

ОСНОВЫ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ

Лекция 8

Трансгенные растения

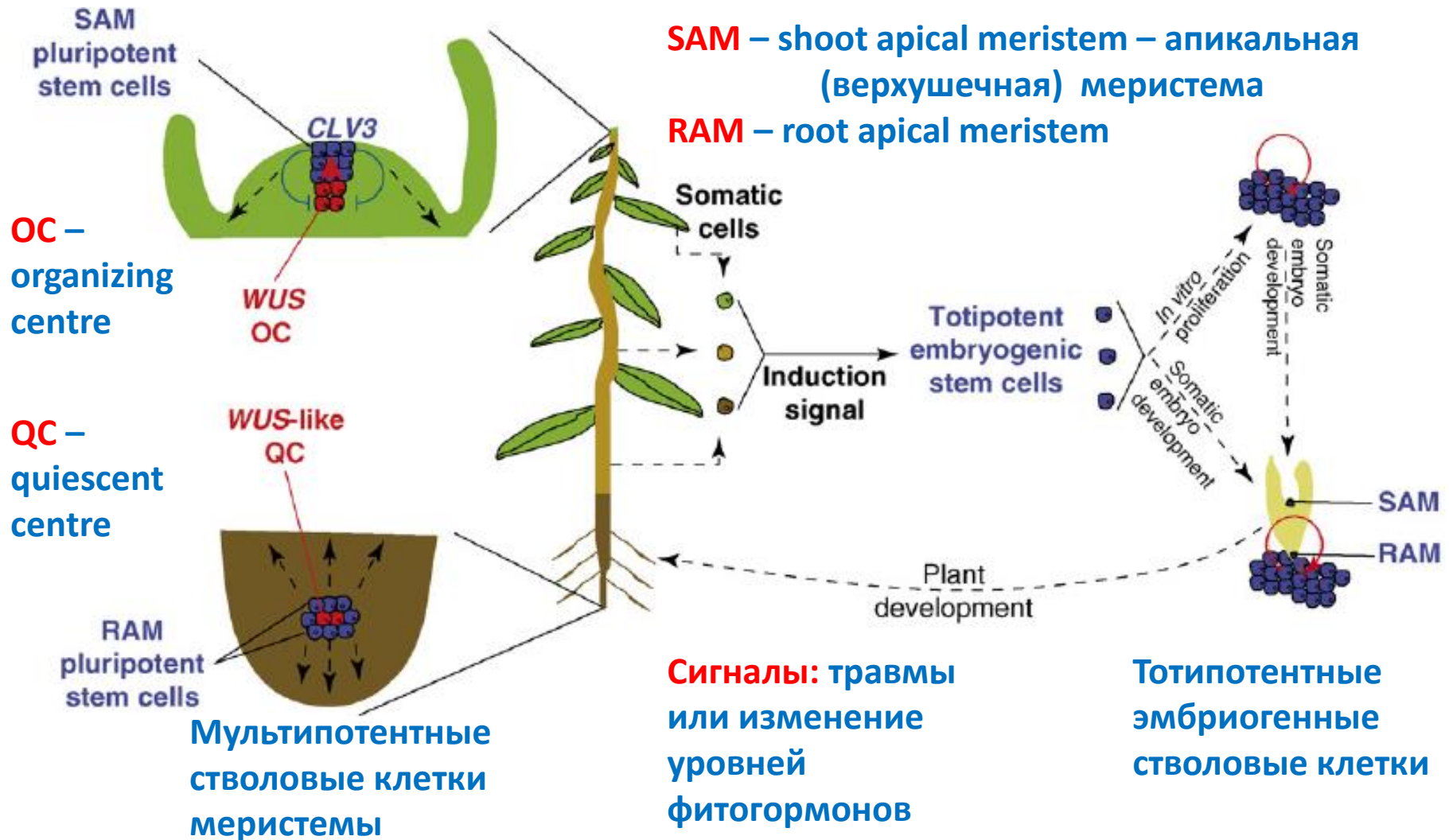


Между животными и растениями на молекулярном уровне имеется большое сходство

- ❖ Животные и растения происходят от общего эволюционного предшественника
- ❖ Для них характерны общие принципы хранения, реализации и воспроизведения генетической информации
- ❖ Молекулярно-биологические механизмы, лежащие в основе реализации этих принципов, исследуются одними и теми же методами (в том числе и генно-инженерными)
- ❖ Особенностью генома растений является его бóльшая пластичность и, как следствие, легкость дедифференцировки соматических клеток.

**В основе искусственного
трансгенеза у животных и растений
лежит концепция эмбриональных
стволовых клеток**

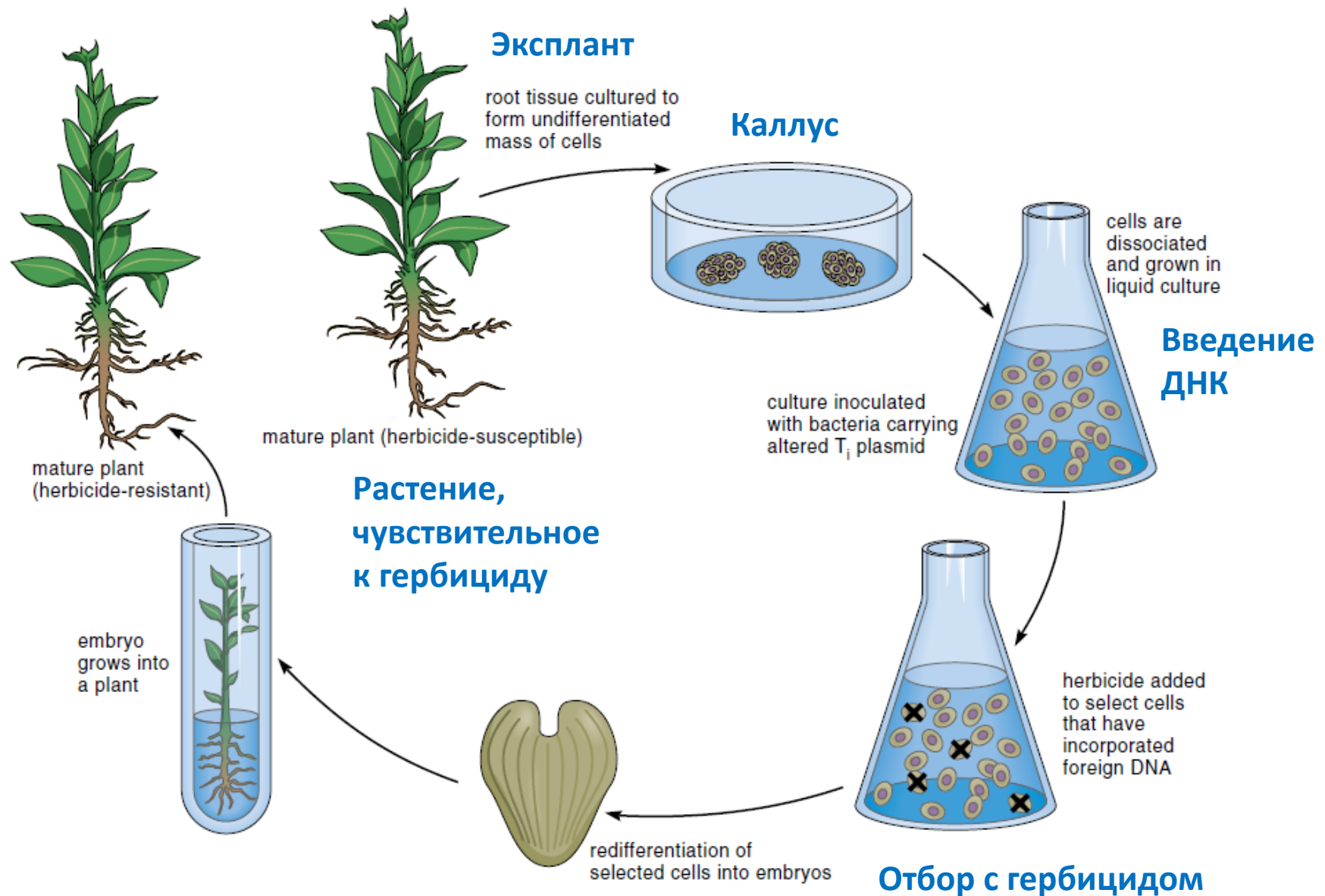
Классическая и расширенная концепции эмбриональных стволовых клеток растений



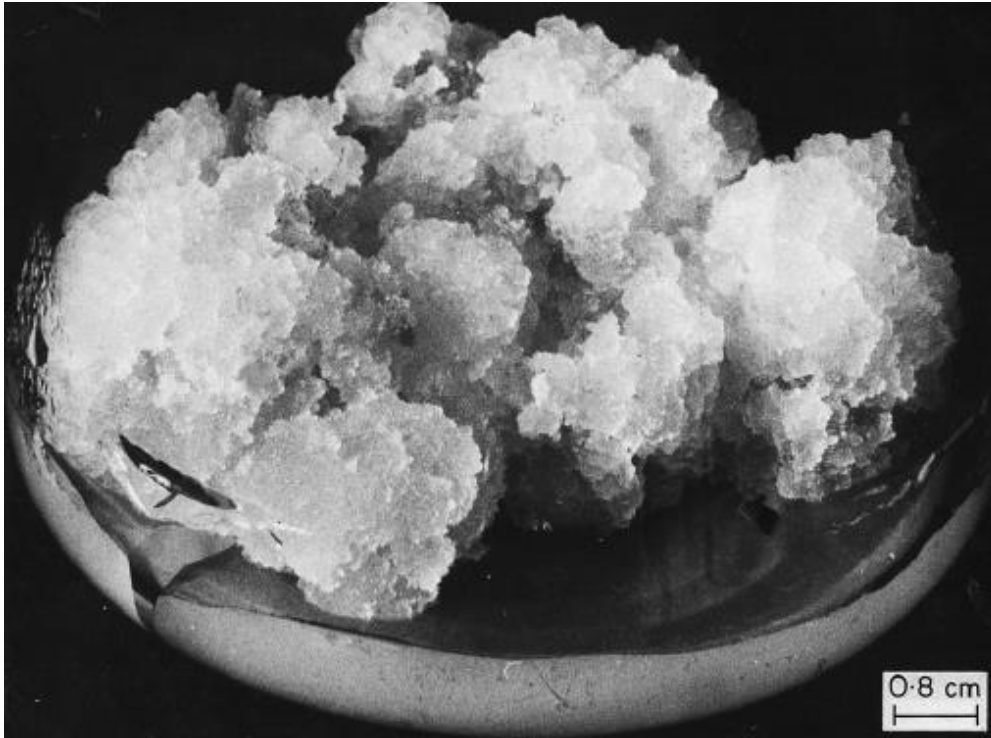
Классическая концепция

Расширенная концепция

Основные этапы получения трансгенных растений



Культура каллуса



Культуру клеток растений получают из эксплантатов, богатых недифференцированными клетками:

- ❖ Почки
- ❖ Узловые части стебля
- ❖ Кончики корней
- ❖ Прорастающие семена

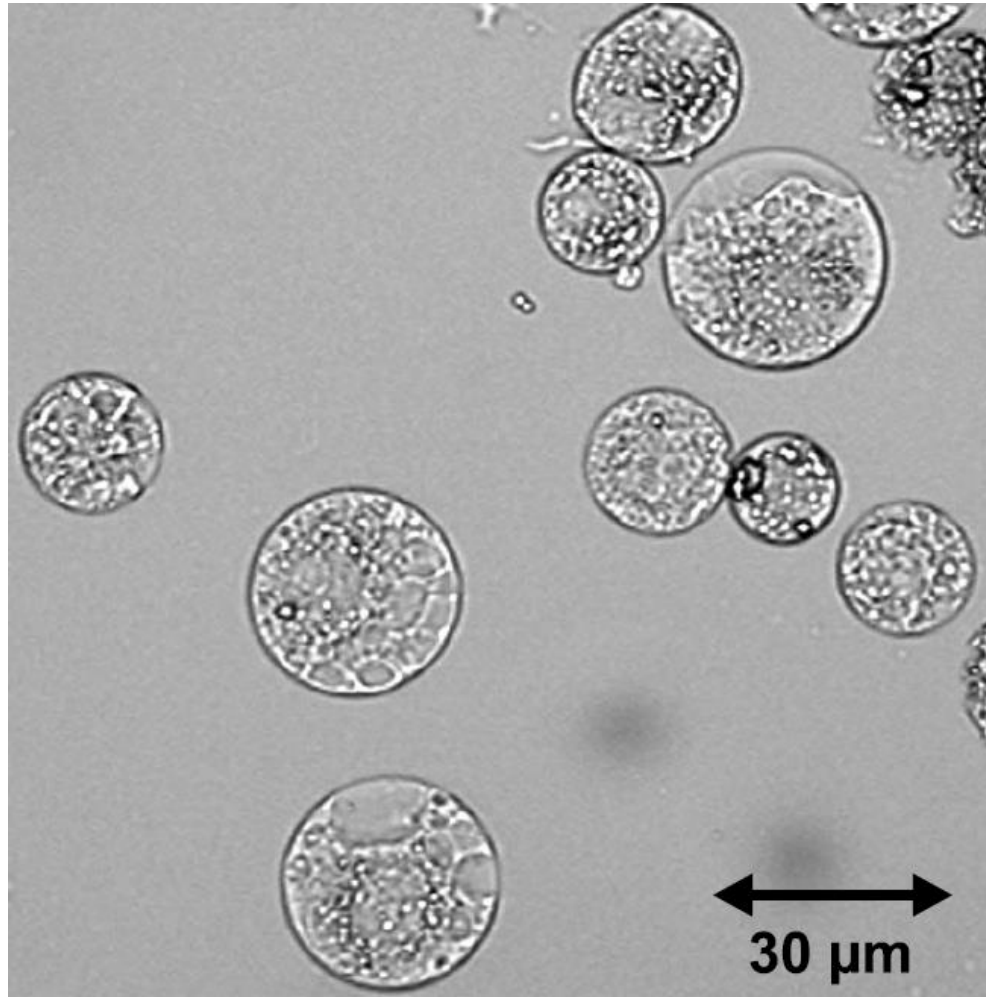
Клетки дедифференцируются в каллус при поддержании в питательной среде определенного баланса между фитогормонами: **ауксинами, цитокининами и гибберелинами**. Пропорции видоспецифичны и зависят от типа тканей эксплантата

Состав питательных сред: неорганические соли, витамины, органические источники азота (глицин и т.д.), инозитол, сахароза, фитогормоны

Суспензионные клеточные культуры

- ❖ Перенос каллуса в жидкую питательную среду с перемешиванием приводит к его дезагрегации: отдельные клетки, мелкие и крупные агрегаты
- ❖ Каллус табака (*Nicotiana tabacum*) и сои (*Glycine max*) легко дезагрегирует до отдельных клеток, каждая из которых может стать источником *клона клеток*
- ❖ Генетическая нестабильность при длительном культивировании: накопление мутаций – *соматоклональные варианты*
- ❖ *Кондиционные среды*: питательная среда, остающаяся после выращивания в ней в течение нескольких дней клеток до высокой плотности с их последующим удалением и стерилизацией. Содержит незаменимые аминокислоты (глутамин, серин), а также фитогормоны
- ❖ Проведенные через кондиционные среды отдельные клетки можно посеять на твердой питательной среде – образуют каллус

Протопласты клеток BY2 табака



Протопласты – клетки с удаленной целлюлозной клеточной стенкой

Получают из нормальных тканей, каллуса и суспензионных клеточных культур

Пектиназа – дезагрегирует клетки, **целлюлаза** разрушает клеточную стенку

На питательной среде протопласты восстанавливают клеточную стенку через 10-15 дней

Удобны для слияния клеток (гибриды) и введения рекомбинантной ДНК

Гибриды и цибриды

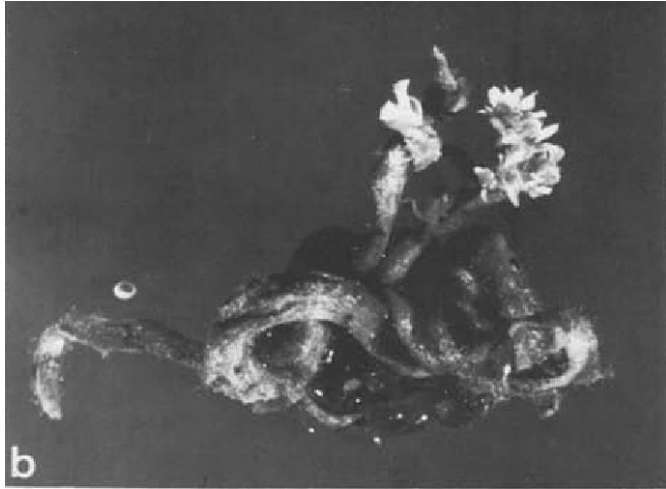
Соматический гибрид - продукт слияния и цитоплазмы, и ядра обоих протопластов. **Асимметричные гибриды** – продукты слияния, имеющие полный хромосомный набор одного из партнеров и часть хромосом другого партнера

Цибрид (цитоплазматический гибрид) - растение-регенерант, содержащее цитоплазму обоих родителей и ядро одного из них. Цибриды получают, облучая перед слиянием один из протопластов γ-лучами.

