

Генная инженерия

Лекции 7-8. Генная инженерия растений (бакалавры)

Составитель: проф. М.Р. ШАРИПОВА

Обоснование для получения трансгенных растений

- **Получение растений с высокой урожайностью:**
 - Повышение устойчивости растений к стрессам (заморозки, засуха и др.)
 - создание растений, устойчивых к гербицидам
 - создание культур, устойчивых к насекомым-вредителям
 - получение вирусоустойчивых растений
- **Биофарминг** - создание растений, способных синтезировать лекарственные белки
- **Модельные растения** для изучения действия целевых генов

Метаболиты



Соединения: фенолы, терпеноиды, амины, алкалоиды, гликозиды, стероиды

Цена продукта на рынках: до нескольких тысяч \$ US за 1 кг.

Особенность получения продуктов вторичного метаболизма:

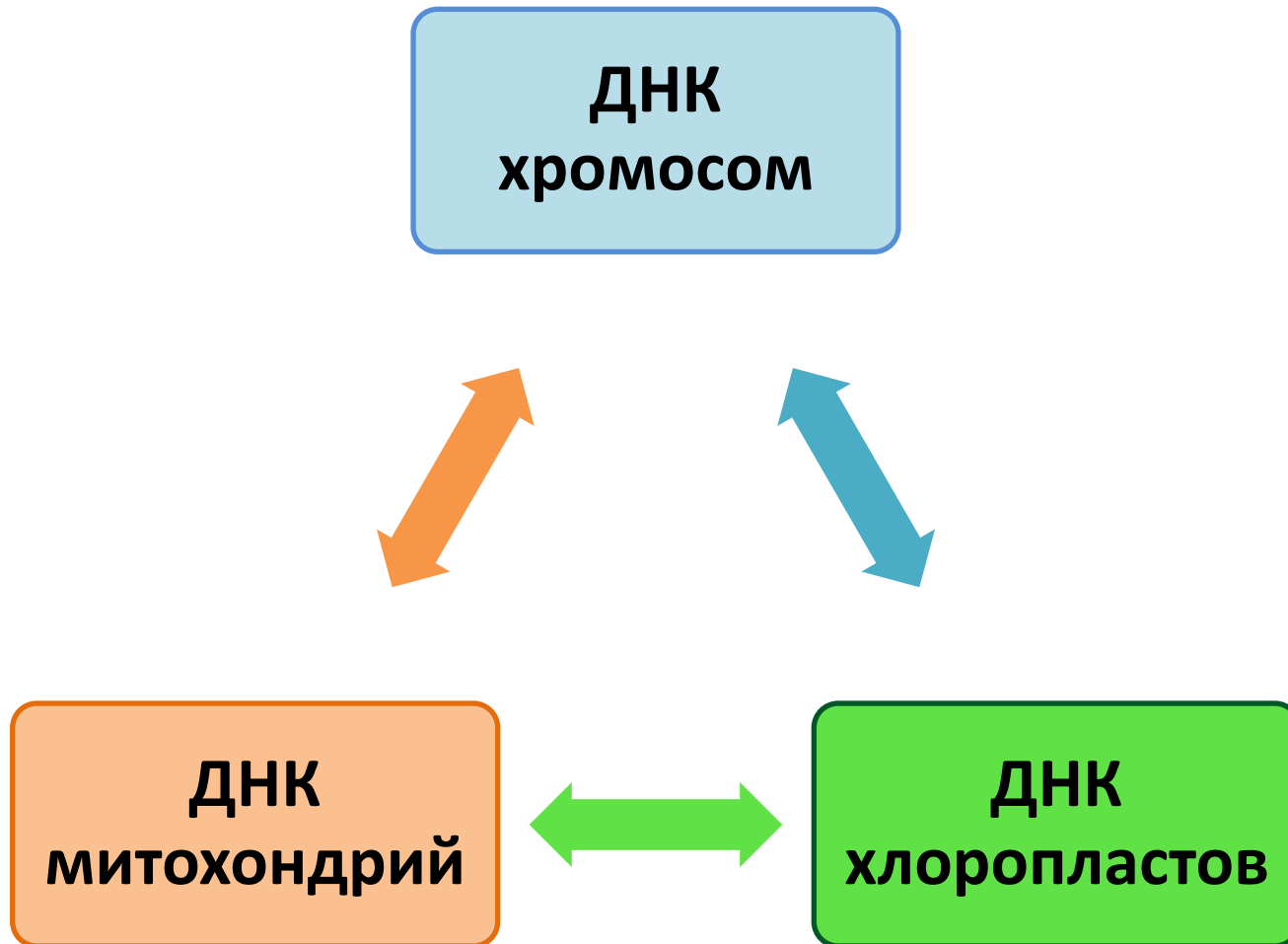
низкая концентрация в клетках!

Использование трансгенных растений позволит удешевить производство целевых соединений

Метаболическая инженерия

- **Метаболическая инженерия** – это конструирование растений с направленными изменениями в метаболических превращениях субстратов в целевые продукты
- **Цель:** получить трансгенные растения, которые эффективно синтезируют вторичные метаболиты, востребованные в медицине, химическом производстве и других областях:
 - **жирные кислоты**
 - **белки с высоким содержанием незаменимых аминокислот**
 - **модифицированные полисахариды**
 - **полимеры, не засоряющие среду**

Генетическая система растений



Определения

- **Трансген** – чужеродная рекомбинантная ДНК, искусственно введенная в геном клеток растений
- **Трансгенные растения** – генетически модифицированные растения, у которых трансген введен в ядерный геном
- **Транспластомные растения** – генетически модифицированные растения, у которых трансген введен в хлоропластный геном

Растения как основа для экспрессии эукариотических генов

- **1) Растения** – эукариоты, хорошо изучены генетика и физиология, секвенированы геномы растений разных классов
- **2) Растения** можно получать в условиях лаборатории, в тепличных и в полевых условиях
- **3) Разработаны генно-инженерные технологии**
- **4) В клетках растений** пост-трансляционные модификации осуществляются адекватно остальным эукариотам в отличие от бактерий
- **5) Многие растения признаны безопасными и употребляются человеком в пищу.** Поэтому процедура допуска медицинских препаратов упрощена
- **6) Для работы с растениями используют бинарные векторы:** основные манипуляции проводят в бактериях, а конечные конструкции переносят в растения

Посттрансляционные модификации

- **1) Модификации аминокислот** - фосфорилирование, ацетилирование, ацилирование, карбоксилирование и др.
- **2) Гликозилирование:** белки приобретают стабильность, присоединение сахарного остатка к серину/треонину/аспарагину
- **3) Протеолитическое расщепление** белков-предшественников
- **4) Образование дисульфидных связей**
катализирует фермент протеиндисульфид-изомераза, неправильно уложенный белок нестабилен и неактивен

Для конструирования проводят оптимизацию экспрессии

Оптимизация
экспрессии

```
graph TD; A[Оптимизация экспрессии] --- B[Кодон-оптимизация]; A --- C[Выбор промотора]; A --- D[Оптимизация трансляции]; A --- E[Секреция]; A --- F[Терминатор];
```

Кодон-
оптимизация

Выбор
промотора

Оптимизация
трансляции

Секреция

Терминатор

Промоторы

Для растений в качестве сильных промоторов используют **конститутивные** и **индуцибельные**:

Конститутивные промоторы

Для двудольных растений:

- 35S-промотор вируса мозаичности цветной капусты (CaMV);
- nos-промотор гена нопалин-синтазы агробактерий

Для однодольных растений:

- промотор гена алкогольдегидрогеназы кукурузы (Adh);
- промотор гена актина риса (Act)

Промоторы

Индуцибельные промоторы

Активируются при определенных условиях:

- температура
- освещение
- концентрация фитогормонов
- механический стресс - поранение
- обработка растений элиситорами

Если индукция экспрессии целевого гена происходит при срезке растений, то продукт гена накапливается в собранной биомассе:

до стадии уборки урожая трансгенные растения можно выращивать как обычные

Эффективная трансляция

Для эффективной трансляции необходимо распознавание участка инициации трансляции AUG-кодона факторами инициации

- У растений в отличие от бактерий нет последовательности Шайна-Дальгарно для связывания с комплементарным участком 16SPHK
- Трансляция ингибируется, если в 5'-нетранслируемой области имеются петлевые структуры

Оптимизация секреции

Для повышения эффективности секреции можно изменять следующие параметры:

- **выбор типа тканей для секреции белка**
- **подбор эффективной векторной системы**
- **тип сигнального пептида**

- При оптимизации секреции приоритетным является подбор эффективного сигнального пептида

Этапы получения трансгенных растений

- **1 этап** – выбор целевого гена и метода его клонирования
- **2 этап** – подбор генотипа растения-реципиента
- **3 этап** – создание конструкции, содержащей целевой ген
- **4 этап** – перенос векторной молекулы в геном растения-реципиента
- **5 этап** – отбор трансгенных растений

Создание конструкции для генетической трансформации растений

1) Поиск и получение целевого гена:

- клонирование
- ПЦР
- химический синтез

анализ структуры гена, выделение кодирующей части, удаление ненужных частей

2) Присоединение промотора к целевому гену

Создание конструкции для генетической трансформации растений

3) Включение маркерных генов –

- гены, по экспрессии которых судят о встраивании чужеродного гена в геном реципиента
- после трансформации растения способны расти в присутствии соединений, ингибирующих рост и деление нетрансформированных растений

Маркерные гены:

- гены, отвечающие за устойчивость к антибиотикам
- гены, отвечающие за устойчивость к гербицидам

4) Включение репортерных генов:

- Служат для идентификации трансгенных растений
- Замена маркерных генов на репортерные исключает риск для окружающей среды и здоровья человека
- Репортерные гены кодируют нейтральные для клеток белки, наличие которых в тканях легко тестировать

Репортерные гены:

- **β -глюкуронидаза (GUS)**-гидролизует глюкурониды, ткани окрашены в голубой цвет при использовании субстрата
- **зеленый флуоресцентный белок (GFP)** - способен флуоресцировать при облучении УФ
- **люцифераза (LUC)**- вызывает свечение клонов

Получение рекомбинантной векторной ДНК

5) Встраивание чужеродной ДНК в векторную молекулу (плазмида или вирус)

- Векторная молекула ДНК служит для переноса чужеродной ДНК в клетку
- Встраивание созданной рекомбинантной конструкции проводят в бактериях по разработанным и доступным генно-инженерным технологиям

