

**Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«Московский физико-технический институт
(национальный исследовательский университет)»**

УТВЕРЖДЕНО

**Директор института нано-, био-,
информационных, когнитивных
и социогуманитарных наук и
технологий**

Т.Е. Григорьев

Рабочая программа дисциплины (модуля)

по дисциплине:	Метаболическая инженерия и геномное редактирование
по направлению:	Прикладные математика и физика
профиль подготовки:	Природоподобные технологии и биомиметический дизайн материалов и систем Физтех-школа природоподобных, плазменных и ядерных технологий им. И.В. Курчатова кафедра нано-, био-, информационных и когнитивных технологий
курс:	1
квалификация:	магистр

Семестр, формы промежуточной аттестации: 2 (весенний) - Зачет

Аудиторных часов: 30 всего, в том числе:

лекции: 30 час.

семинары: 0 час.

лабораторные занятия: 0 час.

Самостоятельная работа: 60 час.

Всего часов: 90, всего зач. ед.: 2

Программу составил: О.В. Березина, канд. биол. наук, доцент

Программа обсуждена на заседании кафедры нано-, био-, информационных и когнитивных технологий
18.03.2022

Аннотация

Метаболическая инженерия – целенаправленное изменение метаболических путей организма и перераспределение клеточных активностей путем перестройки энзиматических, транспортных и регуляторных функций клетки через использование рекомбинантных ДНК и других технологий. Метаболическая инженерия на практике подразумевает оптимизацию генетических и регуляторных процессов внутри клетки с целью увеличения продукции определенных соединений. Эти процессы представляют собой комплекс осуществляемых ферментами биохимических реакций, который позволяет клеткам конвертировать вещества – источники питания в соединения, необходимые для их жизнедеятельности, и целевые продукты. Метаболическая инженерия - мультидисциплинарная область, включающая в себя как биохимические, так и геномные, транскриптомные, протеомные, метаболомные исследования, анализ потоков метаболитов (flux analysis) и другие методологии системной биологии, необходимые для достижения практических целей биотехнологических производств.

С практической точки зрения важнейшим направлением исследований для развития метаболической инженерии является разработка и применение новых генетических инструментов для манипулирования с клетками. Благодаря своей простоте, эффективности и широким возможностям система CRISPR/Cas может быть использована для редактирования геномов микроорганизмов с целью направленного изменения их метаболизма и получения штаммов с заданными свойствами. Данный материал не претендует на полноту изложения. Некоторые вопросы в нем совсем не рассматриваются, другие изложены коротко и схематично. По каждому из направлений имеется, как правило, обширная специализированная литература, список которой приведен ниже.

1. Цели и задачи

Цель дисциплины

- изучение студентами основ метаболической инженерии и технологий геномного редактирования.

Задачи дисциплины

- формирование базовых знаний о принципах, методах и подходах метаболической инженерии;
- формирование базовых знаний об основных технологиях геномного редактирования, их возможностях и области применения.

2. Перечень формируемых компетенций

Освоение дисциплины направлено на формирование следующих компетенций:

Код и наименование компетенции	Индикаторы достижения компетенции
ОПК-5 Способен и готов к повышению квалификации, профессиональному росту и руководству коллективом в сфере своей профессиональной деятельности, толерантно воспринимая социальные, этнические, конфессиональные и культурные различия	ОПК-5.2 Владеет навыком руководства малым коллективом в сфере своей профессиональной деятельности
	ОПК-5.3 Стремится к получению новых знаний, профессиональному и личностному росту
ПК-2 Способен самостоятельно или в качестве члена (руководителя) малого коллектива организовывать и проводить научные исследования и их апробацию	ПК-2.1 Способен планировать и проводить научные исследования самостоятельно или в составе научного коллектива
	ПК-2.2 Способен проводить апробацию результатов научно-исследовательской работы посредством публикации научных статей и участия в конференциях

3. Перечень планируемых результатов обучения по дисциплине (модулю)

В результате освоения дисциплины обучающиеся должны знать:

- основные принципы, методы и подходы, используемые при конструировании микробных штаммов-продуцентов ферментов и метаболитов.
- основные реакции энергетического обмена и биосинтеза у бактерий;
- основные микробные платформы, используемые для конструирования рекомбинантных штаммов-продуцентов;
- основные технологии геномного редактирования;
- функции, механизм и область применения системы CRISPR-Cas.

