

УДК 631:52+602.6

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ РАСТЕНИЙ

© 2014 г. Е.В. Дейнеко

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: deineko@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 25 июня 2013 г. Принята к публикации 1 февраля 2014 г.

ВВЕДЕНИЕ

Генетическая инженерия – новое направление в деятельности человека, позволяющее целенаправленно, по заранее намеченной программе, экспериментально модифицировать геном с использованием генетической информации из разных гетерологических систем: вирусов, бактерий, насекомых, животных и человека. С помощью генетической инженерии становится возможным изменять структуру генов, создавать новые, в том числе и гибридные, гены. Применение генно-инженерных методов существенно расширило возможности модификации геномов и внутри растительного царства, поскольку позволило переносить гены между таксономически удаленными видами растений, относящимися, например, к классам однодольных и двудольных.

В настоящее время четко прослеживаются три аспекта использования трансгенных растений: 1) изучение фундаментальных проблем функционирования генов у растений; 2) трансгенные растения – биореакторы фармацевтически ценных белков; 3) улучшение качества и хозяйственно ценных признаков важных сельскохозяйственных культур и декоративных растений.

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К СОЗДАНИЮ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ РАСТЕНИЙ

Генетическая инженерия растений как направление в биологии сформировалась во второй половине XX в. Развитие этого направления

стало возможным благодаря способности растительных клеток к регенерации полноценных растений в условиях *in vitro* или **тотипотентности**. Следует подчеркнуть, что в культуре *in vitro* соматические клетки растения проходят все стадии развития, связанные с формированием зиготического зародыша в семени (рис. 1).

Именно благодаря тотипотентности **технологии рекомбинантных ДНК**, успешно применяемые в микробиологии, были использованы и для растительных клеток. Стало очевидным, что внесенные в геном соматических клеток модификации в виде чужеродной ДНК могут быть сохранены и реализованы на уровне целого растения. У растений чужеродная ДНК может быть направлена как в ядерный, так и хлоропластный геномы. Если чужеродная ДНК или **трансгены** интегрированы в ядерный геном, такие растения будут называться **трансгенными**, если в хлоропластный геном – **транспластомными**.

Трансген – чужеродная рекомбинантная ДНК, искусственно введенная в геном клеток растений или зародышевых клеток животных, становящаяся его резидентной частью после восстановления полноценного организма и рекомбинирующая среди потомков, согласно законам Менделя.

Трансгенные растения – генетически модифицированные растения, у которых трансген введен в ядерный геном.

Транспластомные растения – генетически модифицированные растения, у которых трансген введен в хлоропластный геном.

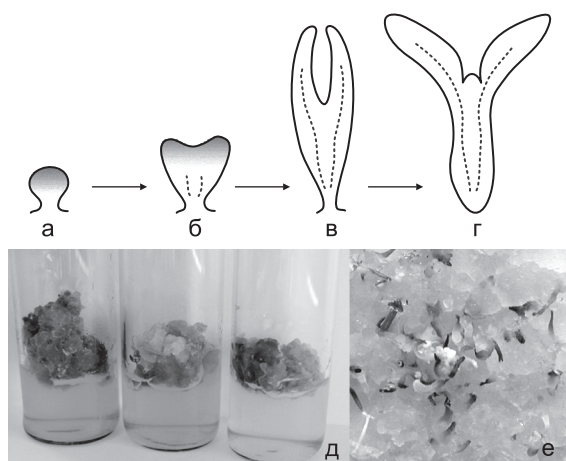


Рис. 1. Схема формирования зиготических зародышей на примере двудольных растений (а–г) и каллусная культура клеток моркови *in vitro* (д, е).

Стадии: а – глобулярная, б – сердцевидная; в, г – стадии торпеды и семядолей.

Первый этап модификации растений с применением методов генетической (генной) инженерии включает поиск и выделение (или синтез) генов, используемых для переноса в растительный геном, а также разработку методов их доставки в ядро или хлоропласты растения. Гены, представляющие интерес для исследователей, или **целевые** гены, могут быть получены химическим путем, а также с помощью ПЦР. Если исследователь располагает данными о первичной структуре самого гена или

данными о первичной структуре полипептида, закодированного в этом гене, то этот ген может быть синтезирован химическим путем. Наличие праймеров, комплементарных к краевым районам искомого гена, дает возможность выделить его из библиотеки генома или библиотеки кДНК. В последнем случае вновь синтезированный ген будет отличаться от исходного гена отсутствием интронов и регуляторных последовательностей. В растительный геном чужеродные гены могут быть доставлены с помощью векторного (агробактериальная трансформация) или прямого переноса (метод биобаллистики).

Для доставки чужеродных генов в клетки растений применяют векторы, созданные на основе вирусов и плазмид почвенных бактерий. Для двудольных растений используют природный вектор горизонтального переноса генов – плазмиды почвенных бактерий (Ti-плазида *Agrobacterium tumefaciens* и Ri-плазида *A. rhizogenes*). В генно-инженерных работах наиболее часто используют векторы на основе Ti-плазмиды (Tumor inducing – индукция новообразований) *A. tumefaciens* (рис. 2, а), которая в естественных условиях вызывает у растений образование опухолей (корончатых галлов) в местах проникновения бактерии (рис. 2, б).