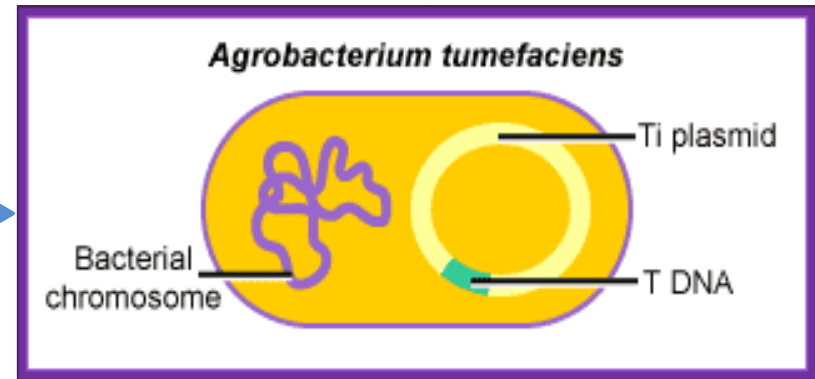
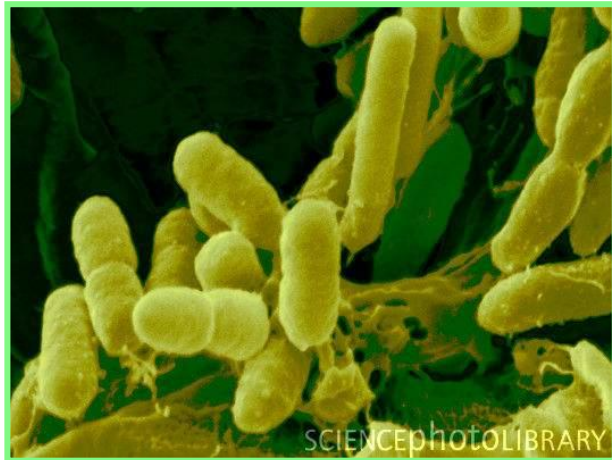
Способы доставки чужеродной ДНК в растения

- Векторная (непрямая) доставка:
 1. Агробактериальная трансформация
 2. Вирусная доставка
- Прямая доставка:
 1. Метод генной пушки (Биобаллистика)
 2. Метод соматической гибридизации
 3. Микроинъекция
 4. Электропорация

Агробактериальная трансформация

- Природная генетическая трансформация растений основана на заражении растений агробактериями
- **Суть:** Агробактерии способны к внедрению в геном растений части собственной ДНК и вызывают образование опухолей у растений
- Заболевание вызывается экспрессией в растительном геноме специфического сегмента бактериальной плазмиды – T-ДНК
- **Агробактерии** инфицируют преимущественно **двудольные растения**

Фитопатогенные агробактерии

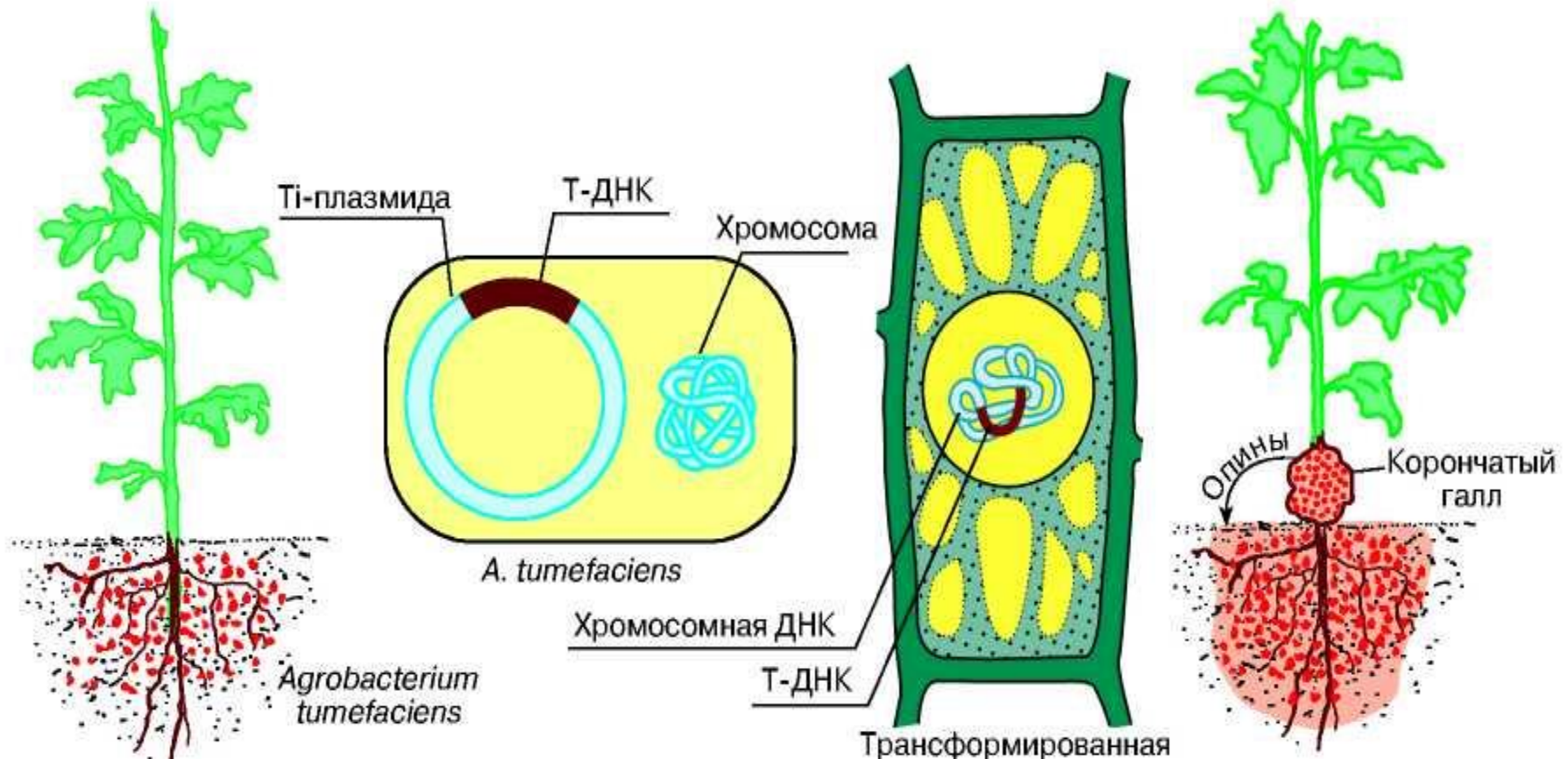


Корончатый галл



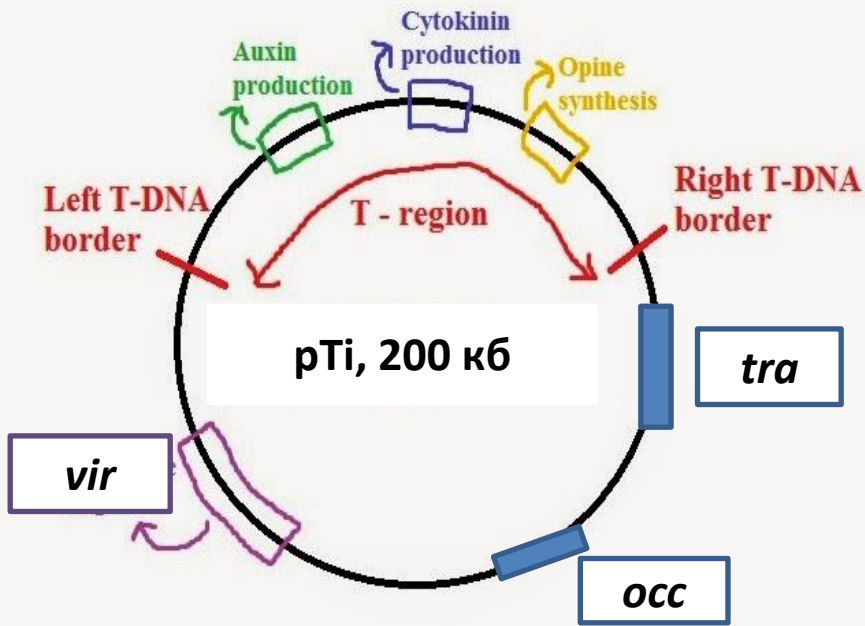
Корневые опухоли

Природная трансформация растений агробактериями

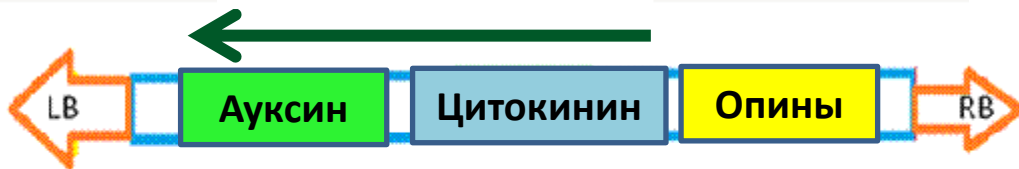


Агробактерии это аэробные почвенные бактерии, они колонизируют ризосферу корней

Структура Ti плазмиды



онкогены



T-ДНК, 24 кб

T-ДНК

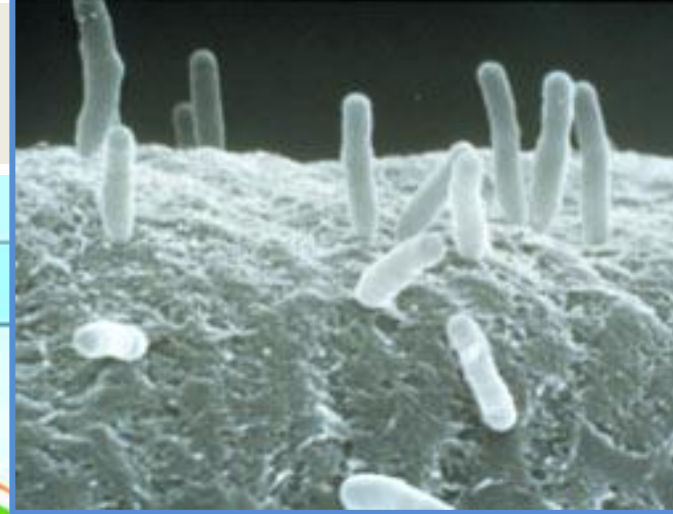
Гены опинов –

гены необычных производных аминокислот, их используют бактерии как источники C и N

