parts*».

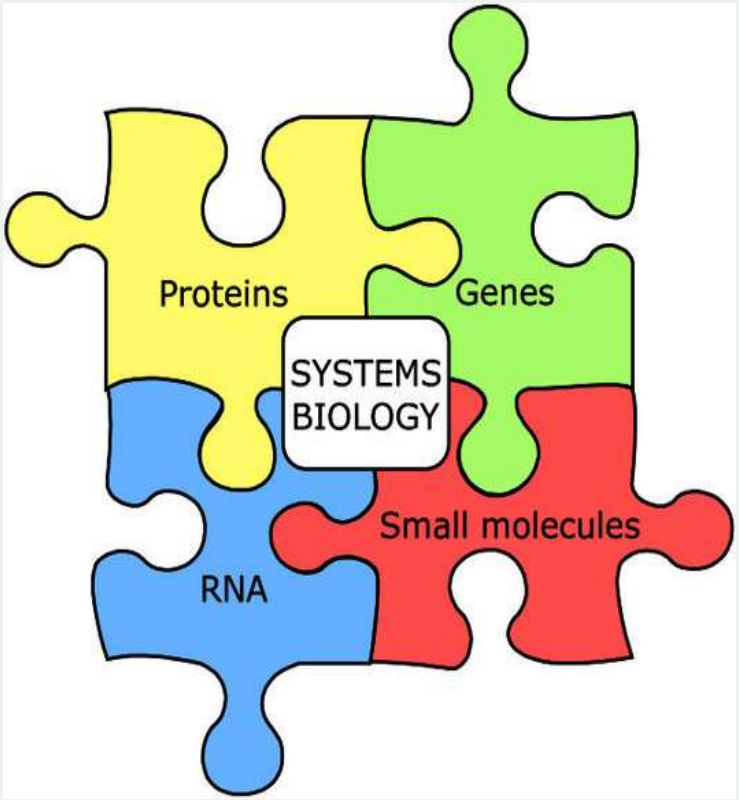
Все части целого взаимо-влияют и взаимо-обусловливают друг друга

Эмерджентные свойства и поведение системы невозможно предсказать, если ограничиваться только простым рассмотрением отдельных элементов, составляющих эту систему.
Именно системный подход позволяет более правильно понять структуру и отдельных клеток и организма в целом, чем при рассмотрении по-отдельности их частей.

Главными задачами системной биологии заключается в выявлении эмерджентных свойств клеток, тканей и организмов путем моделирования (математического и компьтерного) и построения генетических, метаболических и сигнальных сетей.

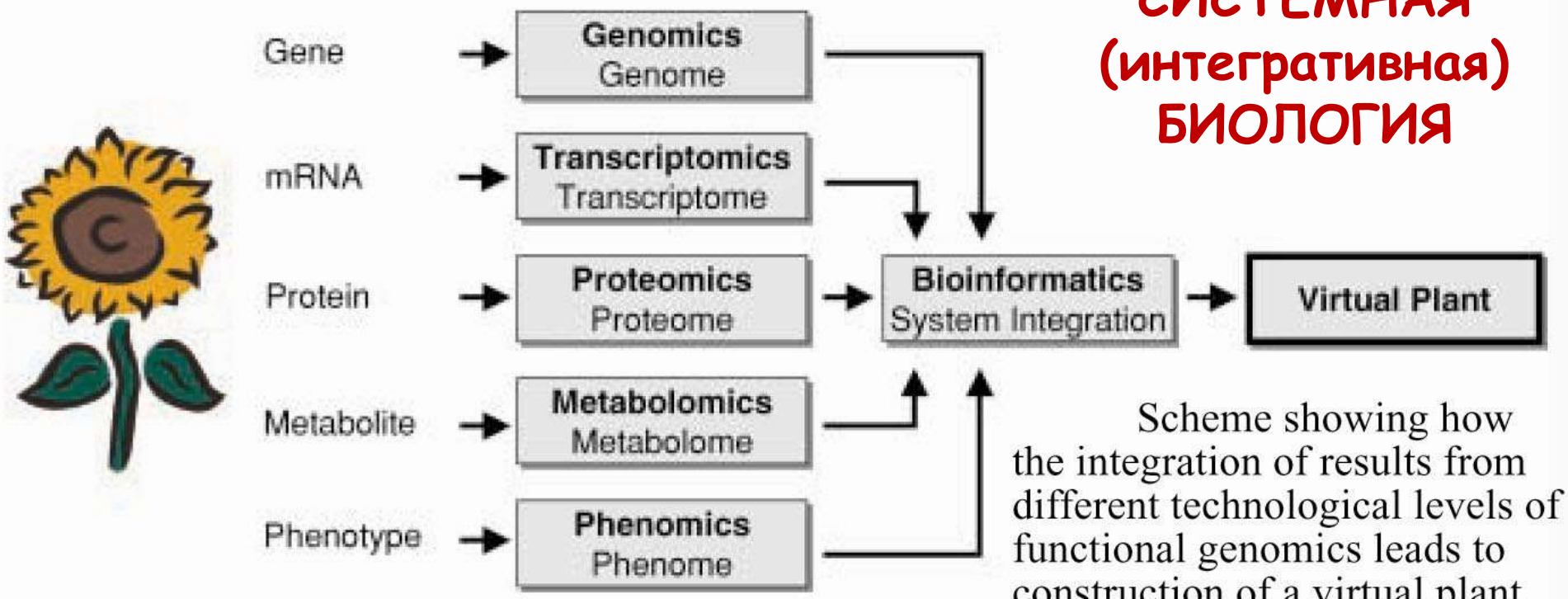
Для построения таких сетей наиболее важную роль играют компьтерные и так называемые «***омиксные» технологии*** (omics techniques) - *транскриптомика, протеомика и метаболомика.*

Использование омиксных технологий резко ускорило получение новой информации о функциях организмов.



Richens et al. (2009) "Systems biology - a novel approach for diagnosis of chronic obstructive pulmonary disease" Respiratory Research. 10:29.

СИСТЕМНАЯ (интегративная) БИОЛОГИЯ



Scheme showing how the integration of results from different technological levels of functional genomics leads to construction of a virtual plant

Holtorf et al., 2002

После получения информации об *отдельных молекулах*, необходимо будет составить *целостную структурную и функциональную картину* клеточных процессов.

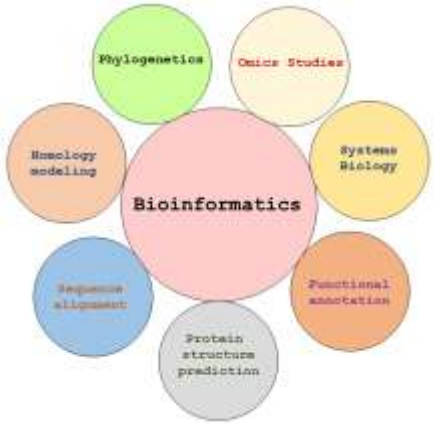
При этом обязательно возникнет проблема понимания:

- Принципов управления физиологией клетки и
- Механизмов ее ответных реакций на внешние и внутренние раздражители.

Окончательная задача будет заключаться в реконструкции клетки и создании виртуального растения.

Из за сложности объекта изучения, большого количества параметров, переменных и уравнений, описывающих биологическую систему, современная системная биология немыслима без использования ***компьютерных технологий и биоинформатики***.

Именно **биоинформатика** способствует системному пониманию биологических процессов на основе математических методов компьютерного анализа.
В биоинформатике используются методы прикладной математики, статистики и информатики.

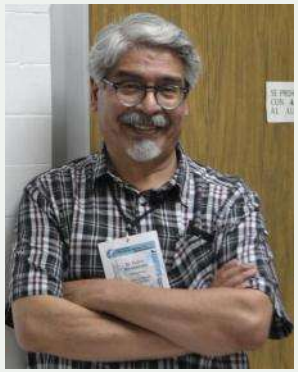


Diniz, Canduri, 2017, Genetics and Molecular Research 16 (1)

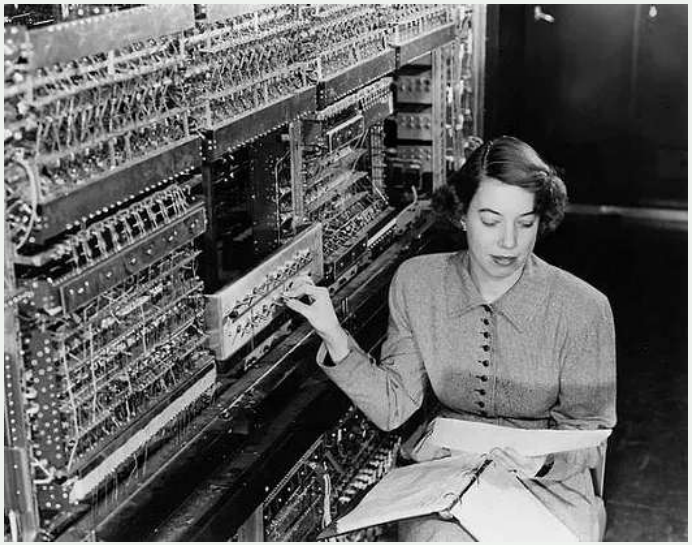
Не так давно биохимики тратили всю жизнь, чтобы определить структуру одного белка и выявить его функцию. С помощью методов биоинформатики можно предсказать функции тысячи белков.
Многие задачи, которые до недавнего времени решались биохимией и молекулярной биологией в реальных экспериментах, сейчас могут быть решены с той или иной степенью точности в **виртуальных компьютерных экспериментах**.

Биоинформатика это способ заниматься биологией, не наблюдая живые организмы в естественных условиях, как зоологи и ботаники, не делая опытов как экспериментальные биологи, а анализируя массивы данных с помощью компьютерных технологий, т.е. работая **in silico**.

Выражение «***in silico***» впервые было использовано мексиканским математиком и биоинформатиком Мирамонтесом (Pedro Miramontes) для обозначения биологических экспериментов, полностью осуществленных на компьютере.

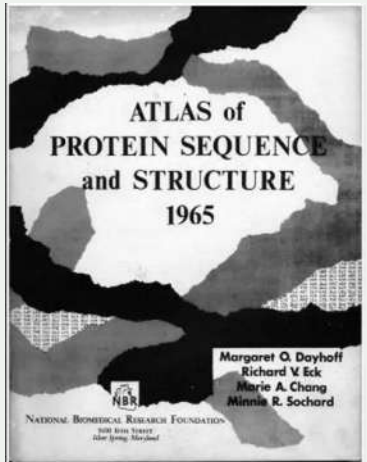


Pedro Miramontes,
National Autonomous
University of Mexico



Основоположник биоинформатики **Margaret Dayhoff**
с ранней версией компьютера.

Она впервые применила математические и вычислительные методы к секвенированию белков и нуклеиновых кислот, создав **первую общедоступную базу данных** для исследований в этой области.
В 1962 г. Маргарет Дейхофф в сотрудничестве с Робертом Ледли стала соавтором статьи под названием "***COMPROTEIN: A computer program to aid primary protein structure determination.***" программ для IBM 7090», помогающая определять по петидным гидролизатам первичную структуру белка».".



Дэвид Дж. Липман (создатель BLAST, бывший директор Национального центра биотехнологической информации, NCBI) даже назвал её -
«**Мать и Отец биоинформатики**»

https://annajguzman20.wixsite.com/computationalgenomic/pioneeers

Транскриптомика

Транскриптом –

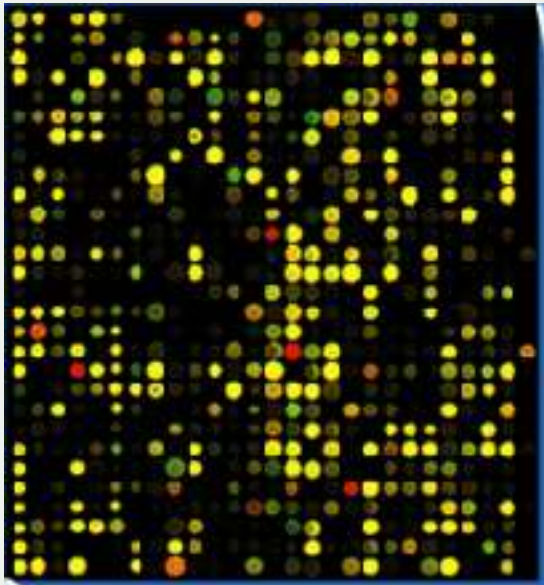
это совокупность всех мРНК (транскриптов), которые определяют функциональную специфичность клетки.

Транскриптом отражает профиль экспрессии генов конкретной клетки (или группы клеток) в данный момент времени.

В отличие от генома, который, как правило, одинаков для всех клеток одной линии, транскриптом может сильно меняться в клетках разного типа или в зависимости от условий окружающей среды.

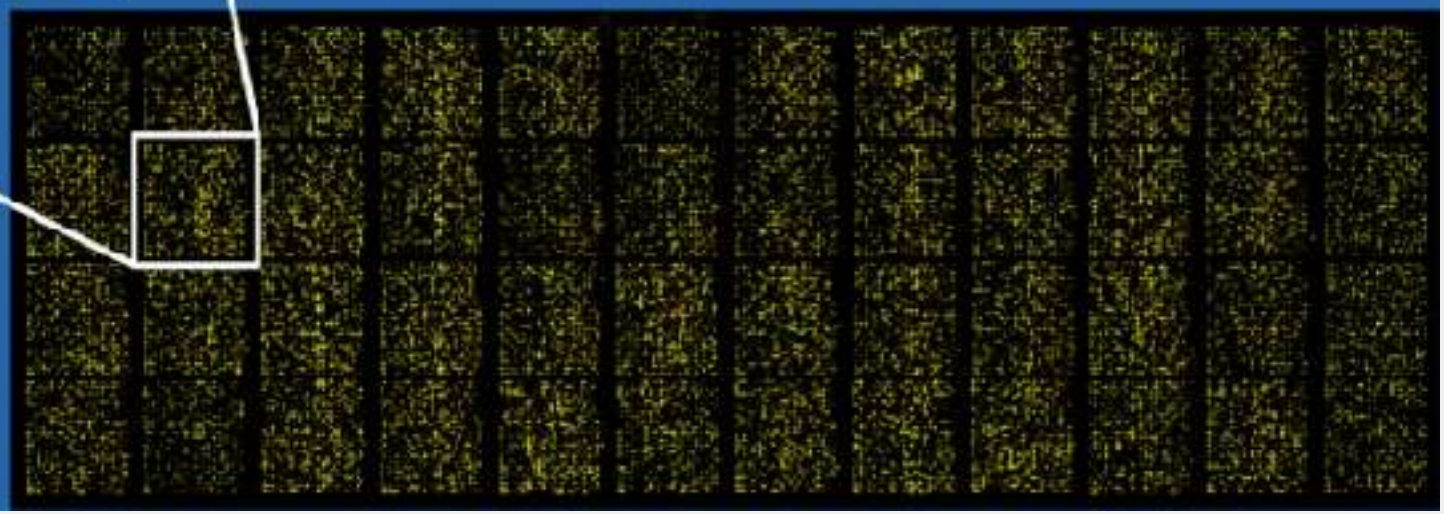
Наиболее распространённые методы изучения транскриптома — использование ДНК-микрочипов и секвенирование РНК.

ДНК-микрочипы



ДНК-микрочипы используют для анализа изменения экспрессии генов и генотипирования.

ДНК-микрочип (DNA microarray) - это небольшие пластинки, на которые нанесены молекулы ДНК, комплементарные РНК изучаемых генов, причем заранее известно, где какая молекула расположена.



Флуоресценция на ДНК-микрочипе после обработки раствором кДНК. Всего примерно 37500 прикрепленных молекул ДНК. (из вики-статьи «ДНК-микрочип»).

Секвенирование РНК

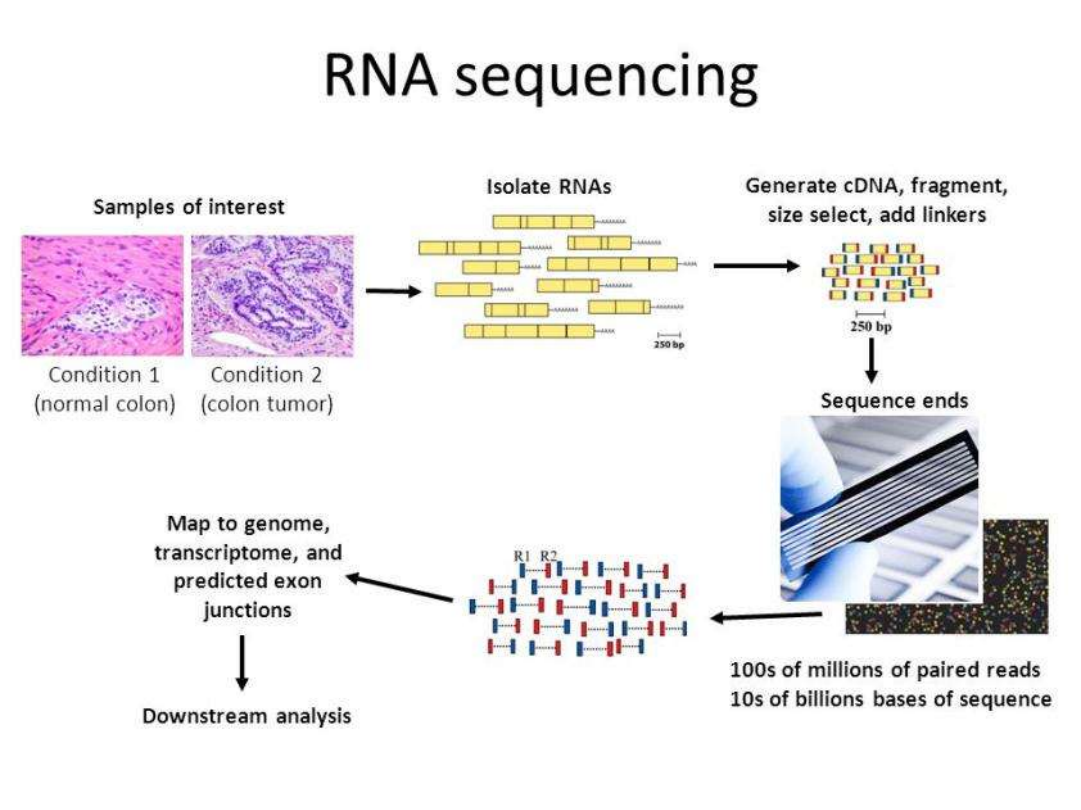
В последнее время все вместо чипов чаще используют массовое секвенирование всей кДНК из ткани (RNA-Seq) создание так называемых **транскриптомов**, что сильно упростилось из-за развития методов секвенирования.

Секвенирование РНК — определение первичной структуры молекулы РНК. Под этим может подразумеваться как секвенирование мРНК, так и определение последовательности некодирующих РНК.

Современное полногеномное секвенирование РНК (RNA-seq) основано на прямом секвенировании фрагментов кДНК

Это оказывается дешевле и эффективнее, поскольку РНК-секвенирование позволяет получить абсолютную количественную информацию о представленности различных транскриптов в пробе, в отличие от относительных количественных данных микрочипов.

Для этого выделяется тотальная фракция ДНК и РНК, создается библиотека кДНК и проводится ее анализ с использованием системы высокопроизводительного полногеномного секвенирования MiSeq Sequencing.



Анализ экспрессии 8300 генов, контролирующих развитие растений арабидопсиса (Zhu et al., 2001).