В состав Ti-плазмиды (рис. 2, а) входят участок, встраивающийся в геном растения (Т-ДНК-область), гены *vir*-области, обеспечивающие перенос Т-ДНК в растительный геном, а также гены синтеза фитогормонов (ауксинов и цито-

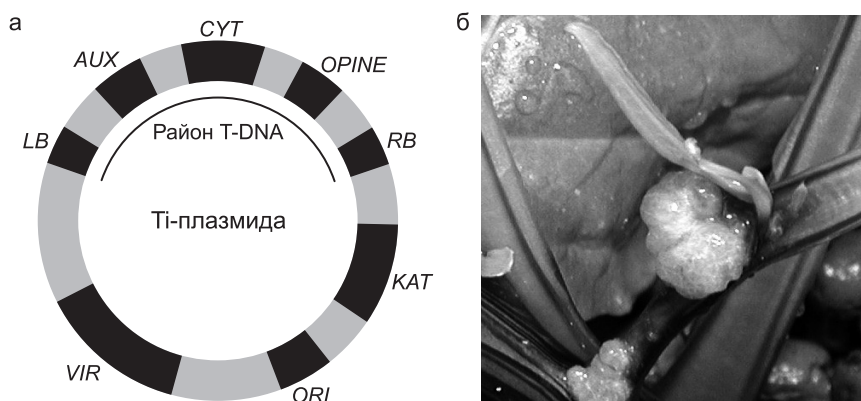


Рис. 2. Генетическая карта Ti-плазмиды *A. tumefaciens* (а) и корончатый галл у свеклы (б).

LB и RB – левая и правая фланкирующие последовательности; AUX – ген синтеза ауксина; CYT – ген синтеза цитокинина; OPINE – ген синтеза опина; VIR – гены вирулентности; KAT – гены ферментов катаболизма опина; ORI – сайт инициации репликации.

кининов) и опинов (производных аминокислот). В зависимости от того, какой тип опинов синтезируется клетками опухоли, Ti-плазмиды подразделяют на плазмиды октопинового, нопалинового, агропинового и других типов. Важную роль в интеграции Т-ДНК в растительный геном играют ее фланкирующие последовательности, представленные несовершенными прямыми повторами по 24–25 п.н., по которым происходит ее вырезание из плазмиды.

Необходимо отметить, что Т-ДНК сыграла неоценимую роль в развитии стратегий модификации растений с применением методов генетической инженерии. Именно эту часть ДНК почвенной бактерии можно рассматривать как уникальный элемент, который интегрируется в ядерный геном растения и является природным «генным инженером». В экспериментах по трансформации растений используют «разоруженные» Ti-плазмиды, из которых удалены онкогены, т. е. гены синтеза фитогормонов и опинов. Вместо них в Т-ДНК-область исследователи интегрируют **целевые** гены, а также доминантные маркерные (**селективные и репортерные**) гены. Модифицированная таким образом Ti-плазида теряет свои онкогенные свойства (образование опухолей), но сохраняет способность переносить и интегрировать Т-ДНК в геном растения. Маркерные гены служат для быстрого и эффективного отбора трансформированных клеток и растений-регенерантов, у которых произошла встройка чужеродной ДНК в ядерный или хлоропластный геномы. Большинство селективных генов обеспечивают преимущество роста и дифференциации трансгенных клеток в присутствии агента, токсичного для нетрансгенных клеток. Именно на этом основан отбор трансформированных клеток от клеток, в геном которых встраивание трансгенов не произошло. В отличие от селективных, репортерные гены позволяют выявлять присутствие в ткани трансформированного растения рекомбинантного белка и предварительно судить об уровне экспрессии самого гена. В качестве селективных генов используют гены устойчивости к антибиотикам (канамицин, гигромицин), устойчивости к гербицидам (фосфинотрицин) и т. д., в качестве репортерных – ген зеленого флюоресцирующего белка (gfp) или ген *uidA*, кодирующий фермент бета-глюкуронидазу.

В зависимости от того, где расположена область Т-ДНК относительно *vir*-области, векторы, используемые для доставки чужеродных генов, делят на два типа: коинтегративные и бинарные. Коинтегративные векторы включают Т-ДНК и *vir*-гены в одном репликоне, тогда как в бинарных векторах эти области разделены и располагаются на двух плазмидах. Бинарные векторы, как правило, способны реплицироваться как в *E. coli*, так и в агробактериях, что позволяет проводить генно-инженерные манипуляции в *E. coli*, а затем переносить векторы в штаммы агробактерий, содержащих дополнительную Ti-плазмиду только с *vir*-генами. К настоящему времени разработано и апробировано достаточно большое количество растительных векторов, удобных для проведения генно-инженерных манипуляций с растениями, таких как pCambia или pCATEWAY. Разработана система RMDAP (Recombination-assisted Multifunctional DNA Assembly Platform), объединяющая три системы рекомбинации (CATEWAY, Cre/loxP и рекомбинантную инженерию), позволяющая переносить в геном растения и эффективно экспрессировать одновременно несколько целевых генов. На основе RMDAP создана серия модульных векторов для экспрессии и инактивирования генов, а также для создания безмаркерных трансгенных растений.

В основе процесса заражения растительной клетки лежит перенос части генетического материала Ti-плазмиды (Т-ДНК). Растительные клетки инфицируются агробактериями только при наличии повреждений на растении, так как в области поранений образуются вещества фенольной природы и низкомолекулярные сахара, которые необходимы для активации бактериальных генов вирулентности (*vir*-генов). Продукты *vir*-генов обеспечивают процессинг (высвобождение) Т-ДНК из Ti-плазмиды и перенос ее в растительную клетку. Процессинг, перенос и интеграция Т-ДНК в растительную клетку – сложный процесс, в котором принимают участие многочисленные белки как бактерии, так и растения-хозяина.

Интеграция Т-ДНК в растительный геном осуществляется случайным образом в различные районы генома растений путем негомологичной (незаконной) рекомбинации, механизм которой предполагает наличие коротких (1–8 п.н.)

участков гомологии между нуклеотидными последовательностями на концах Т-ДНК и геномными районами.

После того как проведена агробактериальная трансформация, растительные клетки культивируют *in vitro* на культуральных средах с добавлением селективных агентов. Устойчивые клетки помещают на среды для регенерации трансформантов и после восстановления полноценных растений подтверждают событие интеграции трансгена с помощью молекулярных методов (ПЦР, Саузерн-блот).