Ауксин и цитокинин –

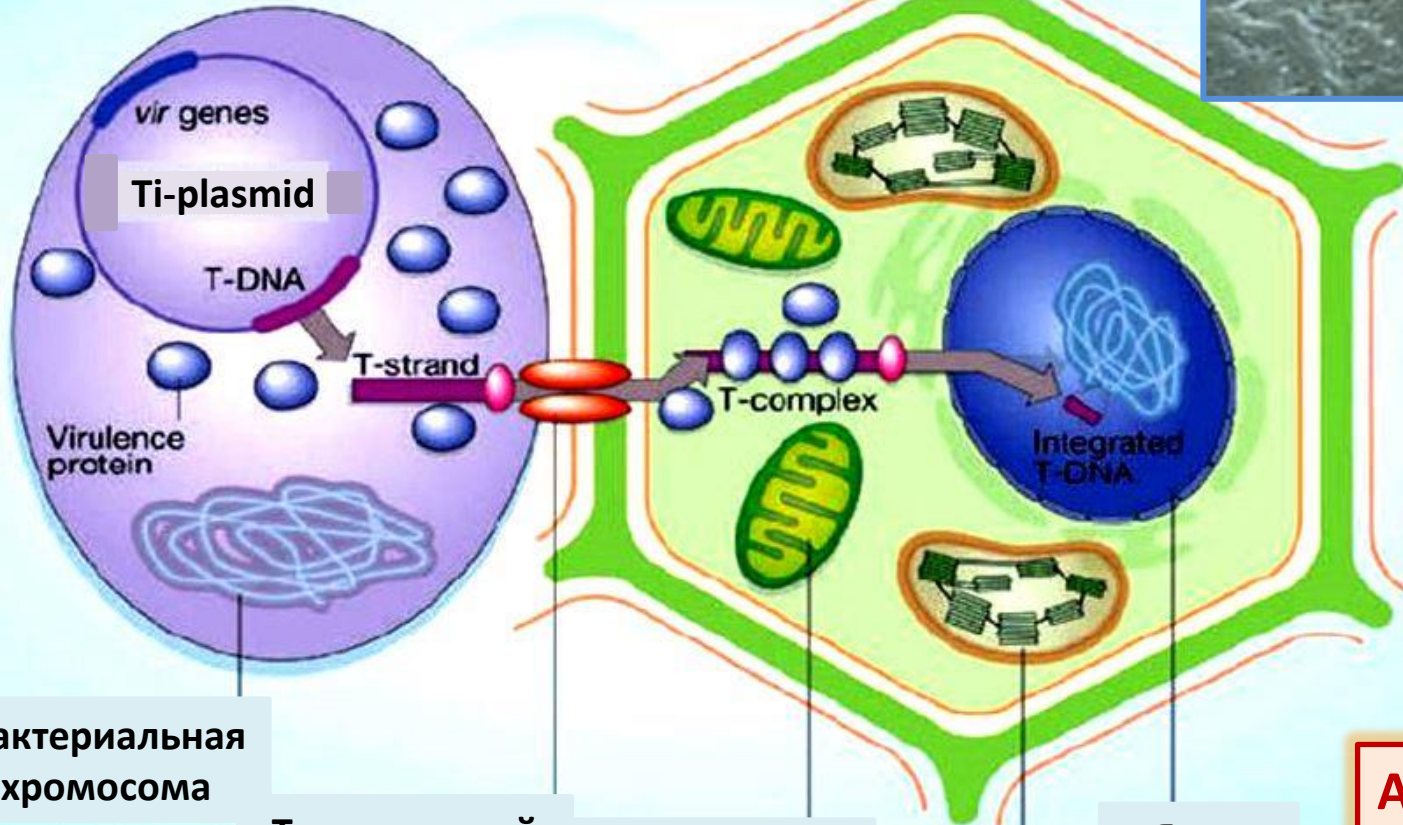
регуляторы роста растений, онкогены, их синтез вызывает разрастание ткани растений

Трансформация Т-ДНК в растительную клетку



Agrobacterium cell

Plant cell



Бактериальная хромосома

Транспортный канал

Митохондрия

Хлоропласт

Ядро

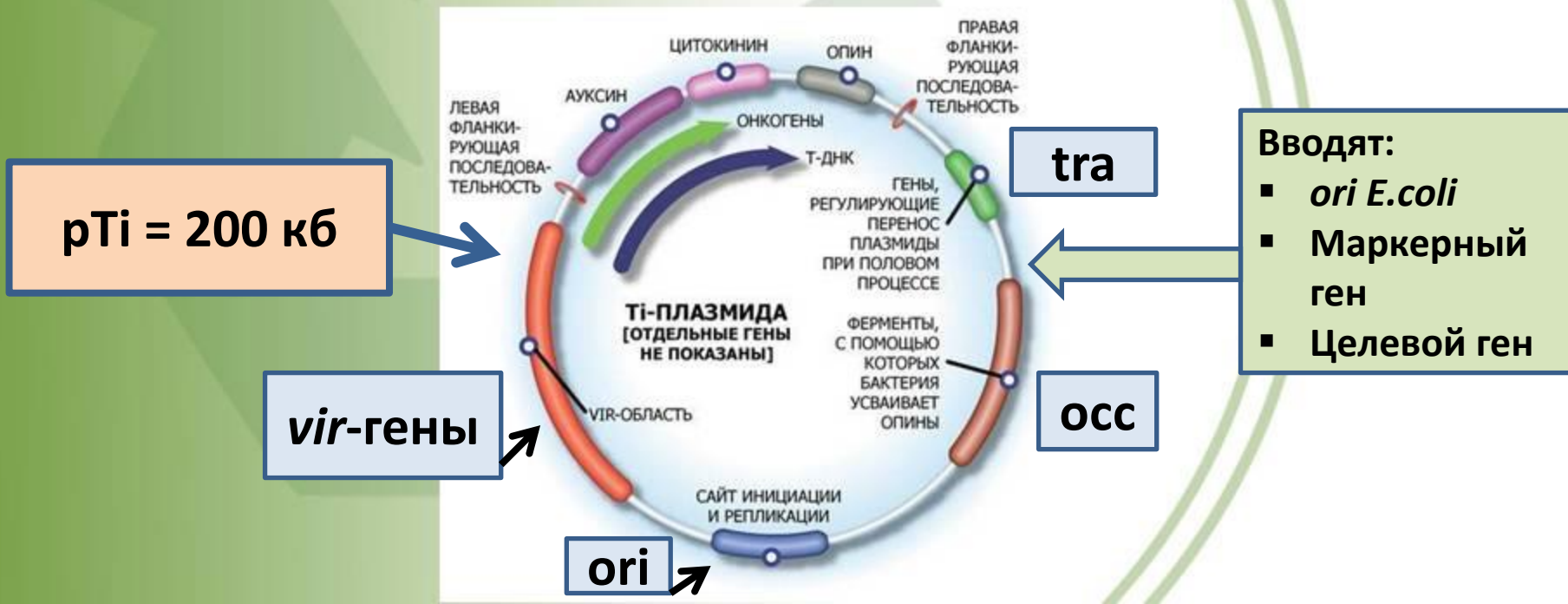
Агробактерии - природный генный инженер

Трансформация Т-ДНК в клетки растения

- **Агробактерии** не умеют разрушать растительную клеточную стенку
- **Трансформация** происходит в местах повреждения ткани растений
- **Перенос Т-ДНК** индуцируется соединениями, которые освобождаются при повреждении
- **Бактерии** воспринимают эти молекулы как сигнальные и активируют *vir*-гены
- **Vir- белки** вырезают Т-ДНК, упаковывают ее и переносят через специфические каналы в растительную клетку
- **Перенос основан** на белок-белковом взаимодействии
- **Укутанную Т-ДНК** узнают рецепторы ядерной мембраны и она проникает в ядро
- **В ядре** происходит интеграция в случайные сайты хромосом

Конструирование генетических векторов на основе Ti-плазмиды

1. удаляется область T-ДНК
2. добавляется сайт инициации репликации (*ori*) плазмиды *Escherichia coli*
3. добавляются маркерные гены

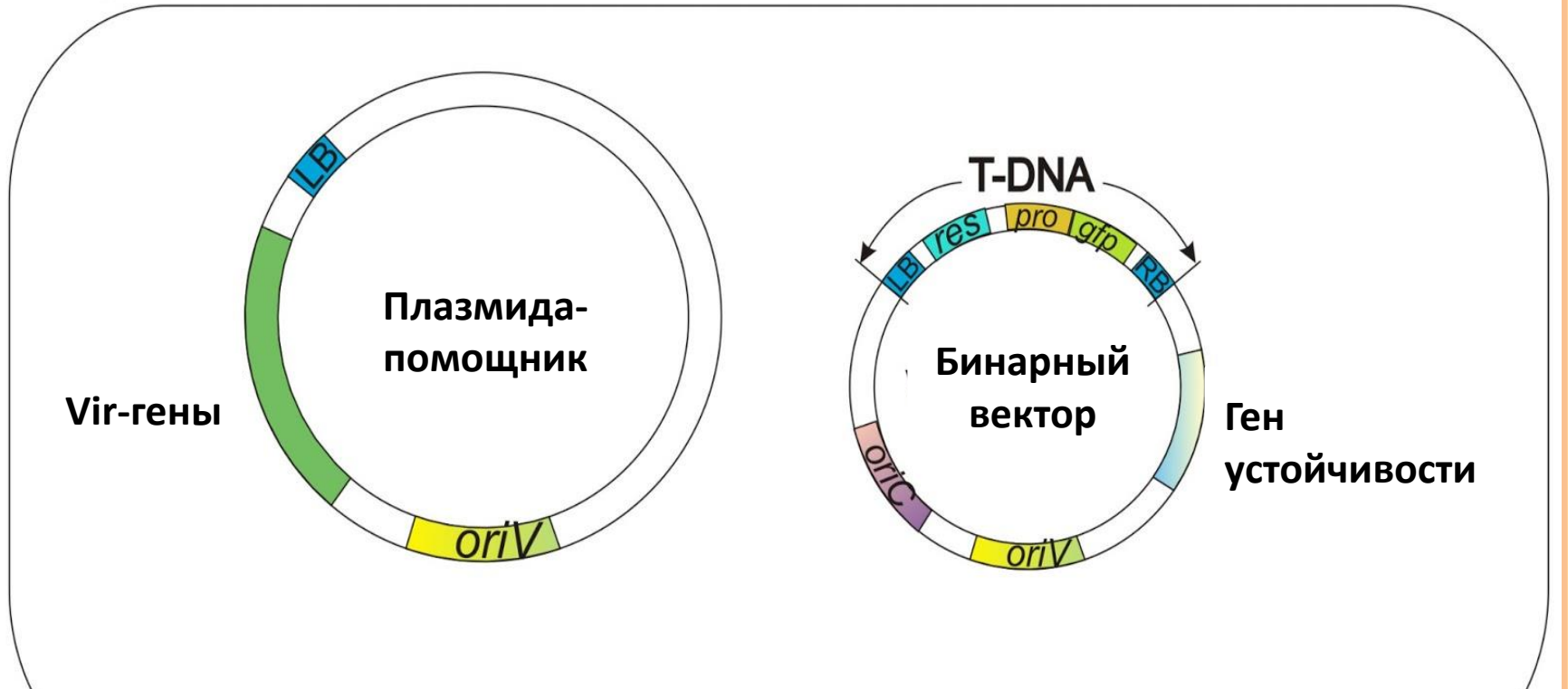


Конструирование генетических векторов на основе Ti-плазмиды

- **Тенденция** – максимально сократить размер вектора (удаляют *tra-*, *осс*-гены)
- **Сохраняют *vir*-гены в векторе**, пограничные последовательности T-ДНК (LB и RB)
- **Вводят в вектор *ori E.coli* и селективный ген** для отбора трансформантов (ген устойчивости)
- **Замена T-ДНК** на чужеродную целевую ДНК вместе:
 - **промоторы** конститутивные или тканеспецифичные (вирусные или растительные)
 - **сигнальные пептиды, репортеры**
 - **терминаторы**, чтобы обеспечить полиаденилирование