уметь:

- производить выбор микробной платформы для синтеза целевого продукта;
- применять основные принципы направленной модификации метаболических путей для поиска оптимального пути синтеза целевого продукта;
- производить выбор генно-инженерного инструментария для конструирования штамма-продуцента;
- эффективно использовать современные информационные технологии и ресурсы для получения необходимых знаний по интересующей научной проблеме.

владеть:

- специальной терминологией в области метаболической инженерии и геномного редактирования;
- представлениями о методах генной инженерии, микробиологии, биохимии, биоинформатики, используемых для конструирования штаммов-продуцентов;
- представлениями о способах модификации уровня экспрессии генов.

4. Содержание дисциплины (модуля), структурированное по темам (разделам) с указанием отведенного на них количества академических часов и видов учебных занятий

4.1. Разделы дисциплины (модуля) и трудоемкости по видам учебных занятий

№	Тема (раздел) дисциплины	Трудоемкость по видам учебных занятий, включая самостоятельную работу, час.			
		Лекции	Семинары	Лаборат. работы	Самост. работа
1	Метаболическая инженерия: возможности, области применения и современные тенденции.	5			10
2	Разнообразие метаболизма микроорганизмов, используемых в биотехнологии.	5			10
3	Бактерии, дрожжи и грибы – основные микробные платформы метаболической инженерии; стратегии создания рекомбинантных штаммов.	5			10
4	Модификация свойств ферментов и частные примеры метаболической инженерии: конструирование штаммов-продуцентов ферментов, витаминов, оргкислот и спиртов, аминокислот, биополимеров.	3			10
5	Технологии геномного редактирования и их возможности.	3			5
6	Примеры технологий геномного редактирования бактерий.	3			5

7	Прокариотические антивирусные системы CRISP-Cas. Разработка методов редактирования геномов бактерий с помощью CRISPR-Cas.	3			5
8	Геномное редактирование и биобезопасность.	3			5
Итого часов		30			60
Подготовка к экзамену		0 час.			
Общая трудоёмкость		90 час., 2 зач.ед.			

4.2. Содержание дисциплины (модуля), структурированное по темам (разделам)

Семестр: 2 (Весенний)

1. Метаболическая инженерия: возможности, области применения и современные тенденции.

Клеточные «фабрики» - промышленное использование микробных штаммов для производства ферментов и метаболитов. Метаболическая инженерия - инструмент для получения микробов с заданными свойствами. Области применения и перспективы метаболической инженерии. Основные принципы направленной модификации метаболических путей: смещение равновесия и повышение скорости реакции (необратимые реакции, транспорт, сопряженные реакции, удельная активность и сродство ферментов к субстрату); модификация метаболических путей (транспорт субстрата в клетку, синтез предшественников, боковые пути синтеза, синтез кофакторов, транспорт продукта, неэкономные пути и футильные циклы). Поиск лимитирующей стадии. Поиск оптимального пути синтеза. Проточные и статические концентрации. Метабономика и потоки.

2. Разнообразие метаболизма микроорганизмов, используемых в биотехнологии.

Биохимический состав клетки. Пластический и энергетический обмен. Баланс углерода, энергии и восстановительного потенциала. Типы брожения и дыхания у основных промышленно-важных микроорганизмов.

3. Бактерии, дрожжи и грибы – основные микробные платформы метаболической инженерии; стратегии создания рекомбинантных штаммов.

Характеристика основных микробных платформ, их преимущества и недостатки. Принципы поиска и отбора генов-мишеней в геноме штамма-хозяина. Прямой отбор: по прототрофности, утилизации различных источников, устойчивости к целевому продукту, токсичным соединениям или антиметаболитам. Селекция и контрселекция. Косвенный отбор: по фенотипу, репортеру, тесту на активность. Поиск генов по базам данных, по комплементации неизвестной мутации, на основе N-концевой последовательности очищенного белка, по консервативной последовательности, на основе инсерционного мутагенеза, профиля транскрипции, протеома, путем секвенирования штамма. Протеомика. Геномика. Современные методы секвенирования. Транскриптомика. RT-PCR. Интерактомика. Основные этапы направленной модификации метаболизма микроорганизмов: выбор целевого продукта, выбор штамма-хозяина и генно-инженерного инструментария, анализ генома и «омикс»-данных, рациональный дизайн эксперимента, модификация метаболических путей, ферментативный процесс. Выращивание продуцентов в биореакторах: основные показатели, методики и особенности.

4. Модификация свойств ферментов и частные примеры метаболической инженерии: конструирование штаммов-продуцентов ферментов, витаминов, оргкислот и спиртов, аминокислот, биополимеров.