При получении трансгенных растений необходимо учитывать тот факт, что в бактериальной клетке процессинг или высвобождение Т-ДНК может сопровождаться ошибками определения концевых повторов. Одной из причин таких сбоев могут быть мутации, приводящие к изменению функциональной активности белков, осуществляющих процессинг Т-ДНК. В результате этого часть векторной ДНК (ДНК, лежащая за пределами краевых повторов Т-ДНК-области) может быть перенесена и интегрирована в геном растения. Такие встройки представляются нежелательными, поскольку векторные последовательности могут являться причиной нестабильности экспрессии перенесенных генов. В связи с этим полученные трансгенные растения необходимо тестировать на наличие в геномной ДНК векторных последовательностей с использованием соответствующих пар праймеров.

Следует подчеркнуть, что агробактериальная трансформация эффективна только для двудольных растений и малоэффективна для однодольных. Для трансформации однодоль-

ных растений используются методы прямого переноса трансгенов. Одним из таких методов является метод биобаллистики с помощью «генной пушки».

Суть этого метода состоит в том, что на поверхность золотых или вольфрамовых частиц наносится ДНК, содержащая маркерные и целевые гены. С помощью «генной пушки» (рис. 3, а) частицы направляются (выстреливаются) на трансформируемый объект (калусы или ткани растений). Сила выстрела устанавливается экспериментально так, чтобы частицы смогли пройти через клеточные стенки и доставить чужеродную ДНК в клетки. Об эффективности доставки можно судить по плотности расположения зон интеграции трансгенов – пятен голубого цвета (рис. 3, б). Голубой цвет пятен обусловлен **транзиентной** или временной экспрессией репортерного *uidA*-гена. Данный метод успешно применяется для трансформации внеядерных геномов растений (хлоропластов и митохондрий).

Как при агробактериальной, так и при биобаллистической трансформации в геном растения может быть интегрировано от одной и более копий Т-ДНК. Множественные копии могут быть сцеплены между собой и находиться в одном локусе генома или могут быть представлены отдельными копиями в локусах, расположенных в разных районах генома.

Таким образом, разработка и совершенствование методов генетической инженерии обеспечили исследователей надежным инструментарием, позволяющим целенаправленно воздействовать на растительный геном. Созда-

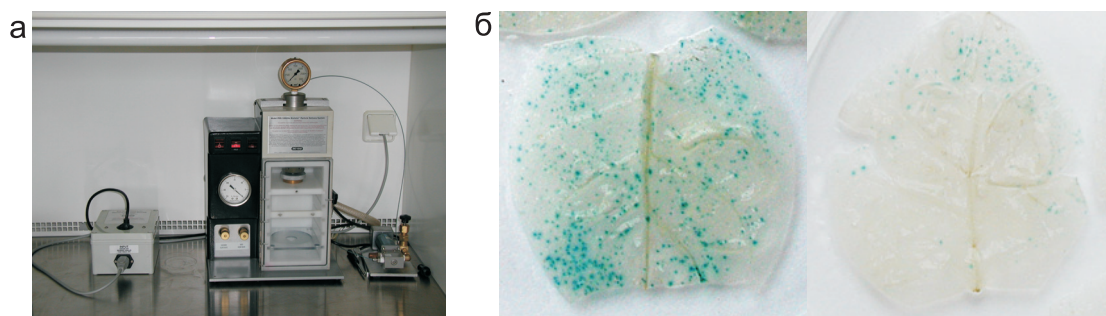


Рис. 3. Генная пушка (Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery System) в ламинарном боксе с вертикальной подачей стерильного воздуха (слева) и пример транзиентной экспрессии гена *uidA* в тканях листа табака после обстрела золотыми частицами (справа).

ны специальные векторы, обеспечивающие экспрессию гетерологичных генов в растительных клетках, а также разработаны системы доставки чужеродной ДНК в геном растений.

ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ В КАЧЕСТВЕ МОДЕЛЕЙ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ПРОБЛЕМ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ГЕНОВ

Современные методы генетической инженерии и биотехнологии позволяют модифицировать геномы растений путем введения чужеродных генов в состав ядерной и хлоропластной ДНК растений. Введенные в геном растения трансгены становятся его резидентной частью, проявляются как доминантные мутации и наследуются согласно классическим законам Менделя.

Чужеродные гены могут быть интегрированы как в один, так и в несколько независимых локусов генома. Предварительно о числе инсерций, интегрированных в геном трансгенного растения, можно судить по соотношению потомков, полученных от самоопыления исходного трансформанта (T_0) и культивируемых *in vitro* на среде с добавлением селективного агента, например антибиотика канамицина. Если соотношение устойчивых и неустойчивых к канамицину T_1 -растений соответствует 3 : 1 или 15 : 1, то это свидетельствует об интеграции в геном соответственно одной или двух независимых копий трансгена, интегрированных в разные локусы генома. Данные генетического анализа о числе интегрированных в геном копий трансгена дополнительно подтверждаются методами молекулярного анализа. Отклонения от менделевского расщепления, как правило, связаны с инактивированием трансгенов среди потомков трансгенного растения.

На рис. 4 представлены суммарные данные, отражающие в долевого соотношении группы трансформантов с различным числом инсерций трансгенов в случайной выборке трансгенных растений табака *Nicotiana tabacum* (линия SR1). У большей части трансгенных растений чужеродные гены стабильно экспрессировались и наследовались в соответствии с законами Менделя для моно- и дигибридного типов расщеп-

ления (52,9 и 20,6 % соответственно), а также для множественных инсерций (18,3 %). Доля трансформантов с отклонениями от менделевского расщепления и потерей Км-устойчивости составила 5,9 и 1,9 % соответственно, что свидетельствует о том, что примерно у каждого восьмого трансгенного растения табака экспрессия трансгена может быть нестабильна.