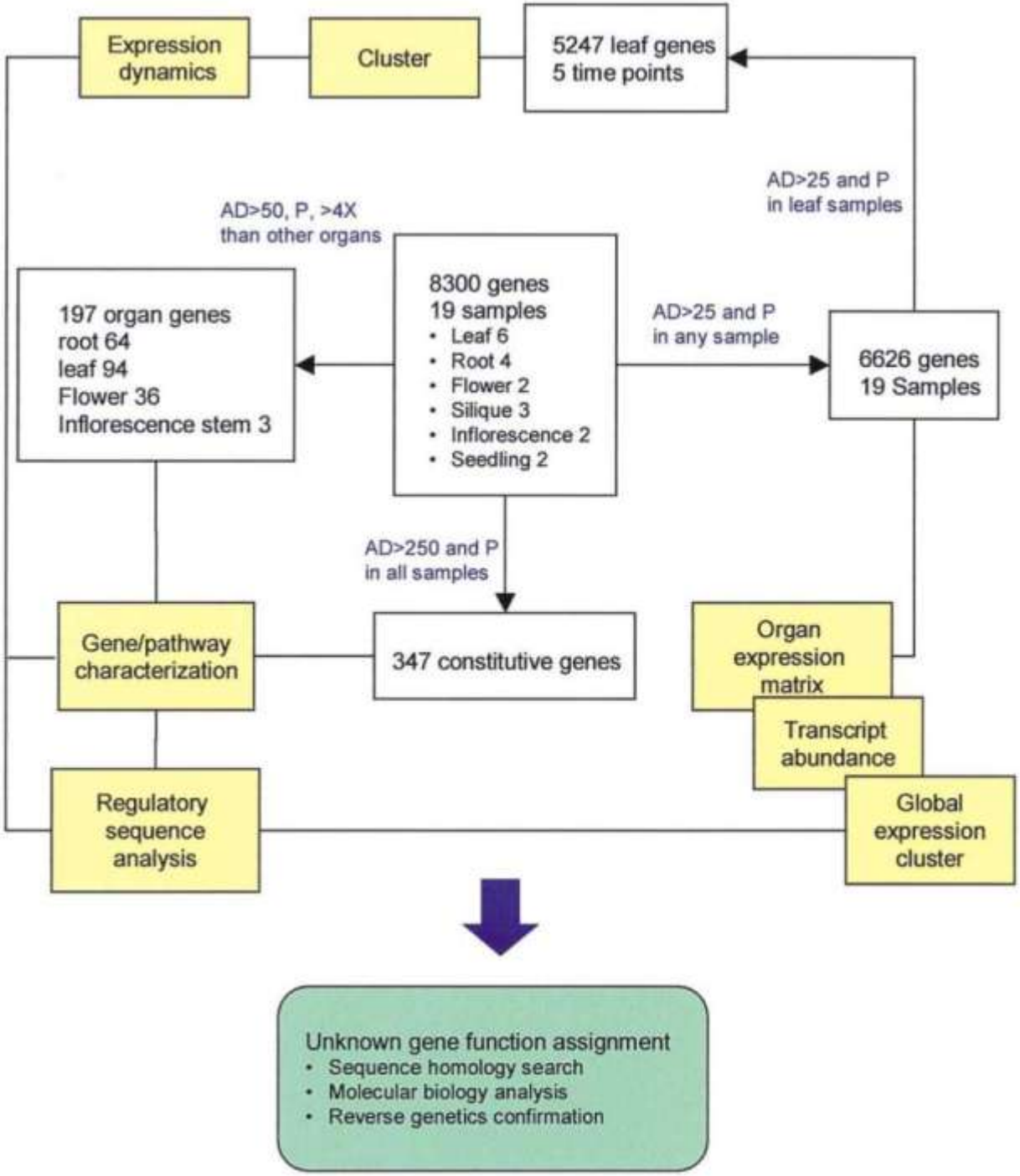


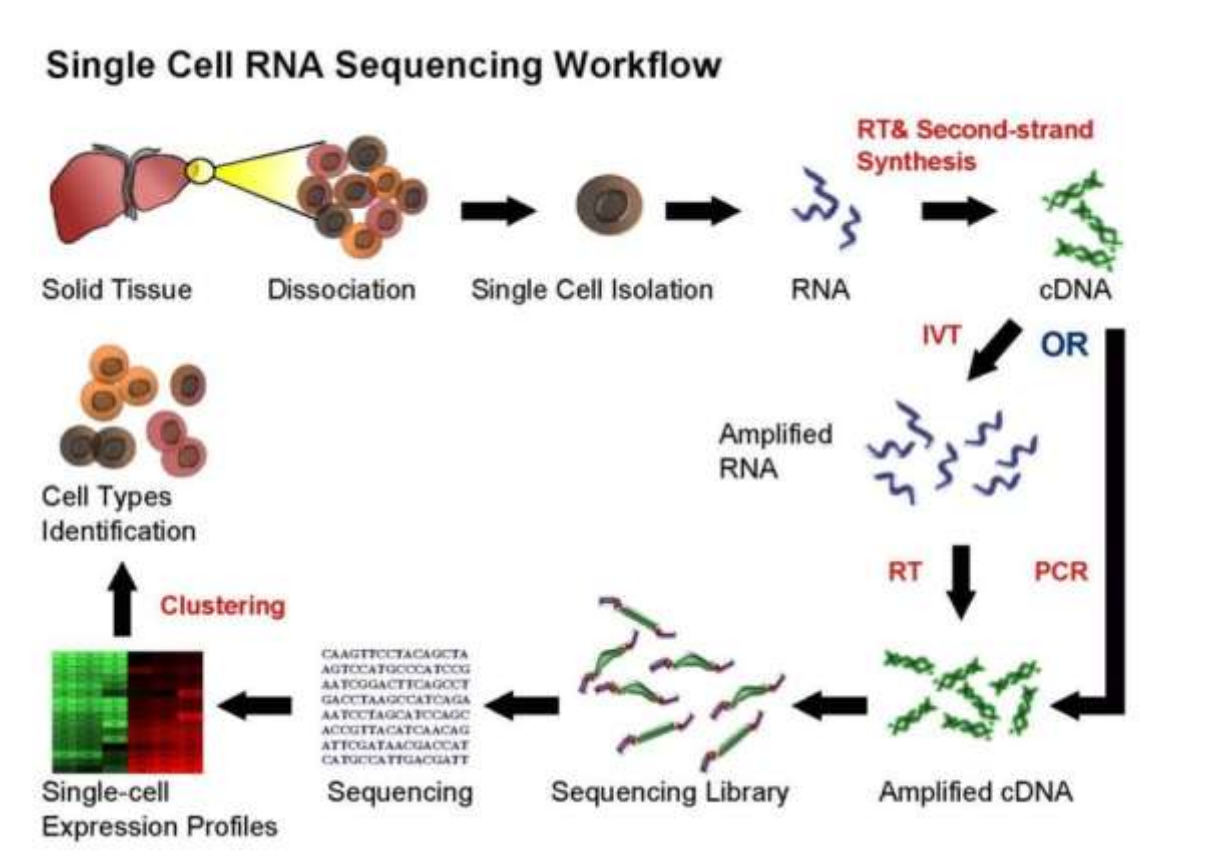
Figure 1. Schematic diagram of the data mining approach used in this study. It is started from the expression measurements of 8 300 genes in nineteen samples. The white boxes indicate the input data, while the yellow boxes indicate the output results. Arrows indicate the data mining process, and solid lines connect the input and output boxes. The green box indicates the approach has been taken for unknown gene function assignment. Fold change is indicated. P, Present call, AD, average difference. **(Zhu et al., 2001)**

64 гена экспрессируются только в корнях,
94 – в листьях,
3 – в цветоносах
36 – в цветках .

Транскриптомика отдельных клеток

Методы количественного анализа экспрессии генов в индивидуальных клетках основаны на сочетании современных методов **секвенирования РНК** и микрогидродинамики.

При исследовании транскриптомики отдельных клеток к каждой мРНК присоединяется молекулярный штрих-код, позволяющий однозначно идентифицировать не только саму молекулу мРНК, но также клетку, из которой она происходит.



Heath J. R., Ribas A., Mischel P. S. Single-cell analysis tools for drug discovery and development // Nat. Rev. Drug Discov. 2016. Vol. 15, no. 3. P. 204-216. DOI:10.1038/nrd.2015.16.

Протеомика

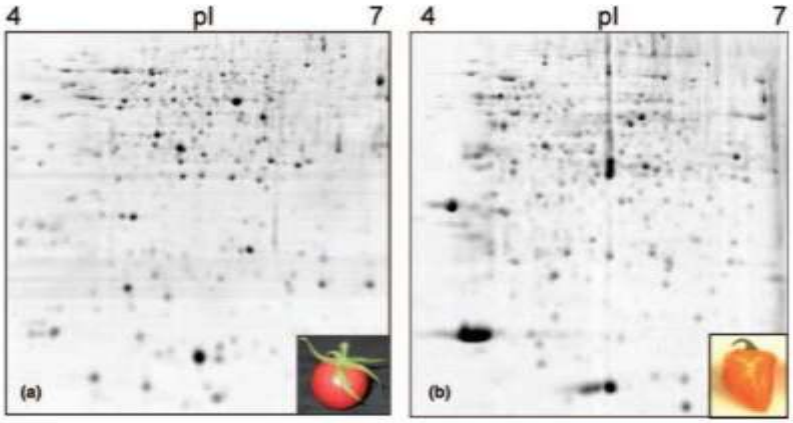
В организме человека около 26 тысяч генов. Белковых молекул на два порядка больше: в наших клетках содержится полмиллиона, а в плазме крови - более двух миллионов различных типов белков. Всё дело в том, что по одному и тому же генетическому коду могут синтезироваться десятки различных вариаций белка, и каждая из них имеет различные модификации.

«Белок – рабочая молекулярная машина, выполняющая функции обмена веществ, превращения энергии, передачи сигналов, катализа биохимических реакций. Белки также выполняют защитную, регуляторную и структурную функции, участвуют в транспорте веществ и в обеспечении двигательной активности организма.

Принципиальное отличие геномики от протеомики можно показать на простом примере: гусеница и бабочка. Геном у них один, протеомы – разные, то есть при одном геноме считываются разные его участки».

Акад А.И.Арчаков

Протеом – совокупность всех белков, которые определяют функциональную специфичность клетки



2-DE analysis of proteins from tomato and pepper fruit. Proteins were extracted from ripe tomato (a) and pepper (b) fruits and subjected to 2-DE analysis using pH 4–7 non-linear IPG strips (17 cm) in the first dimension and 12% SDS gels in the second dimension. The gels were stained colloidal Coomassie blue.
Rose et al, The Plant Journal, (2004), **39**, 715–733

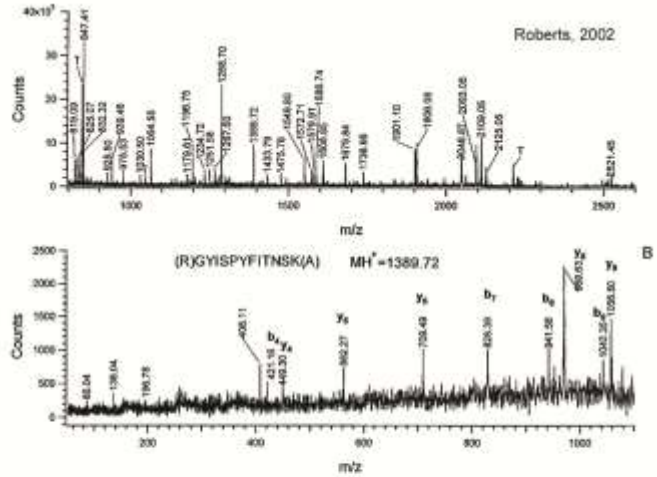
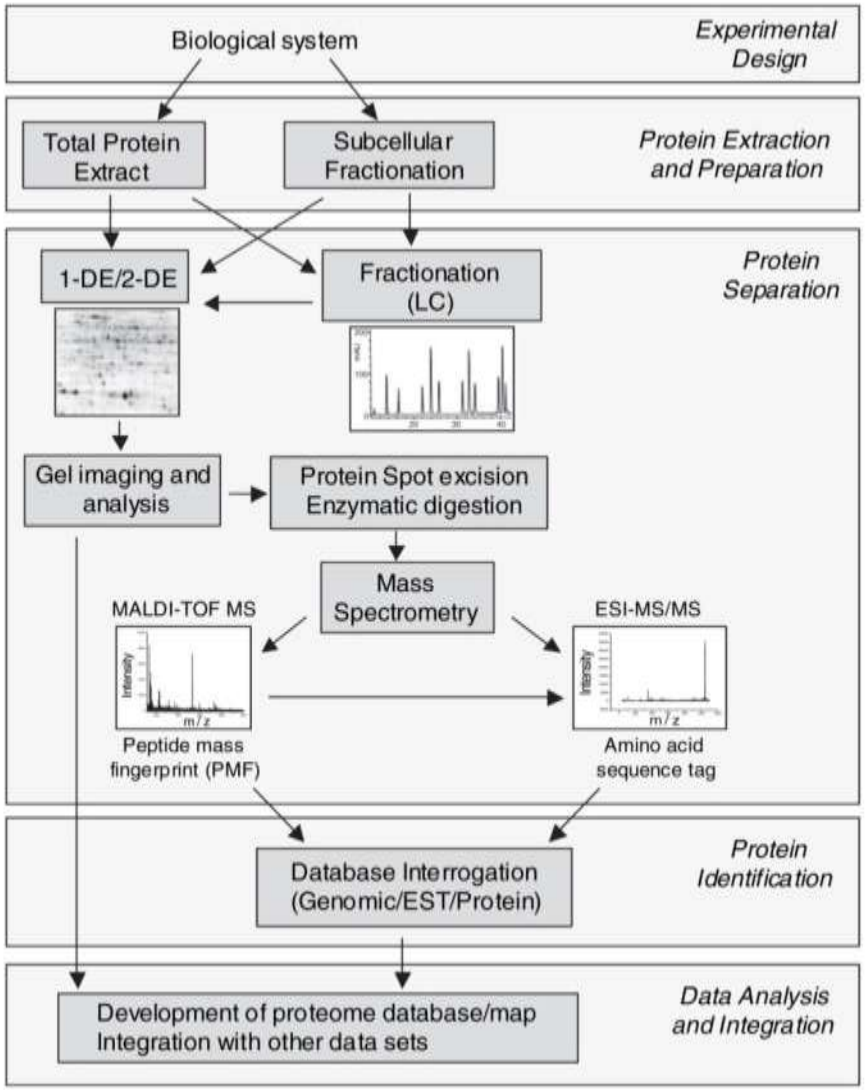


Figure 3. Peptide mass fingerprinting and peptide sequence analysis for protein identification. A. MALDI-DE-TOF peptide mass fingerprint spectrum of a peptide mixture from in-gel tryptic digestion of a protein separated by 2D-PAGE, which matched to maize mitochondrial chaperonin 60. Nineteen peptide ions matched predicted masses from the sequence for the chaperonin, covering 35% of the sequence of the entire gene/protein. Five peptide ions did not match. T, trypsin autolytic products. B. MALDI-TOF-PSD spectrum of a peptide with mass at *m/z* 1389.72 from the tryptic digestion of the protein in spectrum A. The PSD spectrum was acquired by selecting the specific peptide from the tryptic mixture by precursor ion gating. Fragment ion masses from this spectrum were used as the fragment ion tag for this protein in a database search. The partial amino acid sequence deduced from the fragment ion masses and the mono-isotopic mass of the precursor ion are shown above the spectrum, and matched the gene. Peptide backbone cleavage ions associated with charge retention at the N terminus are labeled b, while those with C-terminal charge retention are labeled y (for nomenclature of fragment ions, see Biemann, 1990). (From Chang *et al.*, 2000; copyrighted by the American Society of Plant Biologists; reprinted with permission.)

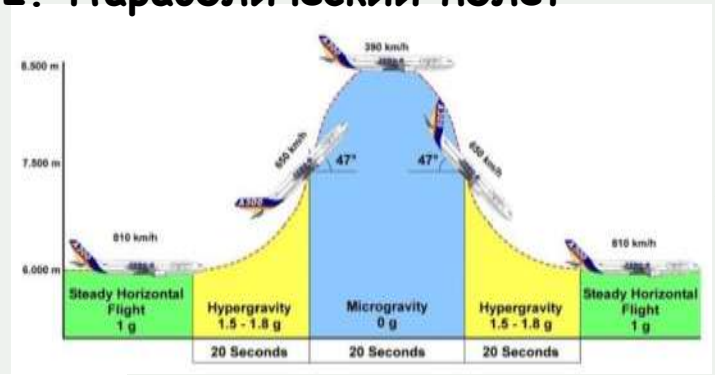


Overview of common steps involved in proteomic analysis. These typically include protein separation by one- or two-dimensional electrophoresis (1-DE or 2-DE, respectively) or liquid chromatography (LC), followed by protein identification using spectra generated by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) or electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI MS/MS). (Rose et al., 2004)

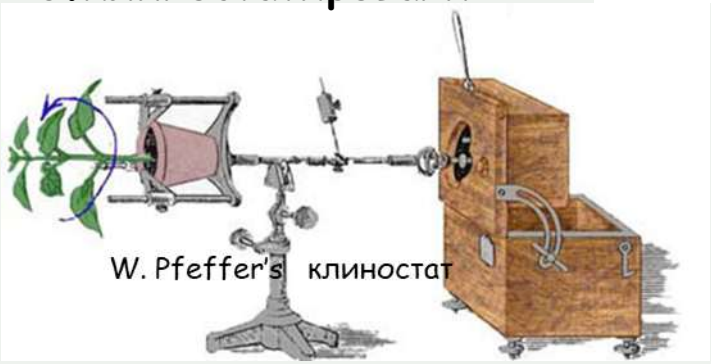
Основное направление работы научной группы: «**Гравитационная биология растений**».
На рисунках приведены 5 основных методических подходов, которые обычно применяются для изучении роли гравитации в жизнедеятельности живых организмов.

1. Микрогравитация

2. Параболический полет



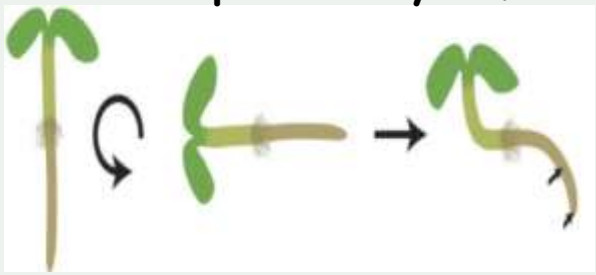
3. Клиностатирование



«Когда растение вращается с помощью клиностата, совершая один оборот за 3–4 мин, положение растения непрерывно меняется и **действие силы тяжести не успевает проявиться»**

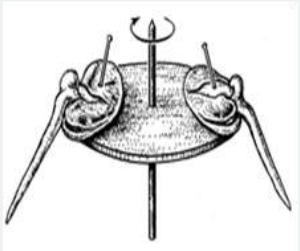
Вильгельм Пфеффер, 1904

4. Гравистимуляция

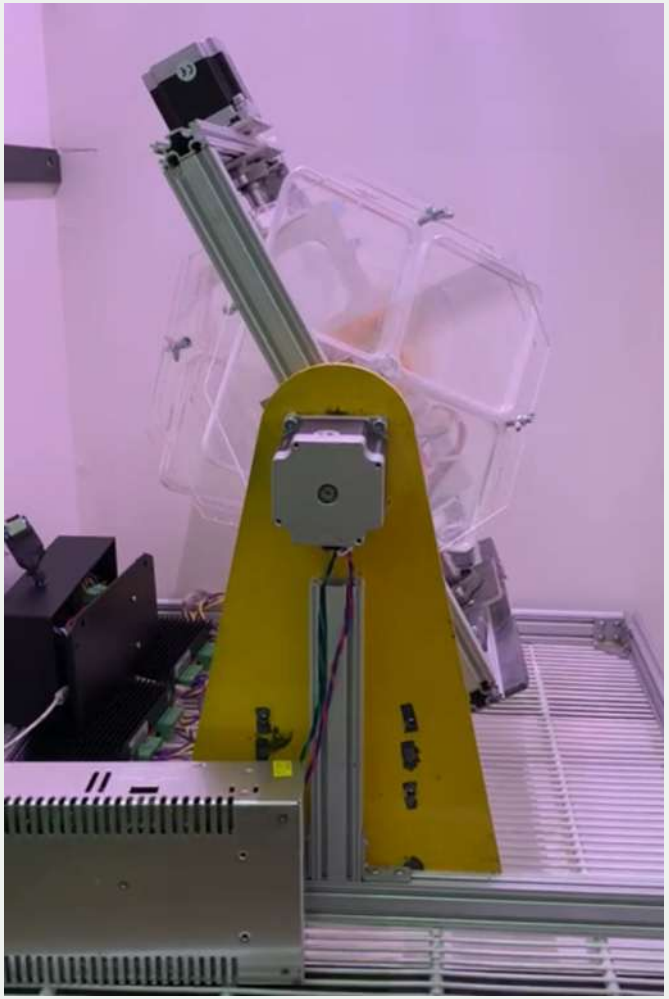


Изменение ориентации растения в пространстве, вызывает ответную ростовую реакцию - **гравитропизм**.

5. Центрифугирование



Опыт Томаса Найта:
При вращении прорастающего семени (150 об/мин) **рост корня идет в направлении центробежной силы - растение принимает его за направление вектора силы тяжести**.



Мы используем 3D-клиностаты с двумя рамками, вращающимися во взаимно перпендикулярных плоскостях

Медленные клиностаты со скоростью вращения 1-5 об./мин. с 2-мя вращающимися осями называют **трехмерными (3-D) клиностатами** или случайно позиционирующими машинами (random positioning machine, RPM).

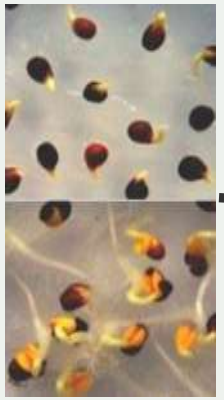
3D-клиностатирование – позволяет **имитировать невесомость (simulated microgravity)** в условиях Земли путем непрерывного изменения положения объектов по отношению к вектору силы тяжести.