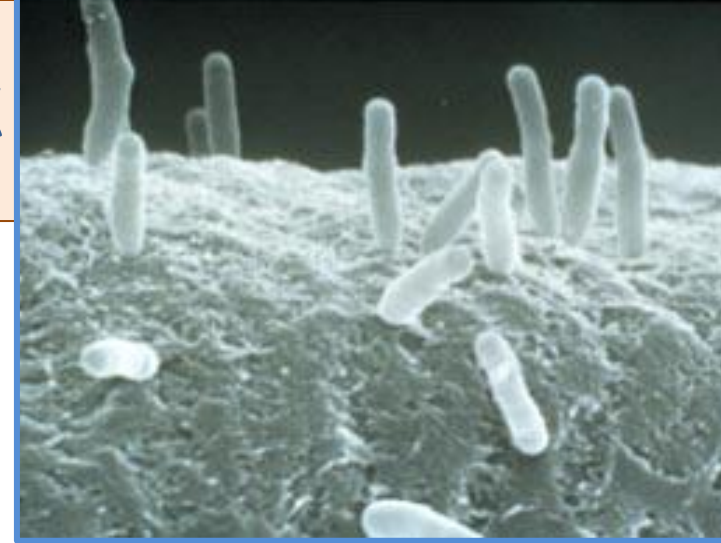
Коинтеграция плазмид

Agrobacterium tumefaciens



- Коинтегративные векторы служат для транспортировки Т-ДНК
- Бинарный вектор: все генно-инженерные манипуляции проводят в *E. coli*, а затем вектор переносят в штаммы агробактерий

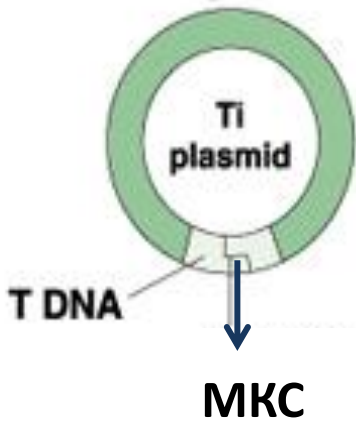
Трансформация чужеродной ДНК



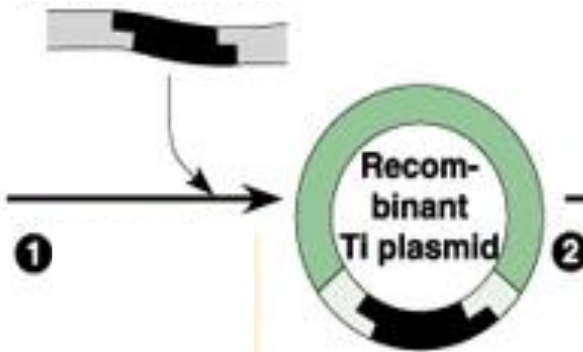
Agrobacterium tumefaciens

Ti

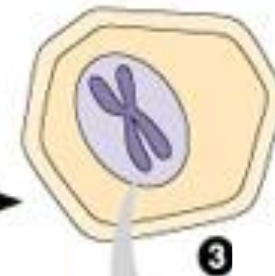
Целевой ген



МКС



2



Интеграция в геном растения



Трансгенное растение

СУТЬ: Рекомбинантные агробактерии инфицируют растения и переносят в растительный геном модифицированную Т-ДНК

Трансгенные растения, полученные при помощи агробактерий

- Двудольные растения:

- Картофель

- Бобовые

- Крестоцветные (рапс, капуста и др.)

- Плодовые деревья

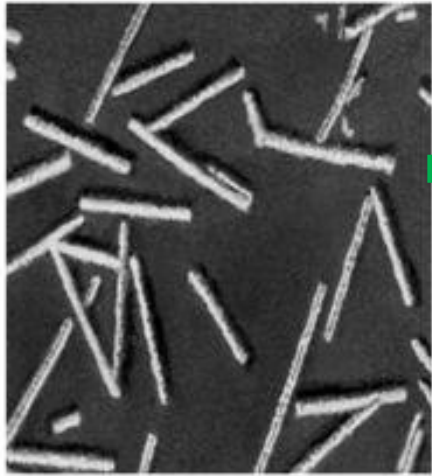
- Однодольные растения

- В стадии разработки – злаки, лилейные, луковичные

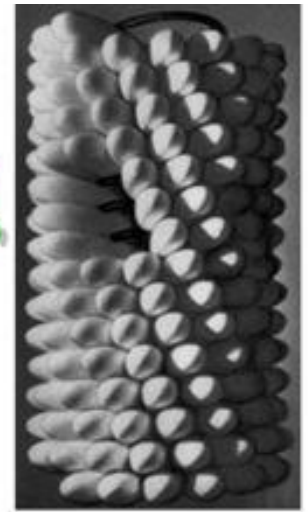
Векторы на основе вирусов растений

В генной инженерии растений используют вирус табачной мозаики (ВТМ) и вирус мозаики коровьего гороха (ВМКГ).

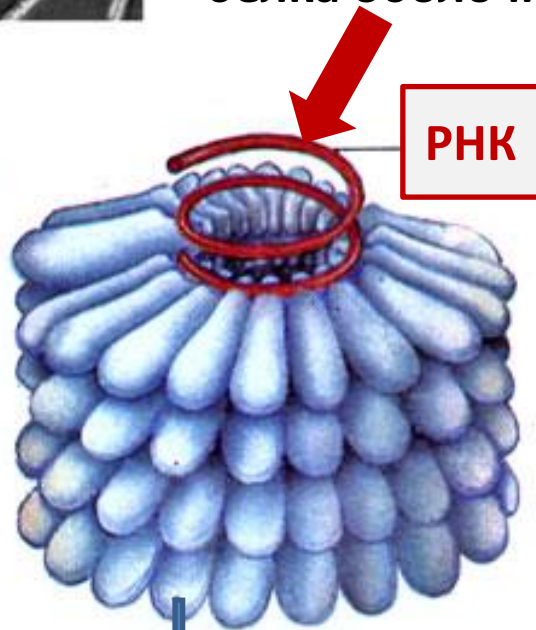
- Геном ВТМ – оцРНК, 6,4 кб, кодирует 4 белка, включая белок оболочки (17,6 кДа)
- Для конструирования используют стратегию вирусного дисплея
- Оболочка **ВТМ** состоит из 2130 молекул одинакового белка. Чужеродную ДНК встраивают в ген белка оболочки ВТМ
- Этим методом получен пептид из 12 аминокислот – ингибитор для применения в лечении гипертонии
- Получены вирусы, в оболочке которых закреплены антигенные детерминанты малярийного плазмодия, вируса гриппа и вируса иммунодефицита человека первого типа (ВИЧ-1)



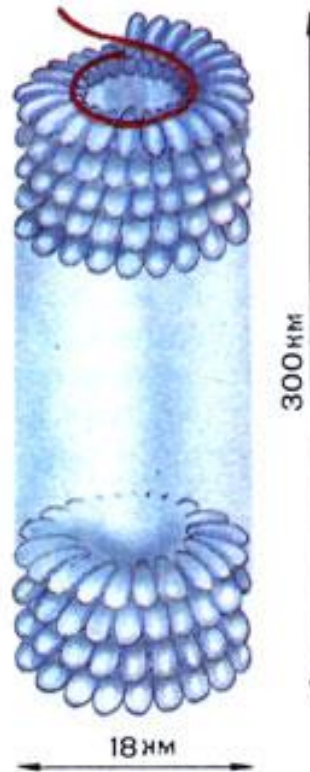
Вирус табачной мозаики.