Инактивирование трансгенов. Феномен потери экспрессии чужеродных генов у трансгенных растений в 90-е годы прошлого столетия послужил толчком к открытию новых механизмов регуляции экспрессии собственных генов, а также механизмов защиты растений от заражения вирусами, виридами и от неконтролируемого размножения в геноме мобильных генетических элементов на основе РНК-интерференции. Как эпигенетический механизм регуляции экспрессии генов РНК-интерференция широко представлена среди про- и эукариот, в том числе и среди растений. Посредством этого механизма осуществляется подавление (в редких случаях активация) экспрессии участка ДНК с помощью комплементарных ему коротких двуцепочечных РНК (дцРНК) на уровне транскрипции (транскрипционный сайленсинг) или трансляции (посттранскрипционный сайленсинг). Общая схема инактивации трансгенов представлена на рис. 5.



Рис. 4. Структура популяции трансгенных растений табака (линия SR1) по числу Т-ДНК инсерций и характеру экспрессии *nptII*-гена среди T_1 -потомков, полученных от самоопыления исходных трансформантов (Дейнеко и др., 1999).

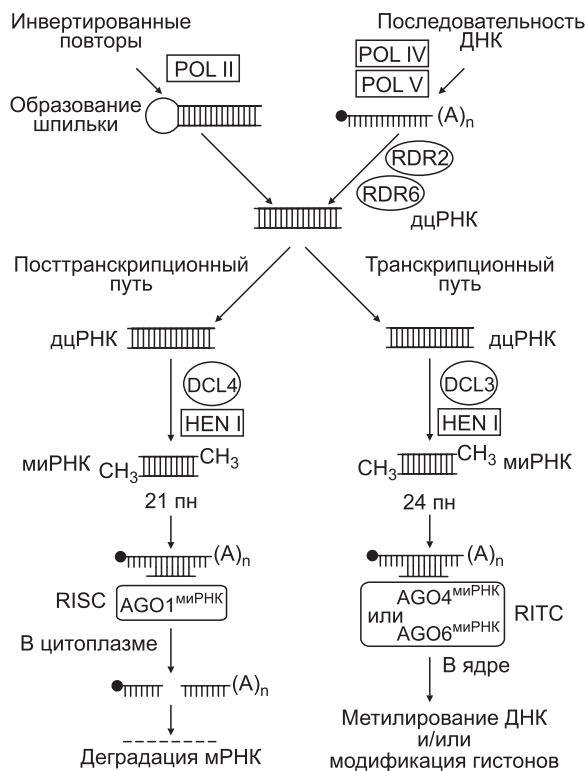


Рис. 5. Общая схема инактивации трансгенов у растений.

POL II – РНК-полимераза II (считывает транскрипты с инвертированных повторов и псевдогенов; по сайтам комплементарности образуются двуцепочечные РНК с образованием шпильки); **POL IV** – РНК-полимераза IV (образование и амплификация миРНК размером 24 п.н.); **POL V** – РНК-полимераза V (метилирование *de novo* локуса-мишени и модификация хроматина); **RDR** – **RNA-Dependent RNA Polymerase** – РНК-зависимая РНК-полимераза; **DCL** – **DICER-Like** – рибонуклеаза; **HEN** – **HUE ENHANCER 1** – метилтрансфераза; **AGO** – белки семейства **ARGONAUTE**; **RITC** – **RNA Induced Transcriptional Silencing Complex** – специализированный рибонуклеопротеиновый комплекс (РПН-комплекс); **RISC** – **RNA Induced Silencing Complex** – РПН-комплекс.

Как видно из схемы, представленной на рис. 5, механизмы посттранскрипционного и транскрипционного сайленсинга трансгенов имеют свои уникальные наборы белков и ферментов, но имеют и общий признак – участие дцРНК, которая разрезается ферментом рибонуклеазой IVDCL4 (**DICER-LIKE 4**) на малые интерферирующие РНК (миРНК) размером 21 н. (посттранскрипционная инактивация) или рибонуклеазой III DCL3 (**DICER-LIKE 3**) на миРНК размером 24 н. (транскрипционная инактивация).

При транскрипционной инактивации, протекающей в ядре клетки, миРНК размером 24 н.

метируются в области 3'-конца метилтрансферазой HEN1 (**Hue Enhancer I**) и направляются в специализированные рибонуклеопротеиновые комплексы (**RNA Induced Transcriptional Silencing Complex** – **RITC**). Основным компонентом **RITC**-комплекса являются белки семейства **ARGONAUTE** (**AGO4** или **AGO6**). Внедрение миРНК в **RITC**-комплекс сопровождается удалением и деградацией одной из ее цепей («пассажирской», *passenger strand*), тогда как вторая цепь, комплементарная области промотора гена-мишени, антисмысловая («ведущая» – *guide strand*), связывается с белком семейства **ARGONAUTE**. миРНК в составе **RITC**-комплекса направляет метилирование ДНК и/или модификацию гистонов гена-мишени. Молекулярные механизмы взаимодействия **RITC**-комплекса с геном-мишенью изучены все еще недостаточно.

В случае посттранскрипционной инактивации, протекающей в цитоплазме, происходит деградация считываемой с трансгена матричной или информационной РНК (мРНК), в разрушении которой важную роль играет миРНК размером 21 н., образующаяся из двухцепочечного предшественника (дцРНК). Фермент DCL4 разрезает дцРНК на миРНК размером 21 н., которые метилируются HEN1 в области 3'-конца и направляются в **RISC**-комплекс (**RNA Induced Silencing Complex**), основным компонентом которого является белок AGO1. «Пассажирская» цепь миРНК удаляется в процессе внедрения в **RISC**-комплекс, а антисмысловая одноцепочечная «ведущая» миРНК, комплементарная транскрибируемой области гена-мишени, связывается с AGO1-белком. Благодаря слайсерной активности AGO1-белка, **RISC**-комплекс разрезает комплементарную мРНК в цитоплазме, что приводит к ее деградации (рис. 5).

Механизмы инактивации трансгенов у растений описаны в основном для *A. thaliana*, *Nicotiana tabacum* и *Petunia hybrida*. Дополнительным источником для выявления новых особенностей в регуляции инактивирования трансгенов/генов могут быть растения с их мозаичным проявлением, у которых в клетках одной и той же соматической ткани трансген может быть и в активном, и инактивированном состояниях. Мозаичный паттерн экспрессии трансгена может определяться механизмами инактивации/

реактивации как на транскрипционном, так и посттранскрипционном уровнях.