Межродовые гибриды - регенеранты как правило стерильны. Картофель + томат, так называемый томатофель. Гибрид ячменя и риса (Х. Кисака с соавт., 1997) По морфологии было близко к растениям риса. Растение имело и маленькие хромосомы от риса, и большие от ячменя.

Межтрибные гибриды получил Глеба между *Arabidopsis* и *Brassica* (турнепс) - *Arabidobrassica*. Растения генетически и морфологически униформны, не цвели. На вид - уродливы, очень много тератомоподобных образований, похожих на цветки.

Межтрибный асимметричный гибрид арабидопсиса и турнепса - «Arabidobrassica»



Гибрид и родители



Проростки,
заканчивающиеся
псевдоцветками



Деформированные
листья без верхней
и нижней
поверхностей



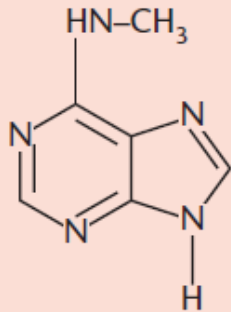
Томатофель TomTato

Прививка томата на
стебель картофеля

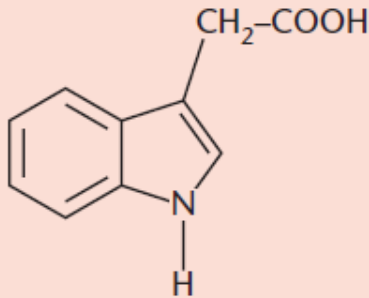
С одного куста
500 помидор и 2 кг
картофеля

Thompson & Morgan,
Великобритания

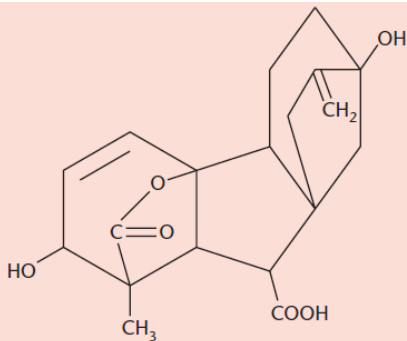
Гормоны растений (фитогормоны), используемые для их регенерации



Цитокинин (N –метиламинопурин) – контролирует деление клеток



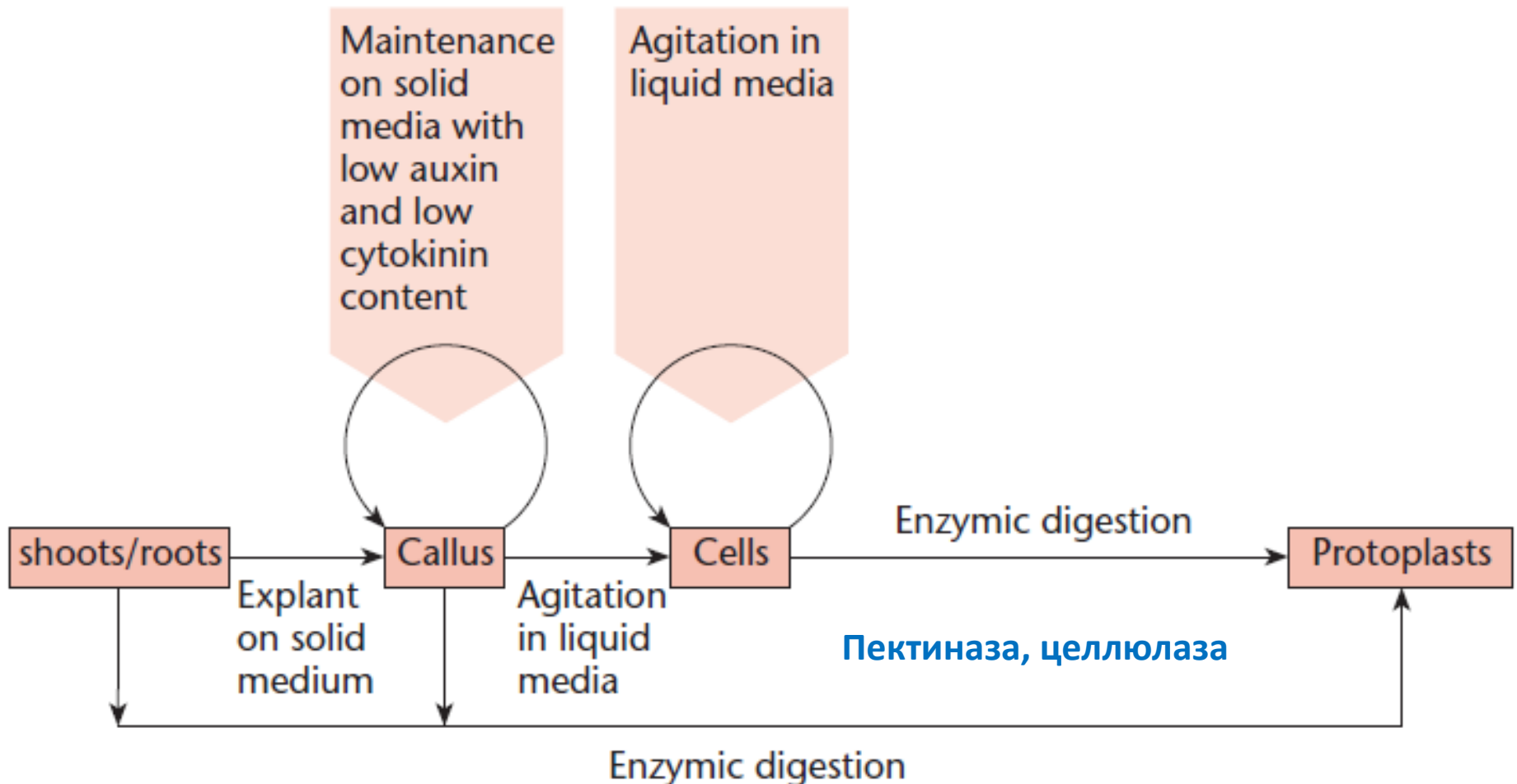
Ауксин (индолуксусная кислота) – контролируют развитие корней



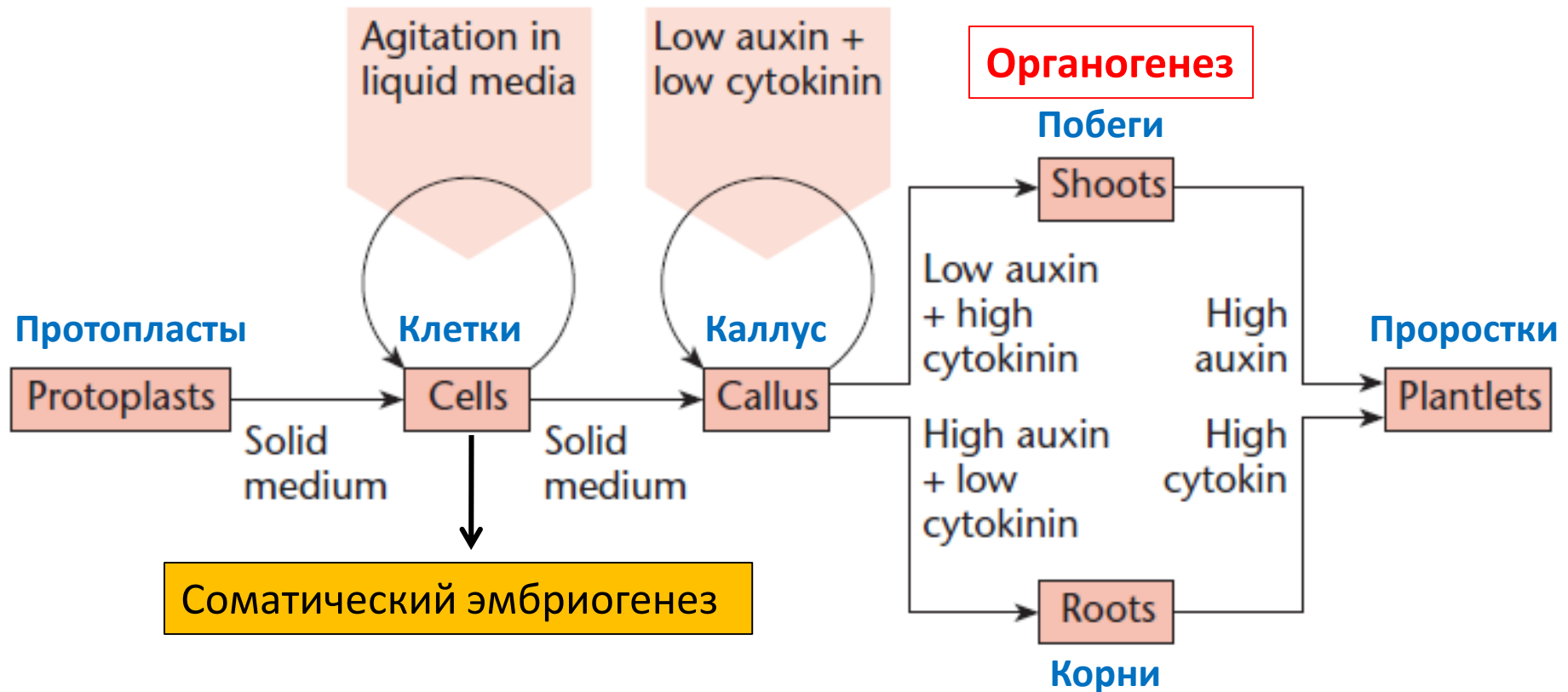
Гибберелиновая кислота – контролирует удлинение стебля, прораствание семян и ряд метаболических процессов

**Баланс между концентрациями
цитокининов и ауксинов в питательной
среде определяет регенерацию
растений из дедифференцированных
клеток**

Получение протопластов из тканей растений



Этапы и условия получения целых растений из протопластов



Достижение органогенеза требует соблюдения видоспецифических и тканеспецифических условий культивирования клеток

Соматический эмбриогенез

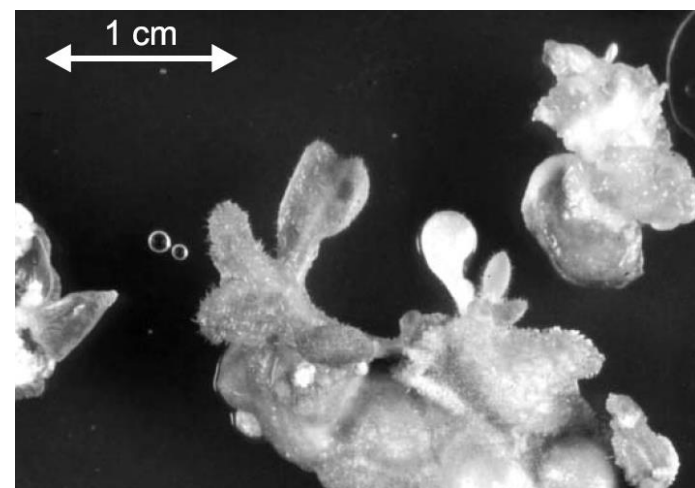


Образование из соматических клеток зародышеподобных структур, которые по своему виду напоминают зиготные зародыши. Каланхоэ.

Развивающиеся побеги и развившиеся проростки



Проростки, развившиеся из культивируемых клеток меристемы, разделяют и переносят в грунт



Побеги, развивающиеся из каллуса табака

Ткани растений, используемые для введения трансгенов



Для трансформации можно использовать многие органы, ткани и типы клеток растений. Выбор зависит от вида трансформированного растения и метода трансформации. После введения ДНК отбирают клетки, содержащие трансген, и из них регенерируют целое растение.

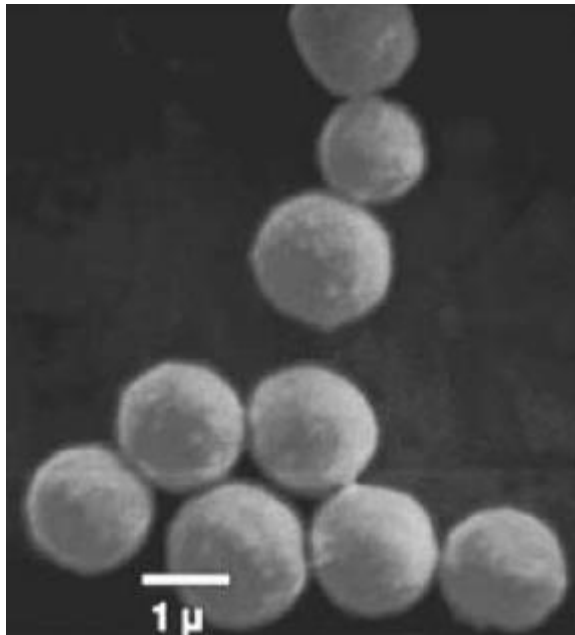
Введение трансгенов в протопласты с помощью прямых воздействий

- ❖ Электропорация
- ❖ Инкубация с полиэтиленгликолем и ионами кальция
- ❖ Микроинъекции ДНК
- ❖ Слияние с липосомами, содержащими ДНК
- ❖ Мягкая обработка ультразвуком 20 kHz в присутствии ДНК

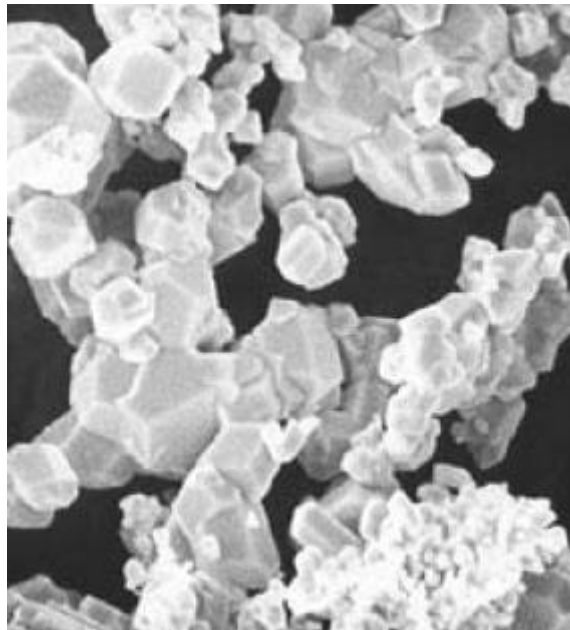
Проблема для однодольных растений – низкая эффективность регенерации из каллуса, у многих природная устойчивость к канамицину (заменяют на гигромицин или фосфинотрицин)

Баллистическая (биолистическая) трансформация клеток растений

Бомбардировка клеток или отдельных органов целых растений микрочастицами золота или вольфрама, нагруженных ДНК