Мы изучаем как рандомизация вектора силы тяжести с помощью 3D клиностатирования влияет на:

- **Протеом** и **метаболом** прорастающих семян рапса и проростков арабидопсиса (*совместно с группой «Функциональная геномика растений», рук. - к.х.н., доцент кафедры биохимии А.А.Фролов*)
- **Организацию актиновых микрофиламентов и микротрубочек** в корнях и гипокотилях арабидопсиса

Протеомный эксперимент

Bottom up (*«снизу вверх»*) протеомика



Мгновенная фиксация (жидкий N_2) → Размол (на шаровой мельнице) → Выделение и очистка тотального белка → Триптический дайжест белка → Очистка пептидов на SPE колонке → Высушивание пептидов

Высушивание пептидов → Относительный количественный анализ

Высушивание пептидов → Идентификация белков → LC-MS/MS эксперименты (nanoUPLC-ESI-Orbitrap-LIT-MS/MS)

nanoUPLC-ESI-Orbitrap-LIT-MS/MS - нанопоточная высокоэффективная жидкостная хроматография осуществляемая в режиме соединения он-лайн с гибридным масс-спектрометром, имеющим орбитальную (**Orbitrap**) и линейную (**LIT**) ионные ловушки, с ионизацией в электроспрее (**ESI**)

SPE (solid phase extraction) - твердофазная экстракция

В.В. Чанцева

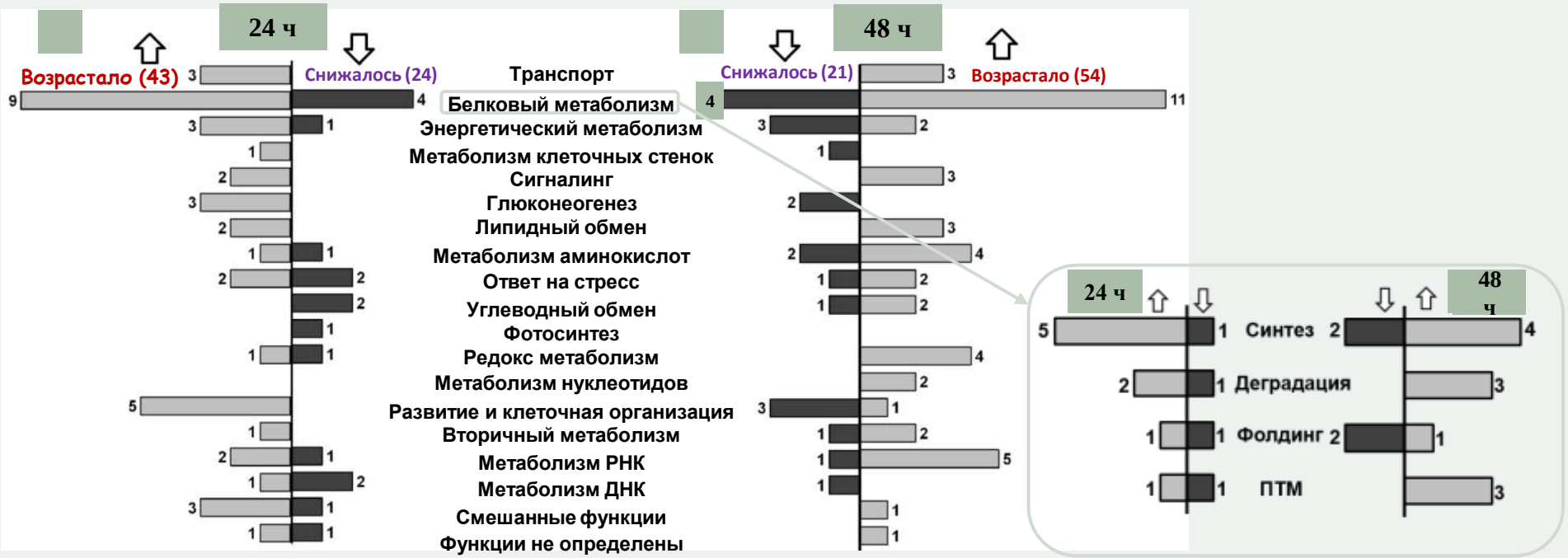
Т.Е. Билова

3D-клиностатирование вызывает значительные изменения в паттерне белков прорастающих семян рапса

Е.М. Лукашева

А.А. Фролов

Содержание 97 белков возрастало, 39 – снижалось.

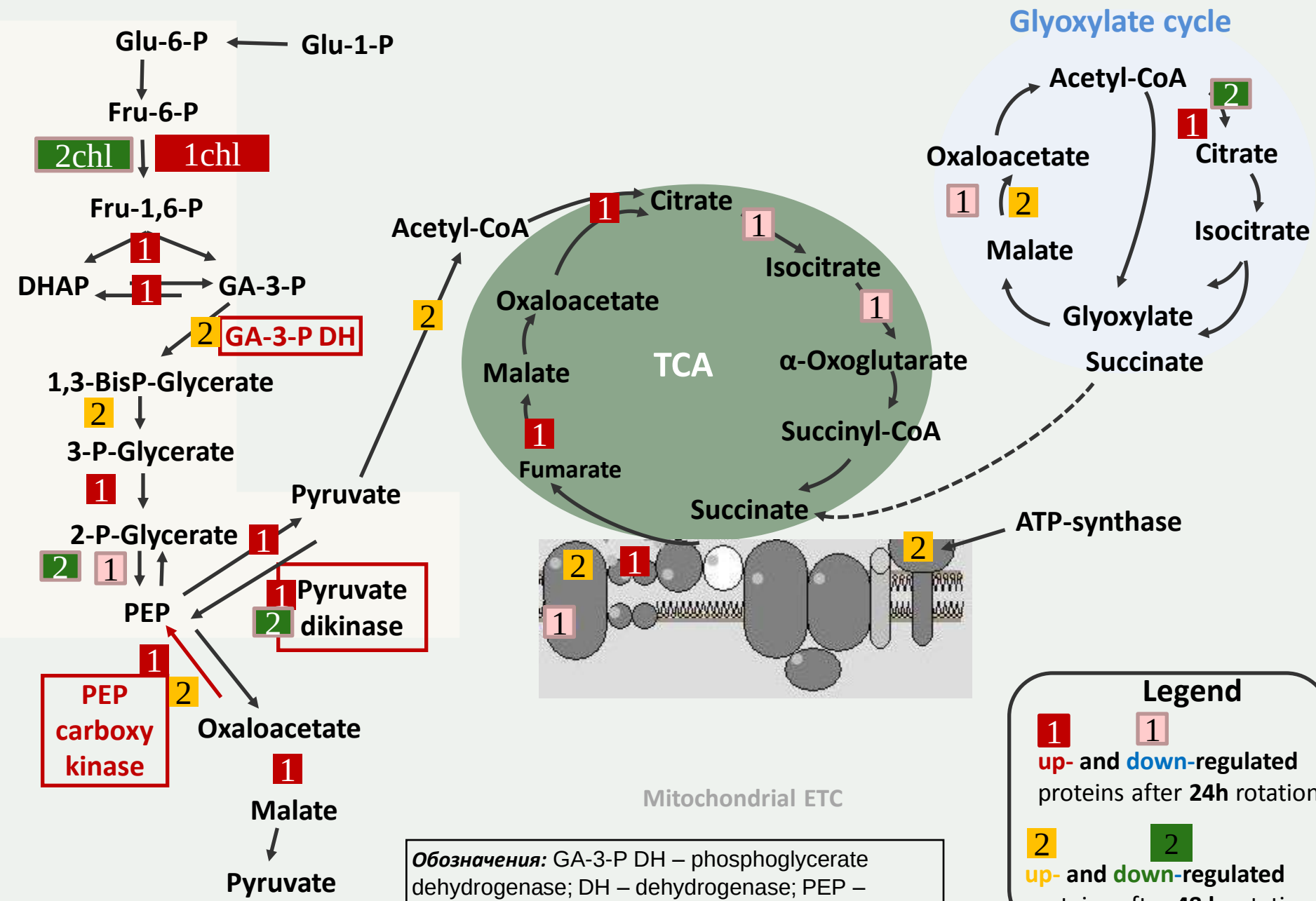


Функциональные группы белков

Содержание большинства белков изменялось от **1,5 до 3 раз**.
Уровень 22 белков изменился почти **в 40 раз!** (37,5).
Наибольшие изменения наблюдались в белках, участвующих в белковом метаболизме, энергетическом обмене, метаболизме РНК, а также в процессах развития.
Содержание белков S13, S8, S3 и S9, входящих в состав малой субъединицы 40S рибосомы, после 24 ч клиностатирования **возрастал в 2.5, 3, 6 и 25 раз**, соответственно.

Frolov A.A., Didio A., Ihling C., Chantseva V.V., Grishina T., Hoehenwarter W., Sinz A., Smolikova G.N., Bilova T.E., Medvedev S.S. (2018) The effect of simulated microgravity on the *Brassica napus* seedling proteome. *Functional Plant Biology. 45. N 4. P. 440-452*

Изменения в энергетическом обмене, вызванные клиностатированием



Обозначения: GA-3-P DH – phosphoglycerate dehydrogenase; DH – dehydrogenase; PEP – phosphoenolpyruvate, chl - chloroplastic isoform.

В.В. Попова

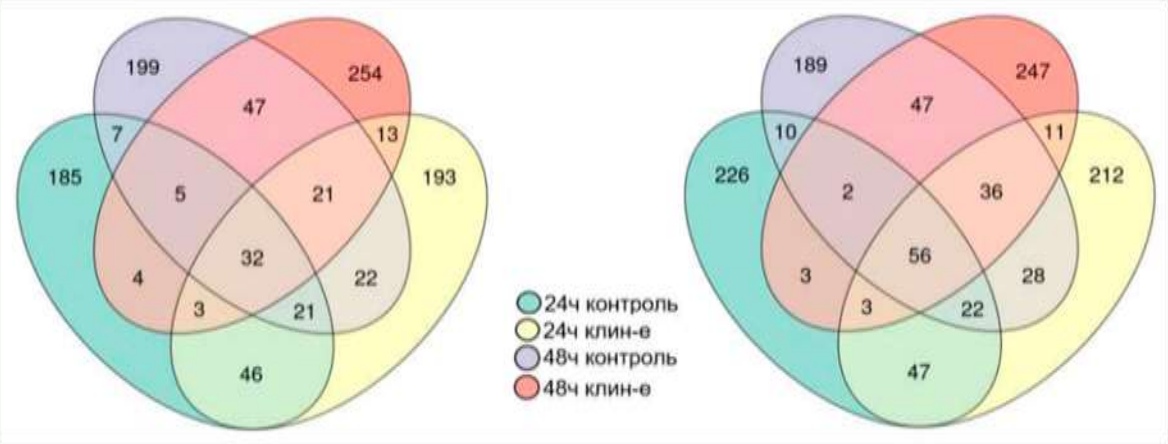
Т.Е. Билова

Влияния 3D-клиностатирования на гликирование и окислительные модификации белков проростков рапса

А.А. Фролов

1. В поиск пост-трансляционных модификаций белков были включены модификации гликирования и окисления, а также пептиды без модификаций в софте Proteome Discoverer 2.2.
2. Выявлены пептиды без модификаций и пептиды, которые имеют гликирование или окисление в своем составе.
3. Построение диаграмм Венна с использованием среды программирования R.

Количество сайтов гликирования и окисления в белках проростков рапса



Гликирование

Окисление

Выявлены белки с 10 *модификациями конечного глубокого гликирования*. Доминантной модификацией был карбоксиметиллизин.

В 24 ч проростках рапса выявлен 303 сайт глубокого гликирования белков в контроле и 351 сайт при 3D-клиностатировании (т.е. +48).

В 48 ч проростках обнаружено 354 сайта гликирования в контроле и 379 при клиностатировании (т.е. +25).

Окислительные модификации:

Идентифицировано 369 и 415 сайтов для однодневных (+46) и 390 и 405 (+15) сайтов для двухдневных контрольных и клиностатированных проростков, соответственно.

При этом 56 сайтов было обнаружено во всех проростках.

- Shumilina J., Kusnetsova A., Tsarev A., Janse van Rensburg H.C., Medvedev S., Demidchik V., Wim Van den Ende, Frolov A. Glycation of plant proteins: regulatory roles and interplay with sugar signalling? International Journal of Molecular Sciences. 2019. 20 (9): 2366

Metabolic pathways – Reference pathway

Метаболомика

изучает изменение содержания низкомолекулярных метаболитов в организме на определенном этапе онтогенеза в зависимости от внешних условий.

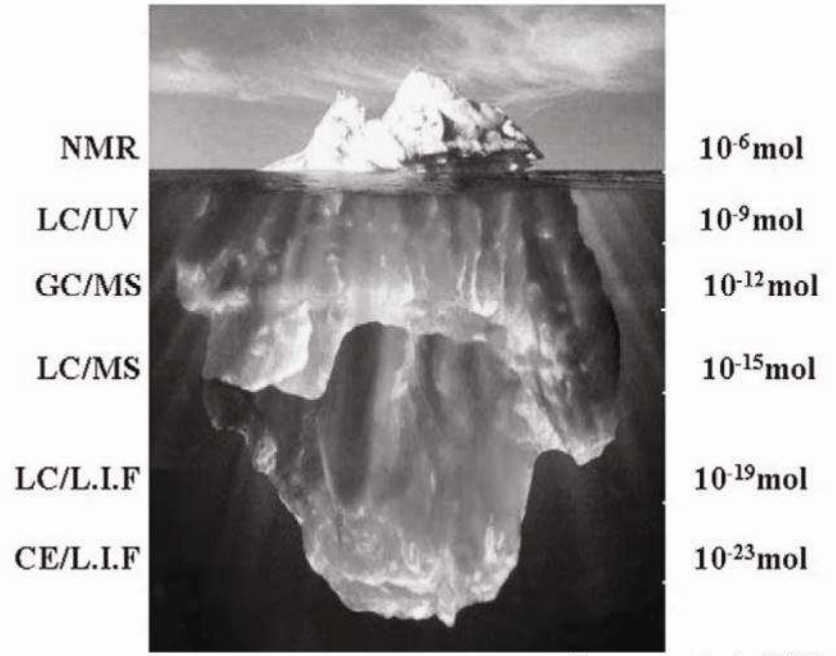
KEGG PATHWAY Database. https://www.genome.jp/kegg/pathway/map/map01100.html

Метаболом – совокупность всех метаболитов, свойственных клетке, ткани или органу на определенном этапе онтогенеза в зависимости от условий среды.

metabolic PROFILING:
GC/MS
LC/MS(/MS),CE/MS(MS)

metabolic FINGERPRINTING
direct MS (Q-TOF, FT-ICR, MALDI)
NMR, Raman, FT-IR, ...

Major techniques for metabolic profiling: gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS), liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS), liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS/MS), capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE/MS), direct MS techniques for metabolic 'fingerprinting': quadrupole-time of flight (Q-TOF), Fourier transform-ion cyclotron resonance (FT-ICR) and matrix assisted laser desorption/ionization (MALDI) and direct spectroscopic techniques: nuclear magnetic resonance (NMR), Raman and Fourier transform infra-red (FT-IR).



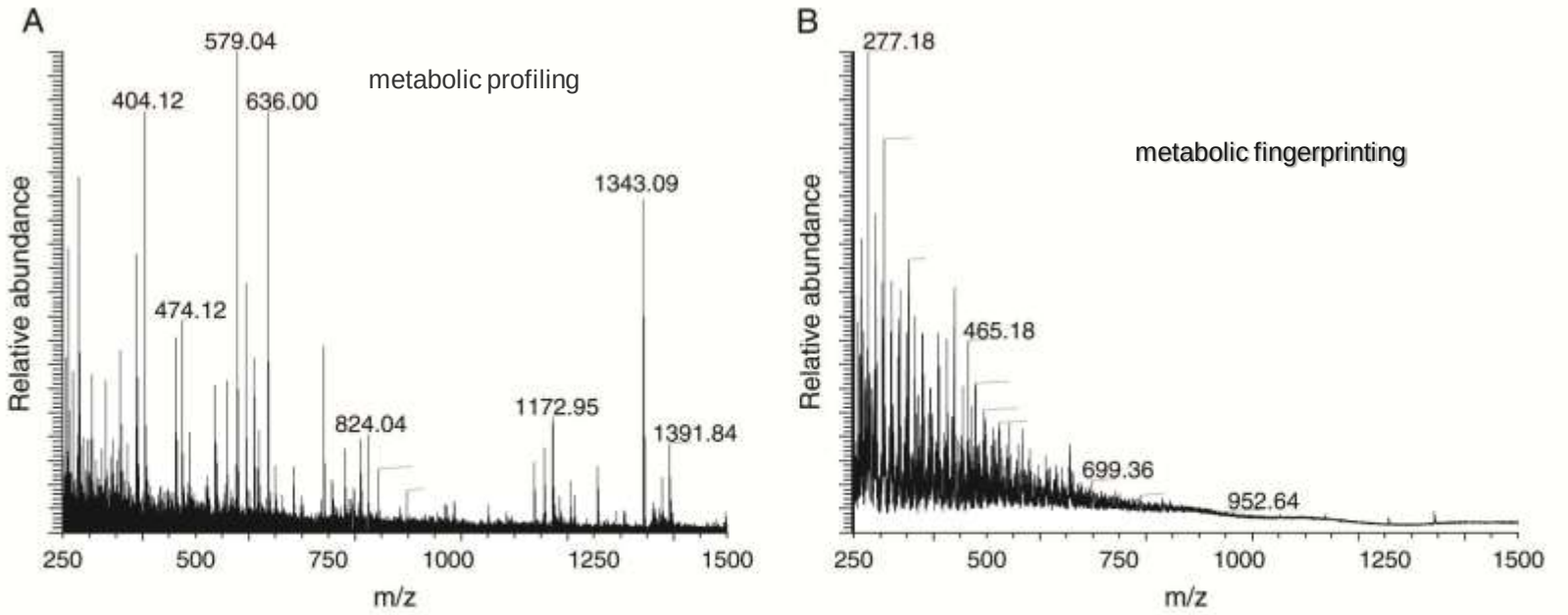
Summer et al., 2002

Fig. 3. A comparison of the relative sensitivities of various metabolomic tools. NMR has rapid analysis times but suffers from lower sensitivity thus allowing visualization only of the more concentrated metabolites (i.e. the tip of the iceberg). GC/MS and HPLC/MS provide good selectivity and sensitivity. CE/LIF (laser induced fluorescence) provides very high sensitivity but lower selectivity.

Метаболомика позволяет получать «**снимок**» физиологических процессов в клетке, как фенотипического проявления генетической информации.

Анализ метаболома (в отличие от транскриптома и протеома) позволяет получить наиболее полную и более адекватную функциональную характеристику организма.

Масс-спектры метаболитов листа арабидопсиса



Summary mass spectrum of Arabidopsis leaf extract following either chromatographic separation (A) or direct infusion (B). Ions were detected for positive ionization full-scan MS. Chromatography was performed on a 0.1 × 450 mm monolithic C18 column. Summary mass spectrum, which derives from adding up all mass scans over the chromatographic run, shows distribution of m/z within the acquisition mass range of 100–1500 atomic mass units, exceeding S/N > 6. (Shulaev et al. Physiol. Plant. 132, 2008)

В основе метаболомики лежит анализ метаболических профилей (metabolic profiling) и метаболических «отпечатков пальцев» (metabolic fingerprinting).