Сайленсинг генов встречается не только у трансгенных растений. Например, парамутации у кукурузы были известны еще задолго до обнаружения эффекта инактивации трансгенов. Однако только сравнительно недавно стали выявляться общие черты между этими явлениями. Накопление любых экспериментальных фактов, касающихся феномена инактивации трансгенов, является важным дополнением к фундаментальным представлениям о функционировании генов в растениях.

Т-ДНК-индуцированные мутации. Трансгенные растения могут служить источником мутаций, вызванных природным инсерционным агентом – Т-областью Ti-плазмиды *A. tumefaciens*. Перенос и интеграция в геном растения чужеродных генов при агробактериальной трансформации в некоторой степени сходны с перемещением мобильных генетических элементов. Попадание инсерций в функционально значимые районы генома может приводить к нарушению проявления генов, локализованных в данной области. Подобно мобильным генетическим элементам, инсерции трансгенов, в зависимости от места встраивания, могут менять экспрессию отдельных генов у трансгенных растений, что фенотипически может выражаться в изменении каких-либо признаков у растений, в том числе и морфологических. В терминах классической генетики подобные нарушения относятся к инсерционным мутациям. Т-ДНК-мутации, маркированные самой инсерцией, становятся доступными для молекулярного анализа, что затруднительно при анализе спонтанных мутаций, а также мутаций, полученных при химическом и

радиационном мутагенезе. Последовательности, фланкирующие инсерцию, могут быть использованы для выделения интактного гена. Таким образом, при модификации генома растений с применением методов генной инженерии становится возможным не только придавать растениям новые свойства, но и использовать их для изучения структуры и механизмов функционирования растительного генома.

Первые мутации, индуцированные внедрением Т-ДНК в растительный геном, были получены у *Arabidopsis thaliana* группой американских исследователей под руководством М. Фельдмана. Данная коллекция Т-ДНК-индуцированных мутаций *A. thaliana* является наиболее обширной. Спектр описанных в литературе Т-ДНК-индуцированных мутаций достаточно широк. Известны мутации, затрагивающие морфологические признаки (высота растений, размеры и форма листовых пластинок, структура цветка (рис. 6), влияющие на формирование мужского и женского гаметофитов (приводящие к снижению фертильности, а также нарушающие развитие зародышей на ранних стадиях), и мутации, обеспечивающие трансформантам устойчивость к агробактериальному заражению.

Мутации, индуцированные у трансгенных растений внедрением фрагментов экзогенной ДНК, представляют интерес для идентификации и клонирования генов, что является важным направлением по анализу структурно-функциональной организации генома растений.

Таким образом, трансгенные растения с измененным проявлением собственных генов и трансгенов являются источником выявления новых генов и механизмов, лежащих в основе их функционирования.



Рис. 6. Изменение морфологии цветка (вид сбоку и сверху) у растений табака.

а – трансгенное растение (лонгостильный фенотип); б – нетрансгенное растение линии SR1 (контроль).

ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ – БИОПРОДУЦЕНТЫ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИ ЦЕННЫХ БЕЛКОВ ВЕТЕРИНАРНОГО И МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ (БИОФАРМИНГ)

Для медицинских целей растения используются человечеством уже многие тысячи лет. Однако только на рубеже XX–XXI вв. с помощью методов генетической инженерии стало возможным создавать новые типы растений, в тканях которых синтезируются и накапливаются белки из различных гетерологичных систем, используемые в медицине и фармакологии. К настоящему времени созданы трансгенные растения, в ядерный и хлоропластный геномы которых перенесены гены, контролирующие синтез рекомбинантных белков, важных в терапии различных заболеваний. Генетически модифицированные растения могут служить более дешевым и безопасным источником рекомбинантных белков по сравнению с традиционными системами экспрессии на основе бактерий, дрожжей, культур клеток насекомых и млекопитающих. Так, в отличие от бактериальных систем, в растениях возможно осуществление посттрансляционных модификаций, которые в ряде случаев являются необходимым этапом получения функционального белка. Отсутствие загрязнения патогенами животного происхождения, относительная простота манипуляций, связанных с переносом экзогенной ДНК в растительный геном, делают растения привлекательными для получения рекомбинантных белков. Заслуживает внимания применение трансгенных растений для синтеза белков медицинского назначения, которые могли бы быть использованы в качестве «съедобных вакцин».

Впервые идея использования клеток растений для синтеза рекомбинантных антигенов была успешно реализована в 1992 г. группой исследователей под руководством доктора Чарлза Арнтзена. Авторами этой работы было установлено, что поверхностный HBsAg-антиген вируса гепатита В не только синтезируется в тканях трансгенных растений табака, но и способен к самосборке в вирусоподобные частицы размером около 22 нм. Такие частицы были

Биофарминг – создание генетически модифицированных живых организмов с применением методов генетической инженерии для их использования в производстве фармакологически активных субстанций. Например, создание трансгенных растений в качестве продуцентов рекомбинантных белков для медицины и ветеринарии.

идентичны рекомбинантным вирусоподобным частицам HBsAg-антигена, выделенным из промышленной рекомбинантной вакцины на основе дрожжей, а также вирусоподобным частицам из плазмы крови больных вирусом гепатита В. На основании полученных данных стало очевидным, что чужеродные белки способны синтезироваться в клетках трансгенных растений в их природной, иммунологически активной форме. Это открывало новые возможности использования растений как более дешевых систем экспрессии для создания рекомбинантных вакцин.