Золото



Вольфрам

Микрочастицы

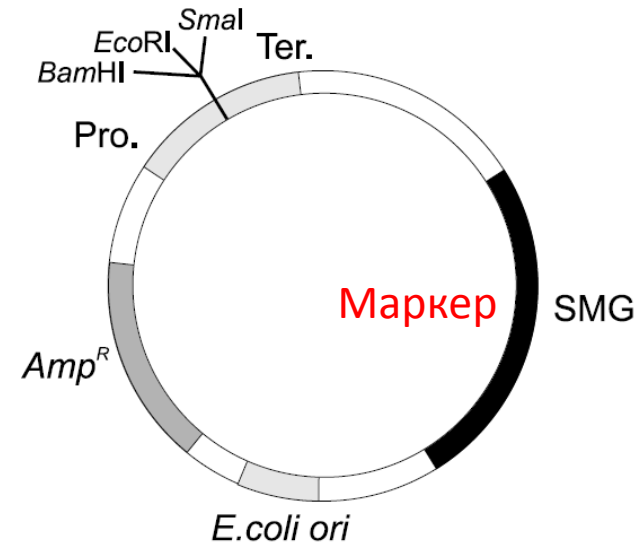
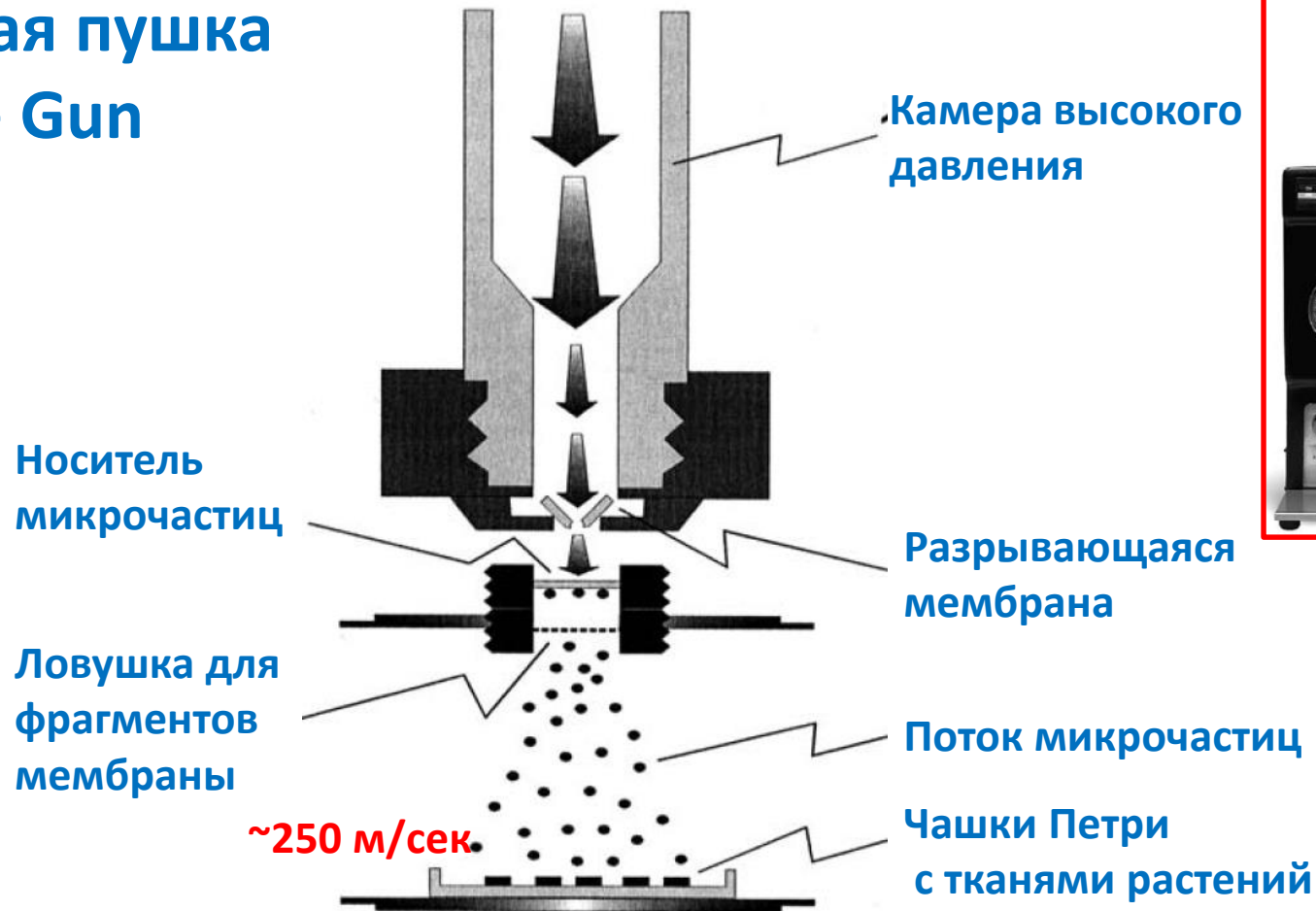


Схема обобщенного вектора, используемого для биолистической трансформации растений

Устройство прибора для бомбардировки тканей микрочастицами

Генная пушка Gene Gun



Прибор
фирмы Bio-Rad

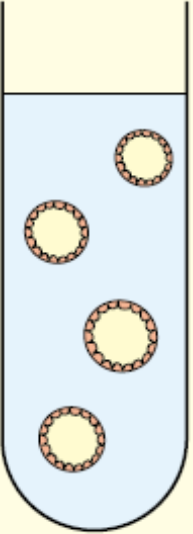
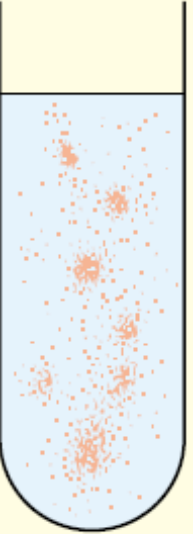
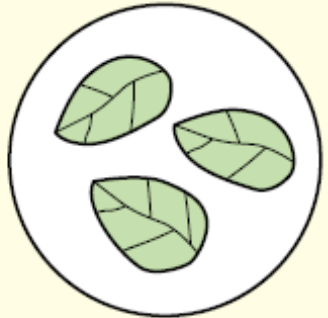
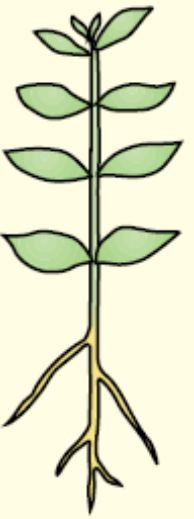


Продолжительность и достоинства эксперимента с биолистической трансформацией тканей растений



- ❖ Отсутствует стадия удаления клеточной стенки
- ❖ Можно трансформировать *любые* клетки и ткани
- ❖ Отсутствуют стадии сложных переносов клеток в разные питательные среды
- ❖ Более простая процедура подготовки векторов
- ❖ Возможен одновременный перенос до 10 разных генов с помощью одинаковых плазмид
- ❖ Метод применим для любых видов и генотипов растений

Методы, используемые для трансформации разных объектов растительного происхождения

			
Protoplasts	Cells in suspension	Plant organs (e.g. leaf pieces)	Whole plant
Methods 1, 2	3, 4, 5	4, 5	4, 5

1 – Химическое воздействие, **2** – Электропорация, **3** – Нитевидные кристаллы карбида кремния, карборунд (SiC), **4** – Бомбардировка микрочастицами, **5** – Заражение *Agrobacterium* или вирусами

Селектируемые маркеры, используемые в генной инженерии растений

Drug resistance markers

aad (preferred for chloroplast transformation (see p. 240)

ble

dhfr

hpt

nptII and *aphII*

gat

Trimethoprim, streptomycin, spectinomycin, sulphonamides

Bleomycin

Methotrexate

Hygromycin

Kanamycin, neomycin, G418

Gentamicin

Herbicide resistance markers

bar and *pat*

csr1-1

dhps (*sul*)

epsp

Phosphinothricin (bialaphos, glufosinate ammonium, Basta)

Chlorsulphuron

Sulphonamides (Asualam)

Glyphosate

Системы контроля экспрессии рекомбинантных генов у растений

Промоторы: генов октопин- (*nos*), нопалин- (*ocs*) и маннопин- (*mas*) синтаз – конститутивные и умеренно индуцируемые; у двудольных 35S-РНК вируса мозаики цветной капусты (CaMV 35S); у злаков – *actin-1* (рис), *ubiquitin-1* (кукуруза); тканеспецифические и индуцируемые промоторы

Интроны: наличие в экспрессирующей кассете повышает активность промотора (энхансеры, упаковка хроматина)

Сайты полиаденилирования: нопалинсинтазы (*nos*)
агробактерии

5'-Концевые нетранслируемые лидерные последовательности:
 ω -последовательность РНК вируса мозаики табака (в 80 раз $\uparrow$)

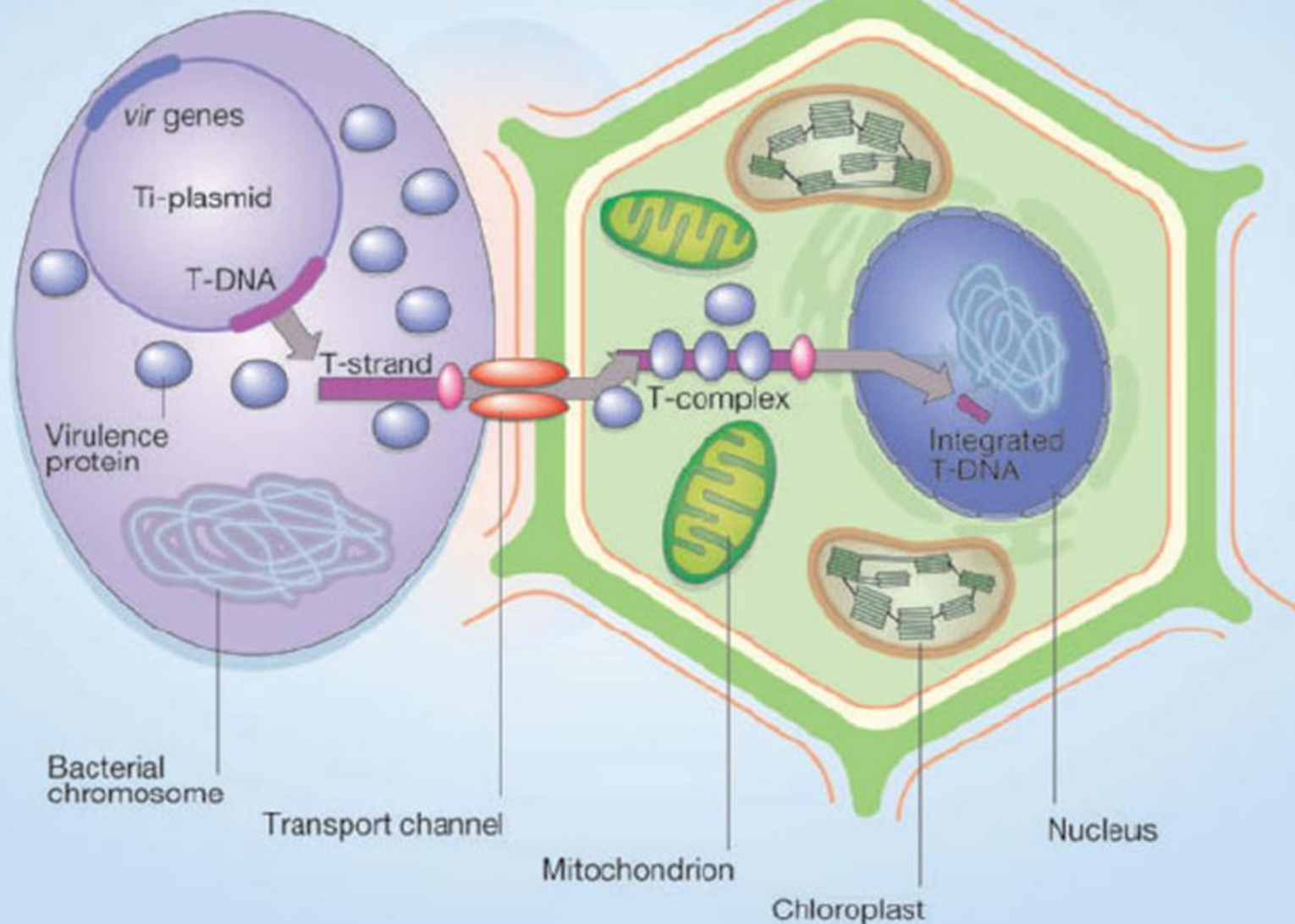
Консенсус Козака: 5'-CCRCCAAUGG-3'

Сигналы локализации и оптимизация кодонов

Agrobacterium tumefaciens

Plant cell

Агробактериальная инфекция



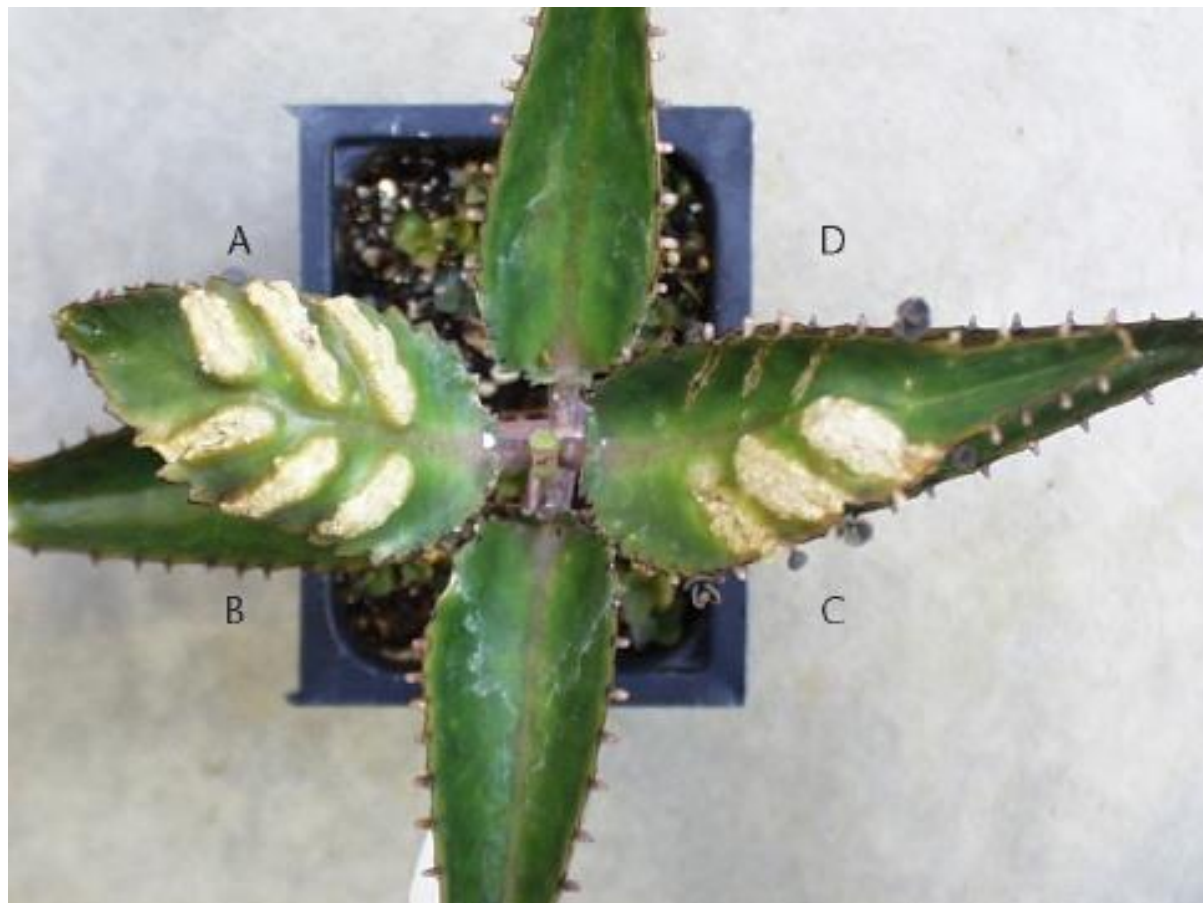


Корончатый галл
образованный на
стебле томата под
действием
бактерии
*Agrobacterium
tumefaciens*

Болезнь развивается у
голосеменных и двудольных
покрытосеменных растений.