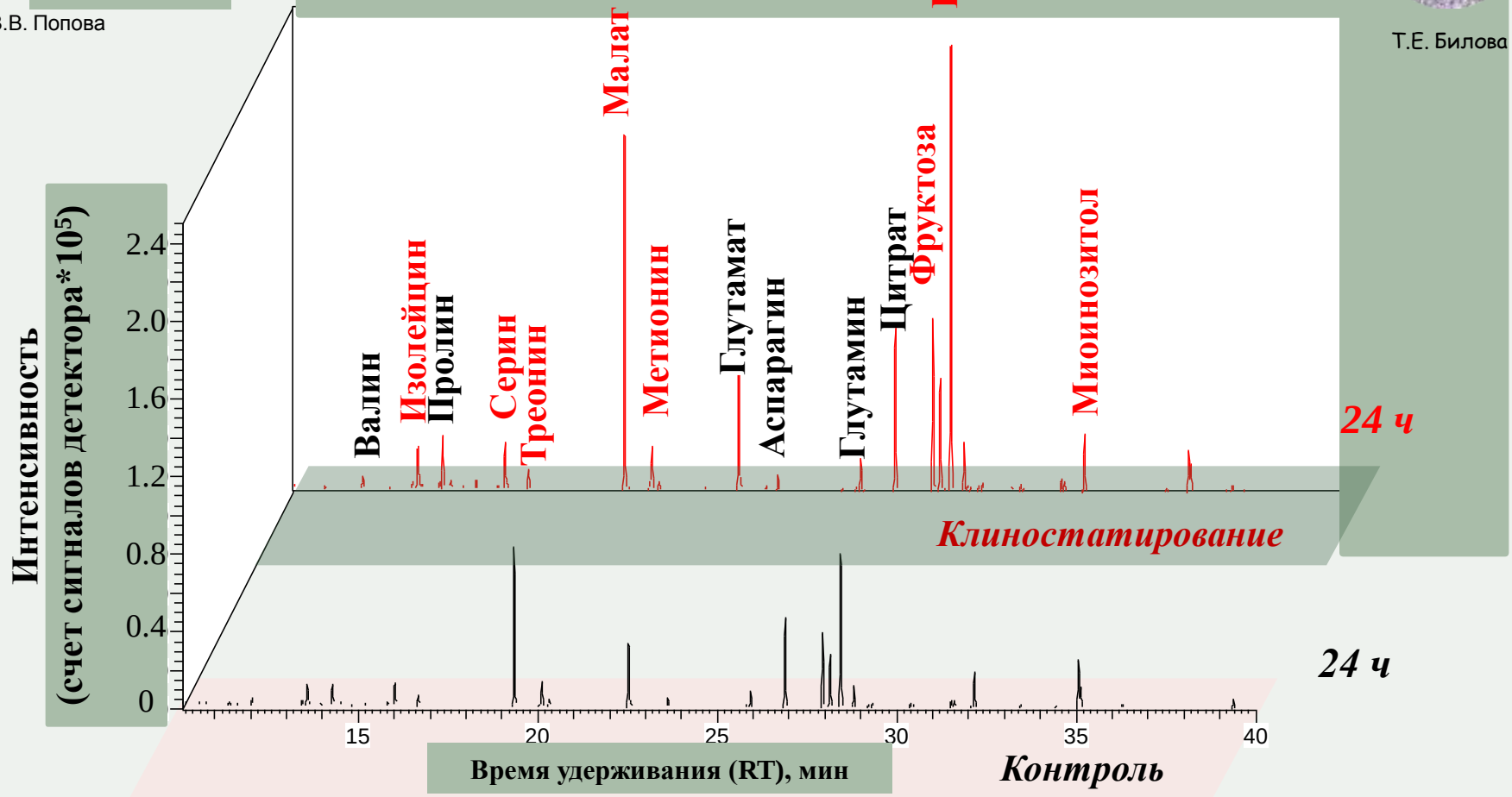
Анализ ***метаболических профилей*** включает определение отдельных метаболитов. Для этого применяют применяют газовую или жидкостную хроматографию с последующей масс-спектроскопией.

Анализ ***метаболических «отпечатков пальцев»*** включает определение всех метаболитов в образце без их идентификации. Для этой цели служат методы Фурье- и Рамановской спектроскопии, а также электроспрэй-ионизации с последующей масс-спектроскопией.

GC-MS анализ метаболитов, выделенных из прорастающих семян рапса выращенных в условиях клиностатирования

В.В. Попова

Т.Е. Билова



Паттерн большинства метаболитов у семян, прорастающих (24 ч) в условиях клиностатирования, не изменялся, однако значительно возрастал уровень содержания многих из них.

Красным цветом отмечены некоторые «доминантные» метаболиты, содержание которых достоверно возрастало (≥ 1,5 раза)

Chantseva V., Bilova T., Smolikova G., Frolov A., Medvedev S. 3D-clinorotation induces specific alterations in metabolite profiles of germinating Brassica napus L . seeds. Biological Communications. 2019. 64(1). 55–74. doi.org/https://doi.org/10.21638/spbu03.2019.107

Для получения метаболома(ов) необходимо строить математические (статистические) модели анализируемых процессов.

Это направление в статистике называют хемометрикой.

Влияние 3D клиностатирования на метаболомы растений:

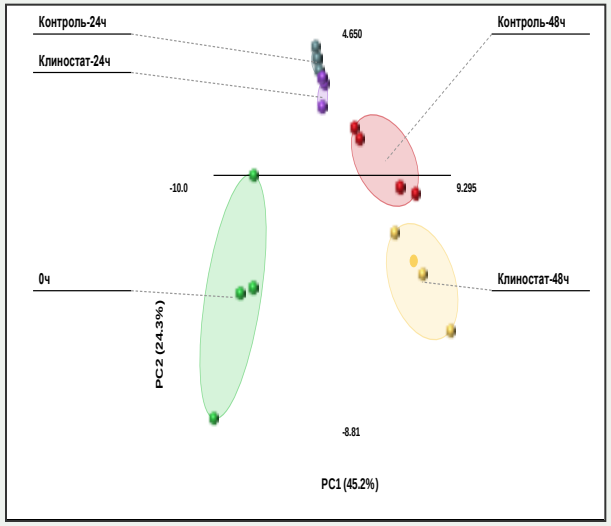
На рисунках показно распределение метаболитных профилей на плоскости в координатах 1-й и 2-й главной компонент (PC 1 и PC 2, соответственно), рассчитанное по методу главных компонент

Г.Н. Смоликова

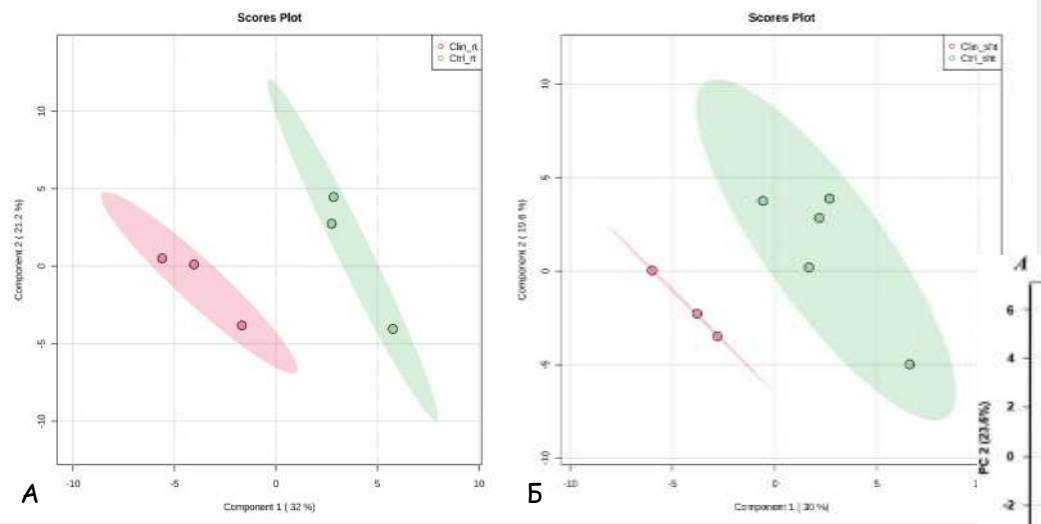
Г.А. Пожванов

В.В. Попова

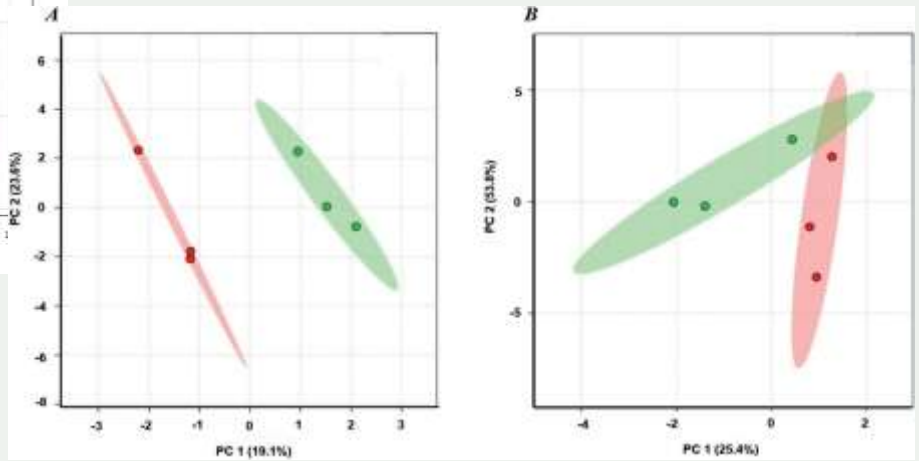
Т.Е. Билова



Зародышевые оси семян капусты, проративших 24 и 48 ч в стационарных условиях (контроль) и в условиях клиностатирования (клиностат)



Корневая система (A) и надземная часть 16-суточных проростков арабидопсиса, выращенных в стационарных условиях (Ctrl) и в условиях клиностатирования (Clin)



Семена рапса, проратившие 24 и 48 ч в стационарных условиях (контроль) и в условиях клиностатирования (клиностат)

Метаболомика позволяет получать «**снимок**» физиологических процессов в клетке, как фенотипического проявления генетической информации.

Метаболом (как фенотипическое проявление реализуемой генетической информации) отражает **все изменения**, которые происходят в организме в ответ на внутренние и внешние факторы.

Анализ метаболома (в отличие от транскриптома и протеома) позволяет получить **наиболее полную** и более адекватную функциональную характеристику организма.

Особенности метаболомики, отличающие её от других "пост-геномных" технологий:

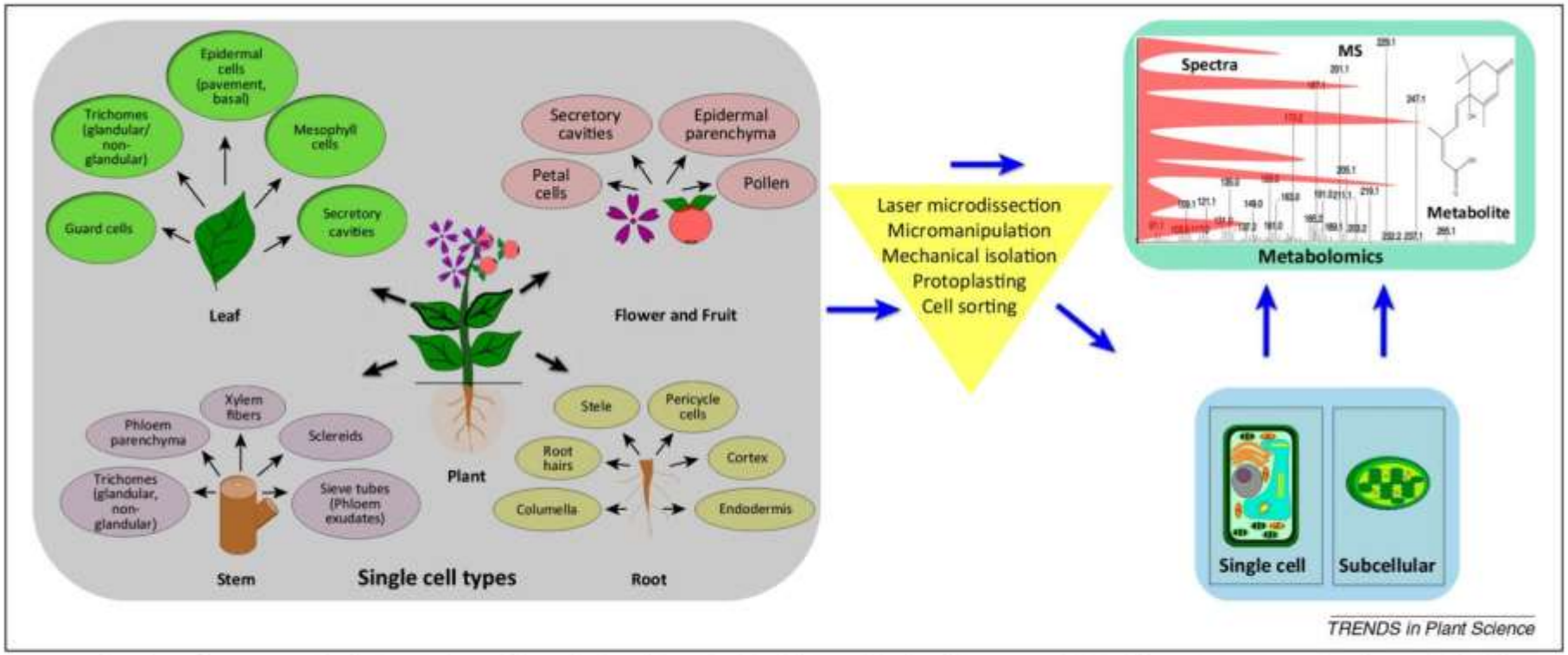
- **Концентрация и компартментализация метаболитов в клетках и тканях постоянно варьируют.**

Это требует, во-первых, жесткой стандартизации протоколов метаболомного анализа, а, во-вторых, нового методологического подхода, который позволяет оценивать динамику потоков и концентраций метаболитов в клетках и тканях. Для этой цели служит такая «омиковая» технология, как **флаксомика**.

- **Метаболитов слишком много** (около 200 000) и они сильно различаются по своим физико-химическим свойствам. Поэтому анализ различных классов химических соединений требует применения различных методов физико-химического анализа**.**
- **Не создана единая технологическая «платформа»** для анализа метаболомов различных биологических объектов.

С методической и методологической точки зрения среди «омиковых» технологий исследований наиболее сложной является именно метаболомика.

Plant single-cell and single-cell-type metabolomics



Overview of current metabolomics studies of plant single cells and single cell types. Single cell types are obtained from plant parts such as leaves, fruits, flowers, stems, and roots by means of laser microdissection, micromanipulation, mechanical isolation, protoplasting, and cell sorting. Subcellular organelles and single plant cells are analyzed using microsampling, mass spectrometry imaging (MSI), nano-electrospray ionization (ESI) tip, and other means, including differential centrifugation. Chromatography, mass spectrometry (MS), and nuclear magnetic resonance (NMR) tools have allowed the analysis of cellular metabolomes.

Misra ea., (2014) Trends in Plant Science Vol. 19, No. 10

Феномика (Phenomics) -

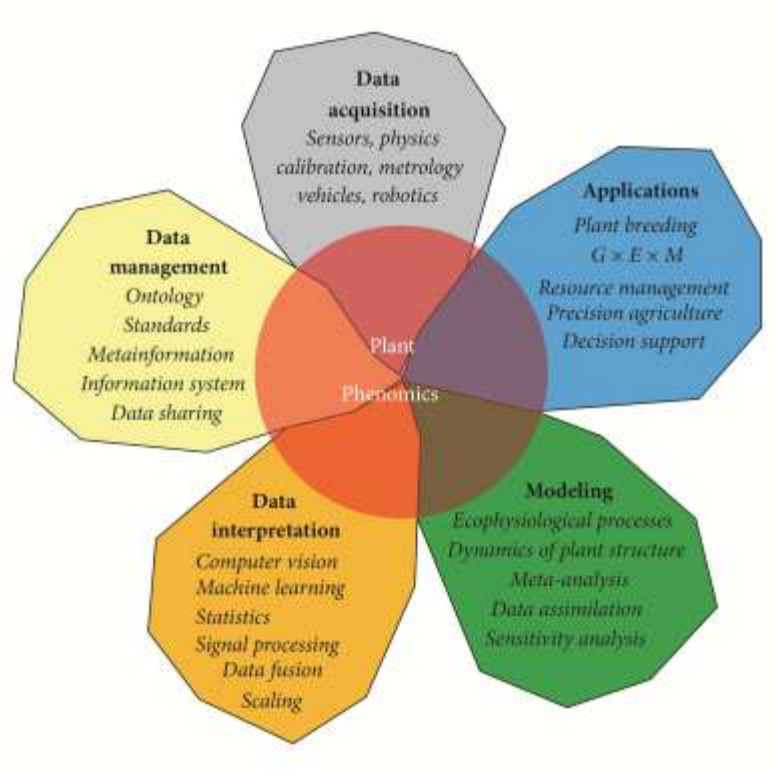
междисциплинарная область знания и технологий, объединяющая биологические науки, инженерные и компьютерные технологии.

Феномика – омиксная дисциплина, которая концентрируется на выявлении закономерностей функционирования организмов в связи с паттернами экспрессии генов, функционального проявления белков и метаболитов.

Феномика получила развитие в связи с необходимостью анализа фенотипических характеристик в широкомасштабных генетических и селекционных экспериментах на растениях.

В последние годы стали появляться много работ, в которых стали обращать внимание на то, что фенотипирование может стать революционной методологией для **Физиологии растений**.

Prof **Steven A. Garan**, University of Berkeley "**Phenomics**: a new direction for study of neuroendocrine aging", "Experimental Gerontology", **2003**.



The five pillars (столпов) of plant phenomics

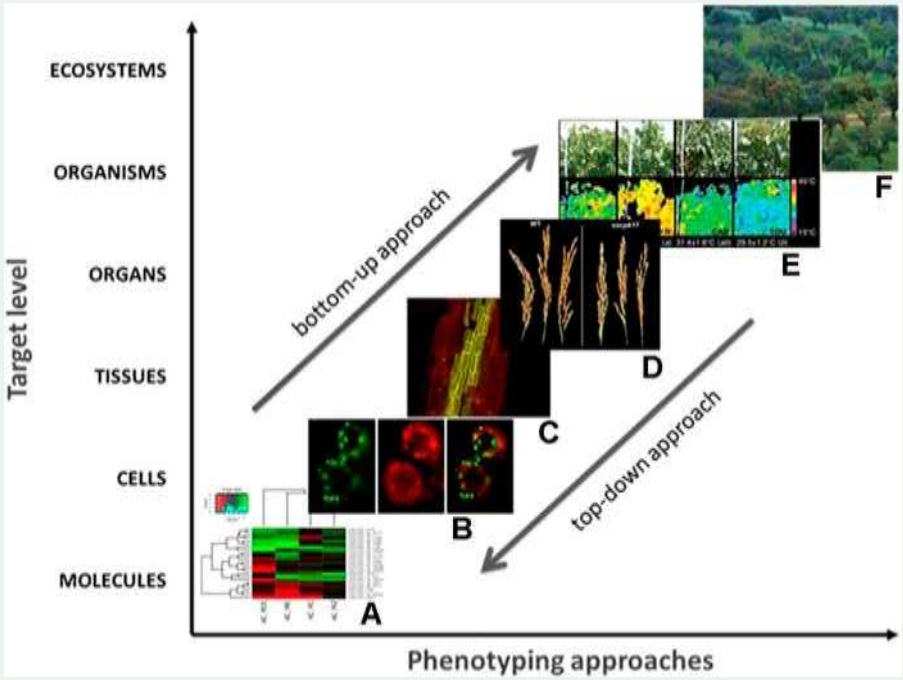
Ninomiya, Plant Phenomics, 2019

Демидчик В.В., Шашко А.Ю., Бондаренко В. Ю., Смоликова Г.Н., Пржевальская Д.А., Черныш М.А., Пожванов Г.А., Барковский А.В., Смолич И.И., Соколик А.И., Мин Ю., Медведев С.С. 2020. Феномика растений: фундаментальные основы, программно-аппаратные платформы и методы машинного обучения. Физиология растений. 67(3): 227-245. doi: 10.31857/S0015330320030069

Феномика и физиология растений

Современные методы фенотипирования позволяют с помощью десятков датчиков и фотокамер непрерывно контролировать множество параметров физиологии растительного организма в течение онтогенеза на всех уровнях его организации.

Именно фенотипирование позволяет не только анализировать, но также моделировать молекулярные сети, контролирующие такие сложные процессы, как рост и развитие, стрессоустойчивость, метаболизм, а также взаимодействия растительных организмов в сообществе" (Costa et al., 2019).

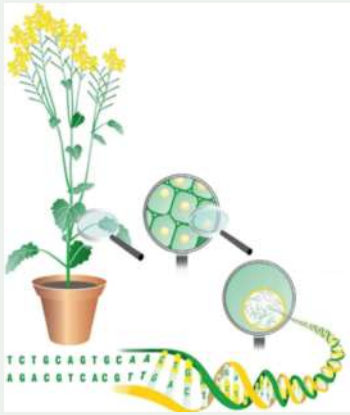


Phenotyping of plant organization: from the molecular level (A) until the plant (B-E) and ecosystem level (F).

Costa et al., Front. Plant Sci. 2019. 10:1125

Robert Furbank и Mark Tester [2011] считают, что "феномику растений можно считать физиологией растений, но в более современной форме".