Следующим принципиальным шагом в разработке концепции «съедобных вакцин» на основе генетически модифицированных растений были работы по созданию трансгенных растений картофеля, продуцирующих термолабильный энтеротоксин из *E. coli* и В-субъединицу холерного токсина. Термолабильный энтеротоксин *E. coli* состоит из двух частей: LT-A (фермент) и LT-B (белковый пентамер из рецептор-связывающих полипептидов). LT-B связывается с рецепторами ганглиозидов на поверхности мембраны эпителиоцитов тонкого кишечника млекопитающих и транспортирует LT-A в клетки кишечника. В эпителиоцитах LT-A вызывает изменение клеточного метаболизма, что приводит к обезвоживанию клеток. Если обе части термолабильного энтеротоксина отделить друг от друга, то презентация LT-B белкового комплекса на поверхности эпителиоцитов будет стимулировать сильный иммунный ответ слизистой оболочки кишечника без проявления каких-либо признаков заболевания, поскольку LT-A отсутствует. Экспериментально установлено, что LT-B, синтезируемый в трансгенных растениях табака и картофеля, вызывает однотипные иммунные реакции у мышей, индуцируемые LT-B,

выделенным из *E. coli*. В клубнях картофеля белок LT-B правильно собирался в олигомеры и накапливался в достаточных количествах. Употребление добровольцами в пищу сырых клубней картофеля, содержащих 0,3–10 мг LT-B-белка, стимулировало образование антител с высокими титрами.

Принципы формирования иммунного ответа при использовании «съедобных» вакцин основаны на антиген-представляющей способности перитонеальных макрофагов тонкого кишечника млекопитающих. В кишечнике чужеродный белок, обладающий антигенными свойствами, распознается специальными М-клетками, которые широко представлены в толще слизистого эпителия. М-клетки транспортируют захваченный антиген к перитонеальным макрофагам и В-лимфоцитам, находящимся в лимфоидных образованиях тонкого кишечника (пейеровых бляшках).

В результате презентации антигена на поверхности антиген-представляющих клеток происходит активация Т-лимфоцитов-хэлперов, которые в сочетании с антигеном активируют В-лимфоциты. Дифференцированные В-клетки выходят из лимфоидных фолликулов слизистой оболочки и поступают через общую циркуляцию в мезентральные лимфатические узлы, где происходят их созревание и превращение в плазматические клетки, синтезирующие специфические антитела. Плазматические клетки способны снова мигрировать к слизистым оболочкам дыхательных путей, желудочно-кишечного и мочеполового трактов. Секреторные иммуноглобулины IgA транспортируются на поверхность слизистых оболочек, где связываются с чужеродными антигенами и препятствуют их проникновению в организм.

В настоящее время растительные клетки являются весьма перспективной альтернативной системой экспрессии для получения рекомбинантных белков медицинского назначения во многих ведущих биотехнологических лабораториях и коммерческих фирмах. Разрабатываемые фундаментальные основы биофарминга позволили преодолеть лимитирующее звено в использовании растительных систем – низкий уровень экспрессии рекомбинантного белка, а также улучшить его посттрансляционные изменения по типу клеток млекопитающих,

найти подходы к направленной модификации генома растений. Становится очевидным, что растительные системы потенциально могут обладать высокой конкурентоспособностью по сравнению с другими системами экспрессии и представляют интерес для инвестиционных компаний.

Разработаны системы экспрессии рекомбинантных белков на основе генетически модифицированных клеток растений (с доставкой трансгена в ядерный и хлоропластный геномы), а также транзистная или временная система экспрессии. Основное внимание исследователей направлено на создание трансгенных растений – биореакторов фармацевтически ценных белков с использованием ядерной трансформации, т. е. доставкой чужеродного гена в ядерный геном растения. Среди компаний, деятельность которых основана на использовании трансгенных растений с ядерной трансформацией, следует отметить фирмы «Protalix» (Израиль), «Medicago» (Канада), «Lemna Gene» (Франция), «Planet Biotechnology» (США), «ProgyGene» (Люксембург).

Такие фирмы, как «Chlorogen Inc.» (США) и «Bayer AG» (Германия), для получения рекомбинантных белков используют транспластмные растения (доставка трансгена в хлоропластный геном), а также транзистную экспрессию чужеродных генов в растительных клетках (метод агроинфильтрации).

В Институте цитологии и генетики СО РАН разрабатывается технология создания трансгенных растений – продуцентов антигенов ESAT6 и CFP10 *Mycobacterium tuberculosis*. Методом агробактериальной трансформации получены трансгенные растения моркови, продуцирующие антигены ESAT6 и CFP10 *M. tuberculosis* (не менее 0,056 % общего растворимого белка (ОРБ) для ESAT6 и 0,002 % ОРБ для CFP10); при пероральной иммунизации мышей установлено формирование как клеточного, так и гуморального звеньев иммунитета.

Итак, благодаря развитию методов генетической инженерии и биотехнологии разработана новая альтернативная система экспрессии – генетически модифицированные растения – перспективная для получения рекомбинантных фармацевтически ценных белков для медицины и ветеринарии.

УЛУЧШЕНИЕ ХОЗЯЙСТВЕННО ЦЕННЫХ ПРИЗНАКОВ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР: КОММЕРЦИАЛИЗАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ СОРТОВ РАСТЕНИЙ

Использование генно-инженерных методов для переноса генов, определяющих хозяйственно ценные признаки, открыло большие перспективы для улучшения важных сельскохозяйственных культур. Созданы трансгенные растения, устойчивые к гербицидам, насекомым-вредителям, вирусам и болезням; растения со сбалансированным составом аминокислот и измененным составом жирных кислот; декоративные сорта с измененной окраской цветов и т. д. Крупнейшим успехом генной инженерии явилось создание под руководством швейцарского профессора И. Потрикуса нового сорта риса с повышенным содержанием провитамина А, железа и фолиевой кислоты. Употребление такого «золотого» риса позволит компенсировать нехватку витамина А в повседневном рационе, особенно в странах, испытывающих его дефицит. Еще один сорт риса (высокопродуктивный, устойчивый к засухе и засолению почв) создали американские ученые из Корнельского университета. Они перенесли в растительный геном от обычной кишечной палочки два гена, контролирующих синтез углевода *трегалозы*, который обеспечивает высокую устойчивость растений как к высоким, так и низким температурам. Потенциальная сфера применения трансгенных растений необычайно широка. Например, созданы растения для очищения окружающей среды от различного рода загрязнений, в том числе тяжелых металлов; для биодegradации полимеров и т. д. Методами генетической инженерии возможно изменять ростовые характеристики растений, создавая миниатюрные карликовые формы декоративных культур. В настоящее время в научно-исследовательских лабораториях мира разрабатываются все новые и новые проекты, поражающие своей смелостью и дерзостью замыслов.