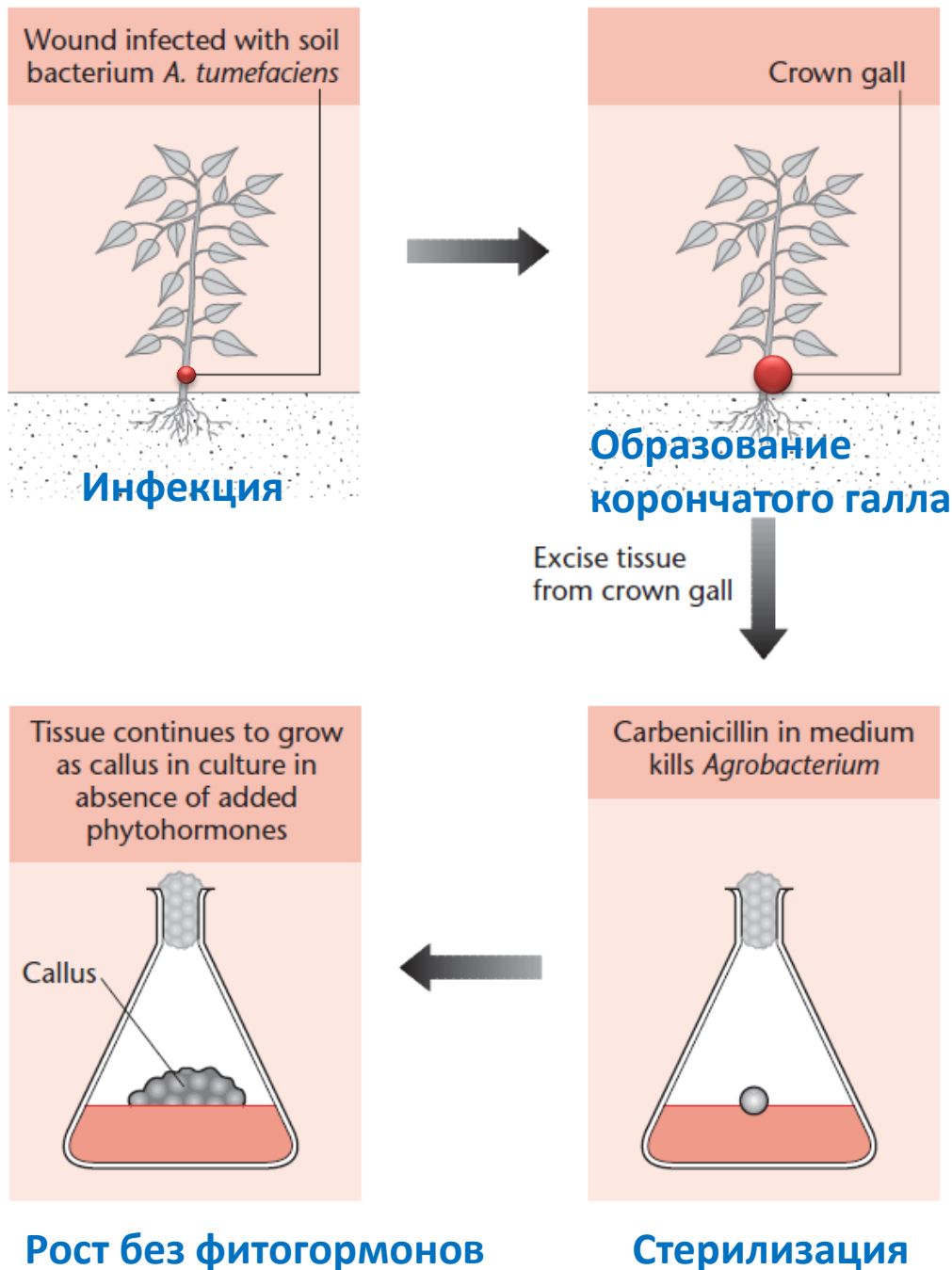
Бактериальная природа
болезни была
продемонстрирована в 1907 г.

Доказательство участия Ti-плазмид в агробактериальной инфекции



На листья каланхоэ, поцарапанные стерильной иглой, были нанесены агробактерии, содержащие (А,В,С) или не содержащие (D) Ti-плазмиды

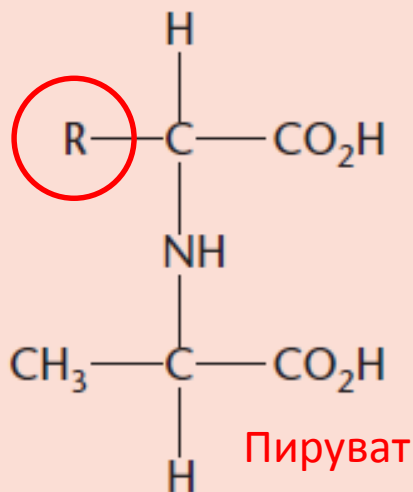
Видно образование корончатых галлов белого цвета



Agrobacterium tumefaciens индуцирует у растений развитие опухолей

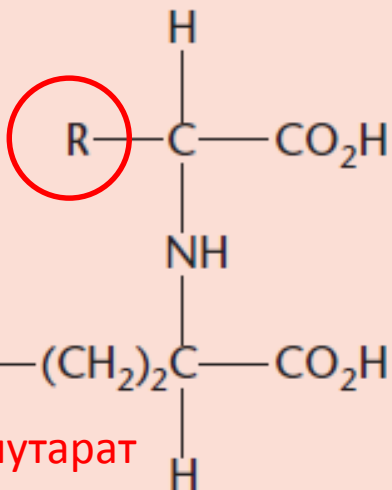
Перенос ткани корончатого галла в питательную среду сопровождается неограниченным ростом клеток в виде каллуса в *отсутствие фитогормонов* после удаления бактерий с помощью антибиотика карбенициллина

Клетки вызывают развитие опухолей после трансплантации здоровым растениям



Пируват

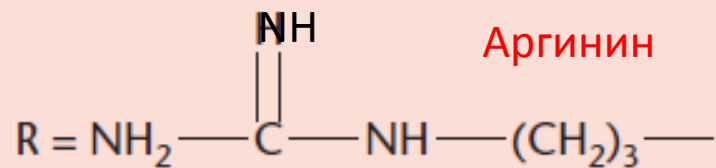
Octopine family



α-Кетоглутарат

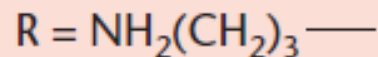
Nopaline family

Octopine

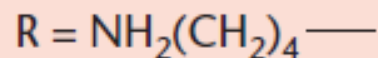


Аргинин

Octopinic acid

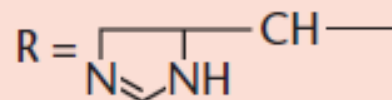


Lysopine



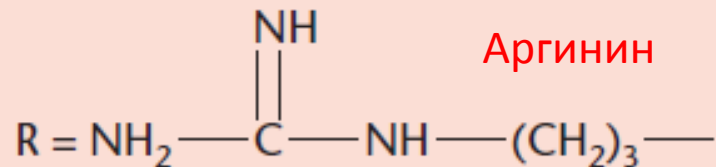
Лизин

Histopine



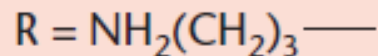
Гистидин

Nopaline



Аргинин

Nopalinic acid



Синтез опинов зараженными растениями – центральное событие агробактериальной инфекции

Иминовые конъюгаты аминокислот с сахарами или кетокислотами

Тип синтезируемых опинов определяется не растением-хозяином, но штаммом агробактерий, участвующим в инфекции

Бактерии катаболизируют эти необычные производные аминокислот, используя их в качестве единственного источника углерода и азота

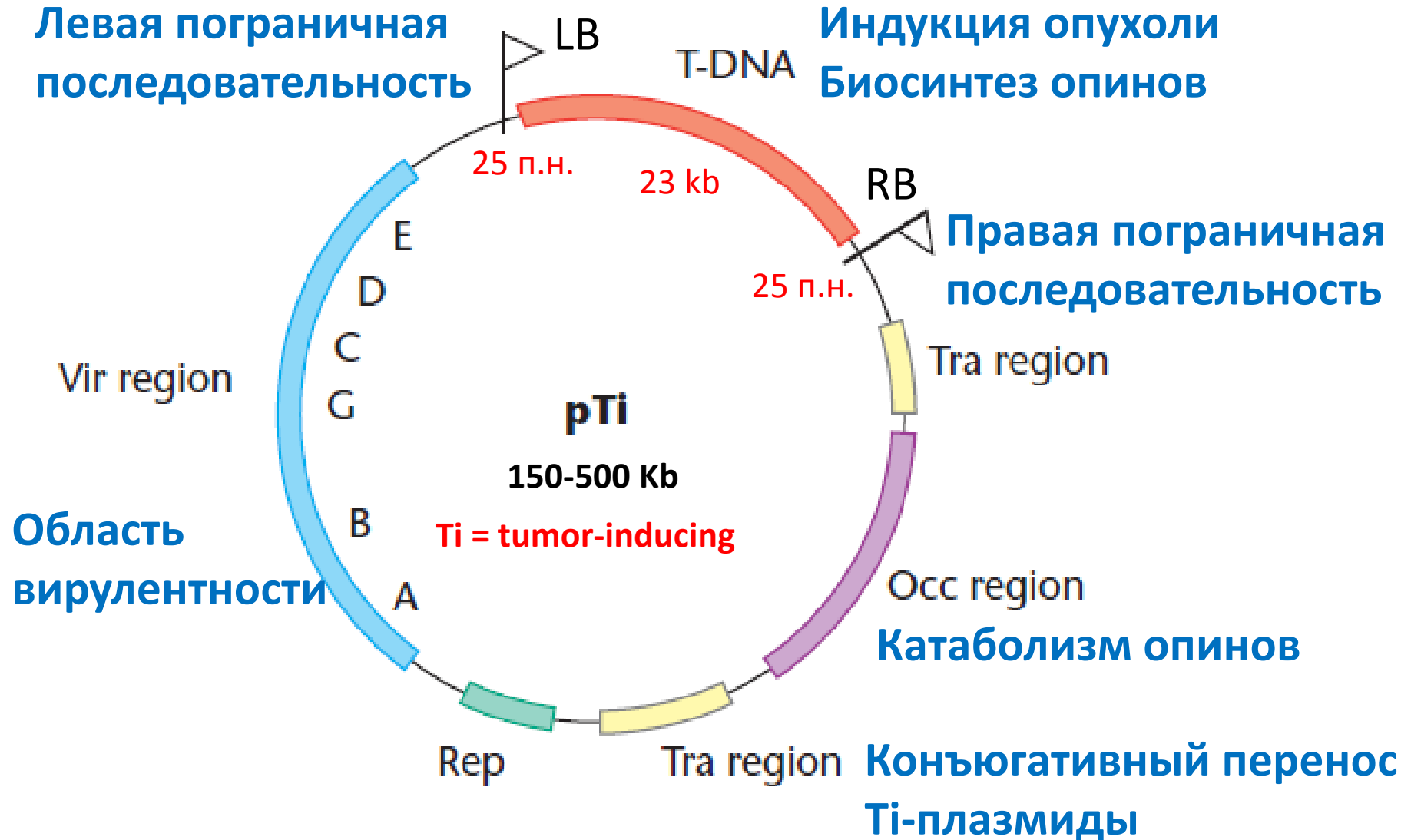
Бактерии катаболизируют те опины, синтез которых они индуцируют в зараженных растениях

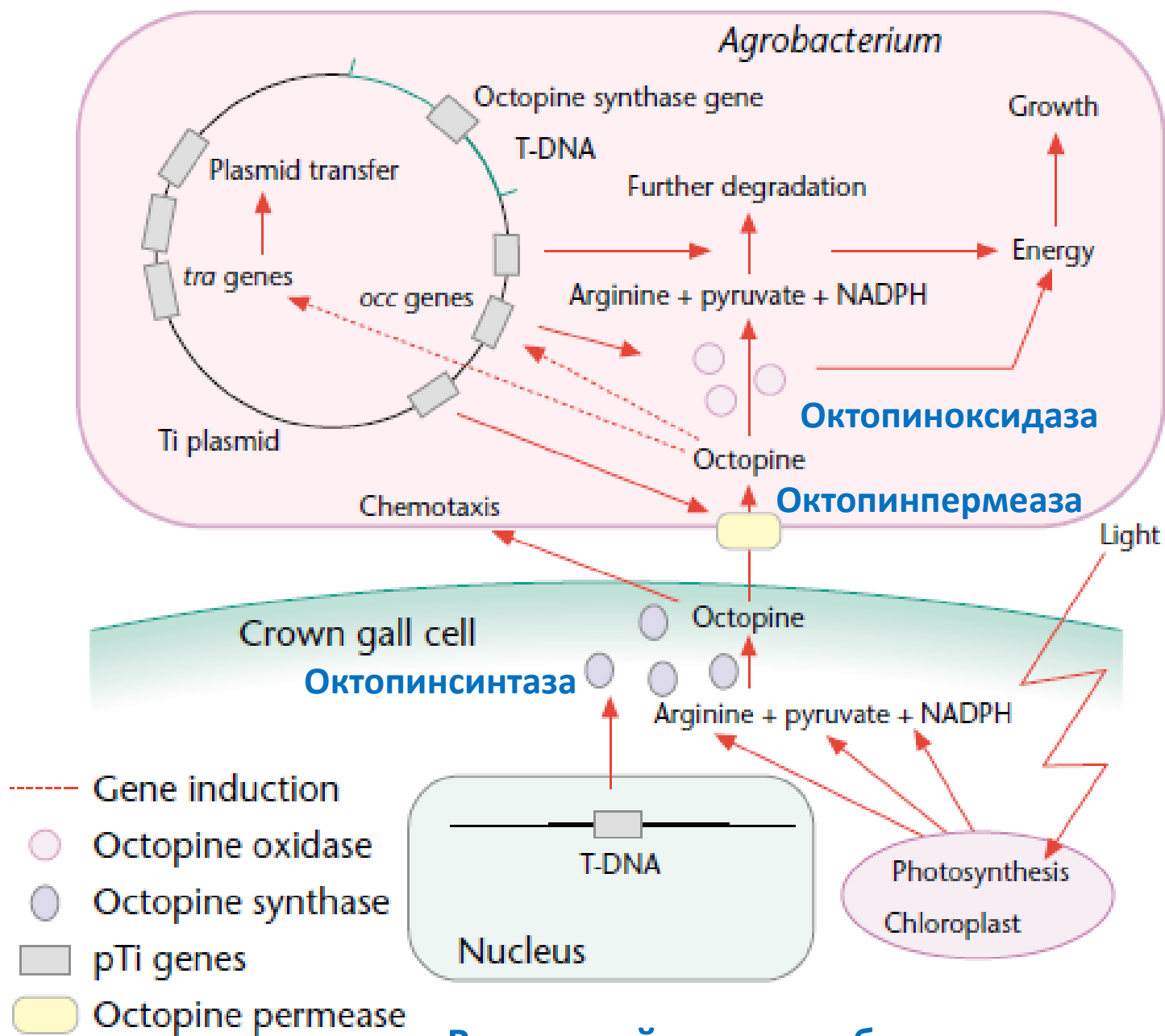
Опины составляют до 7% сухого веса опухоли

Схема строения Тi-плазмиды

Левая пограничная
последовательность

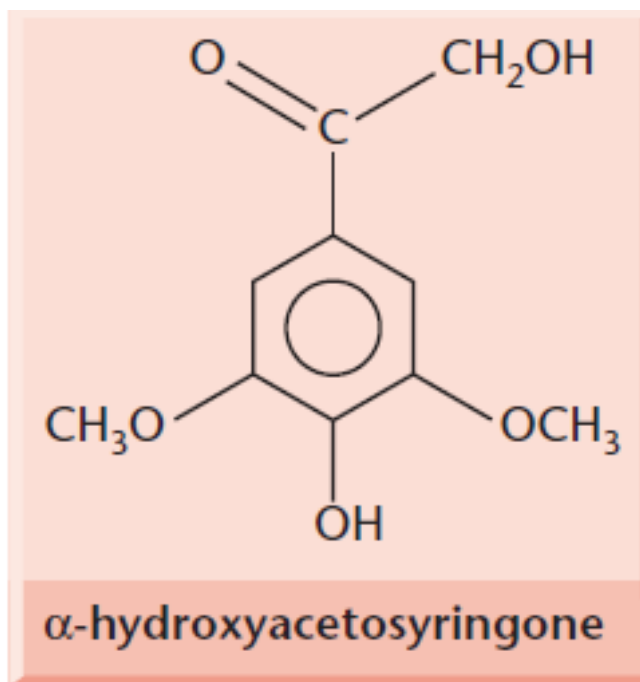
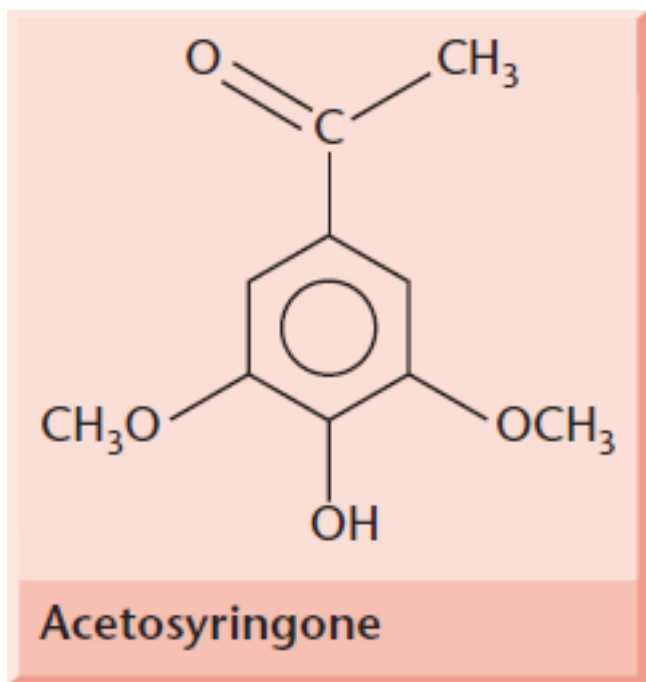
Индукция опухоли
Биосинтез опинов