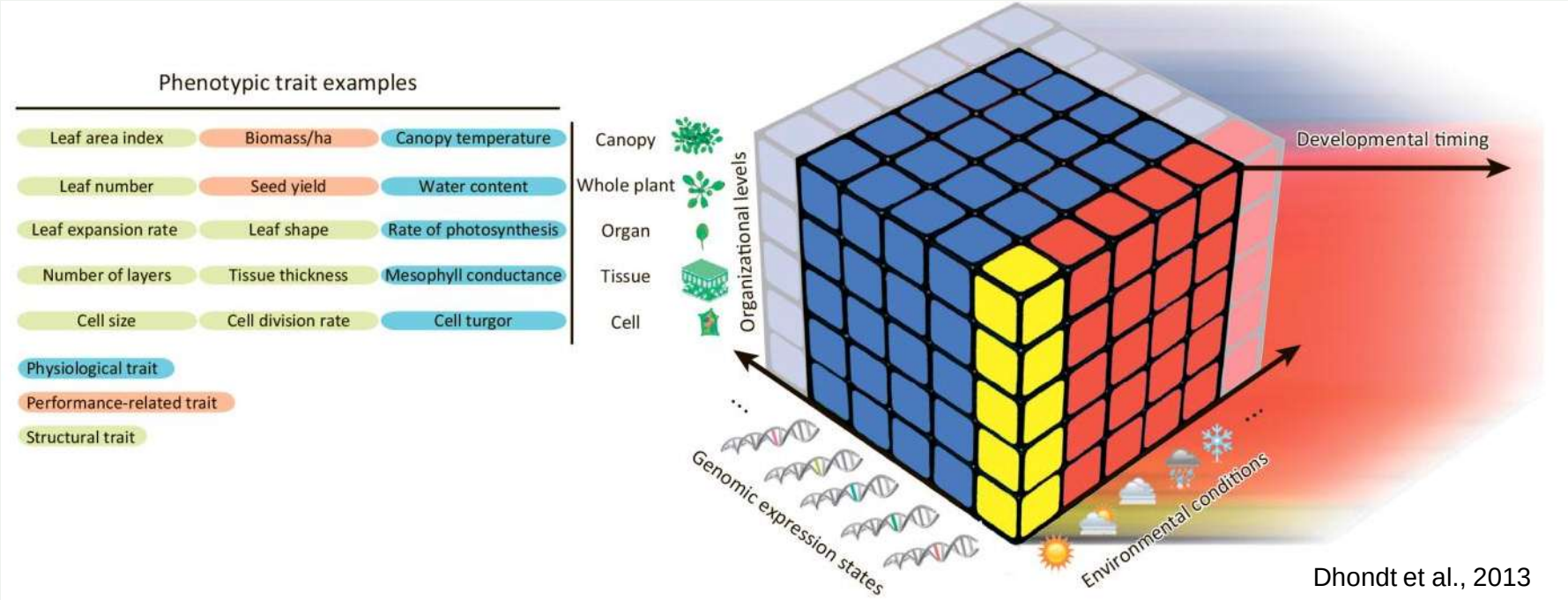
По их мнению, феномика может довести развитие физиологии растений до скоростей, с которыми развивается геномика.



Furbank,Tester (2011).
Trends in Plant Science

Фенотипирование растений -

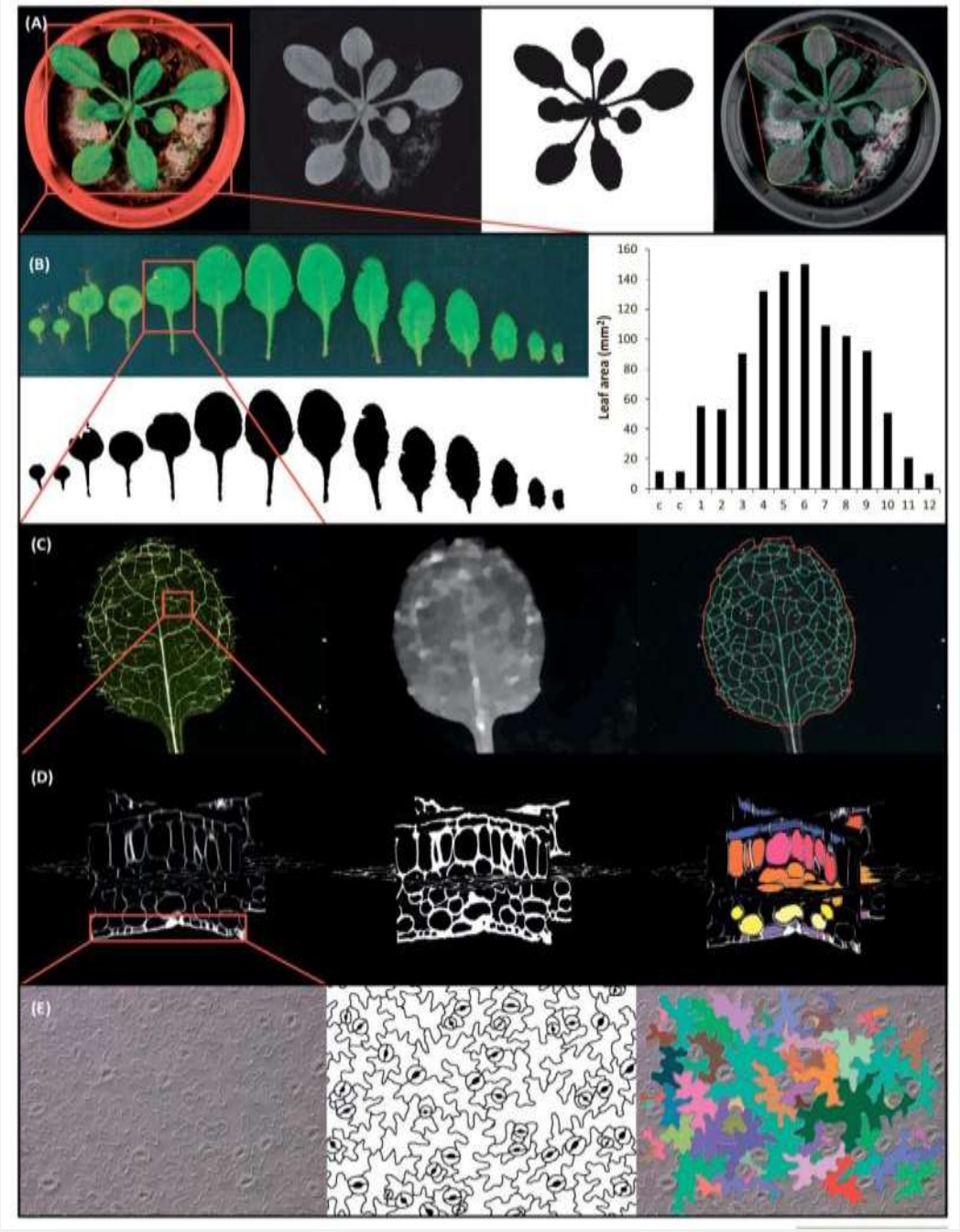
это процедура оценки фенотипа растения по его размерам, форме, физиолого-биохимическим характеристикам на любом уровне организации в конкретных условиях внешней среды и активности генома.



Dhondt et al., 2013

Фенотипирование растений может выполняться **на нескольких уровнях**, начиная от агроценоза до целого растения, его отдельных органов, тканей и клеток и, в конечном итоге, до субклеточного уровня..

Фенотипические характеристики, представляющие интерес, могут быть классифицированы как физиологические, структурные или связанные с продуктивностью.



Dhondt et al., 2013

Фенотипирование растений на разных уровнях их организации

(A) Image **color channel** manipulation followed by thresholding is used for the extraction of the **Arabidopsis rosette** from the background, and the subsequent measurement of the projected rosette area, perimeter, and convex hull.

(B) **Leaf series** are created by dissecting the rosette and arranging the individual leaves on an agar plate. Leaves are segmented by means of automated image processing and their **individual sizes can be plotted in a leaf area profile**.

(C) **Dark-field image of a cleared Arabidopsis leaf**. The LIMANI tool extracts several venation parameters by consecutive segmentation of the leaf and the **vascular pattern**.

(D) Orthogonal view of a **confocal image stack** of an Arabidopsis leaf. Volumes **of individual epidermal and mesophyll cells** are obtained by **3D image processing**.

(E) **Differential interference contrast** picture of the Arabidopsis abaxial epidermis. A microscopic drawing aids in the extraction of size and shape characteristics of segmented **epidermal pavement (puzzle-like) cells**.

Платформы фенотипирования растений -

аппаратно-программные комплексы, обеспечивающие стандартизацию условий, инсталляцию растений, а также сбор данных, характеризующих морфологические и физиолого-биохимические параметры фенотипа.

Феномные платформы могут включать боксы для культивирования растений, измерительное оборудование (сенсоры и датчики), системы перемещения, автоматического взвешивания, полива и освещения, комплекс поддержания микроклимата, системы компьютерного управления процессами, хранения и обработки информации, программное обеспечение для глубокого анализа изображений.

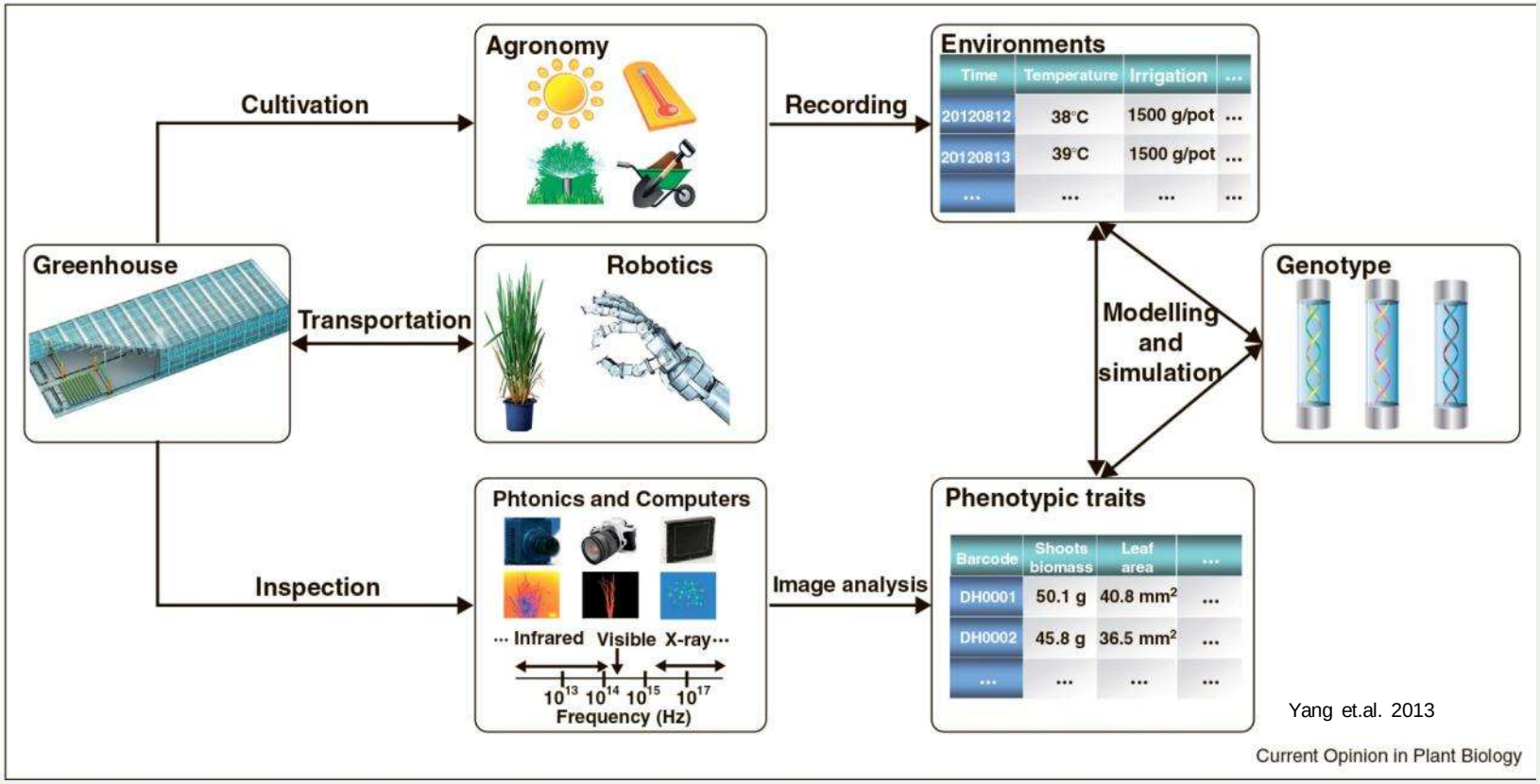
Количество регистрируемых и анализируемых параметров зависит от насыщенности феномных платформ регистрирующими устройствами:
RGB, гиперспектральные и тепловые/термальные камеры, флуориметры, 3D-сканерами, лидары, X-RAY, магнитно-резонансные, позитронно-эмиссионные томографы и др.

Фенотипическая платформа (PhenoArch, INRA, France), на которой выращиваются 1680 растений в контролируемых условиях (влажности почвы, температуры, скорости транспирации). Датчики постоянно регистрируют освещенность, относительную влажность, температуру воздуха и листьев и транспирацию.

Tardieu F. et al., “Plant Phenomics, From Sensors to Knowledge” Current Biology. 2017.

Наиболее популярными феномными платформами являются **LemnaTec** (Германия), **Photon Systems Instruments** (Чехия), Qubit Phenomics (Канада), Phenomix (Франция), Phenospex (Австралия), Delta-T Devices Ltd. (Великобритания), Heinz Walz (Германия), WPS (Голландия), CropDesign (BASF, отделение в Бельгии), WIWAM (Бельгия), Rothamsted Research (Великобритания) и VBCF (Австрия). На их долю приходится почти 100% феномного оборудования.

Платформы по фенотипированию



С использованием робототехники, растения подвергаются неинвазивному сканированию с использованием фотоники и компьютеров.

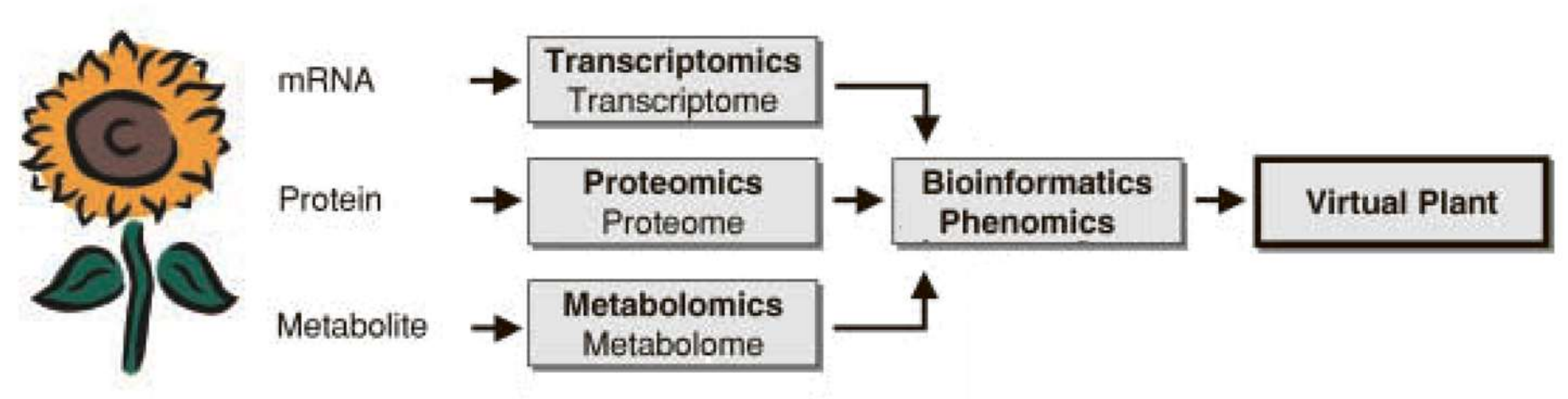
После анализа изображений, количественные параметры растения, данные о параметрах среды (освещение, температура, полив, обеспеченность удобрениями), а также генотип растения анализируются с использованием баз данных.

Затем строится модель, которая прогнозирует фенотипическое поведения генотипов в различных экологических условиях.

В современных феномных комплексах количество исследуемых образцов различных видов может исчисляться миллионами.

Yang e.a. Plant phenomics and high-throughput phenotyping: accelerating rice functional genomics using multidisciplinary technologies // Current Opinion in Plant Biology 2013, 16:180–187.

Схема, показывающая как интеграция разных уровней функциональной геномики приводит к созданию виртуального растения (по Holtorf et al. 2002; с модификациями)



Феномика и биоинформатика

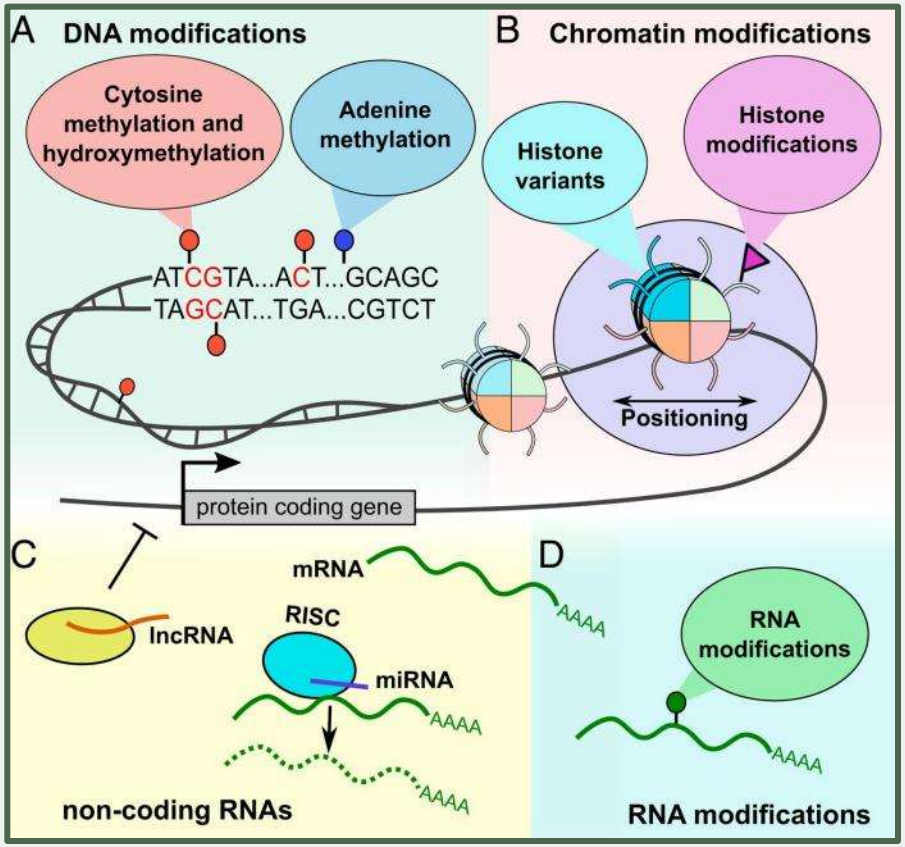
интегрируют данных транскриптомики, протеомики и метаболомики для получения целостного представления о функционировании растения.

Эпигенетика (эпигеномика)

Основные механизмы эпигенетической регуляции

- Основным носителем информации о том, как растению пройти путь от семени до семени является ***геном***.
- Однако геном функционирует в некой среде, которая не может не оказывать влияние на характер экспрессии его генов.
- Поэтому реализация информации, заключенной в геноме, будет зависеть не только от нуклеотидных последовательностей конкретных генов, но также и **от внешних условий**.
- К числу основных механизмов эпигенетической регуляции относятся: 1. Энзиматическое метилирование ДНК; 2. Гистоновый код; 3. Процесс РНК-интерференции.

У высших растений имеются все основные механизмы эпигенетической регуляции, характерные для эукариот, а также выявлены уникальные механизмы, не известные для животных организмов.

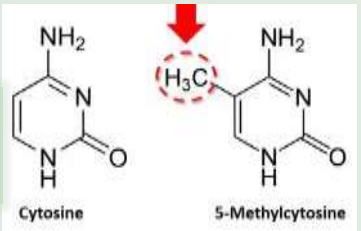


Aristizabal et al., PNAS, 2019

- **Метилирование (деметилирование)** ДНК

CG

CHG (H = A, T, C)
CHH (H = A, T, C)



У эукариот 5-метилцитозин

У прокариот N(6)-метиладенин

- **Модицикации гистонов и ремоделироние хроматина**
  - ацетилирование (деацетилирование) гистонов
  - метилирование (деметилирование) гистонов
  - фосфорилирование гистонов
  - убиквитинирование, СУМОилирование гистонов
  -- включение белков, участвующих в сборке нуклеосом и др. комплексов ремоделинга хроматина

- **РНК-зависимый сайленсинг** (miRNA, siRNA, non-codingRNAs ect).

Обычно все эти процессы взаимосвязаны и иногда даже частично взаимозаменяемы, что обеспечивает надежность реализации эпигенетической сигнализации. Чаще всего эти процессы связаны с изменением структурной и функциональной организации хроматина.

Впервые термин «**Эпигенетика**» был введен английским эмбриологом и генетиком Конрадом Уоддингтоном (C. Waddington, 1957) для описания наблюдающихся в ходе развития (эмбриогенеза изменений экспрессии генов.

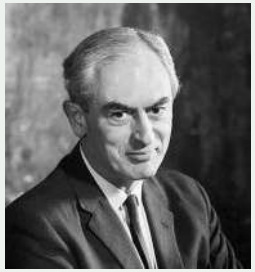
"…взаимодействия между генами и их производными, которые приводят к формированию фенотипа"

Конрад Уоддингтон
английский генетик

Этот термин был им предложен как среднее между «генетикой» и аристотелевским «**эпигенезом**» — учением о последовательном эмбриональном развитии.
Когда Уоддингтон ввёл этот термин, физическая природа генов не была до конца известна, поэтому он использовал его в качестве концептуальной модели того, как гены могут взаимодействовать со своим окружением при формировании **фенотипа.**

"…формирование и наследование признаков, обусловленное молекулярными процессами, регулирующими функционирование генов и генных продуктов без изменения первичной структуры и количества ДНК" (О.Н.Тиходеев, 2015).