Модификация свойств ферментов: активация и инактивация, изменение субстратной специфичности оптимумов активности и термостабильности. Гомологичное моделирование пространственной структуры фермента. Сайт-направленный мутагенез на основе 3D-структуры белка и выравнивания. Конструирование химерных ферментов и шаффлинг библиотек. Конструирование штаммов для прямого отбора и скрининга по фенотипу. Направленная эволюция и селекция в ферментере. Использование платформы *Pichia pastoris* для гетерологичного синтеза промышленных ферментов. Конструирование штаммов-продуцентов рибофлавина на основе *Bacillus subtilis*. Конструирование микробных штаммов-продуцентов органических кислот и спиртов. Использование методов и подходов метаболической инженерии для разработки штаммов-продуцентов аминокислот. Создание продуцентов высокомолекулярных биополимеров.

5. Технологии геномного редактирования и их возможности.

Использование технологий геномного редактирования: достижения и перспективы. Геномное редактирование прокариот и эукариот. Сайт-направленный мутагенез, гомологичная рекомбинация, TALENs и ZFN нуклеазы для геной инженерии эукариот. CRISPR-Cas9 система. Геномное редактирование в метаболической инженерии. Модификация уровня экспрессии генов. Снижение экспрессии генов: нулевые и лики-мутации, делеции, репрессия, антисмысловой нокдаун. Повышение экспрессии генов: плазмидная амплификация, интегративная амплификация, замена промотора, «эффект положения», инактивация репрессора, замена сайта связывания рибосом, оптимизация кодонов, регуляция на уровне фермента и другие уровни регуляции. Температурочувствительные и ауксотрофные мутации. Транскрипционный и трансляционный фьюжн как инструменты отслеживания экспрессии. Конститутивные и регулируемые промоторы. Токсичный эффект при сверхэкспрессии. Методы работы с токсичными генами: тонкий тюнинг промоторов, промоторы с искусственной регуляцией. Определение уровня экспрессии фермента в трансформированном штамме. Подбор оптимальных условий для выработки фермента, методы сохранения трансформированных штаммов.

6. Примеры технологий геномного редактирования бактерий.

Использование механизмов гомологичной рекомбинации для направленного редактирования геномов. Редактирование генома *E.coli* с помощью системы рекомбинации Lambda Red. Ключевые компоненты системы рекомбинации на основе Red-системы фага Lambda. Получение делеций и инсерций в хромосоме *E. coli* с помощью Red-системы фага Lambda. Современные методы генетического конструирования промышленных штаммов на основе бактерий рода *Bacillus*. Методы переноса генетического материала в клетки бацилл. Векторы для бацилл. Методы генетического конструирования штаммов бацилл.

7. Прокариотические антивирусные системы CRISPR-Cas. Разработка методов редактирования геномов бактерий с помощью CRISPR-Cas.

CRISPR-Cas — система адаптивного иммунитета бактерий и архей. Функция и механизм работы. Разнообразие и эволюция систем CRISPR-Cas. Спектр применений CRISPR-Cas и ее модификаций. Разработка методов редактирования геномов бактерий с помощью CRISPR-Cas на примере бацилл. Использование CRISPR для конструирования новых метаболических путей и осуществления направленной эволюции биомолекул.

8. Геномное редактирование и биобезопасность.

Группы опасности микроорганизмов. Возможные неблагоприятные воздействия ГМ-микроорганизмов на здоровье человека, методы их оценки и способы предупреждения. Оценка риска, обусловленного возможностью горизонтального переноса маркерных генов устойчивости к антибиотикам к микроорганизмам пищеварительного тракта человека и животных. Риски, связанные с высвобождением и распространением ГМО в окружающей среде. Биологическая защита. Документы регламентирующие биобезопасность.

5. Описание материально-технической базы, необходимой для осуществления образовательного процесса по дисциплине (модулю)

учебная аудитория, оснащенная компьютером и мультимедийным оборудованием (проектор, звуковая система).