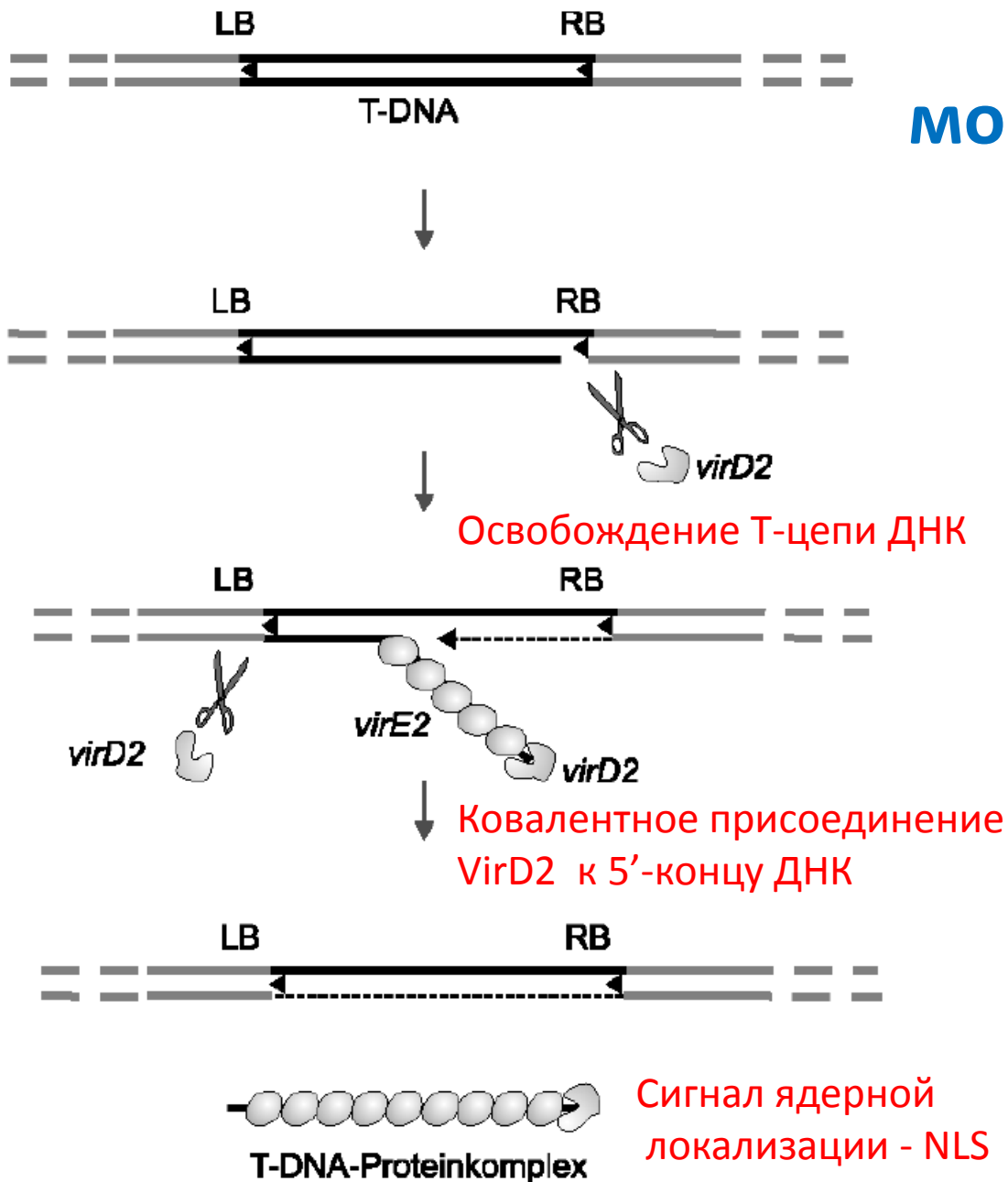
Взаимодействие агробактерии с корончатым галлом

Структура сигнальных молекул поврежденного растения, активирующих перенос Т-ДНК



Ацетосирингон часто используют для индукции Vir-генов в лаборатории
Рецептором является трансмембранная протеинкиназа VirA
Данные молекулы для бактерий **не являются аттрактантами**.

Механизм мобилизации Т-ДНК Ti-плазмиды



❖ После получения сигнала от поврежденного растения происходит активация *virD2*-гена ,

❖ эндонуклеаза делает одноцепочечный разрыв в правой пограничной последовательности,

❖ цепь вытесняется при синтезе ДНК,

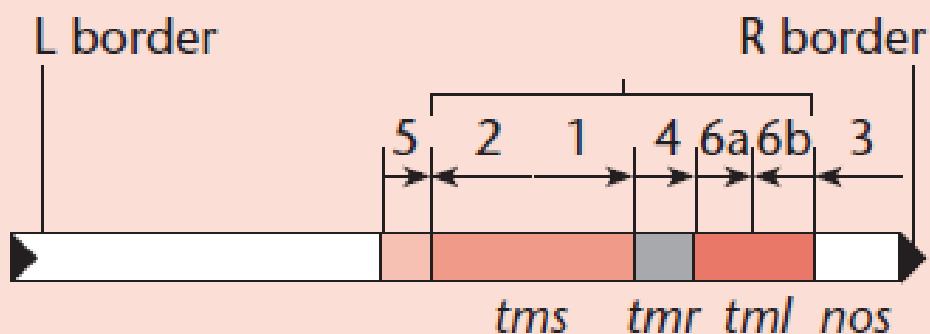
❖ освобождается и в составе комплекса с белком

❖ переносится в ядро зараженной клетки

❖ Делеция RB-, но не LB-сайта блокирует перенос

Строение Т-ДНК нопалиновой и октопиновой Ti-плазмид

Nopaline T-DNA (23 kb) pTiC58



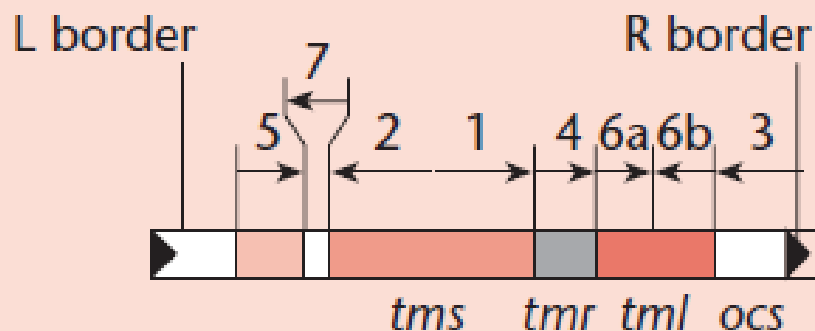
nos, nopaline synthase

Фрагменты ДНК выровнены в соответствии с гомологией;

Стрелки указывают направление транскрипции соответствующих генов;

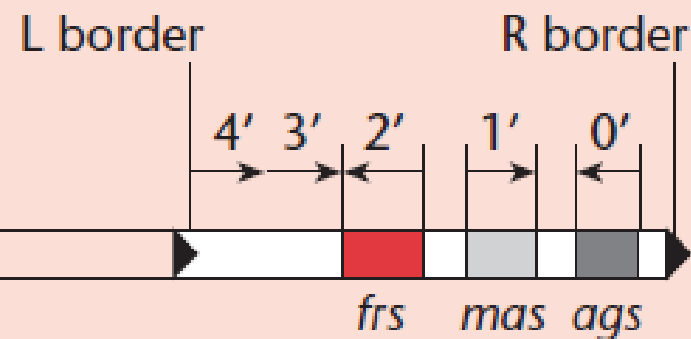
Промоторы генов эукариотического типа

Octopine TL-DNA (13.6 kb) pTiAch5



ocs, octopine synthase

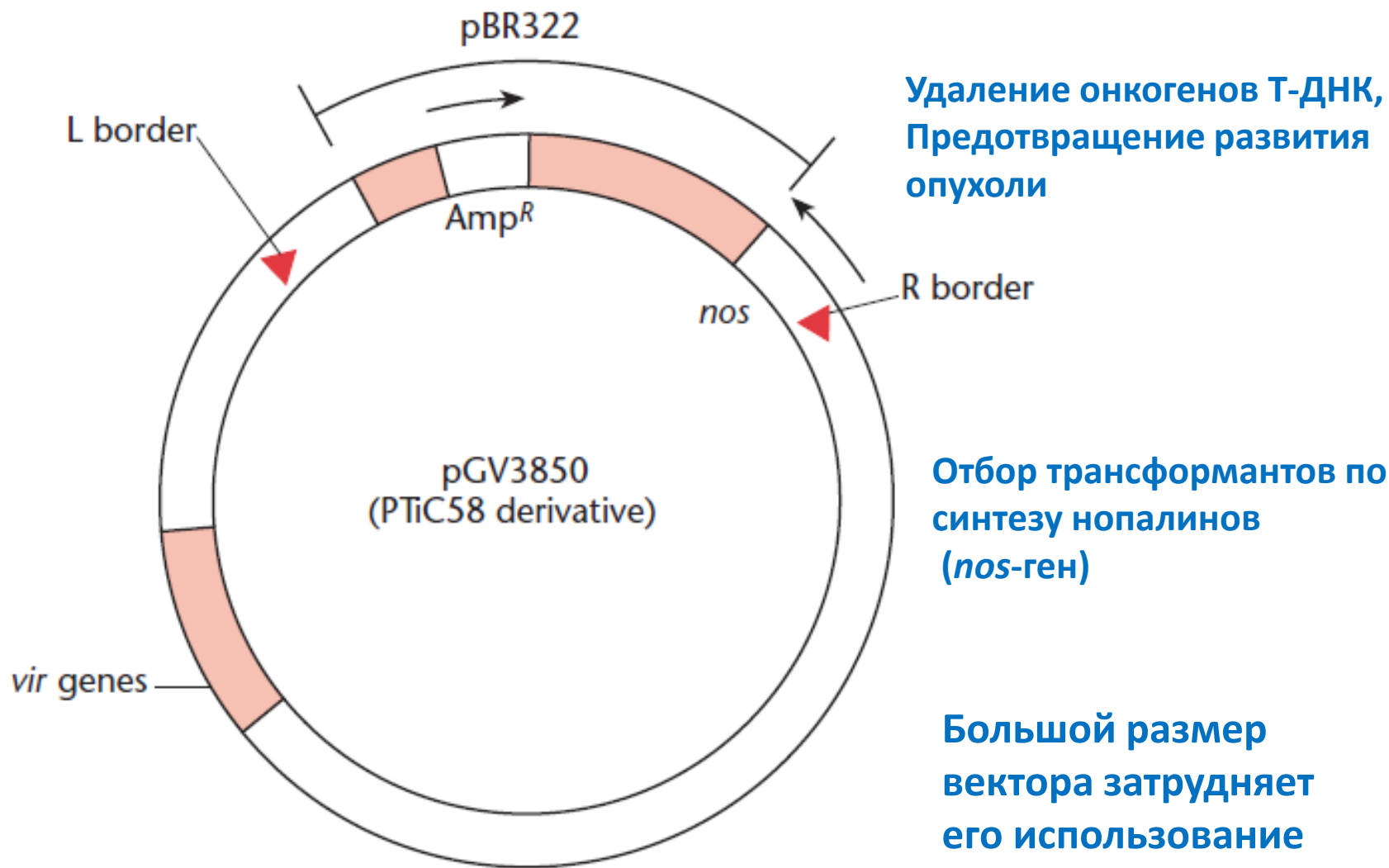
TR-DNA



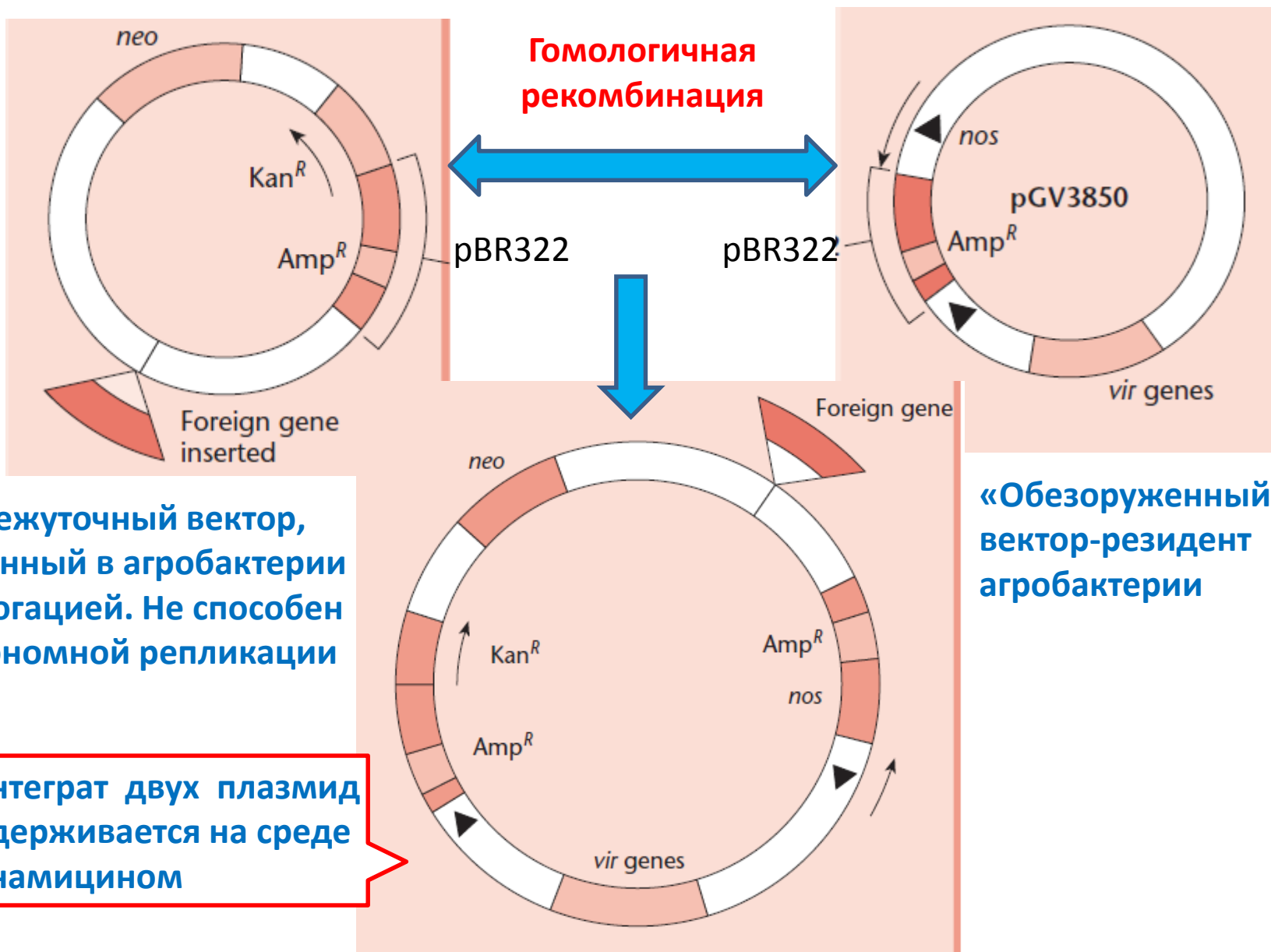
Гены Т-ДНК Ti-плазмид агробактерий

Gene	Product	Function
<i>ocs</i>	Octopine synthase	Opine synthesis
<i>nos</i>	Nopaline synthase	Opine synthesis
<i>tms1 (iaaH, auxA)</i>	Tryptophan-2-mono-oxygenase	Auxin synthesis
<i>tms2 (iaaM, auxB)</i>	Indoleacetamide hydrolase	Auxin synthesis
<i>tmr (ipt, cyt)</i>	Isopentyl transferase	Cytokinin synthesis
<i>tml</i>	Unknown	Unknown, mutations affect tumour size
<i>frs</i>	Fructopine synthase	Opine synthesis
<i>mas</i>	Mannopine synthase	Opine synthesis
<i>ags</i>	Agropine synthase	Opine synthesis