Первые достижения в области генной инженерии растений достаточно быстро нашли применение в практике. Первые трансгенные

Биотехнологические культуры – коммерциализированные сорта, созданные на основе генетически модифицированных растений.

растения были созданы в начале 80-х годов прошлого столетия, и уже в 1994 г. в США было получено первое разрешение на генетически модифицированный пищевой продукт – томаты «Flavr Savr», а в 1995 г. отмечен выход на рынок трансгенных растений кукурузы (Bt-кукурузы), устойчивых к насекомым-вредителям.

Площади, занимаемые первыми коммерческими сортами генетически модифицированных растений, в 1996 г. составляли 1,7 млн га (рис. 7).

За 17-летний период коммерциализации трансгенных сортов растений отмечались постоянный неуклонный прирост площадей и крупномасштабный выход новых сортов, созданных на основе генетически модифицированных растений. В мире к 2012 г. были коммерциализованы такие виды сельскохозяйственных культур, как соя, кукуруза, хлопчатник, рапс, сахарная свекла, папайя, тыква, томаты, сладкий перец, люцерна и тополь. В 2012 г. площади, занимаемые под возделывание биотехнологических культур, составили 170,3 млн га. Это свидетельствует том, что использование биотехнологических культур является наиболее быстро адаптируемой сельскохозяйственной технологией.

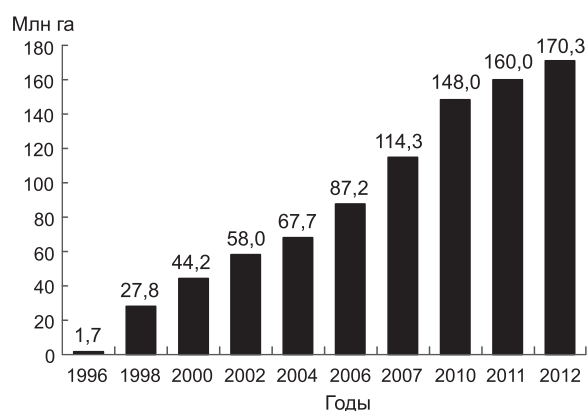


Рис. 7. Динамика распределения площадей, занимаемых под возделывание биотехнологических культур в мире (James, 2013).

К 2012 г. около 17 млн фермеров в 28 странах размещали трансгенные растения на своих полях, причем 15 млн из них представляли мелкие хозяйства из развивающихся стран. Всего к этому году биотехнологические культуры возделывались в 28 странах, а в 31 страну был разрешен их ввоз, т. е. в 59 странах мира генетически модифицированные культуры использовались для народнохозяйственных целей (табл.).

Несомненными лидерами по возделыванию биотехнологических культур являются США и Бразилия, где общие площади в 2012 г. составили 69,5 и 36,6 млн га соответственно. Впервые в 2012 г. доля мировых посевных площадей, занимаемых под биотехнологические культуры в развивающихся странах (52 %), превысила долю площадей, отведенных под соответствующие культуры в промышленно развитых странах (48 %). Эти показатели не подтвердили

предсказаний некоторых критиков, которые еще до начала коммерциализации технологий на основе генетически модифицированных растений считали, что биотехнологические культуры будут выгодны только для промышленно развитых стран.

В 2014 г. планируется получить разрешение на возделывание нового сорта биотехнологического картофеля Фортуна, устойчивого к фитофторозу, что позволит сократить число обработок растений фунгицидами и снизить потери урожайности. При одобрении регулирующих органов уже с 2013–2014 гг. на Филиппинах могут начать высевать «золотой» рис, а в Индонезии – засухоустойчивый сахарный тростник. К 2015 г. ожидается, что число стран, возделывающих биотехнологические культуры, возрастет за счет присоединения нескольких новых стран из развивающихся регионов.

Таблица

Страны, выращивающие биотехнологические культуры

Страны	Площади, млн га	Культуры	Страны	Площади, млн га	Культуры
США	69,5	Кукуруза, соя, хлопчатник, рапс, сахарная свекла, люцерна, папайя, тыква	Филиппины	0,8	Кукуруза
Бразилия	36,6	Соя, кукуруза, хлопчатник	Австралия	0,7	Рапс
Аргентина	23,9	Соя, кукуруза, хлопчатник	Буркина Фасо	0,3	Хлопчатник
Канада	11,6	Рапс, кукуруза, сахарная свекла	Мьянма	0,3	Хлопчатник
Индия	10,8	Хлопчатник	Мексика	0,2	Хлопчатник, соя
Китай	4,0	Хлопчатник, папайя, тополь, томат, сладкий перец	Испания	0,1	Кукуруза
Парагвай	3,4	Соя, кукуруза, хлопчатник	Чили	< 0,1	Кукуруза, соя, рапс
Южная Африка	2,9	Хлопчатник, соя, кукуруза	Колумбия	< 0,1	Хлопчатник
Пакистан	2,8	Хлопчатник	Гондурас	< 0,1	Кукуруза
Уругвай	1,4	Соя, кукуруза	Судан	< 0,1	Хлопчатник
Боливия	1,0	Соя	Португалия	< 0,1	Кукуруза
			Чешская Республика	< 0,1	Кукуруза
			Куба	< 0,1	Кукуруза
			Египет	< 0,1	Кукуруза
			Коста Рика	< 0,1	Хлопчатник, соя
			Румыния	< 0,1	Кукуруза
			Словакия	< 0,1	Кукуруза