6. Перечень рекомендуемой литературы

Основная литература

1. Основы биохимии Ленинджера. В 3 томах. Том 3 = Lehninger Principles of Biochemistry / Д. Нельсон, М. Коке ; перевод с английского Т. П. Мосоловой, О. В. Ефременковой ; под редакцией А. А. Богданова, С. Н. Кочеткова. Пути передачи информации, [учебное пособие]. Москва, Лаборатория знаний, 2017
2. Микробиология [Текст] / М. В. Гесев, Л. А. Минеева - М. МГУ, 1985
Фонд литературы кафедры
3. Метаболизм бактерий / Г. Готтшальк ; пер. с англ. М. : Мир, 1982. - 310 с.
4. Systems Biology / E. Klipp, W. Liebermeister, C. Wierling, A. Kowald, H. Lehrach, R. Herwig ; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009.
5. Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Jun 6;97(12):6640-5. doi: 10.1073/pnas.120163297.
6. Закатаева НП, Юсупова ЮР, Романенков ДВ, Лившиц ВА. Современные методы генетического конструирования промышленных штаммов на основе бактерий рода Bacillus. Биотехнология. 2013; 5(8-23)
7. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science. 2012; 337(6096):816-21. doi: 10.1126/science.1225829
8. Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science. 2014; 346(6213):1258096. doi: 10.1126/science.1258096

Дополнительная литература

Фонд литературы кафедры

1. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science. 2013 Feb 15;339(6121):819-23. doi: 10.1126/science.1231143.
2. Burgess DA. CRISPR genome-editing tool. Nat Rev Genet. 2013; 14, 81.
<https://doi.org/10.1038/nrg3409>
3. Trevino AE, Zhang F. Genome editing using Cas9 nickases. Methods Enzymol. 2014;546:161-74. doi: 10.1016/B978-0-12-801185-0.00008-8.
4. Ферментативные процессы в биотехнологии / А.М. Безбородов, Н.А. Загустина, В.О. Попов; Ин-т биохимии им. А.Н. Баха РАН. – М.: Наука, 2008. – 335 с.

7. Перечень ресурсов информационно-телекоммуникационной сети "Интернет", необходимых для освоения дисциплины (модуля)

1. <http://ctem.web.cmu.edu/>
2. www.matter.org.uk/tem/
3. <http://www.cmca.uwa.edu.au/access/training>
4. <http://www.microscopy.info/Microscopy/Guide>
5. database.iem.ac.ru/mincryst/descript.htm
6. www.crystallography.net
7. <http://lib.mipt.ru/> – электронная библиотека Физтеха.
8. <http://www.Sci-lib.com> – Большая научная библиотека.

8. Перечень информационных технологий, используемых при осуществлении образовательного процесса по дисциплине (модулю), включая перечень необходимого программного обеспечения и информационных справочных систем (при необходимости)

На лекционных занятиях используются мультимедийные технологии, включая демонстрацию презентаций. В процессе самостоятельной работы обучающихся возможно использование таких программных средств как Mathcad, Mathlab для решения физических задач и моделирования изучаемых процессов на компьютере.

9. Методические указания для обучающихся по освоению дисциплины (модуля)

Для успешного освоения курса, помимо посещения лекций, от студентов требуется самостоятельная работа в объеме не менее чем те часы, которые указаны для каждого раздела программы. В основном, это время отводится на самостоятельное повторение материала лекций, чтения рекомендованной литературы и подготовку к промежуточным тестированиям, которые проводятся для текущего контроля за усвоением материала. Всего предполагается провести за семестр одну промежуточную контрольную, а также ряд проверочных работ. Студенты, успешно прошедшие данную форму промежуточного контроля, допускаются к сдаче зачета по дисциплине.

ПРИЛОЖЕНИЕ

ОЦЕНОЧНЫЕ МАТЕРИАЛЫ ПО ДИСЦИПЛИНЕ (МОДУЛЮ)

по направлению:	Прикладные математика и физика
профиль подготовки:	Природоподобные технологии и биомиметический дизайн материалов и систем Физтех-школа природоподобных, плазменных и ядерных технологий им. И.В. Курчатова кафедра нано, био, информационных и когнитивных технологий
курс:	1
квалификация:	магистр
Семестр, формы промежуточной аттестации: 2 (весенний) - Зачет	
Разработчик:	О.В. Березина, канд. биол. наук, доцент

1. Компетенции, формируемые в процессе изучения дисциплины

Код и наименование компетенции	Индикаторы достижения компетенции
ОПК-5 Способен и готов к повышению квалификации, профессиональному росту и руководству коллективом в сфере своей профессиональной деятельности, толерантно воспринимая социальные, этнические, конфессиональные и культурные различия	ОПК-5.2 Владеет навыком руководства малым коллективом в сфере своей профессиональной деятельности
	ОПК-5.3 Стремится к получению новых знаний, профессиональному и личностному росту
ПК-2 Способен самостоятельно или в качестве члена (руководителя) малого коллектива организовывать и проводить научные исследования и их апробацию	ПК-2.1 Способен планировать и проводить научные исследования самостоятельно или в составе научного коллектива
	ПК-2.2 Способен проводить апробацию результатов научно-исследовательской работы посредством публикации научных статей и участия в конференциях