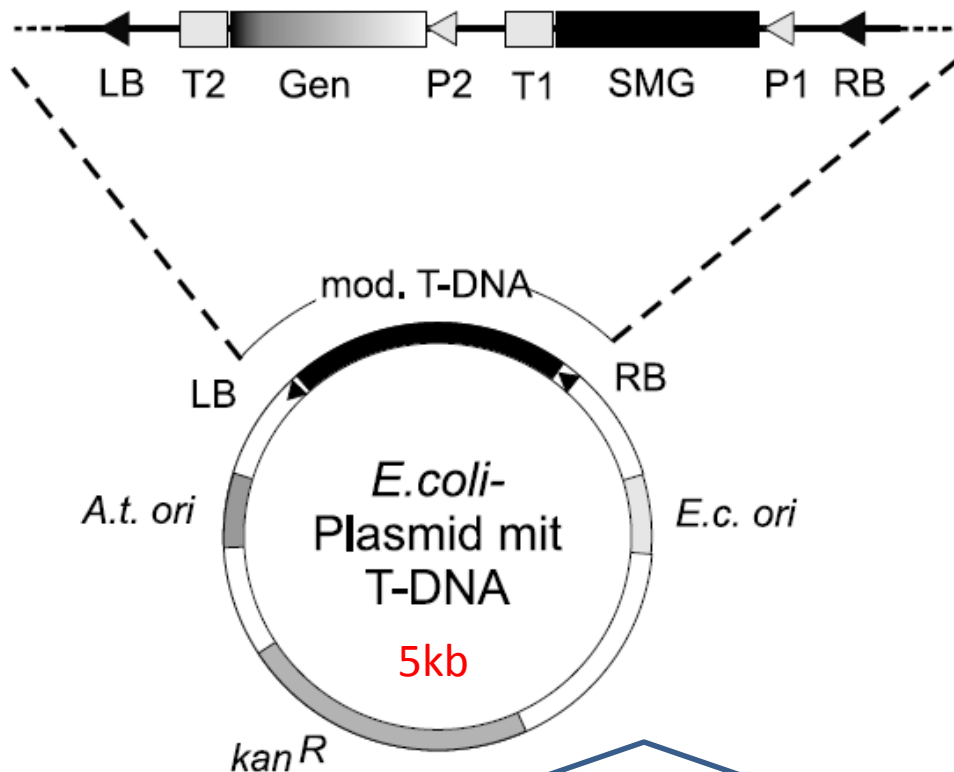
Вектор на основе «обезоруженной» Т-ДНК



Вектор на основе коинтеграта двух плазмид



Бинарная векторная система



Бинарный вектор, содержащий модифицированную Т-ДНК, в которую включены рекомбинантный ген, селектируемый маркер (SMG), промоторы (P) и терминаторы (T)

Вспомогательная плазмида, содержащая гены мобилизации Т-ДНК *vir* и область начала репликации *ori A. tumefaciens*

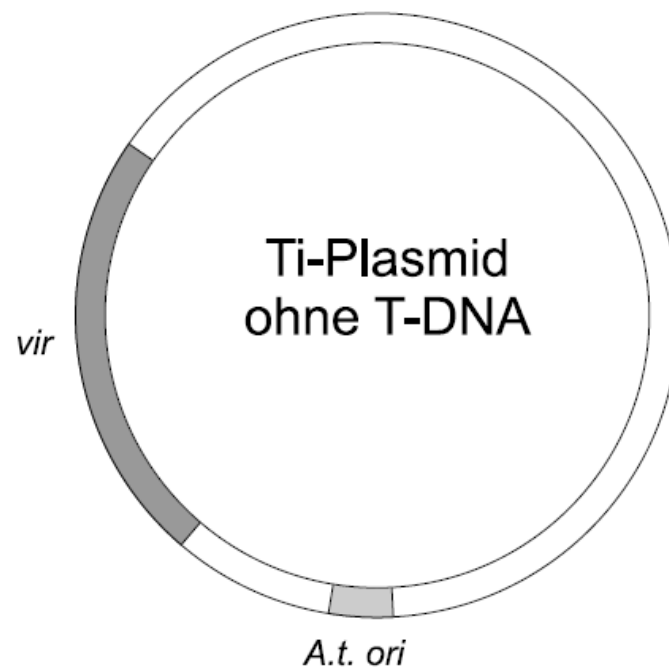
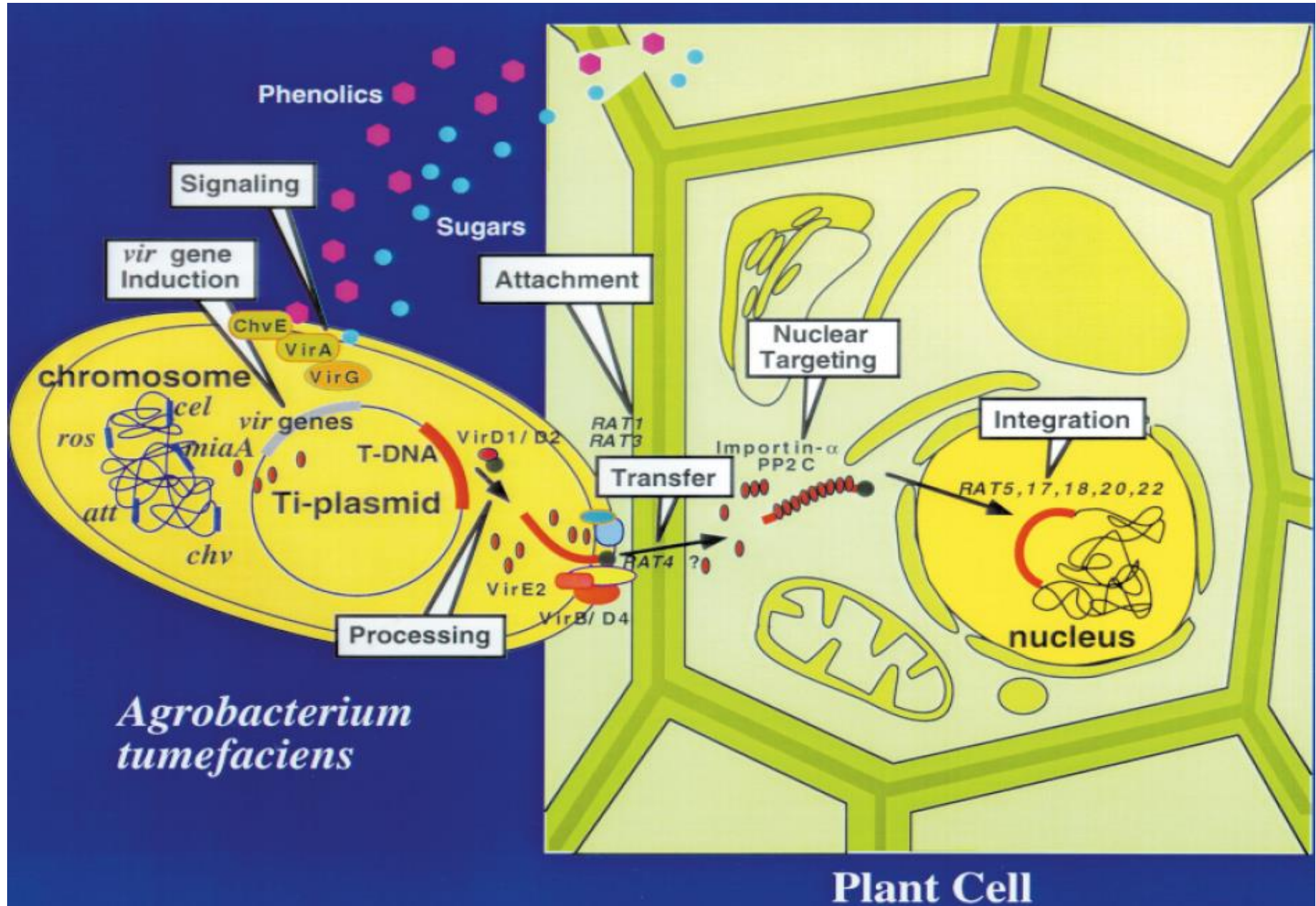
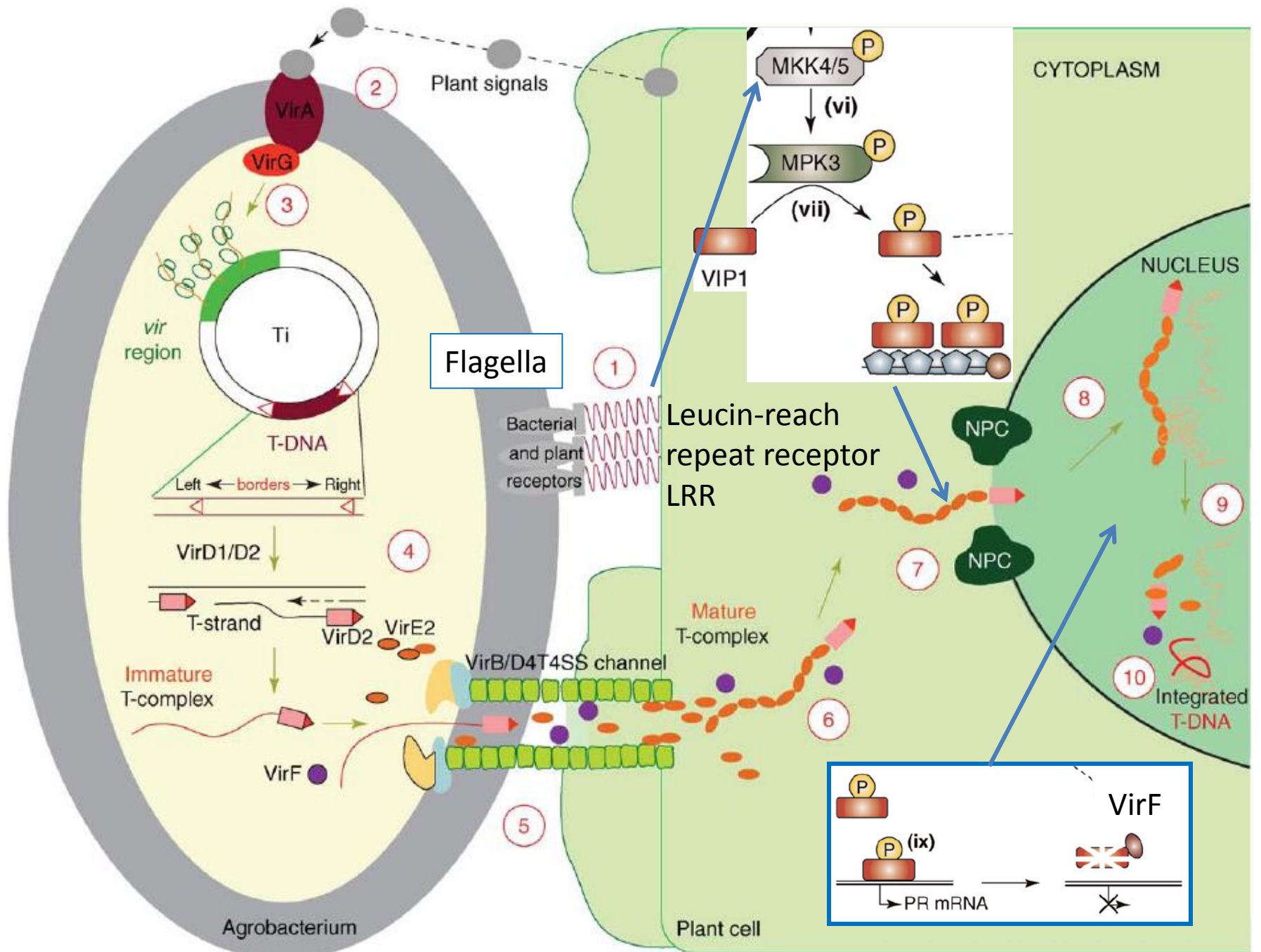
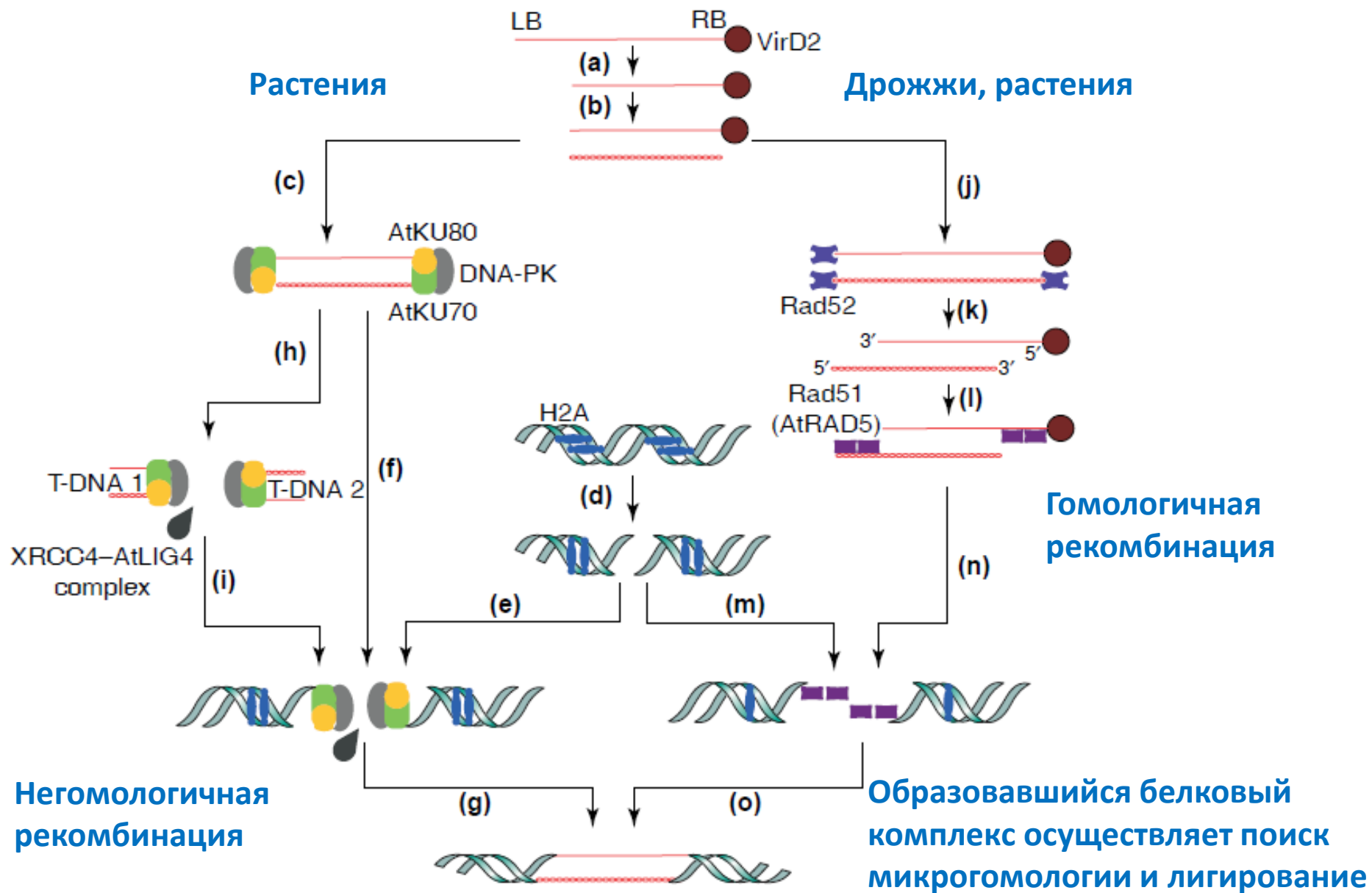