Чужеродную ДНК
встраивают в ген
белка оболочки ВТМ

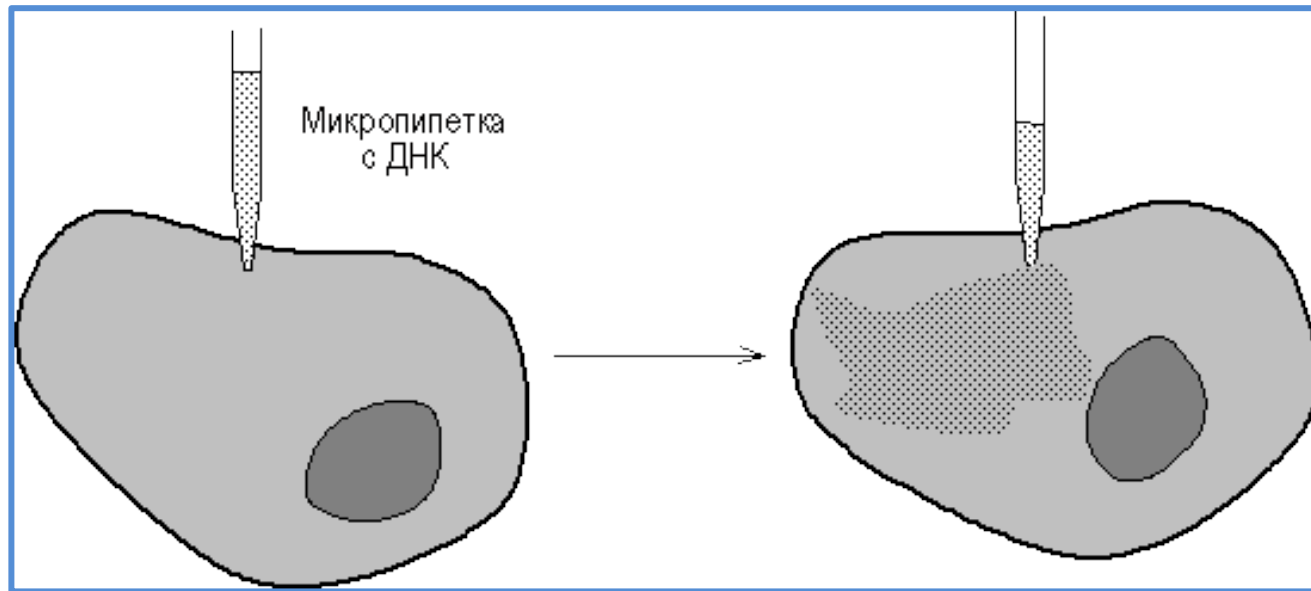


Оболочка состоит
из **2130** молекул
одинакового белка



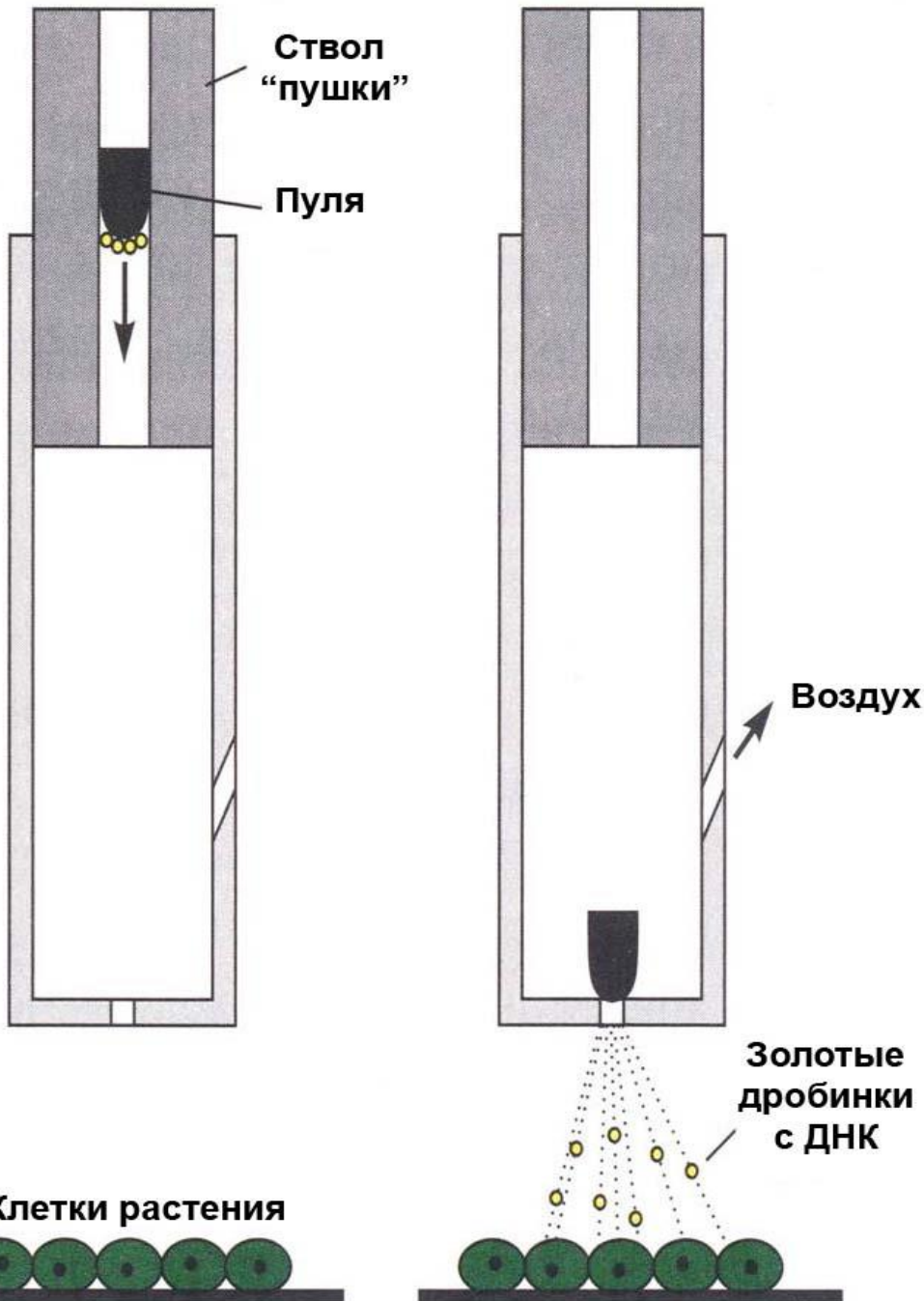
- Вирус растений.
- Форма вириона – палочковидный.
- Геном – одна цепь РНК.
- Капсид – спиральный.
- Нет сайтов для встраивания в геноме

Микроинъекция ДНК



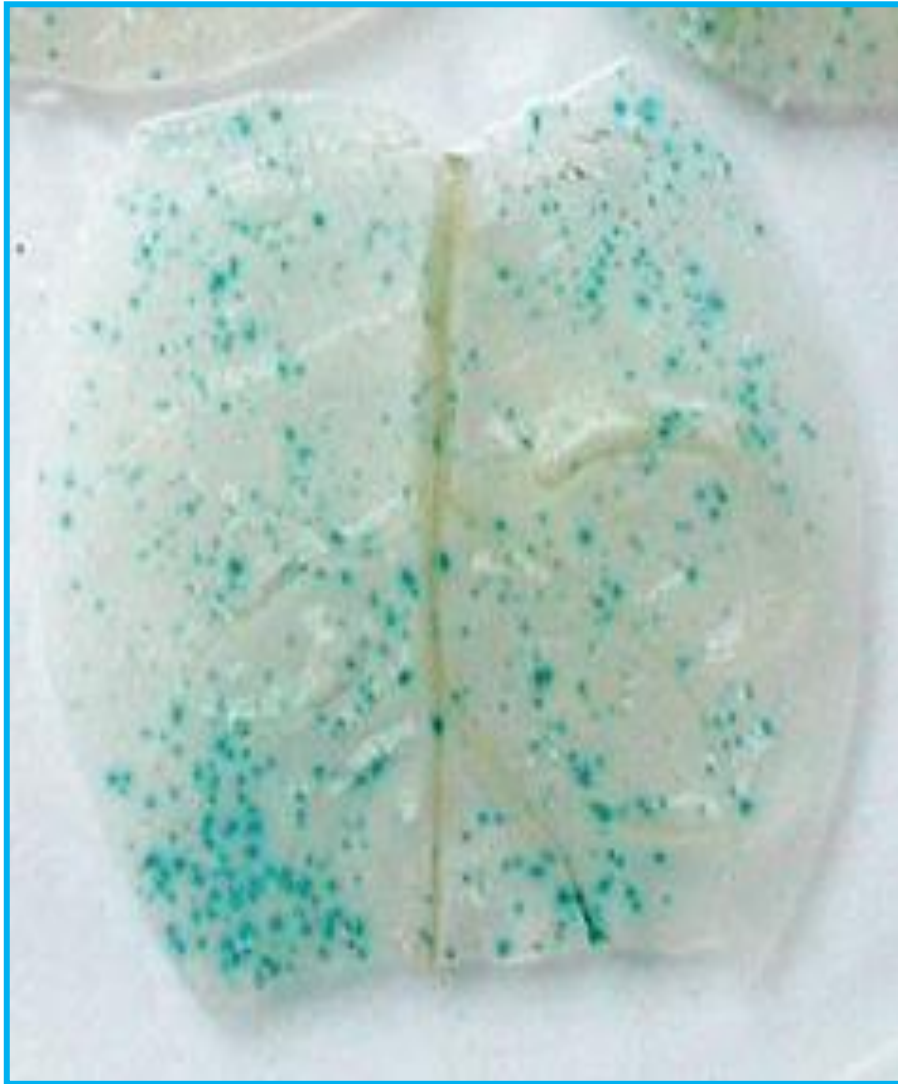
- При использовании специального оборудования можно за 1 час инъецировать до 1000 клеток
- В 50% клеток наблюдается стабильная интеграция и экспрессия инъецированных генов
- **Преимущество метода в том, что он позволяет вводить любую ДНК в любые клетки**

Метод «генной» пушки - биобаллистика



- На дробинки золота напыляют ДНК и помещают внутрь пушки
- Клетки помещают под пушку
- В пушке вакуумным насосом уменьшают давление до 0,1 атм
- В момент сбрасывания давления дробинки с ДНК с огромной скоростью вылетают из пушки, разрывают клеточные стенки, входят в цитоплазму и ядро клеток
- Так получены стабильные трансформанты кукурузы, риса, пшеницы и ячменя

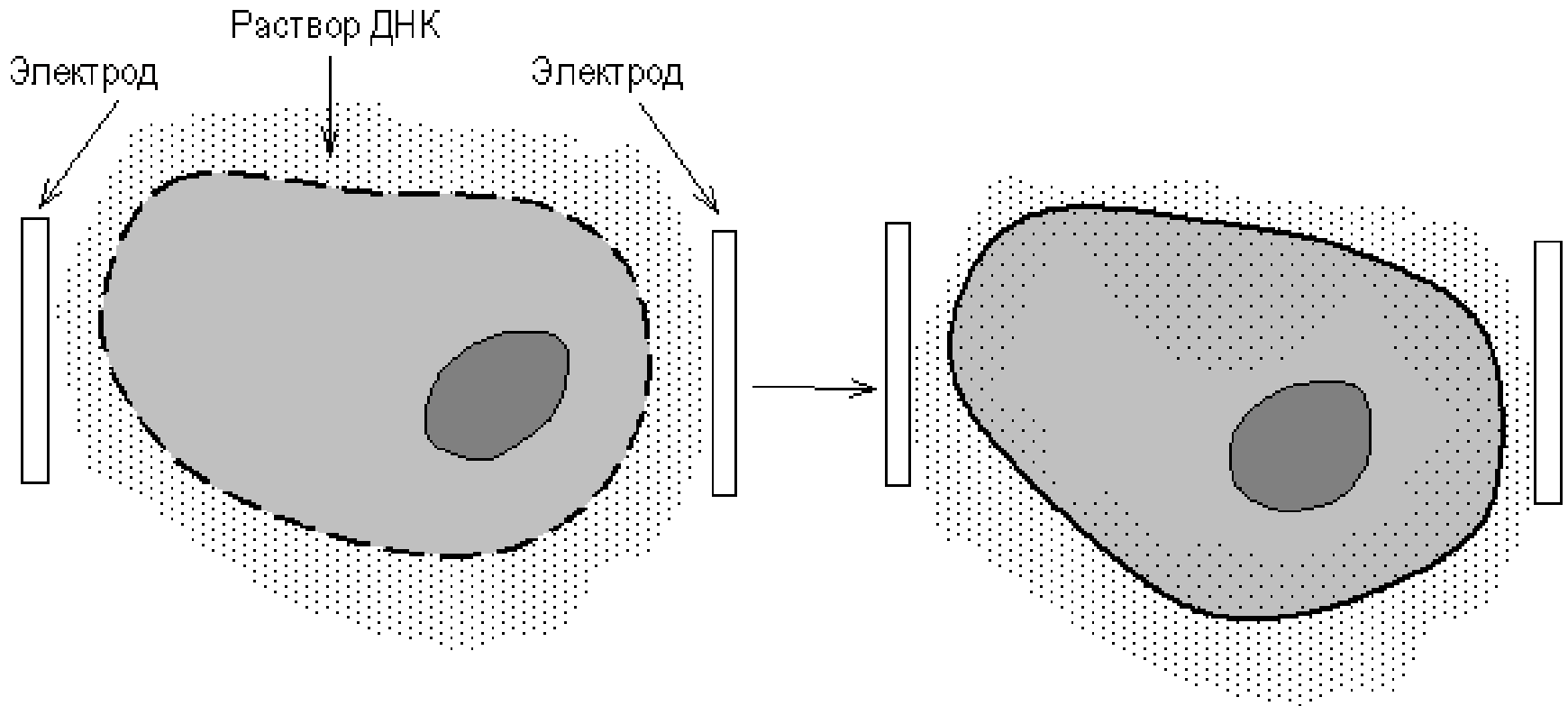
Метод биобаллистики



Пятна голубого цвета указывают на зоны интеграции трансгенов - это экспрессия репортерного **GUS-гена**, кодирующего бета-глюкуронидазу при инкубации в растворе со специфическим субстратом