2. Показатели оценивания компетенций

В результате изучения дисциплины «Метаболическая инженерия и геномное редактирование» обучающийся должен:

знать:

- основные принципы, методы и подходы, используемые при конструировании микробных штаммов-продуцентов ферментов и метаболитов.
- основные реакции энергетического обмена и биосинтеза у бактерий;
- основные микробные платформы, используемые для конструирования рекомбинантных штаммов-продуцентов;
- основные технологии геномного редактирования;
- функции, механизм и область применения системы CRISPR-Cas.

уметь:

- производить выбор микробной платформы для синтеза целевого продукта;
- применять основные принципы направленной модификации метаболических путей для поиска оптимального пути синтеза целевого продукта;
- производить выбор генно-инженерного инструментария для конструирования штамма-продуцента;
- эффективно использовать современные информационные технологии и ресурсы для получения необходимых знаний по интересующей научной проблеме.

владеть:

- специальной терминологией в области метаболической инженерии и геномного редактирования;
- представлениями о методах генной инженерии, микробиологии, биохимии, биоинформатики, используемых для конструирования штаммов-продуцентов;
- представлениями о способах модификации уровня экспрессии генов.

3. Перечень типовых (примерных) вопросов, заданий, тем для подготовки к текущему контролю

В целях текущего контроля успеваемости предусмотрен краткий опрос по темам предыдущих занятий по теме прошлой лекции или в конце занятия по пройденной теме.

4. Перечень типовых (примерных) вопросов и тем для проведения промежуточной аттестации обучающихся

1. Метаболическая инженерия: возможности, области применения и современные тенденции.
2. Разнообразие метаболизма микроорганизмов, используемых в биотехнологии.

3. Биохимический состав клетки. Пластический и энергетический обмен. Баланс углерода, энергии и восстановительного потенциала.
4. Типы брожения и дыхания у основных промышленно-важных микроорганизмов.
5. Бактерии, дрожжи и грибы – основные микробные платформы метаболической инженерии; стратегии создания рекомбинантных штаммов.
6. Модификация свойств ферментов и частные примеры метаболической инженерии: конструирование штаммов-продуцентов ферментов, витаминов, органических кислот и спиртов, аминокислот, биополимеров.
7. Конструирование микробных штаммов-продуцентов органических кислот и спиртов. Использование методов и подходов метаболической инженерии для разработки штаммов-продуцентов аминокислот.
8. Использование технологий геномного редактирования: достижения и перспективы.
9. Геномное редактирование в метаболической инженерии. Модификация уровня экспрессии генов.
10. Методы работы с токсичными генами: тонкий тюнинг промоторов, промоторы с искусственной регуляцией.
11. Примеры технологий геномного редактирования бактерий.
12. Прокариотические антивирусные системы CRISPR-Cas. Разработка методов редактирования геномов бактерий с помощью CRISPR-Cas.
13. Геномное редактирование и биобезопасность.

Примеры билетов:

Билет №1

1. Крио-электронная микроскопия.
2. Определение структуры белков, вирусов и макромолекул методом одиночных частиц.

Билет №2

1. Электронная микроскопия в режиме естественной среды.
2. Получение и обработка экспериментальных данных крио-электронной томографии.

Критерии оценивания

1. Оценка «зачтено» выставляется студенту, который
 - прочно усвоил предусмотренный программный материал;
 - правильно, аргументировано ответил на все вопросы, с приведением примеров;
 - показал глубокие систематизированные знания, владеет приемами рассуждения и сопоставляет материал из разных источников: теорию связывает с практикой, другими темами данного курса, других изучаемых предметов
2. Оценка «не зачтено» Выставляется студенту, который не справился с 50% вопросов билета, в ответах на другие вопросы допустил существенные ошибки. Не может ответить на дополнительные вопросы, предложенные преподавателем, не знает большей части основного содержания учебной программы дисциплины, допускает грубые ошибки в формулировках основных принципов.

5. Методические материалы, определяющие процедуры оценивания знаний, умений, навыков и (или) опыта деятельности

При проведении зачета обучающемуся предоставляется 40 минут на подготовку. Опрос обучающегося по билету на зачете не должен превышать двух астрономических часов.

Во время проведения зачета обучающиеся могут пользоваться программой дисциплины, конспектами лекций, а также любой справочной литературой.