Схема процесса инфекции с участием агробактерий

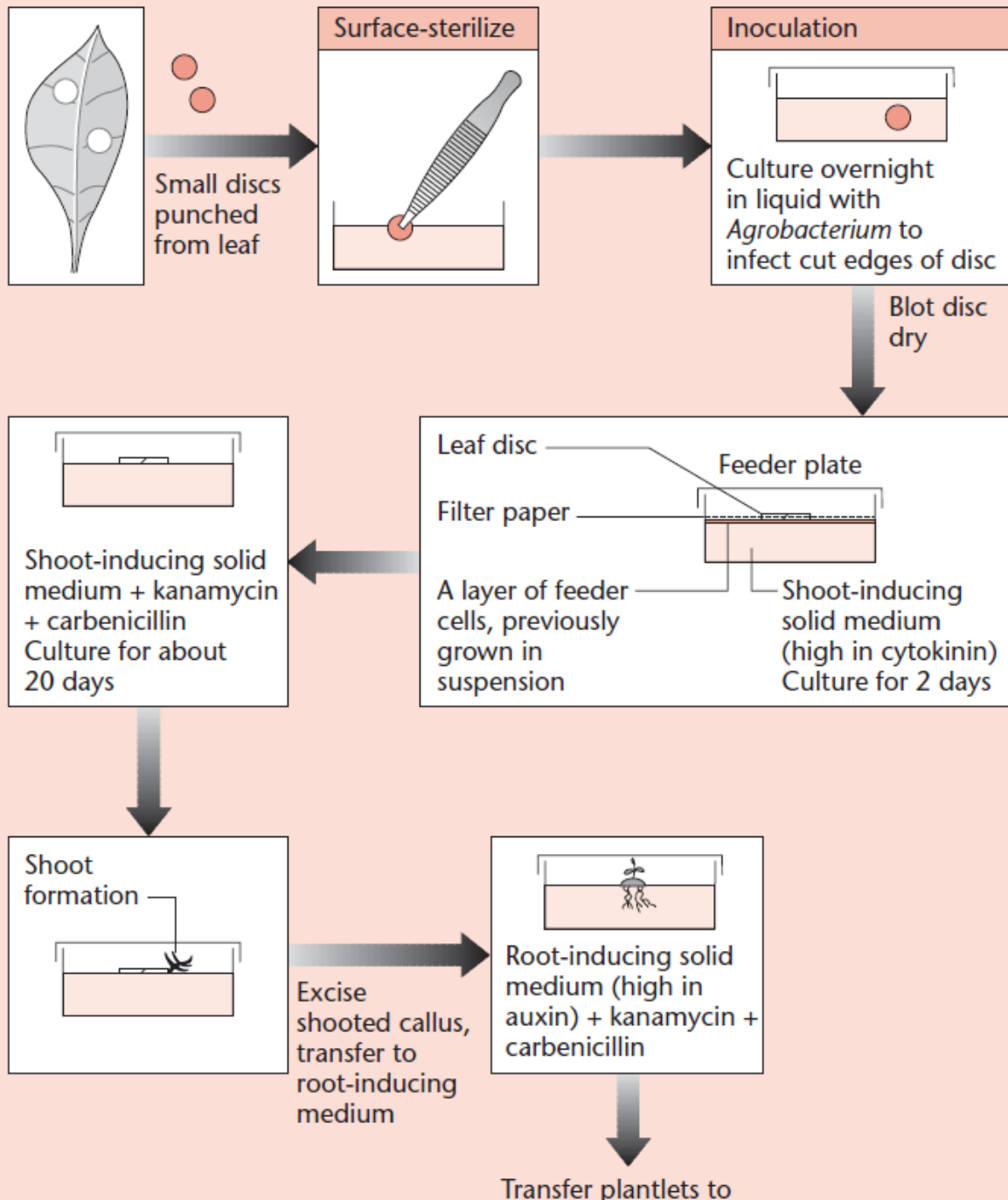




Модель интеграции Т-ДНК в геном клетки-хозяина



Этапы получения трансгенных растений с помощью агробактерий



Высокий уровень
цитокинина - побеги

Высокий уровень ауксина
- корни

Продолжительность и особенности эксперимента с использованием агробактерий для трансформации растений

Культивирование фрагментов листьев с агробактериями



1 день

Промывка фрагментов листьев



Удаление бактерий и селекция клеток антибиотиками с одновременной регенерацией фитогормонами – образование каллуса и побегов



2-6 недель

Перенос листьев на среду без фитогормонов – образование корней

Для однодольных растений (рис, кукуруза, ячмень, сахарный тростник:

- ❖ Использование эксплантатов, содержащих активно делящиеся клетки
- ❖ Инкубация эмбрионов в присутствии ацетосирингона
- ❖ Использование супервирулентных бактериальных штаммов (повышение экспрессии генов *virG* и *virE1*)

3-6 недель



Трансгенные растения

Трансформация целых растений (*in planta*)

Агробактерии:

Инкубация семян в суспензии бактерий с последующим проращиванием

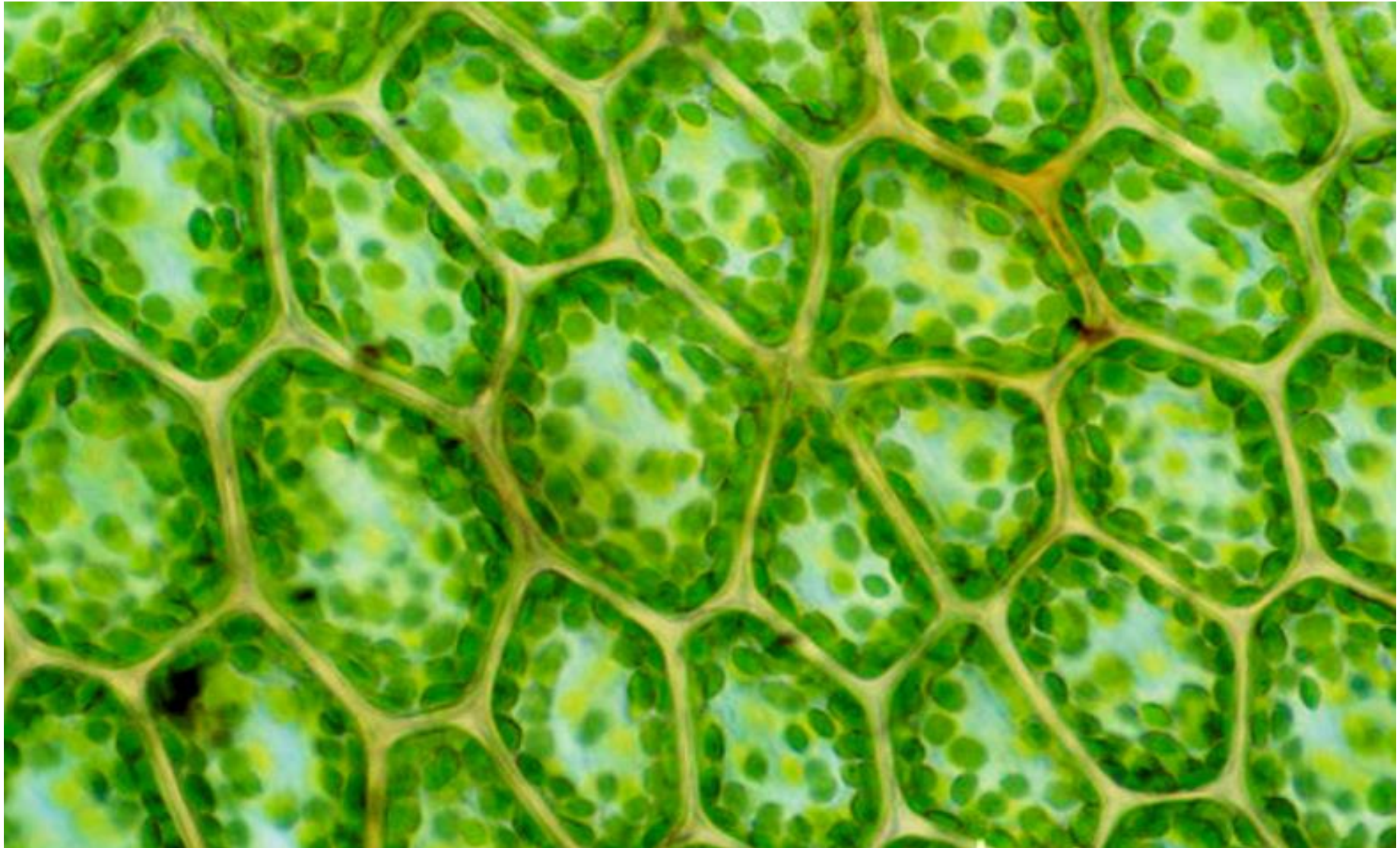
Вакуумное нанесение агробактерий на цветы

Погружение цветов в суспензию бактерий (floral dip)

Инкубация эксплантатов ткани меристемы с агробактериями

Недостаток: низкая эффективность и воспроизводимость

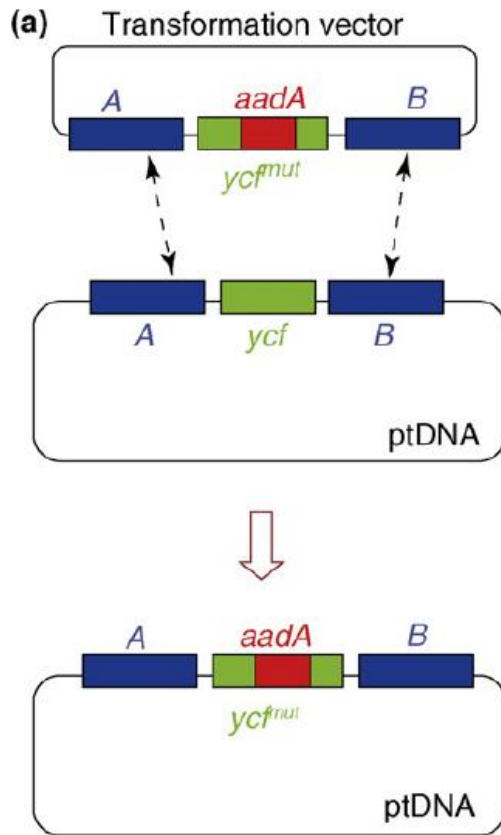
Трансгенные хлоропласты (Транспластомные растения)



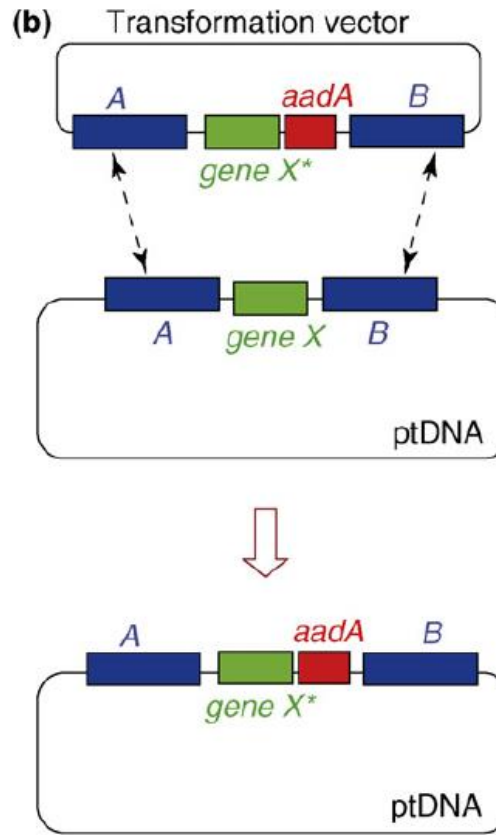
Преимущества использования хлоропластов для экспрессии трансгенов

- ❖ В фотосинтезирующей клетке присутствуют тысячи хлоропластов и тысячи копий трансгена
- ❖ Суммарный уровень экспрессии трансгена в хлоропластах может быть в ~50 раз выше, чем того же ядерного трансгена
- ❖ Трансгены хлоропластов не подвержены сайленсингу и эффекту положения (локализованы в межгенных областях)
- ❖ Трансгены хлоропластов не передаются через пыльцу, что предотвращает их неконтролируемое распространение
- ❖ Правильные фолдинг и образование дисульфидных связей у белков человека
- ❖ Низкая токсичность рекомбинантных белков
- ❖ Равномерная экспрессия трансгенов в разных линиях транспластомных растений

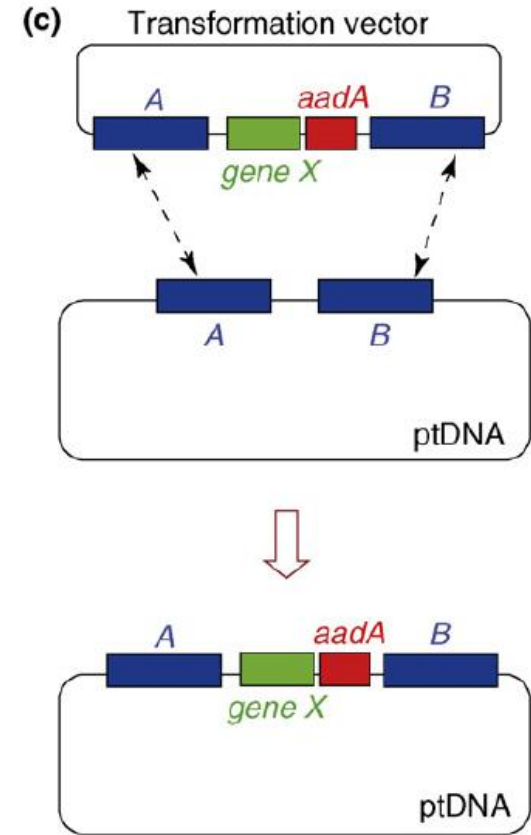
Три направления в использовании транспластомных растений



Обратная генетика:
генные нокауты



Обратная генетика:
исследование аллельных
вариантов генов



Биотехнология,
Тестирование
регуляторных
элементов

aadA – устойчивость к спектиномицину

Получение транспластомных одноклеточных водорослей

(1) Синтез *de novo* и сборка гена для оптимизации кодонов

(2) Амплификация гена с помощью ПЦР

(3) Лигирование в вектор

Клонируемый ген



1
W
E
E
K



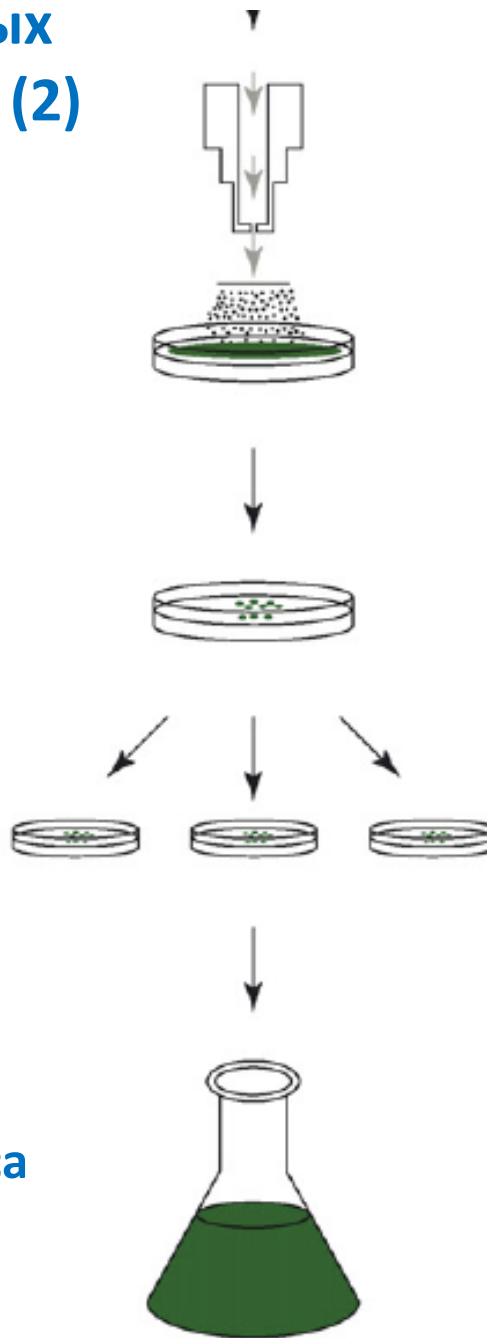
Получение транспластомных одноклеточных водорослей (2)