Любые биотехнологические культуры, прежде чем получить разрешение на крупномасштабный выпуск, подвергаются экспертизе, которая включает оценку соответствия химического состава исходных (нетрансгенных) и трансгенных растений. Проводится оценка, не ухудшилась ли биологическая ценность и усвояемость приготовленных из генетически модифицированных растений продуктов, не вызывают ли отдельные компоненты аллергические реакции, не окажутся ли они канцерогенными, токсичными или мутагенными, а также не оказывают ли они негативного влияния на репродуктивные функции животных и человека. Полученные трансгенные растения проходят испытания на биобезопасность, включающую оценку возможных путей переноса встроенных в геном растения трансгенов в другие организмы и, в частности в близкородственные виды, путем их естественного переопыления. Оценивается, не влияет ли новый ген на поражаемость полученных трансгенных растений болезнями и вредителями, а также не влияют ли такие растения на почвенную микрофлору и другие составляющие биоценоза. В странах, где выращивают трансгенные растения, созданы специальные комиссии для их проверки и регистрации.

Следует упомянуть о настороженном отношении общественности в некоторых странах к пищевым продуктам, полученным с использованием сырья из трансгенных растений. В основе такого отношения зачастую лежат экономические причины, основанные на конкуренции крупных биотехнологических фирм-производителей генетически модифицированных растений. Например, несмотря на то что общественность европейских стран выступала с протестами по отношению к использованию трансгенных растений (движение «зеленых»), в ряде научно-исследовательских лабораторий проводились интенсивные разработки в этом направлении, завершившиеся выпуском на рынок нескольких сортов биотехнологических культур. Очевидно, что данное движение было направлено на «защиту» европейских рынков от притока более дешевых технологий производства продовольственного сырья из США и Канады.

Аналогичная ситуация развивается и в России. В открытой печати проводится активная

кампания против использования трансгенных растений, однако зарубежные фирмы поставляют в Россию сельскохозяйственное сырье и корма, полученные на основе трансгенных растений. На страницах открытой печати разгораются дискуссии, привлекающие внимание к проблеме выявления «чужеродных генов» в поставляемом из-за рубежа сырье. С одной стороны, создается иллюзия необходимости запрета ввоза и использования сырья из генетически модифицированных растений, так как они представляют угрозу для здоровья. С другой стороны, активно обсуждается вопрос о необходимости маркировки генетически модифицированных продуктов и предоставлении потребителям права самостоятельно решать вопрос их использования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Конец 20-го столетия в биологии завершился созданием новых направлений, таких как биотехнология и генетическая инженерия. В настоящее время генетическая инженерия представляет собой мощный инструмент для проведения фундаментальных исследований в области генетики растений. Методы генетической инженерии широко используются в прикладных исследованиях, являясь основой новых направлений в фармакологической индустрии и растениеводстве. На современном мировом рынке коммерциализировано десять новых биотехнологических культур (соя, кукуруза, рапс, хлопчатник, сахарная свекла, папайя, тыква, тополь, томат и сладкий перец), созданных на основе генетически модифицированных растений. В ближайшие годы этот список пополнится новыми биотехнологическими культурами, которые на данный момент проходят завершающие тесты и испытания в научно-исследовательских центрах и лабораториях мира. Появление на рынке фармпрепаратов, созданных на основе генетически модифицированных растений, а также увеличение на два порядка посевных площадей, занимаемых биотехнологическими культурами в 2012 г. по сравнению с 1996 г. (до 170,3 млн га), свидетельствуют о том, что технологии с применением методов генетической инженерии востребованы и являются технологиями будущего.

Работа выполнена при финансовой поддержке бюджетного проекта. V1.62.1.5 (№ регистрации 01201280334).

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Агробιοтехнология в мире: Научно-популярная монография / Под ред. К.Г. Скрыбина. М.: Центр «Биоинженерия» РАН, 2008. 130 с.
- Ванюшин Б.Ф. Метилирование ДНК у растений: эпигенетический контроль за генетическими функциями // Эпигенетика / Под ред. С.М. Закияна, В.В. Власова, Е.В. Дементьевой. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2012. С. 53–88.
- Дейнеко Е.В., Загорская А.А., Шумный В.К. Т-ДНК-индуцированные мутации у трансгенных растений // Генетика. 2007. Т. 43. С. 5–17.
- Дорохов Ю.Л. Умолкание генов у растений // Молекуляр. биология. 2007. Т. 41. № 4. С. 579–592.
- Маренкова Т.В., Логинова Д.Б., Дейнеко Е.В. Мозаичный характер экспрессии трансгенов у растений // Генетика. 2012. Т.48. № 3. С. 293–306.
- Дейнеко Е.В., Новоселя Т.В., Загорская А.А. Стабильность экспрессии и наследование гена *nr1II* в популяции трансгенных растений табака // Докл. АН. 1999. Т. 369. № 3. С. 420–423.
- Тарантул В.З. Толковый биотехнологический словарь (русско-английский). М.: Языки славянских культур, 2009. 936 с.
- Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия: Уч.-справ. пособие. Новосибирск: Сиб. ун-в. изд-во. 514 с.
- James C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2012. ISAAA Brief No.44. ISAAA: Ithaca N.Y. 2013.
- Matzke M., Scheid M. Эпигенетическая регуляция у растений // Эпигенетика / Под ред. С.Д. Элліса, Т. Дженьювейна, Д. Рейнберга. М.: Техносфера, 2010. С. 167–190.
- Sahai A., Shahzad A., Shahid M. Plant Edible Vaccines: A Revolution in Vaccination // Recent Trends in Biotechnology and Theurapeutic Application of Medicinal Plants / Eds M. Shahid *et al.* Dordrecht; Heidelberg; N.Y.; London: Springer, 2013. P. 225–252.