Очень емкое определение термина «***эпигенетика»*** принадлежит Нобелевскому лауреату Питеру Медавару (Peter Brian Medawar):
«**Генетика предполагает, а эпигенетика располагает**».



Питер Брайан Медавар

NP в области трансплантологии «За открытие искусственной иммунной толерантности».

Эпигенетика изучает стабильные, передаваемые в длинном ряду клеточных делений и даже в ряду поколений изменения уровня экспрессии генов, не связанные с изменениями последовательности нуклеотидов в ДНК.

Поэтому **Фенотип** представляет собой продукт совокупной реализации не только **Генома**, но и **Эпигенома**.

Один из наиболее известных эпигенетических феноменов, который впервые был описан Барбарой МакКлинток – это периодическое освобождение транспозонов от гетерохроматинового подавления их активности.

Анализируя изменения пигментации зерен индийской кукурузы и используя только микроскоп для исследования хромосом она обнаружила **явление перемещения генов в хромосомах**, вызывающее изменение цвета зерновок.

МакКлинток выделила два перемещающихся гена (*Ac-Activator* и *Ds-dissociation*), которые могут перемещаться по хромосоме и вызывать изменения в поведении соседних генов, отвечающих за пигментацию. Т.о. она открыла т.н. «прыгающие» гены – **транспозоны**.

При этом она открыла **эпигенетическое явление, выходящее за рамки генетики**, поскольку генетические законы Менделя не объясняли изменения цвета зерновок кукурузы, связанных с перемещением по хромосоме генов.

McClintock B (1950) The origin and behavior of mutable loci in maize. PNAS 36(6): 344–355.

Барбара МакКлинток

Barbara McClintock in the laboratory at Cold Spring Harbor, 1947.

McClintock accepting her Nobel Prize, 1983

В 1951 г. она доложила об исследовании изменчивости генов на ежегодном симпозиуме в Колд Спринг Харбор, но столкнулась не только с полным непониманием, но и с неприятием. Концепция транспозиции не укладывалась в рамки генетики. А описание ею мутаций, которые включают и выключают гены, противоречило существующей идее о том, что мутации навсегда инактивируют гены.

Разочаровавшись в своих коллегах, она перестала публиковать результаты своей работы, хотя продолжала заниматься исследованиями.

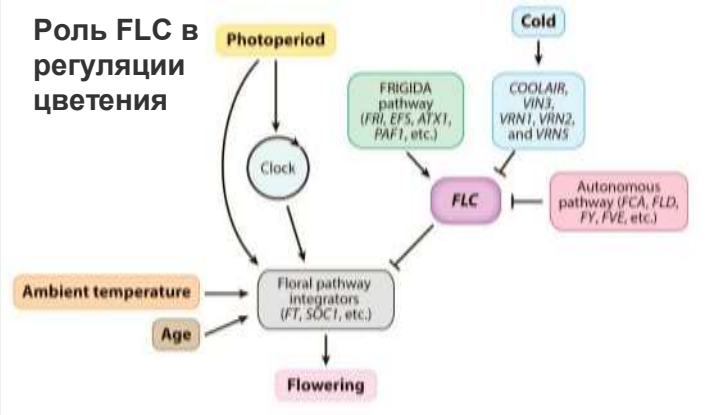
Только в 1970-х годах, после того как биологи определили, что генетическим материалом является ДНК, ученые стали проверять ее открытия и, наконец, пришло признание; Макклинток была завалена наградами и получила в 1983 г. Нобелевскую премию по физиологии и медицине «За открытие мобильных генетических элементов».

Регуляция цветения FLC

Еще одним примером эпигенетической регуляции развития растений является репрессия гена, который кодирует фактор транскрипции FLC (flowering locus C), ингибирующий цветение.

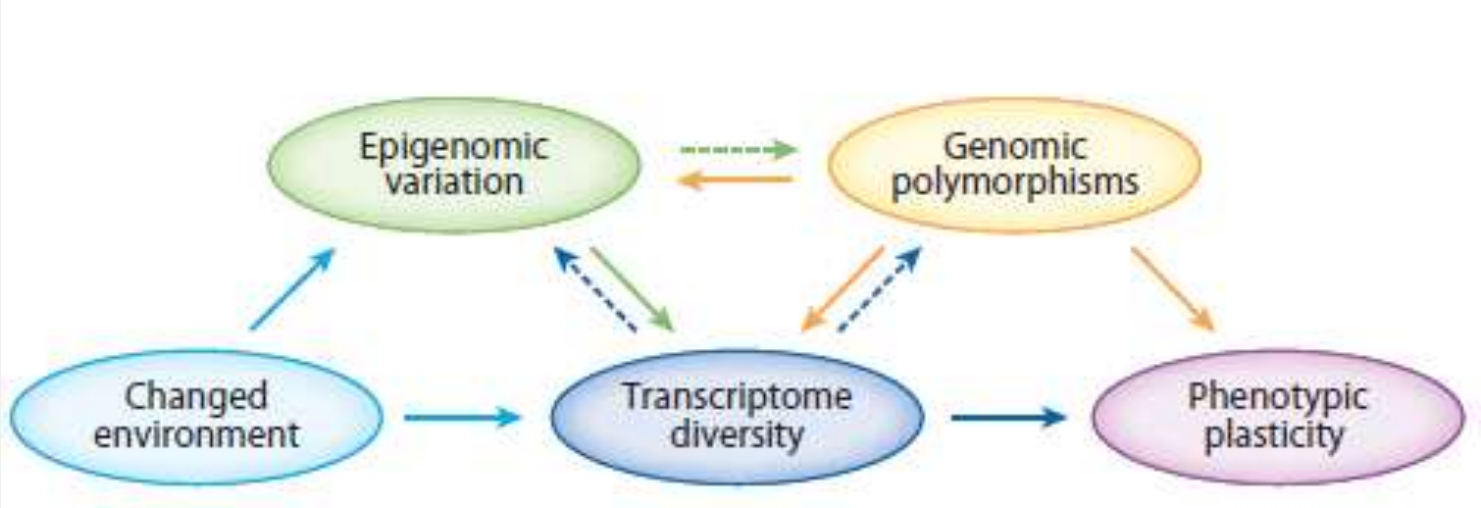
Репрессия этого гена (и снятие его ингибирующего эффекта на цветения) происходит в процессе вернализации (яровизации), т.е. обработке холодом.

Репрессия гена *FLC* сохраняется всю жизнь растения (независимо от того, при какой температуре оно в дальнейшем выращивается).



Whittaker, Dean, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2017.

Взаимодействие вариаций генома, эпигенома и транскриптома, их связь с сигналами окружающей среды и фенотипом (He ea., 2011) .



«…Стабильное аллельное ***эпигенетическое наследование*** *эффективно дополняет наследственную роль ДНК, представляя дополнительный молекулярные механизмы, лежащие в основе их практически неограниченного разнообразия»* (Тиходеев, 2018).

Все основные эпигенетические механизмы, которые на сегодняшний день широко известны у эукариот, успешно подтверждены на растениях (Pikaard, Scheid, 2014; Yamamuro et al., 2016; Лебедева и др., 2017).

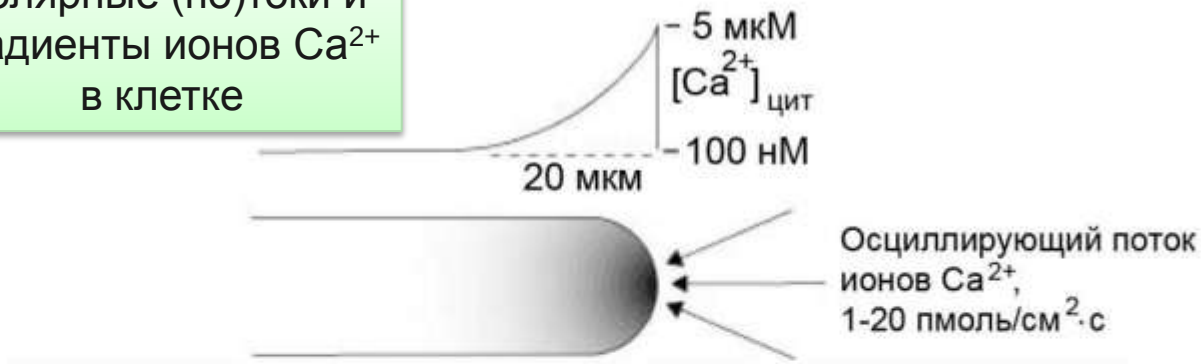
Метилирование ДНК, посттрансляционная модификация гистонов и взаимодействие с некодирующими РНК обеспечивают многофакторную и надежную основу для эпигенетической регуляции процессов развития и адаптации растений (Han et al.2019; Perrone and Martinelli 2020).

Визуализация биологических процессов-

важный элемент в системного подходе при изучении функций растительных организмов.

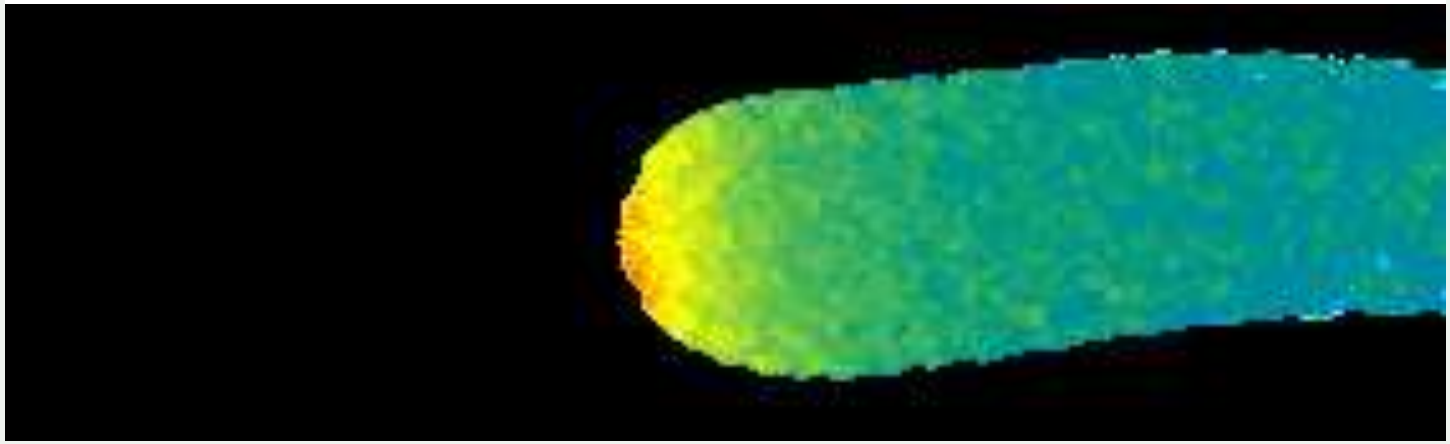
Визуализация биологических процессов

Полярные (по)токи и градиенты ионов Ca^{2+} в клетке

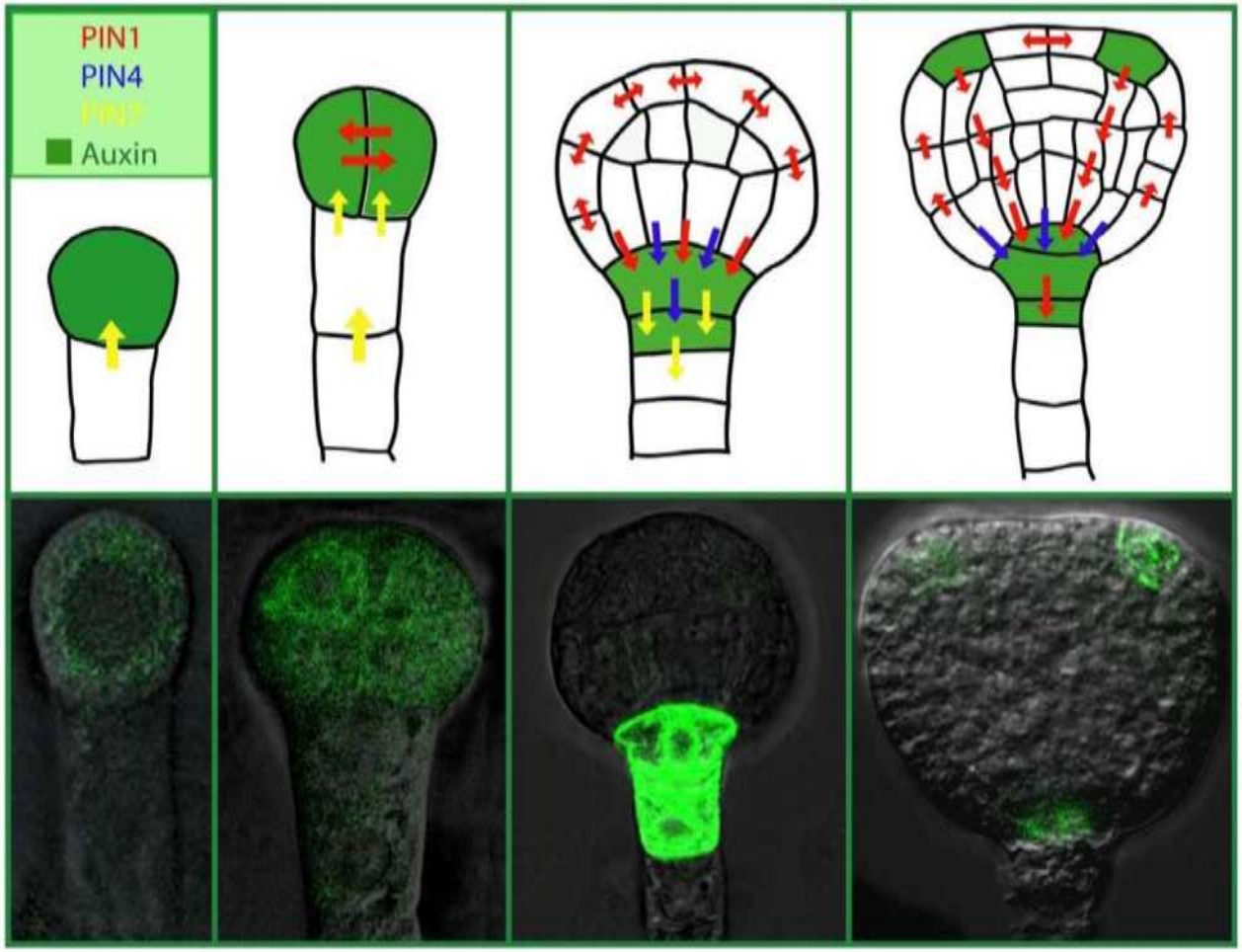


Градиент концентрации ионов Ca^{2+}, в апикальной части цитоплазмы растущей пыльцевой трубки (по Holdaway-Clarke, Hepler, 2003).

Стелками показан вход ионов Ca^{2+} в апикальную часть пыльцевой трубки.
Затемнение (darker shading) указывает на высокий уровень ионов Ca^{2+} в апикальной части.

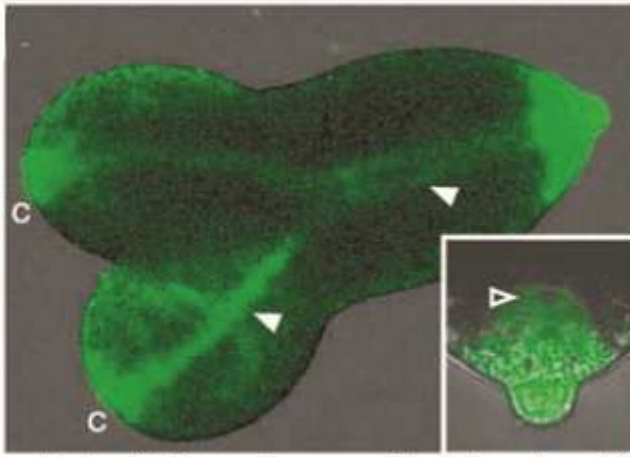


Транспорт ИУК - эмбриогенез



PIN-mediated auxin transport and distribution during Arabidopsis embryo development. The upper panel illustrates embryo development, auxin transport and distribution from the one-cell stage to the triangular-stage. PIN7 become expressed from the earliest stages of embryo development (marked by yellow arrow), later also PIN1 and PIN4 become present (marked by red and blue arrows, respectively). Notice that during embryo development the polarity of PIN localization changes. PIN expression correlates with the accumulation of auxin (highlighted in green) first in the apical cell and developing proembryo, and later at the basal part of the embryo with a maximum in the upper suspensor cell. The lower panel shows pictures of auxin accumulation as indirectly visualized by DR5rev::GFP. Images adapted from Friml et al (2003b) and Benkova et al (2003).

Michniewicz et al., 2007 The Arabidopsis Book



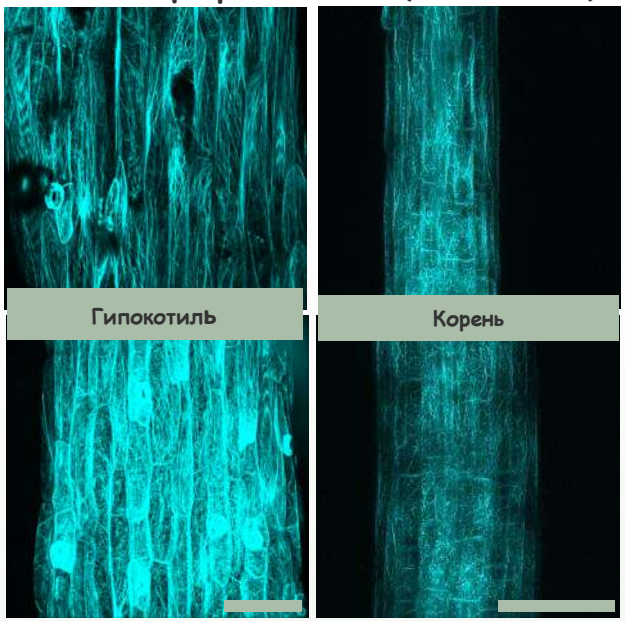
cotyledon (c) tips and provasculature (arrowheads) inset, maximum below the quiescent centre (open arrowhead). Torpedo stage (Friml et al., 2003)

Влияние 3D клиностатирования на организацию актиновых микрофиламентов и микротрубочек в проростках арабидопсиса

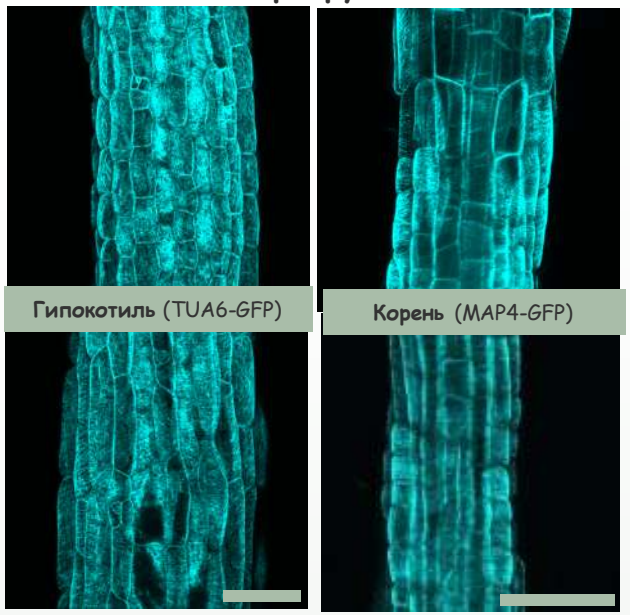
Г.А. Пожванов

Контроль

Микрофиламенты (GFP-fABD2)



Микротрубочки

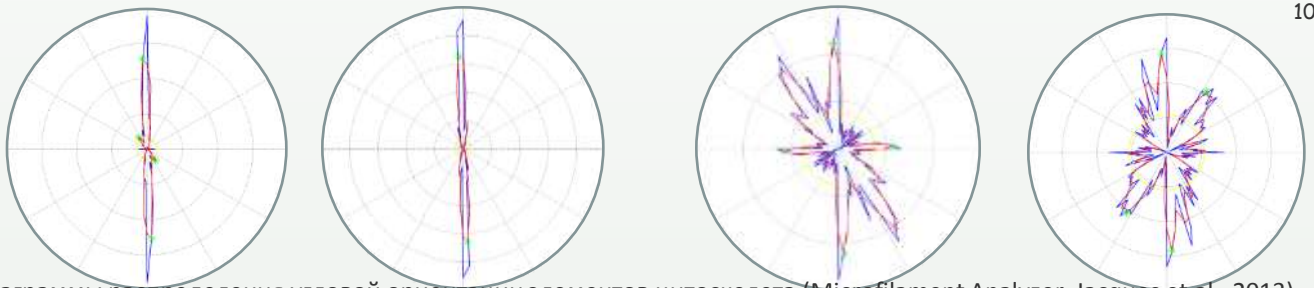


100 мкм

Конфокальные изображения актинового цитоскелета и микротрубочек в клетках арабидопсиса.