(4) Биолистическая трансформация

(5) Отбор первичных трансформантов

(6) Отбор гомоплазматических линий с высоким уровнем экспрессии

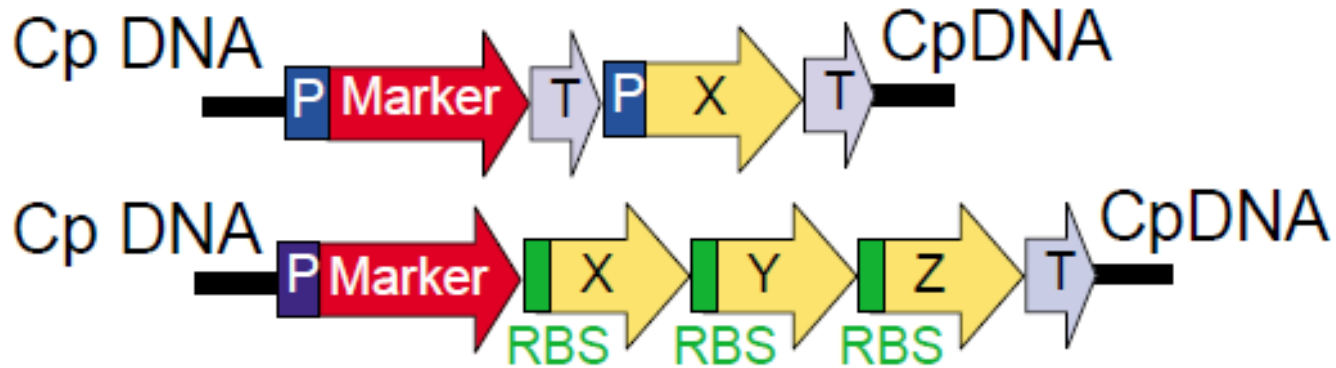
(7) Масштабирование процесса



3 WEEKS

2 MONTHS

Мультигенная инженерия



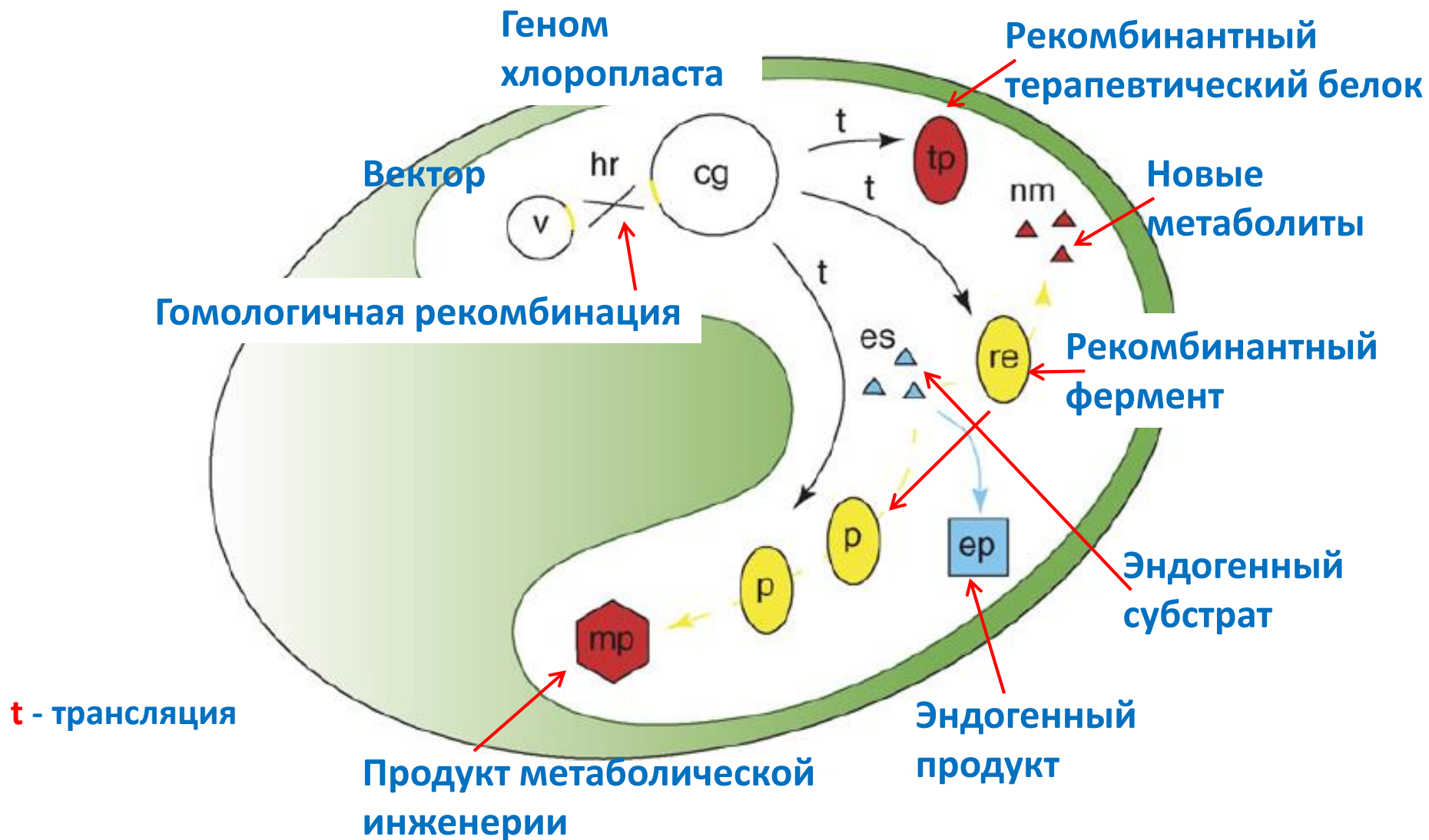
P – промотор, **T** – терминатор транскрипции, **RBS** – сайт связывания рибосом, **Cp** – хлоропласты



Тельца включения человеческого сывороточного альбумина (HSA) в хлоропластах.

Трансген HSA был введен в хлоропласты в дицистронном или полицистронном виде

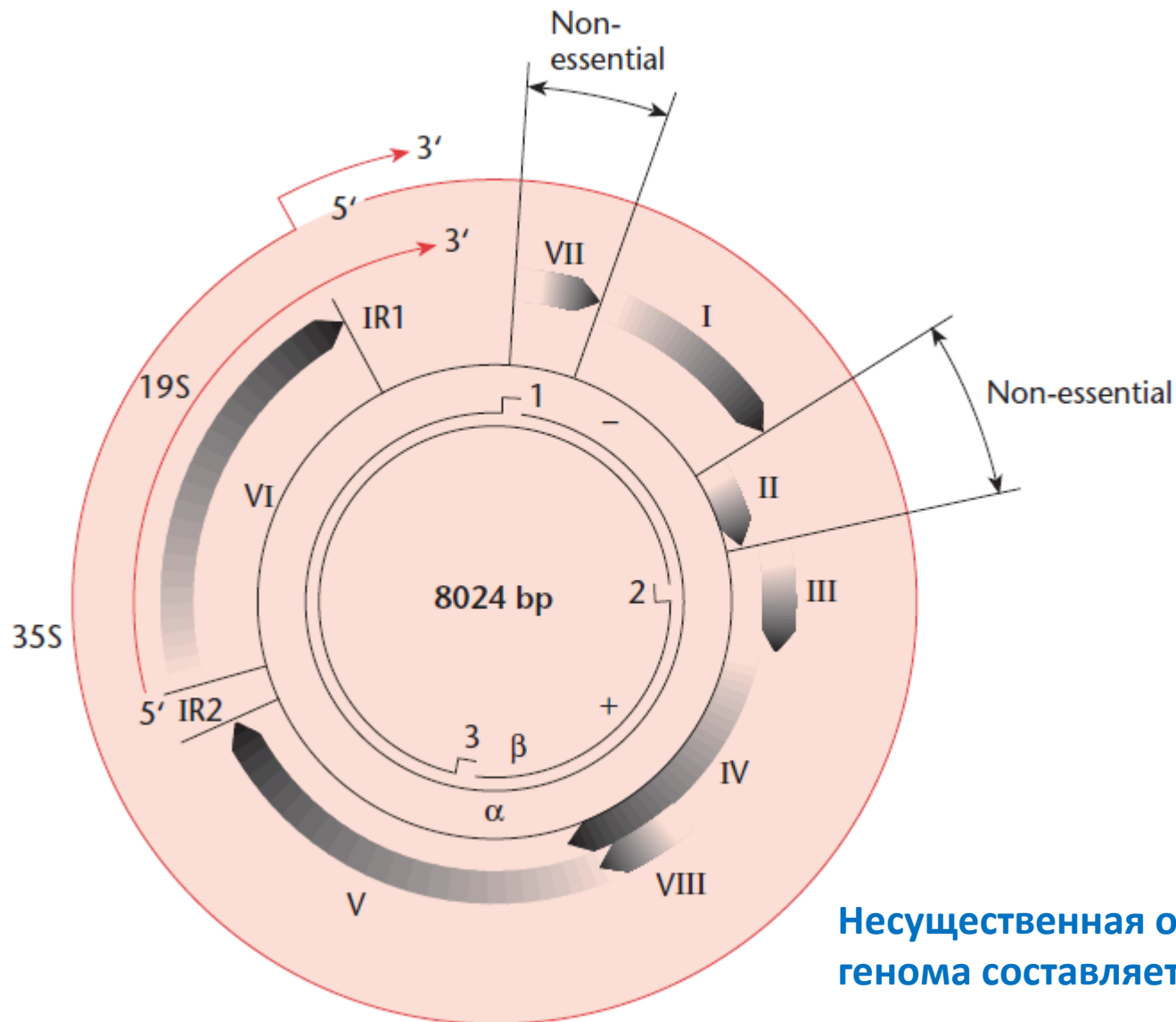
Возможности использования хлоропластов *Chlamydomonas reinhardtii* в биотехнологии



Рекомбинантные белки, препаративно синтезированные в хлоропластах *C. reinhardtii*

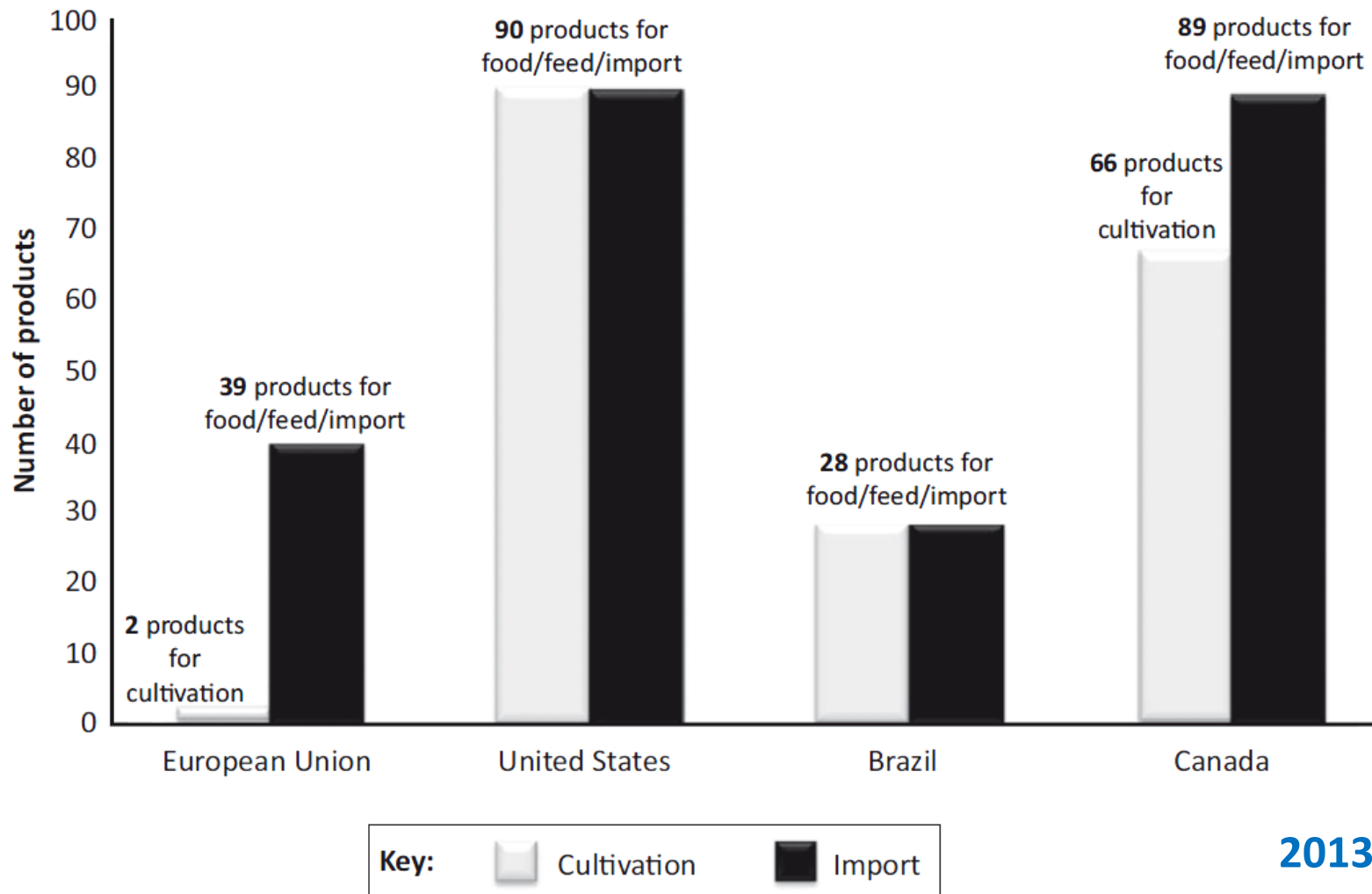
Protein product	Application/comments
Aminoglycoside adenine transferase	Reporter, confers spectinomycin and streptomycin resistance
β -Glucuronidase	Reporter, catalyzes the conversion of substrates to colored products
Renilla luciferase	Reporter protein, luminescent
Aminoglycoside phosphotransferase	Reporter, confers kanamycin and amikacin resistance
Green fluorescent protein	Reporter protein, fluorescent
HSV8-lsc	Pharmaceutical, first mammalian protein expressed in chloroplasts
Cholera toxin B subunit fused to foot and mouth disease VP1	Pharmaceutical, vaccine
Bacterial luciferase	Real-time reporter protein, can be visualized in living cells
HSV8-scFv	Pharmaceutical, classic single-chain antibody
Allophycocyanin	Fluorescent protein
Human metallothioneine-2	Pharmaceutical, UV protection
Firefly luciferase	Real-time reporter protein, can be visualized in living cells
Human tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)	Pharmaceutical

Карта генома вируса мозаики цветной капусты



Несущественная область генома составляет < 1 т.п.н.

Использование генетически модифицированных растений в разных странах

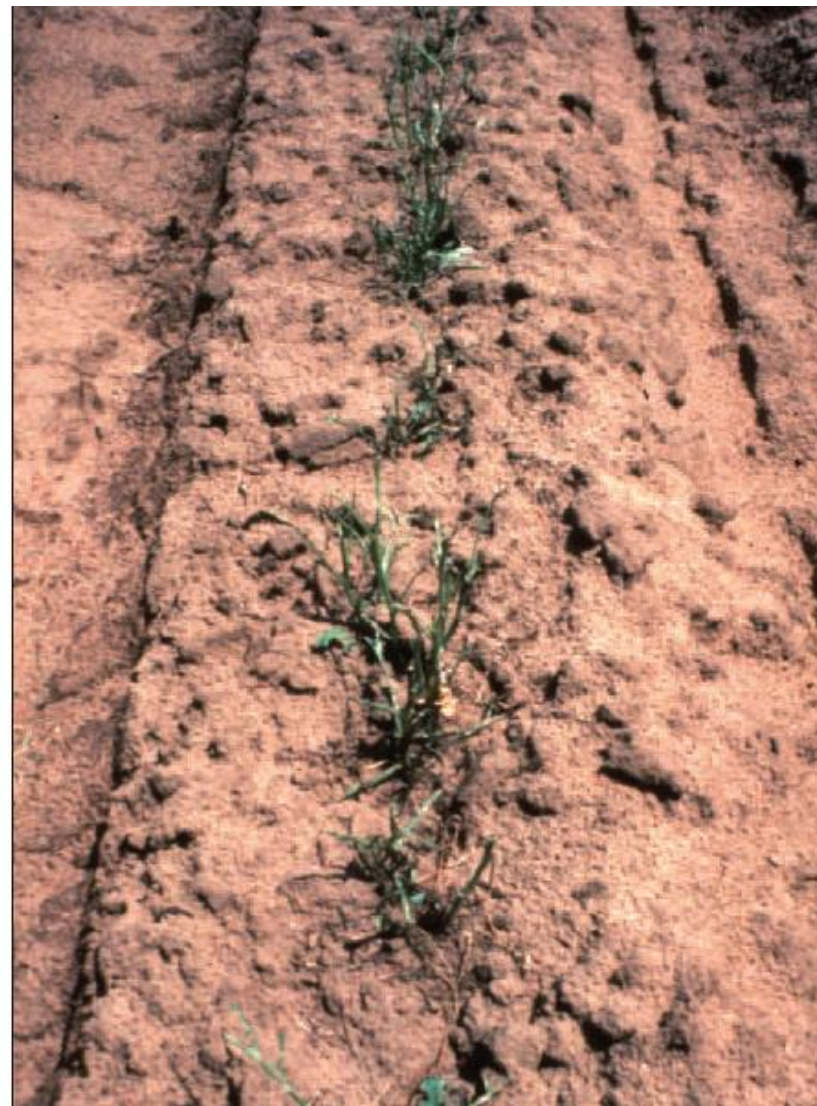


2013

GM Кукуруза MON 810, экспрессирующая Bt-токсин (компания Monsanto, США)



Трансгенные растения картофеля, экспрессирующие ген Bt-токсина *Bacillus thuringiensis* против колорадского жука



GM Картофель Amflora, содержащий амилопектин, но не амилозу



В обычном картофеле 80% амилопектина и 20% амилозы – проблема с гидролизом