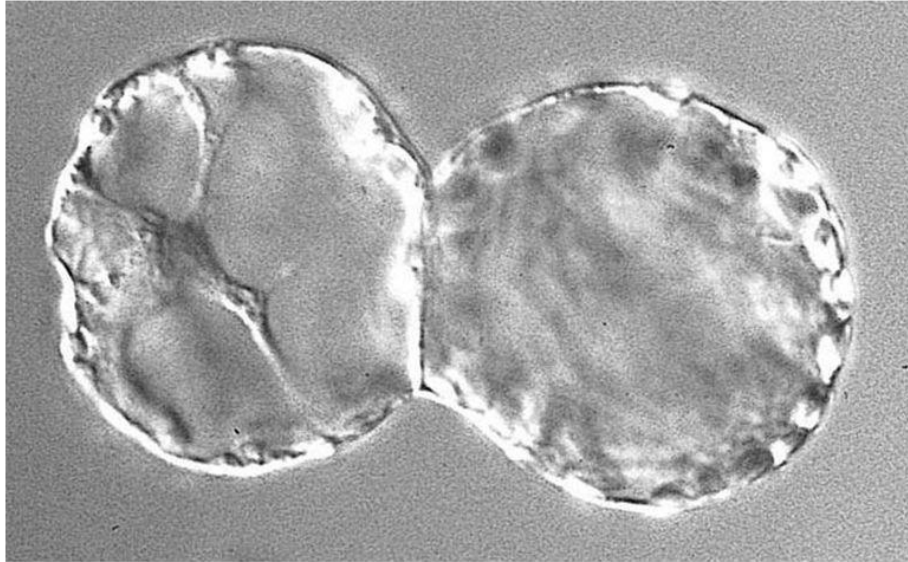
Этот метод применяют для трансформации однодольных растений и внеядерных геномов - хлоропластов и митохондрий

Метод электропорации



- **Электропорация** - импульсы высокого напряжения, которые увеличивают проницаемость мембран
- В среду добавляют клетки и фрагменты ДНК, которые необходимо ввести в клетки
- Через среду пропускают высоковольтные импульсы, приводящие к образованию пор в мембране, через которые ДНК может войти в клетку

Техника слияния протопластов



Достоинство - ЭТИМ методом можно ввести большой объем ДНК.

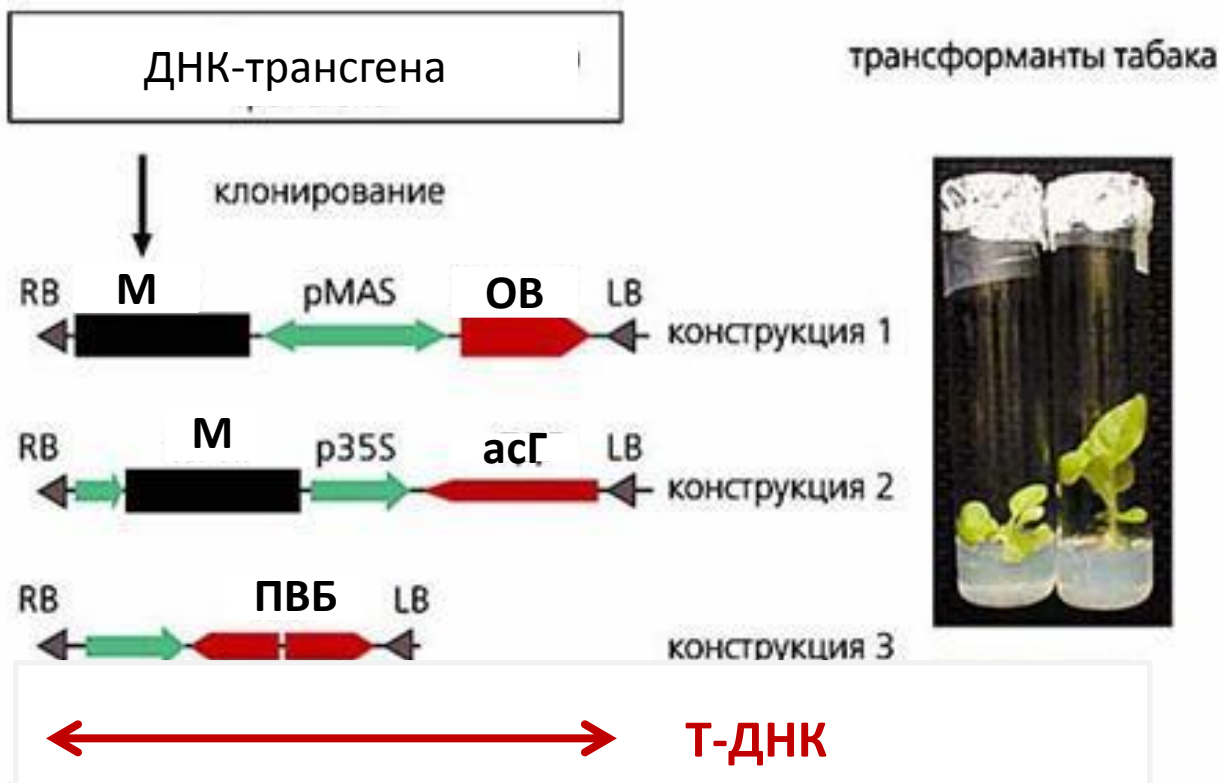
Недостаток – отсутствие прогнозируемого результата

- **Для получения гибридных клеток** растений получают протопласты путем разрушения клеточных стенок растений ферментами
- Слияния протопластов добиваются обработкой их полиэтиленгликолем
- Гибриды восстанавливают клеточные стенки и размножаются делением

Вирусостойчивые растения

1. Чтобы получить вирусостойчивые растения в геном растения вводят ген белка оболочки вируса, что приводит к уменьшению инфицированности и ингибированию размножения вируса
2. Защита растений от вирусов может осуществляться с помощью введения генов противовирусных белков, синтезируемых растениями

Получение растений, устойчивых к вирусам



p35S – сильный конститутивный промотор вируса мозаики цветной капусты

RB, LB – фланги Т-ДНК;
М – ген устойчивости к канамицину;
ОВ – ген белка вирусной оболочки
acГ- гены вируса, размещенные в антисмысловой ориентации
ПВБ – гены противовирусных белков растений
pMAS, p35S – промоторы для экспрессии трансгенов
pMAS - промотор гена маннопинсинтазы обеспечивает средний уровень экспрессии трансгена в листьях и корнях растения и высокий в клетках, окружающих поврежденные ткани.

Устойчивость к вирусам

- Первые попытки – табак
- Поражается вирусом табачной мозаики (опасен также для томатов)
- С помощью *Agrobacterium* ген ВТМ, кодирующий оболочку вируса введен в растения табака - вакцинация

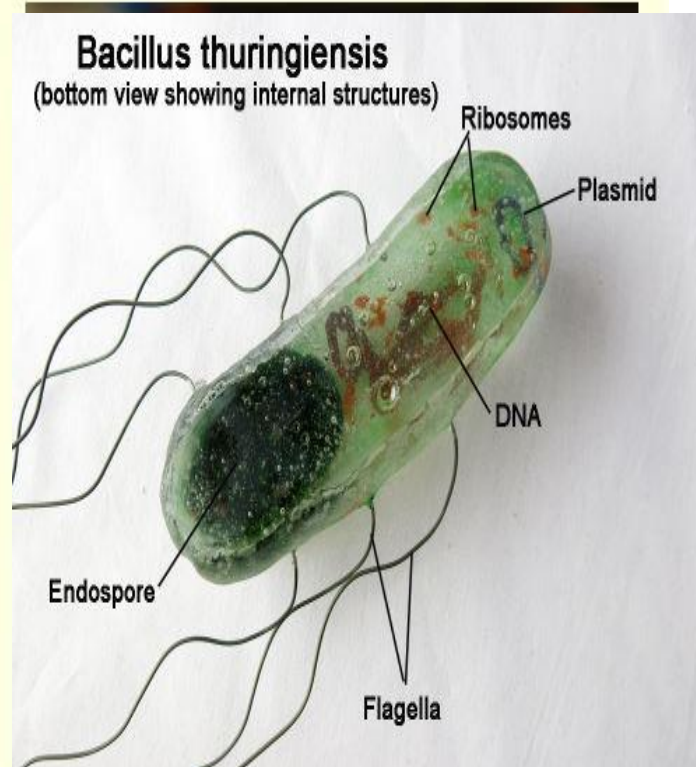


Получены растения, устойчивые к вирусам:

- Вирус скручивания листьев картофеля
- Вирус X картофеля
- Вирус Y картофеля
- Вирус S картофеля
- Вирус мозаики сои
- Вирус желтой мозаики кабачков
- Вирус мозаики огурца

Растения, устойчивые к насекомым-вредителям

Почвенная бактерия *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) образует белковый токсин инсектицидного действия. В 80 000 раз более мощного действия, чем фосфорорганические инсектициды. Специфичен (разные штаммы действуют на разных насекомых).