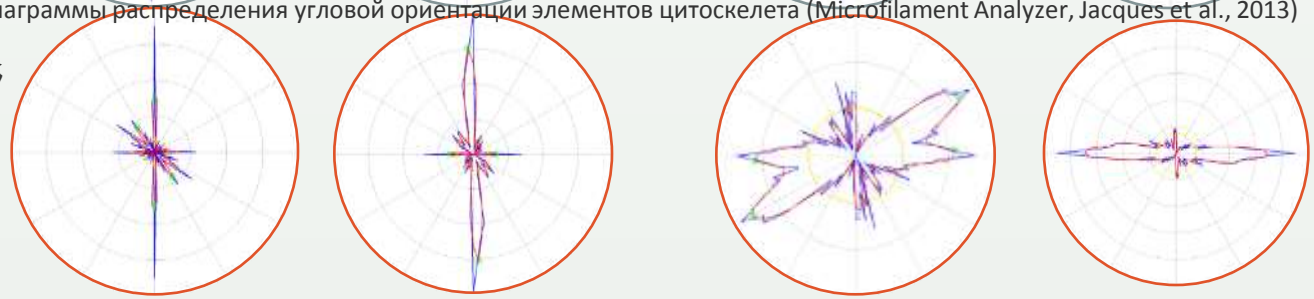
В гипокотиле организацию цитоскелета изучали в эпидерме и коре; в зоне растяжения корня – в ризодерме и коре.

Контроль



Круговые диаграммы распределения угловой ориентации элементов цитоскелета (Microfilament Analyzer, Jacques et al., 2013)

3D-клин-е



Контроль: Микрофиламенты ориентированы, в основном, аксиально. Микротрубочки имеют широкий спектр ориентации.

Клиностатирование: Повышение спектра ориентации микрофиламентов актина и микротрубочек.

Pozhvanov G., Sharova E., Medvedev S. (2021) Microgravity modelling by 3D-clinorotation leads to random organisation of microfilaments cytoskeleton in Arabidopsis seedlings. Functional Plant Biology.. 48(10): 1062-1073. doi.org/10.1071/FP20225.

«Человек есть то, что он ест»

Пифагор

«Проблема питания стала огромным пазлом, в котором сомкнуты мифы и достижения диетологии, «зеленая революция», рацион космонавтов и спортсменов, а также борьба с болезнями. В России проблема питания связана еще и с зависимостью от импорта и отсталостью сельского хозяйства».

Акад. РАН Н.А. Колчанов

Питание человека XXI века состоит

не только из натуральных продуктов, но также технологически измененных генетически модифицированных продуктов.

При этом доля продуктов и сырья, полученного из генно-модифицированных организмов (ГМО), будет постоянно возрастать.

С 1999 по 2016 год площади посевов ГМ-культур на возросли более чем в 100 раз и составили почти 180 миллионов гектар, то есть 12 % от всех возделываемых земель в мире.

Основной ГМ−культурой является соя, занимающая около 50 % от всех площадей под ГМО, на втором месте кукуруза (около 30 %), далее хлопок (15 %) и рапс (5 %). В России ГМ-культуры никогда не вводились в сельскохозяйственный оборот.

В 2016 г. принят Федеральный закон № 358, который ошибочно считают полностью запрещающим в России ГМО.
Однако это не так: не разрешается выращивать такие организмы и производить из них продукцию на территории нашей страны, но не запрещается импорт ГМО, а нашим ученым — их исследование.

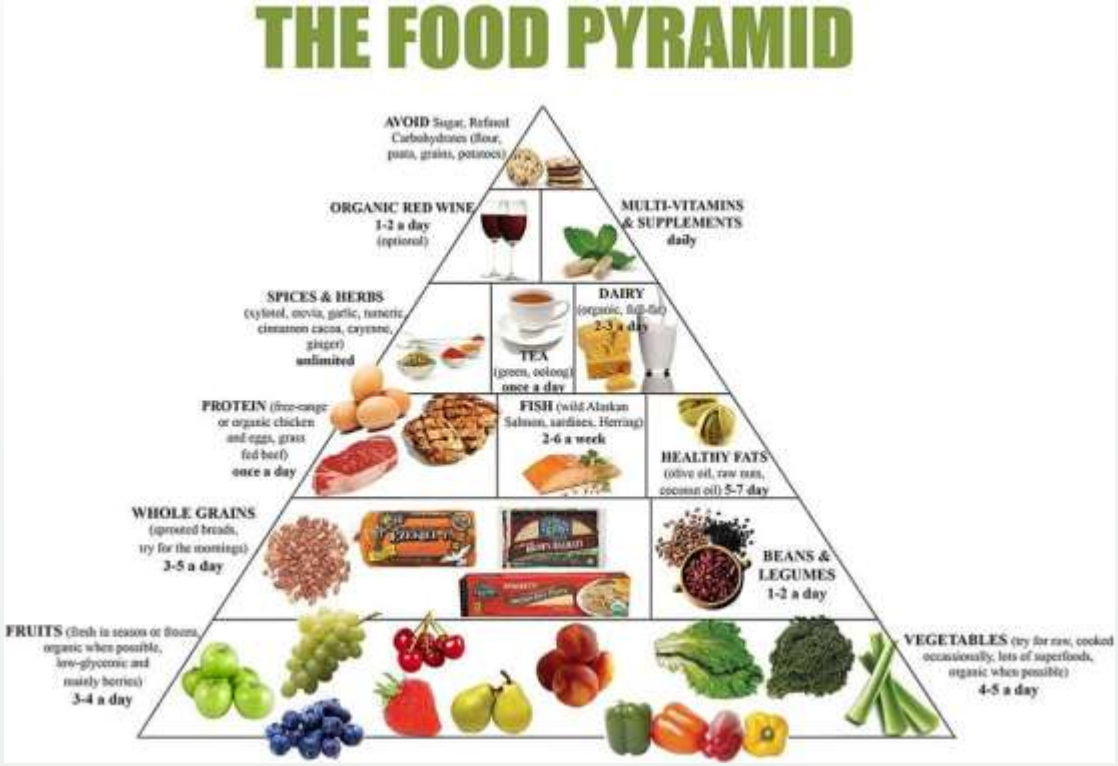
Запрет связан с тем, что «выращивание ГМО предполагает применение более высоких технологий, уровня культуры и дисциплины в с/х, которые пока в РФ отсутствуют»!!?

"Medicine is not health care, food is health care"

Martin C.& Li J., New Phytol (2017). doi: 10.1111/nph.14730

Растения вносят существенный вклад в здоровье через наши диеты, обеспечивая органическими соединениями и макроэлементами для энергии и роста, а также необходимыми витаминами и фитонутриентами, которые защищают нас от болезней.

Поэтому пищевая безопасность является глобальной проблемой, которая может быть решена в том числе с помощью метаболической инженерии растений для улучшения качества потребляемых пищевых продуктов.



https://www.teoinspiro.com/the-food-pyramid/

https://sanepidemstantsiya-ses.ru/analiz-pishhevyx-produktov

Биофортификация (биообогащение)

Биообогащенные культуры создаются с помощью различных подходов и технологий (трансгенными, агрономическими, селекционными и физиолого-биохимическими).

Большинство с/х культур характеризуется низким содержанием основных элементов питания. Поэтому в последнее десятилетие во многих селекционных программах для улучшения питательного профиля зернобобовых культур большое значение приобрело их **биообогащение**.
Основными целевыми пищевыми элементами являются железо, цинк, селен, йод, каротиноиды и фолаты.

Jha & Warkentin (2020). Plants. doi:10.3390/plants9010073

В последние годы компания HarvestPlus совместно с глобальными партнерами в развивающихся странах выпустил несколько биообогащенных бобовых культур, в том числе обыкновенную фасоль и чечевицу, что помогло преодолеть дефицит ряда питательных элементов.

HarvestPlus - www.harvestplus.org

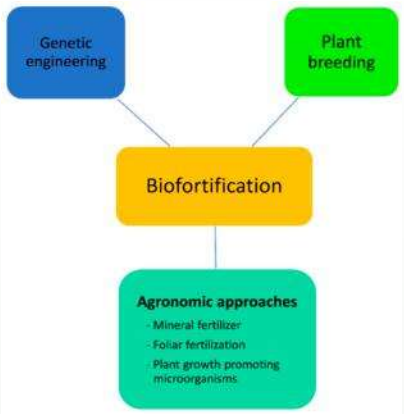
Относительно новым направлением в биологии растений является биофортификация (биообогащение, biofortification) — т.е. комплекс мер по улучшению питательных качеств культурных растений.

В процессе биофортификации происходит повышения биодоступности и концентрации питательных веществ в сельскохозяйственных культурах с помощью традиционной селекции растений, технологий рекомбинантной ДНК, а также варьирования режима минерального питания и применения синтетических регуляторов роста (Jha & Warkentin (2020, doi:10.3390/plants9010073).

Биофортификация отличается от традиционного обогащения продуктов в процессе их переработки, тем что обеспечивает повышенное содержание определённых ценных веществ (железо, цинк, селен, йод, каротиноиды и фолаты) в сельскохозяйственных культурах в процессе их выращивания.

Биофортификация применяется также к кормам животных, так как от питательности и экологической чистоты кормов зависит качество поступающих в пищу людям мясных продуктов. Следует различать биофортификацию, т.е. биообогащение пищевых продуктов и биологически активные добавки.

Технологические подходы, применяемые для улучшения питательных качеств культурных растений



Jha & Warkentin (2020). Plants. doi:10.3390/plants9010073

С/х культуры, при выращивании которых уже использована биофортификация

Garg ea. (2018) Frontiers in Nutrition. doi: 10.3389/fnut.2018.00012).

From genomes and phenomes to candidate genes

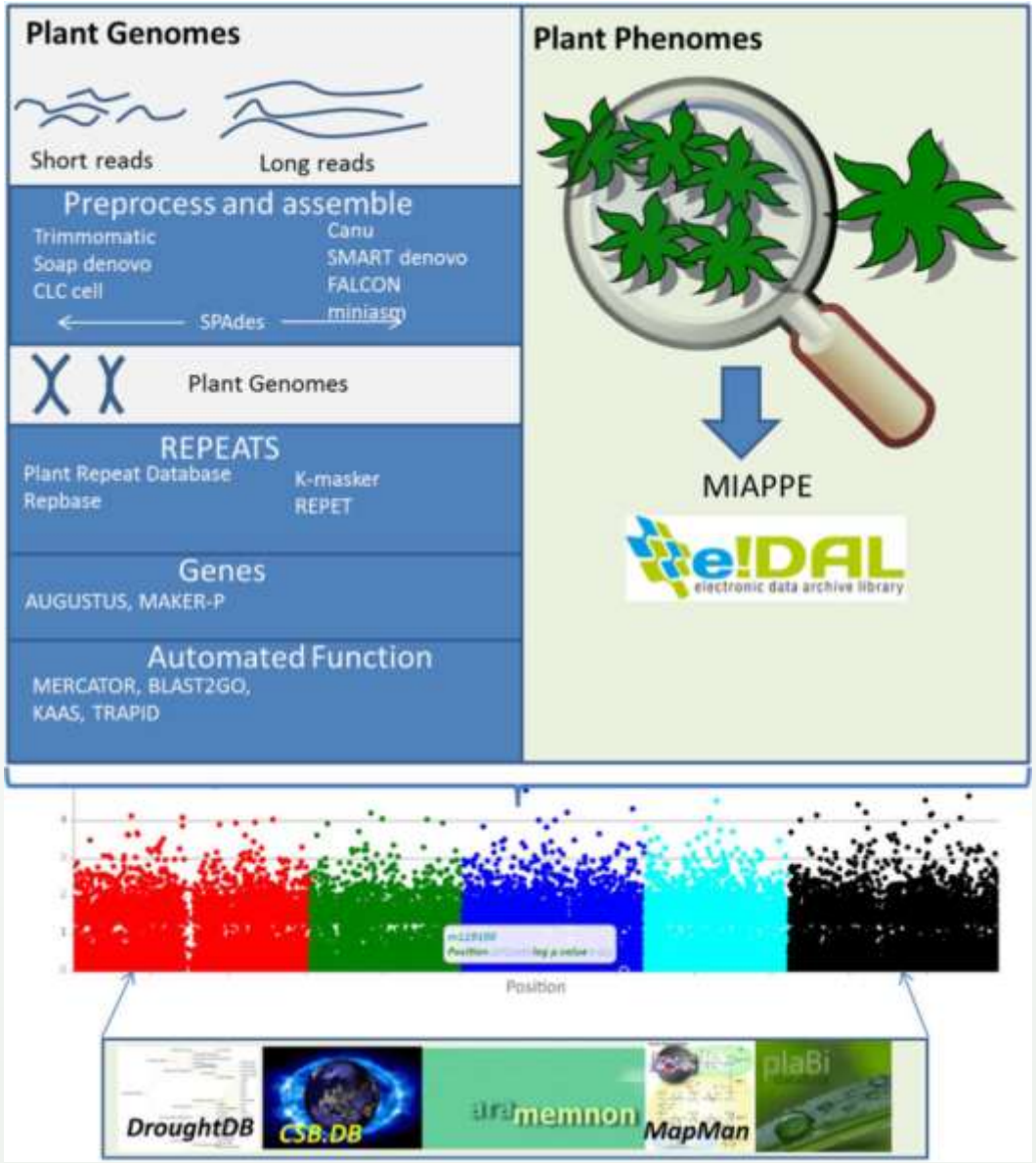


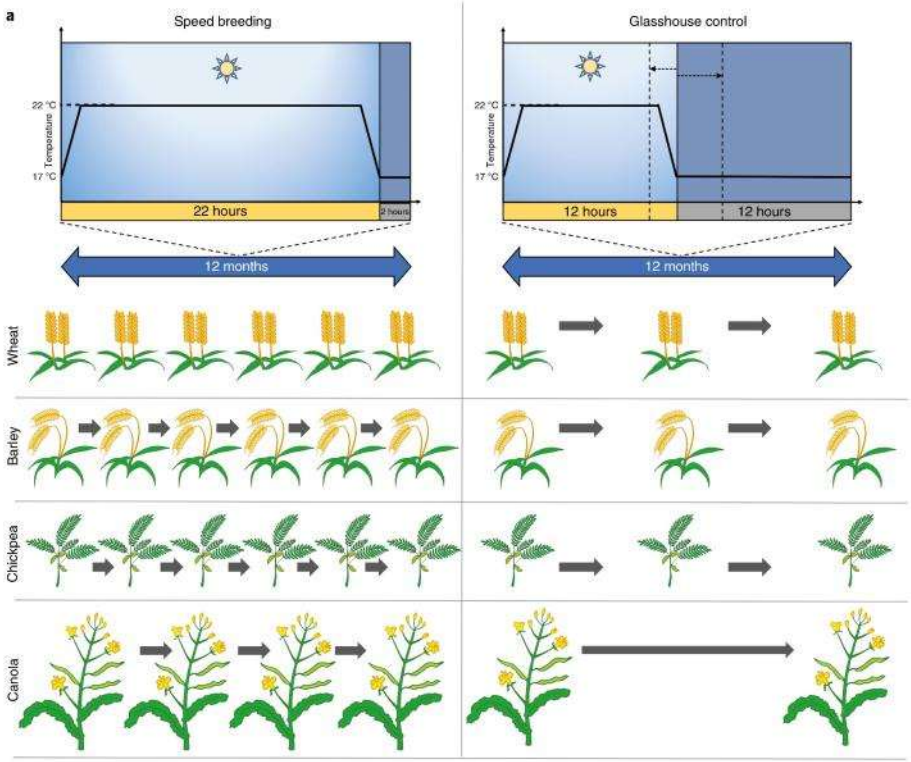
Fig. shows which tools one can typically use to assemble and annotate plant genomes and what standards are being developed for plant phenotyping. The analysis of genomes and phenotypes leads to candidate regions which can be further delineated.

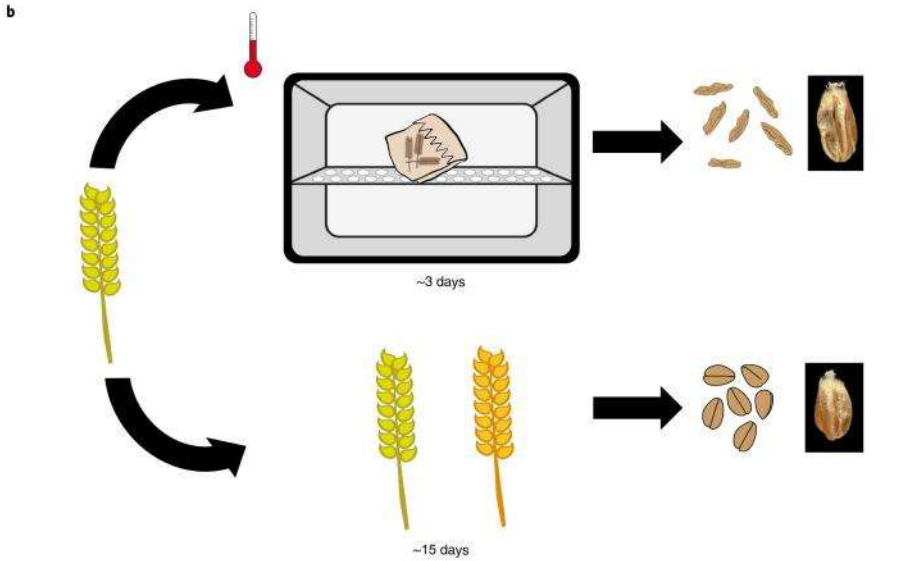
Bolger e.a. Journal of Biotechnology 261 (2017) 46–52.

В течение последних лет наблюдается резкое возрастание числа публикаций, сообщающих об успешном редактировании генома растений с помощью относительно простой и удобной системы CRISPR/Cas9, в том числе направленной модификации хозяйственно ценных генов возделываемых растений (картофель, капуста, томат, кукуруза, рис, пшеница, ячмень, соя, сорго).

Эти публикации демонстрируют возможность получения с помощью системы CRISPR/Cas9 нетрансгенных растений со специфическими заданными мутациями, стабильно наследуемыми в поколениях, что открывает перспективу для получения сортов с заданными моно- и олигогенными признаками.

Ускоренная селекция





Для быстрой селекции ряда культурных растений разработана новая платформа, основанная на увеличении продолжительности ежедневного освещения растений, которая позволяет всего за **8 недель** получать новую генерацию пшеницы [Watson et al., 2018; Ghosh et al., 2018; Voss-Fels et al., 2019].

Dr Lee Hickey, Principal Research Fellow Centre for Crop Science, Univ of Queensland, Brisbane, Australia.

Показано, что увеличение продолжительности светового дня может приводить к получению 4-6 поколений в год растений мягкой пшеницы Triticum aestivum, твердой пшеницы Triticum durum, ячменя Hordeum vulgare и гороха Pisum sativum вместо 2–3 поколений при обычных условиях выращивания. При этом особенно эффективно применение светодиодов, которые позволяют модифицировать освещение не только по интенсивности, но и по спектральному составу.

Быстрое размножение ускоряет время генерации основных сельскохозяйственных культур селекции:

(a) по сравнению с теплицей с естественным переменным фотопериодом (10–16 часов), где в год можно достичь только 2–3 поколений пшеницы, ячменя, нута и канолы (справа), ускоренное размножение дает 4–6 поколений этих посевов в год (слева).

(b) Сбор незрелых колосьев и сушка их в сушильном шкафу (~ 3 дня) обеспечивает более быструю цикличность семян по сравнению с обычным процессом созревания, который занимает около 15 дней.

Watson A., Ghosh S., Williams M.J., Cuddy W.S., Simmonds J., Rey M.-D., Hatta M. A., Hinchliffe, A., Steed A., Reynolds D.… Hickey L.T. Speed breeding is a powerful tool to accelerate crop research and breeding. Nat Plants. 2018. V. 4. P. 23–29.

Ghosh S., Watson A., Gonzalez-Navarro O.E., Ramirez-Gonzalez R.H., Yanes L., Mendoza-Suárez M., Simmonds J., Wells R., Rayner T., Green P… Hickey L.T. Speed breeding in growth chambers and glasshouses for crop breeding and model plant research. Nat Protoc. 2018. V.13. P. 2944–2963.

K.P.Voss-Fels ….Lee T.Hickey (2019) “SpeedGS” to Accelerate Genetic Gain in Spring Wheat. In: “Applications of Genetic and Genomic Research in Cereals”. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. P. 303-332. doi.org/10.1016/B978-0-08-102163-7.00014-4.

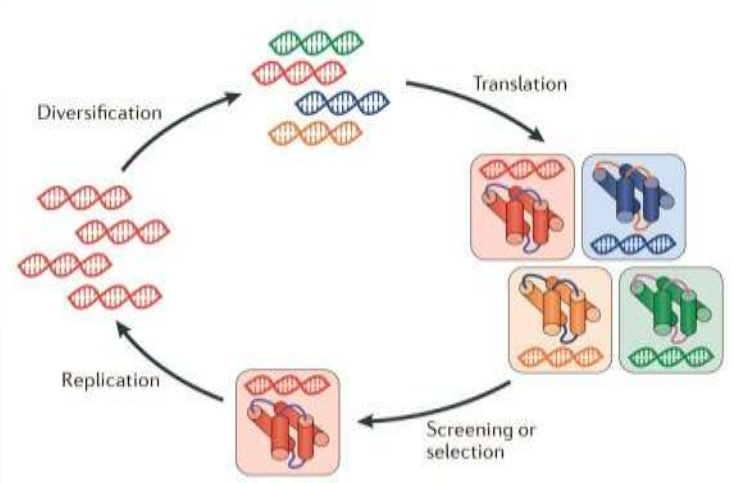
Направленная эволюция (directed evolution)

Направленная эволюция - это мощный подход, используемый в белковой инженерии, для создания белков с новыми химическими и физическими свойствами. Он имитирует принципы дарвиновской эволюции, позволяя избирательно отобрать популяции молекул, несущих случайные генетические изменения в ДНК с желаемыми свойствами.

Направленная эволюция имитирует процесс естественного отбора, чтобы направить белки или нуклеиновые кислоты к определенной пользователем цели.

Направленная эволюция оказалась эффективной стратегией для улучшения или изменения активности биомолекул для промышленного, исследовательского и терапевтического применения. Методология направленной эволюции белков включает создание генетического разнообразия (которого можно добиться, например, сомаклональной изменчивостью или другими методическими приемами) и последующую идентификацию различных вариантов белков с желаемыми свойствами.

Ключевые шаги в цикле направленной эволюции белков



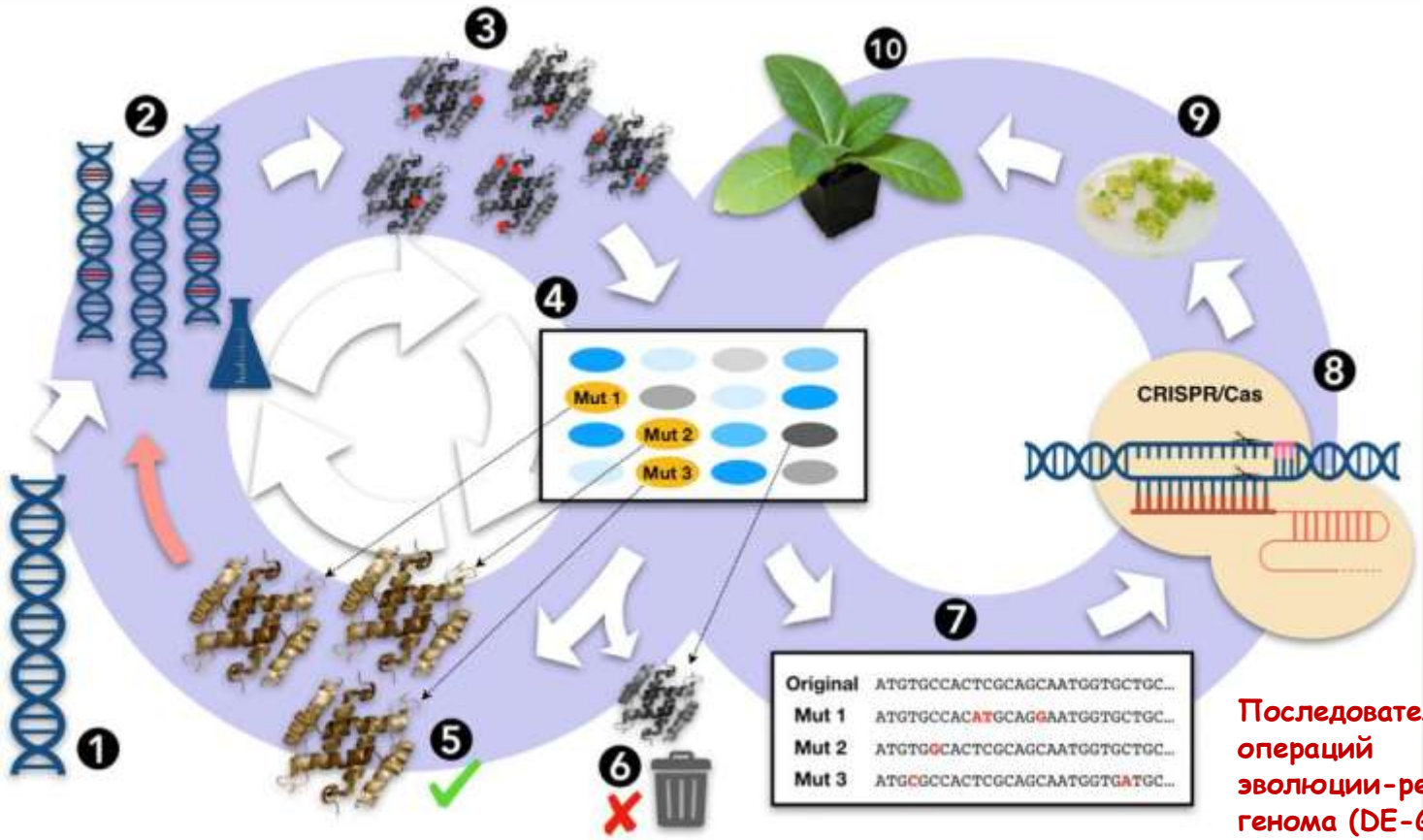
Процесс направленной эволюции в лаборатории имитирует процесс биологической эволюции. Разнообразная библиотека генов транслируется в соответствующую библиотеку белков и проверяется (или отбирается) для функциональных вариантов таким образом, чтобы поддерживать соответствие между генотипом (гены) и фенотипом (генные продукты и их функции). Эти функциональные гены реплицируются и служат отправными точками для последующих раундов диверсификации и скрининга или отбора

(Packer & Liu. NATURE REVIEWS | GENETICS. 2015.16: 382) .

В работе Gionfriddo (2019) предлагается объединить технологии направленной эволюции и редактирования генома (directed evolution-genome editing, **DE-GE**). Авторы считают, что **технология DE-GE** обладает потенциалом для создания исследовательской платформы, которая создаст условия для новой «зеленой» революции в сельском хозяйстве, которое не только повысить продовольственную безопасность и качество продуктов питания, но будет также устойчиво к изменения климата.

Объединение технологий направленной эволюции и редактирования генома (directed evolution-genome editing, DE-GE)

Gionfriddo et al (2019): **Directed Evolution of Plant Processes: Towards a Green (R)Evolution?**



Gionfriddo с коллегами (2019) предлагают объединить технологии направленной эволюции и редактирования генома.

Итальянские ученые считают, что технология DE-GE обладает потенциалом для создания исследовательской платформы, которая создаст условия для новой «зеленой» революции в сельском хозяйстве.

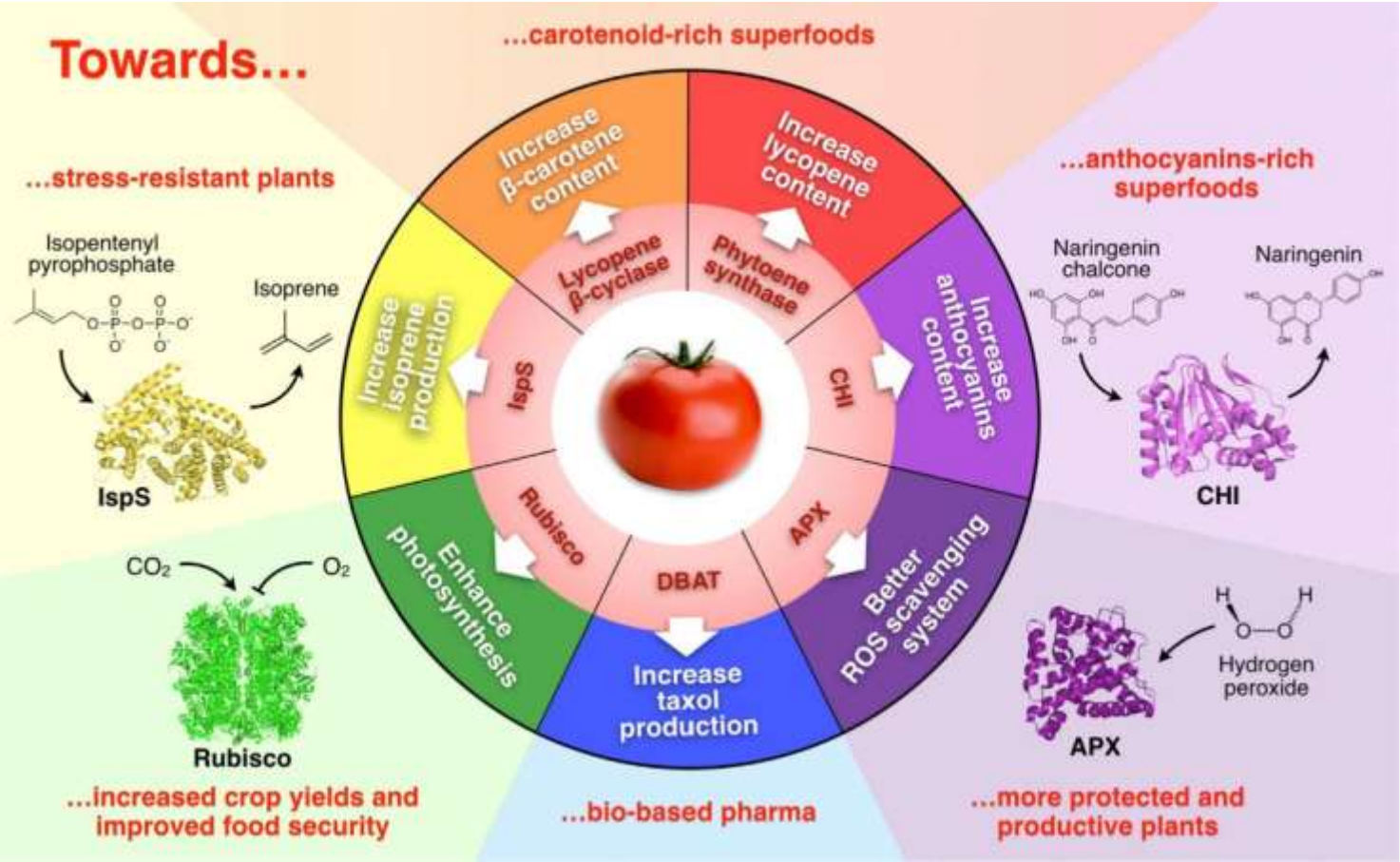
Новые технологии позволят не только резко повысить продовольственную безопасность и качество продуктов питания, но будут также устойчивы к изменениям климата.

Последовательность операций направленной эволюции-редактирования генома (DE-GE)

(1) The gene that encodes the enzyme to be improved is selected. (2) Mutagenesis of the selected gene is achieved in vitro [e.g., using error-prone (ep) -PCR or DNA shuffling] and a library of mutated genes is created. (3) Mutated gene libraries (nucleotide substitutions are represented by red dots) are transformed into a microorganism (e.g., Escherichia coli) and the mutated enzymes are expressed.
(4) A (preferably high-throughput) screen for the desired catalytic phenotype is used to identify the beneficial mutant enzymes, and (5) these are subjected to further cycles of random mutagenesis and screening to increase enzyme performance, whereas (6) enzymes with reduced fitness are discarded.
(7) Selected enzymes are sequenced to identify the altered nucleotides (red letter in the figure). (8) Nucleotide changes encoding desired enzyme amino acid substitutions are introduced into the plant genome using the site-directed nuclease (SDN)-2 mode of CRISPR/Cas, and (9) plants are propagated in vitro to generate (10) mature transformed plants for molecular, biochemical, and physiological (growth chamber, field) analysis.

Gionfriddo et al. Trends in Plant Science (2019). doi.org/10.1016/j.tplants.2019.08.004.

Plant pathways where directed evolution-genome editing (DE-GE) may be usefully applied



Examples of how DE-GE could help to increase the yield of useful secondary metabolites or to improve primary metabolism in plants.

Directed evolution (DE): a gene mutation and selection technology based on Darwinian evolution to generate protein variability and select for enzymes with desired catalytic properties.

Genome editing (GE): methods to introduce precise modifications into a genome. Traditional methods include zinc-finger nucleases (ZFNs) and transcription activator-like effector nucleases (TALENs), and the more recently discovered clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) method provides superior gene-editing precision and efficiency that has revolutionized numerous research fields, including plant transformation.

- Working on lycopene b-cyclase, phytoene synthase, and chalcone isomerase (CHI) may help to increase plant production of β-carotene, lycopene, and anthocyanins, respectively.
- Increasing the catalytic activity of isoprene synthase (IspS) and 10-deacetylbaccatin III-10-β-Oacetyltransferase (DBAT) may trigger isoprene and taxol production, respectively.
- Enhancing the affinity/resistance of ascorbate peroxidase (APX) to hydrogen peroxide will increase plant resilience to stress, and Rubisco with improved carboxylation properties is predicted to increase agricultural yield.

Gionfriddo et al. Directed Evolution of Plant Processes. Trends in Plant Science (2019). doi.org/10.1016/j.tplants.2019.08.004

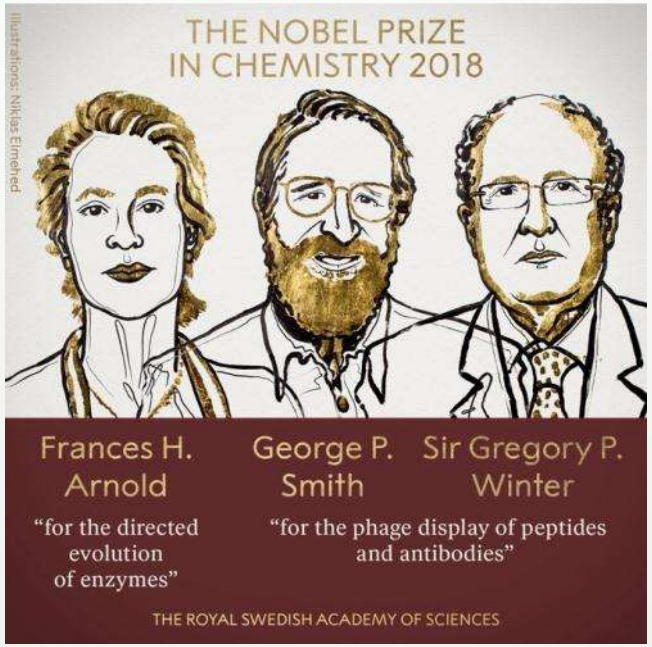
В 2018г Нобелевская премия по химии году присуждена ученым Фрэнсису Арнольду «За направленную эволюцию ферментов» и Джорджу Смиту и Грегори Винтеру «За фаговый дисплей антител и пептидов»

Направленная эволюция белков-ферментов — это комплекс лабораторных процедур с целью ускорить эволюционный процесс изменения и отбора молекул (в данном случае белков ферментов) с улучшенными, желаемыми и новыми свойствами.
Сначала выбираются исходные, наиболее подходящие белковые молекулы, затем в кодирующую их последовательность ДНК вводятся продуманные или случайные изменения.
Модифицированные белки анализируются: из них отбираются наилучшие варианты.

Затем процедура искусственного мутагенеза повторяется для уже отобранных вариантов молекул, и из них вновь отбираются самые подходящие — и так до тех пор, пока не будут получены варианты молекул ферментов с желаемыми свойствами: например, повышенной ферментативной активностью, активностью в отношении новых субстратов, способностью катализировать новые химические реакции или уже известные реакции.

Благодаря направленной эволюции новые белки с улучшенными и полезными свойствами (термостабильность, энантиоселективность, субстратная специфичность, растворимость) могут быть получены без какого-либо предварительного знания информации о структуре фермента.

Arnold F.H. (2018) Directed evolution: bringing new chemistry to life. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 57, 4143.



Технология фагового дисплея — это очень эффективный метод для проведения массового параллельного анализа и отбора наиболее перспективных вариантов белков, пептидов или рекомбинантных антител, специфически связывающих определенную мишень.
Одновременно с этим функциональным отбором определяют и ДНК, кодирующую эти связывающие белки. На основе кодирующей ДНК затем получают клетки-продуценты соответствующих белков с искомыми свойствами.

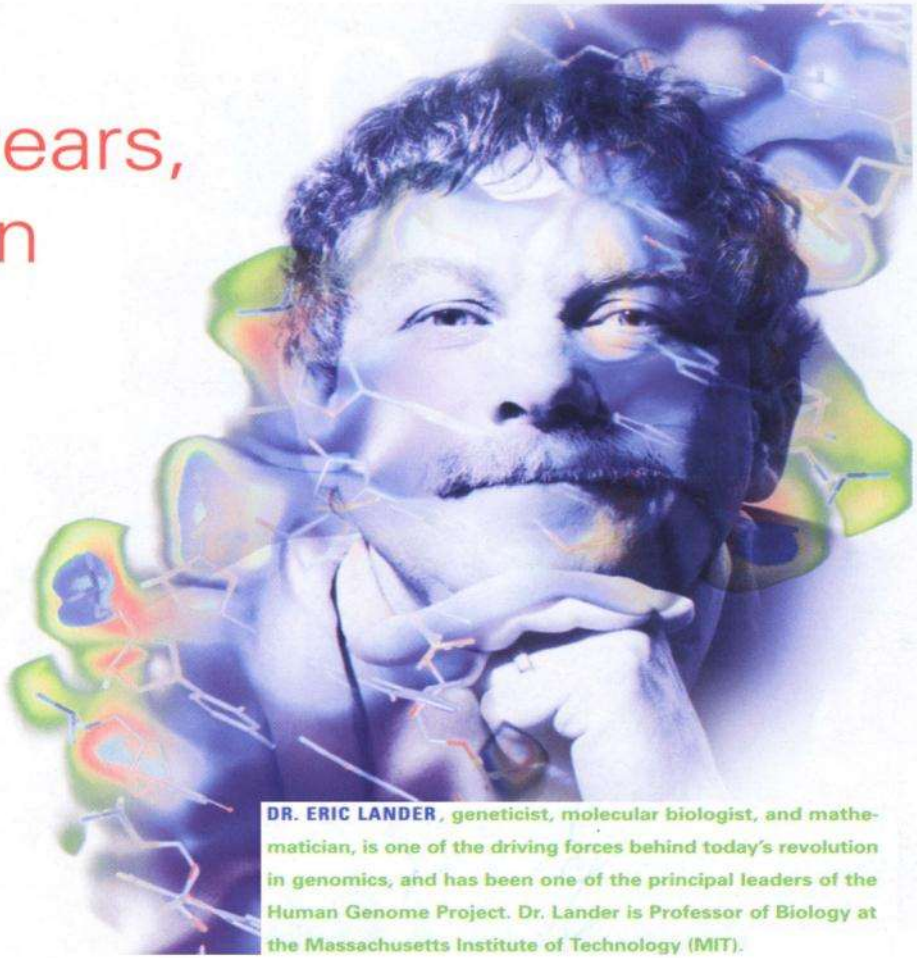
Фаговый дисплей основан на принципе физического соединения гена и кодируемого полипептида в одной фаговой/вирусной частице, а также на специфическом аффинном обогащении. В ходе обогащения полипептид (на поверхности фага) связывается с заданной мишенью. Затем следует амплификация — размножение в бактериальной культуре фагов, которые несут в составе белка на своей поверхности встроенный чужеродный полипептид с требуемыми для специфического связывания свойствами.

Сейчас эта эффективная технология активно используется практически во всех биотехнологических компаниях для создания новых поколений диагностических и иммунотерапевтических препаратов.

"For the last three and a half billion years, evolution has been taking notes."

"It tries experiments. It wakes up each morning, does a little mutagenesis, changes a nucleotide here and there, and sees how it works. If it's a success, it keeps the notes. In this notebook, we have all of the information of the greatest experimental tinkerer ever."

"Biology is undergoing one of the most fundamental revolutions that any science has seen. It's changing from a purely lab-based science to an information-based science. Where 20–30 years ago a biologist would largely rely on data generated in his or her laboratory, today it's hard to find anybody whose work isn't dependent on large quantities of data generated elsewhere. The whole 20th century can be read, in some sense, as the prelude to this informational biology. And what it's done is to hand the next generation of scientists the keys to the most remarkable library of information on this planet."



DR. ERIC LANDER, geneticist, molecular biologist, and mathematician, is one of the driving forces behind today's revolution in genomics, and has been one of the principal leaders of the Human Genome Project. Dr. Lander is Professor of Biology at the Massachusetts Institute of Technology (MIT).

«Биология подвергается одной из наиболее фундаментальных революций, которой пока не наблюдалось ни в одной из наук. Она трансформируется от чисто лабораторной науки в науку, основанную на информационных технологиях….
Всё 20-е столетие можно рассматривать как некую прелюдию к этой информационной биологии. И то, что ещё осталось сделать – это передать последующим поколениям биологов ключи от самой замечательной библиотеки информации на этой планете».