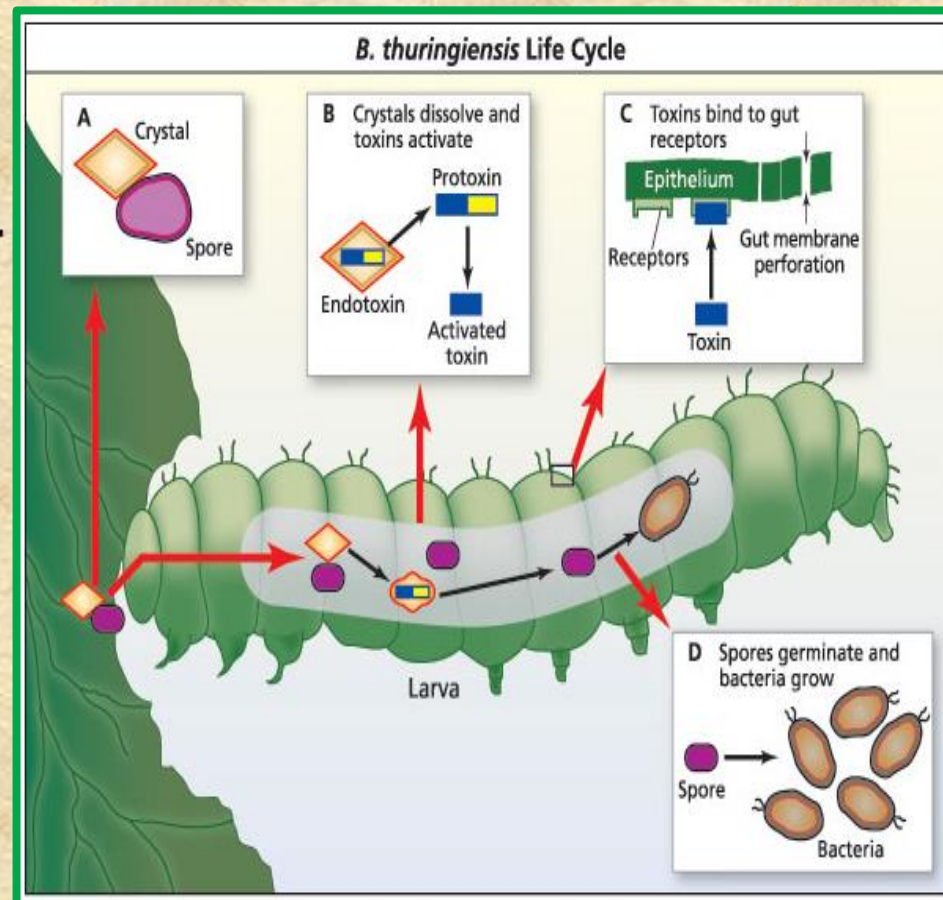
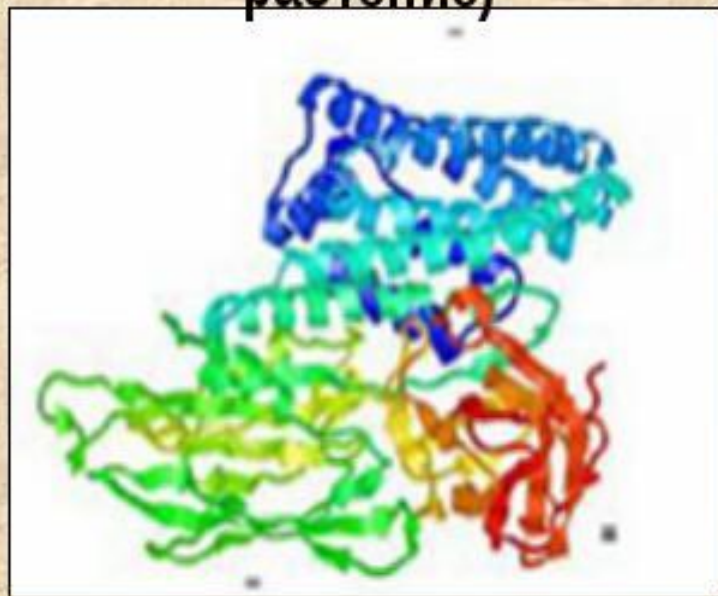
- Вредители питаются внутренними тканями растений и препараты, распыляемые на поверхности растений малоэффективны

Проблему решают путем экспрессии протоксина Bt в растениях

Задача генных инженеров в создании трансгенного растения, которое синтезирует активную форму бактериального инсектицида

• Трансгенные растения, устойчивые к насекомым

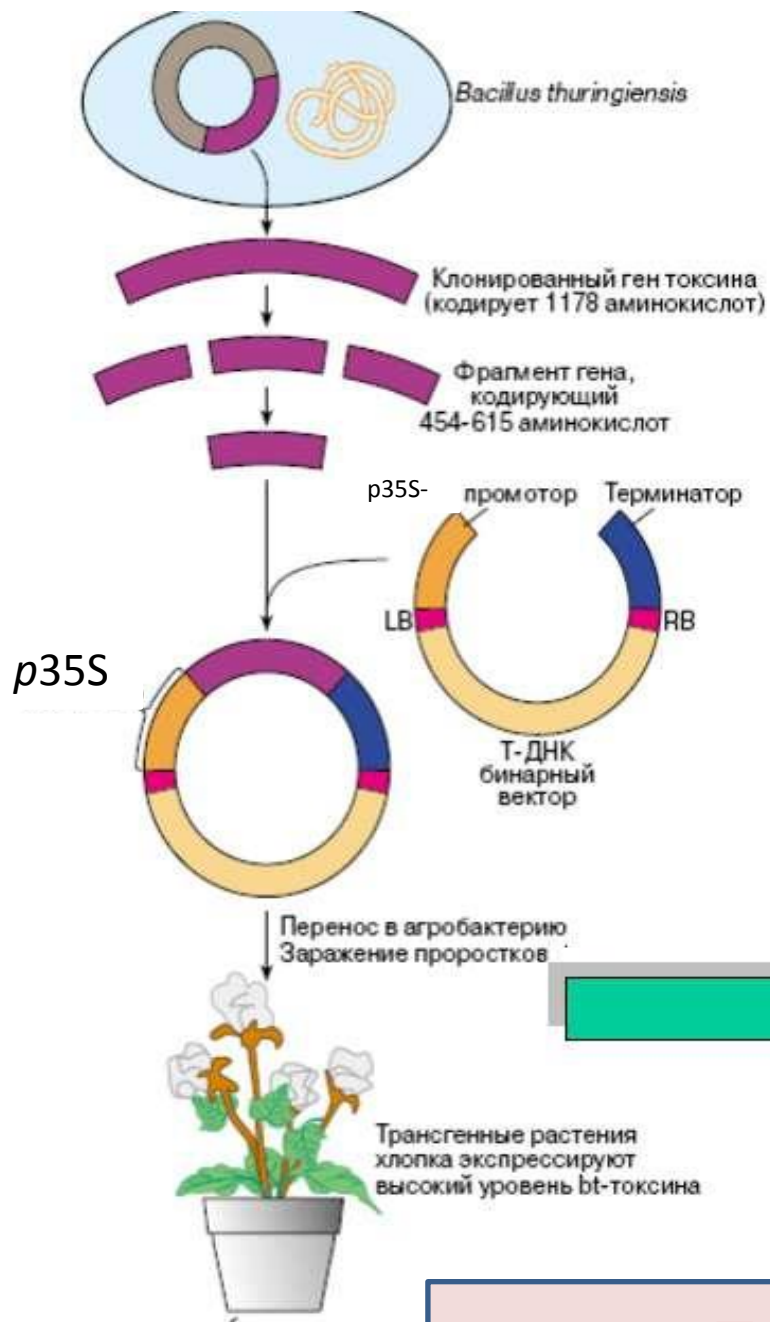
- Современные высоко продуктивные сорта очень подвержены воздействию вредителей (10 вредителей на 1 растение)



- Структура Bt-токсина (протоксина) *Bacillus thuringiensis*. Белок 1178 а/к. Бактерию уже 50 лет используют для борьбы (поливают поля)

- Попадая в кишечник личинок насекомого, протоксин разрушается под действием ферментов с образованием эндотоксина

- Ген Bt (*Bacillus thuringiensis*) кодирует токсин для насекомых. Достаточно фрагмента гена Bt для устойчивости растений к насекомым (*cry*-гены).
- Ген Bt встраивают в Т-ДНК агробактерий под сильный *p35S* промотор.
- Вектор трансформировали в растения хлопка.
- Трансгенные растения устойчивы к личинкам многих насекомых.



ПОЛУЧЕНИЕ Bt-растений

Гербициды предназначены для борьбы с сорняками в посевах сельскохозяйственных культур



Ежегодно на производство гербицидов в мире расходуют 100 млрд долларов

Растения с устойчивостью к гербицидам

Создание сельскохозяйственных культур, устойчивых к гербицидам по направлениям:

1. Уменьшение поглощения гербицида растением
2. Снижение способности белка, чувствительного к гербициду, к связыванию с НИМ
3. Инактивация гербицида в растении

Растения, устойчивые к патогенным грибам и бактериям

- В ответ на проникновение патогенов растения синтезируют патогенез-связанные (PR) белки: глюконаза, хитиназа, ингибиторы протеиназ, амилаз и др.
- Стратегия: получить растения, способные конститутивно экспрессировать гены одного или нескольких PR-белков
- Получены рис, табак, картофель, которые более устойчивы к патогенным грибам, чем в контроле

Растения, устойчивые к стрессам

- Окислительный стресс (накопление супероксид аниона) – повышение уровня экспрессии супероксид-дисмутазы (превращает супероксид-анион в O₂ и перекись водорода)
- Солевой стресс (засуха ведет к засолению почв) - повышение уровня экспрессии низкомолекулярных нетоксичных белков-осмопротекторов

Трансгенные растения - продуценты фармацевтических белков

- Многие фармацевтические белки получают из трансгенных микроорганизмов, которые часто не умеют синтезировать аутентичные белки животных и человека
- Трансгенные растения – перспективные продуценты гормонов, факторов роста и ферментов для фармакологии

Биофарминг

- **Биофарминг** - создание генетически модифицированных растений для использования в производстве фармакологически активных субстанций
- Таким способом можно получать витамины, жирные кислоты, углеводы
- Чаще - это создание трансгенных растений в качестве продуцентов рекомбинантных белков для медицины

Фармацевтические белки, полученные в трансгенных растениях

| ПРИМЕНЕНИЕ | РАСТЕНИЕ-ПРОДУЦЕНТ | ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ БЕЛОК |
|--------------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| Лечение гепатитов С и В | Табак | В-интерферон |
| Анемия | Табак | Эритропоэтин |
| Заменитель материнского молока | Картофель | Казеин |
| Ингибитор тромбина | Рапс | Гирудин |
| Антимикробное средство | картофель | Лактоферрин |
| Анестезия | аробидопсис | Энкефалин |
| Воспаление кишечника | Табак | Интерлейкин-10 |
| Косметология | Табак | Коллаген |
| Ингибитор трипсина | Кукуруза | Апротонин |

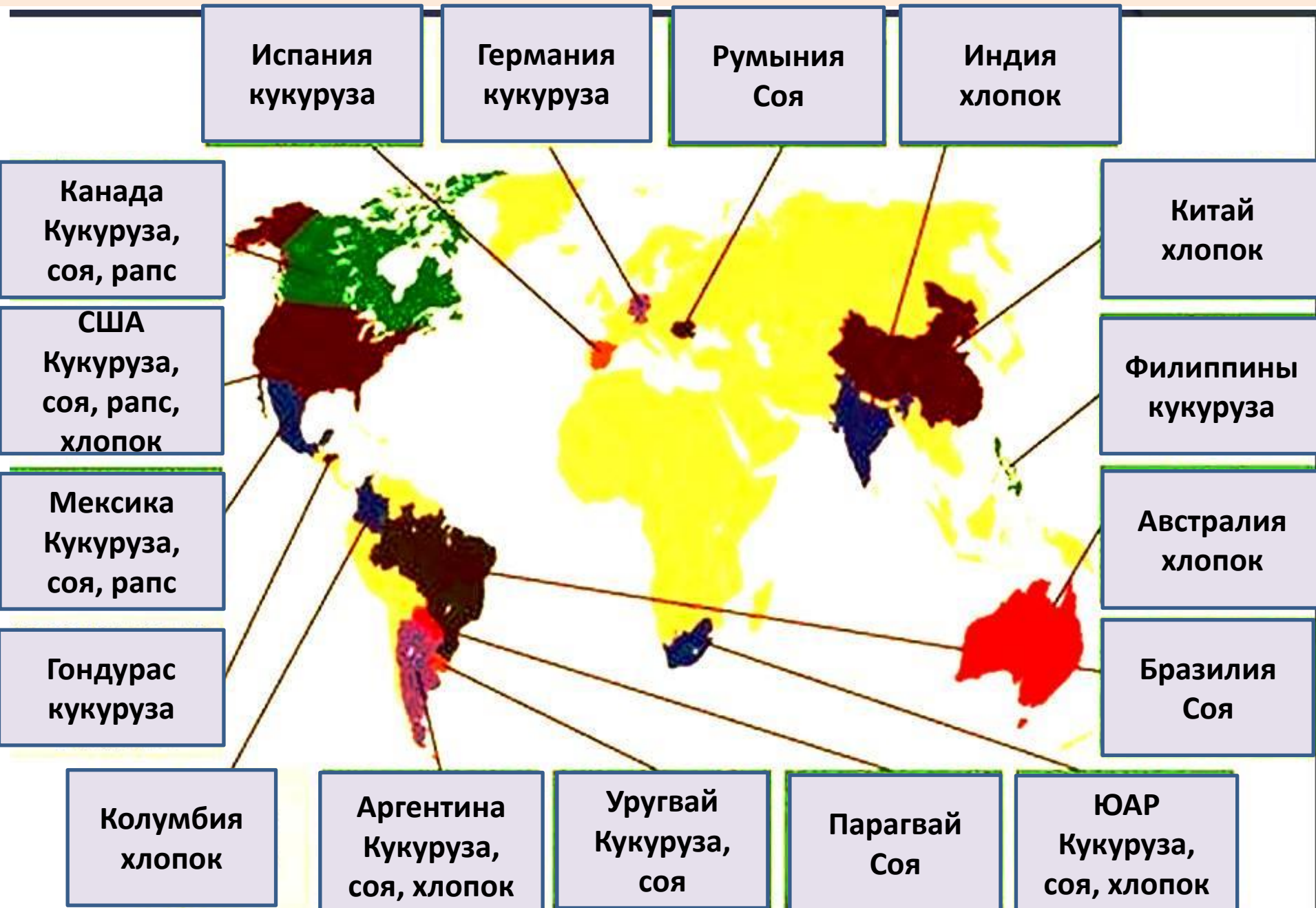
Трансгенные растения-продуценты вакцин (антигенов)

- Чужеродные вирусные белки способны синтезироваться в клетках трансгенных растений в их природной, иммунологически активной форме
- **Это открыло новые возможности использования растений как более дешевых систем экспрессии для создания рекомбинантных вакцин**

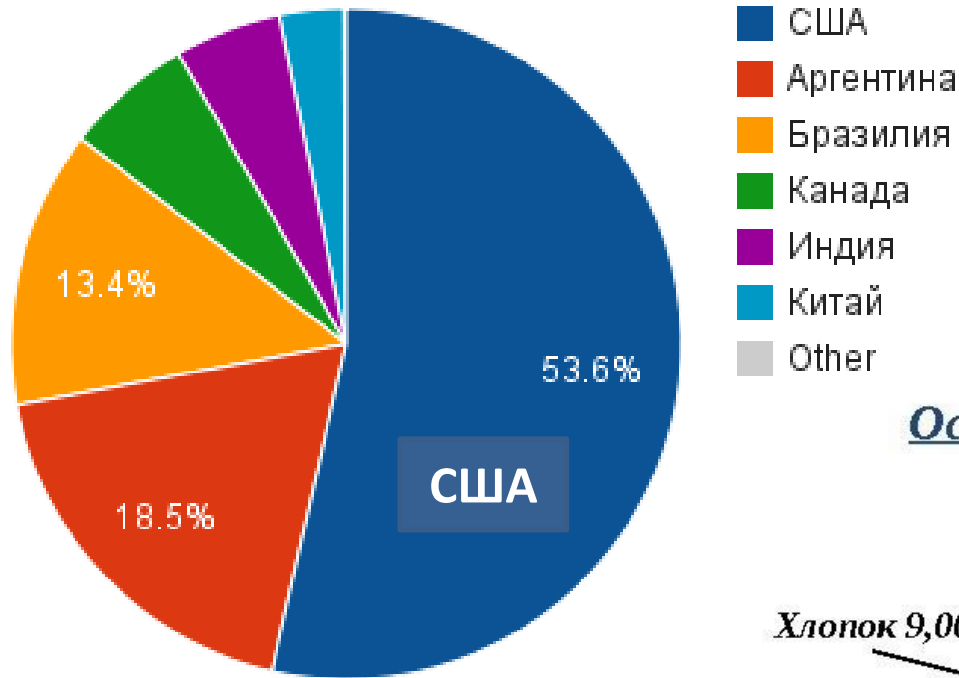
Трансгенные растения-продуценты вакцин (антигенов)

| ПАТОГЕН | РАСТЕНИЕ-ПРОДУЦЕНТ | АНТИГЕН |
|---------------------|--------------------------------------|---|
| Вирус гепатита В | Табак Картофель Люпин Салат | HbsAg – оболочечный белок (способен к самосборке в вирусоподобные частицы) |
| Вирус бешенства | Томаты | Гликопротеин |
| ВИЧ1 | Табак | gp120 |
| Вирус ящера | Арабидопсис Люцерна | VP1 |
| Холерный вибрион | Картофель | В-субъединица токсина |

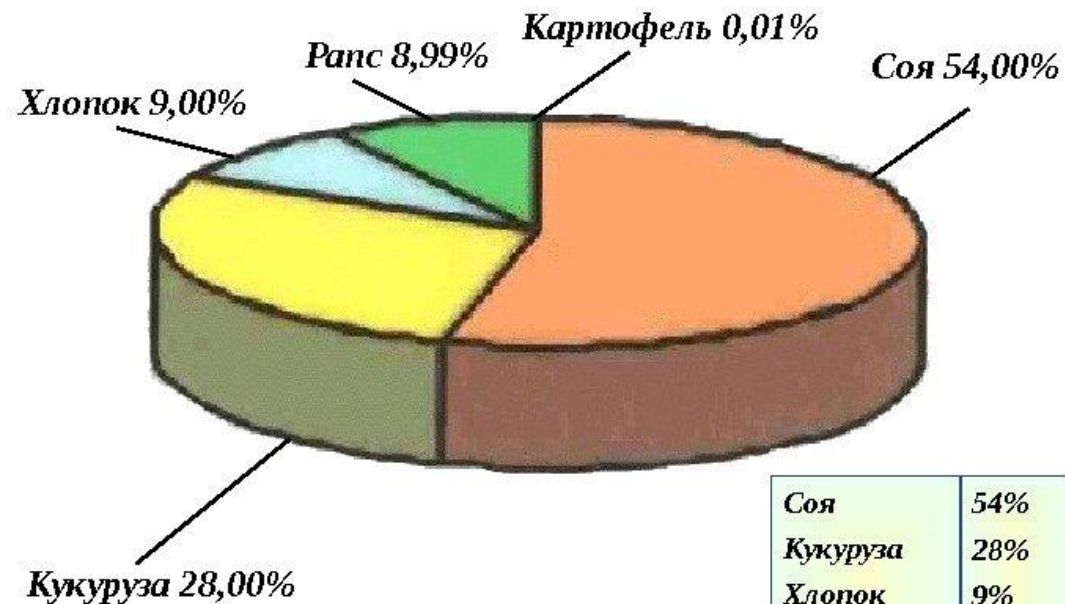
Карта трансгенного мира



Страны, выращивающие генно-модифицированные растения



Основные культуры трансгенных растений



| | |
|-----------|-------|
| Соя | 54% |
| Кукуруза | 28% |
| Хлопок | 9% |
| Рапс | 9% |
| Картофель | 0,01% |

- **53.6%** всех ГМО-культур выращены американскими фермерами

To be or not to be



Соя— самое „трангенное“ растение в мире. В США около 75% её посевных площадей засеяны генетически модифицированными сортами, а, например, в Аргентине они составляют 99%!



Рапс масличный в диком виде не встречается. В настоящее время рапс — основная масличная культура во многих странах мира, а также частый объект генетической модификации.



Бабочка-монарх — символ движения противников генетически модифицированных растений...

- **Н.К.Янковский:**

- «С хорошей телячьей отбивной Вы съедаете около миллиона миллиардов генов, в том числе нужных для формирования рогов. Однако рога появляются при этом далеко не у каждого»
- **ДНК из трансгенных растений подвержена гидролизу как и любая ДНК, присутствующая в пище и воздухе: поджелудочная железа выделяет в 12-перстную кишку РНКазы и ДНК-азы, которые разрушают содержащиеся в пище нуклеиновые кислоты. Затем процесс разрушения продолжается в кишечнике.**

Разумные опасения для применения гмо:

- 1. **Изменение микробиоты человека** (повышение ее устойчивости к антибиотикам)
 - 2. **Горизонтальный перенос** ("утечка" генов)
 - 3. **Аллергенные свойства** экзотических белков
 - 4. **Влияние на регуляцию** генов
 - 5. **Инактивация** генов
- Устойчивость к антибиотикам – самый удобный признак для отбора трансгенных растений
 - В 2002 г. ЕС запретил использовать гены устойчивости к антибиотикам, поскольку существует угроза попадания этих генов в бактерии желудка и кишечника

Пути решения этой проблемы:

- 1) ищут и используют другие "не страшные" маркеры - репортеры
- 2) вообще не используют маркеры (трудоемко и дорого)
- 3) используют маркеры, которые затем удаляют из состава Т-ДНК (вводят в состав Т-ДНК мобильные элементы)
- Разработаны специальные системы векторов, позволяющие избавиться от селективного маркера

Пути решения проблемы горизонтального переноса ("утечки" генов)

- Один из подходов - разрабатывают методы трансформации хлоропластной ДНК – это способ предотвращения "утечки", т.к. хлоропласты передаются только через яйцеклетку, а не через пыльцу, а значит нет нежелательного переноса трансгена с пыльцой на другие растения.

- **Ежова Татьяна Анатольевна «Трансгенные организмы – мифы и реальность»**
- http://www.bio.msu.ru/res/DictionaryAttachment/29/DOC_FILENAME/MFK_2014_vesna_sovremennaya_genetica_7.pdf