

УДК 577.216.4:

МОДЕЛИРОВАНИЕ И РЕДАКТИРОВАНИЕ РАСТЕНИЙ

Лыков К.А., Караваева А.А., Смольянинова А.Д.

ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава Российской Федерации — Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, направление подготовки «Биология», Россия, Волгоград, e-mail: lykovkirill8@gmail.com

Геномное моделирование и редактирование – это технологии, базирующиеся на результатах секвенирования генома растений. Но также, важны и основные способы редактирования генома, в статье представлены методы доставки геномных конструкций в геном растений.

Ключевые слова: геномное редактирование, CRISPR/Cas9, биологическая баллистика, Электропорация, Микроинъекции ДНК, липосомы, Ti-плазмиды агробактерий

MODELING AND EDITING PLANTS

Lykov K.A., Karavaeva A.A., Smolyaninova A.D.

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Volgograd State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, field of study "Biology", Russia, Volgograd, e-mail: lykovkirill8@gmail.com

Genomic modeling and editing are technologies based on the plant genome sequencing corpus. The article presents methods for delivering genomic structures into the plant genome.

Key words: genomic editing, CRISPR/Cas9, biological ballistics, electroporation, DNA microinjection, liposomes, Agrobacterium Ti-plasmids

Введение:

Редактирование генома растений это, сложный, но крайне необходимый для человечества процесс. Сознательное изменение генома растений позволяет достичь результатов, которые невозможно добиться обычными методами селекции.

Термины:

Вектор — молекула ДНК или РНК, состоящая из двух компонентов: векторной части (носителя) и клонируемого чужеродного гена. Задача вектора – донести выбранную ДНК в

клетку-реципиент, встроить ее в геном, позволить идентификацию трансформированных клеток, обеспечить стабильную экспрессию введенного гена [3].

Генная (экспрессионная) кассета – фрагмент ДНК, содержащий все необходимые генетические элементы для экспрессии внедренного в него гена. Используется для клонирования и трансформации [4].

Трансформация — процесс поглощения клеткой организма свободной молекулы ДНК из среды и встраивания её в геном, что приводит к появлению у неё новых наследуемых признаков, характерных для организма-донора ДНК [5].

Метод биологической баллистики (биолистики, баллистическая трансформация)

Для бомбардирования растительных клеток наиболее удобны химически инертные частицы золота диаметром 0,6-1 мкм, на которые адсорбируют молекулы ДНК в присутствии хлорида кальция и спермидина. Также можно использовать более дешевые вольфрамовые микрочастицы, но они иногда проявляют фитотоксичность. Микрочастицами, несущими чужеродную ДНК, заряжают генную пушку, обеспечивающую ускорение частиц, которые пробивают клеточные стенки и проникают внутрь клетки, чужеродная ДНК, в конечном итоге, оказывается ядре либо в пластидах растительной клетки.

В клетке молекулы ДНК, введенные методом биолистики, рекомбинируют между собой и геномной ДНК и интегрируются в геномы растительных клеток. Интеграция в геном растения происходит случайным образом.

Добавление осмопротекторов - маннитола или сорбитола – в среду культивирования клеток при бомбардировке обеспечивает высокий выход стабильных трансформантов различных суспензионных культур клеток.

Метод биолистики является основным методом трансформации пластид растительных клеток. Данная технология адаптирована для получения трансгенных линий растений, устойчивых к агробактериальной трансформации. Опыление растений пыльцой, полученной из трансформированных методом биолистики микроспор, позволяет создавать трансгенные линии растений *in planta*, минуя стадии культивирования растительных клеток.

Успешно применяется комбинированный метод трансформации, названный агролистическим. В растительные клетки вводятся молекулы ДНК, содержащие экспрессионную кассету с генами *vir* Ti-плазмид *A. tumefaciens* под контролем активного в растениях промотора и T-ДНК сегмент с целевым и маркерным генами. Временная экспрессия агробактериальных генов вирулентности приводит к синтезу белков, которые

правильно вырезают ТДНК и встраивают ее в геном растения, как при обычной агробактериальной трансформации [7].

Электропорация

Электропорация основана на том, что импульсы высокого напряжения обратимо увеличивают проницаемость биомембран. В среду для электропорации добавляют клетки и фрагменты ДНК, которые необходимо ввести в клетки. Через среду пропускают высоковольтные импульсы малой длительности (1,5 кВ, 10 мкс), либо низковольтный импульс гораздо большей длительности (350 В, 54мс), приводящие к образованию пор (электропробой) в цитоплазматической мембране, время существования и размер которых достаточны, чтобы такие макромолекулы, как ДНК, могли из внешней среды войти в клетку в результате действия осмотических сил. При этом объем клетки увеличивается [6].

Метод электропорации успешно применен для стабильной трансформации различных культур растений, а также для исследования временной экспрессии трансгенов в растительных клетках.

В качестве исходных клеток для трансформации можно использовать зародыши растений, или микроспор (пыльцы) [7].

Микроинъекции ДНК

Микроинъекции ДНК. С помощью микроинъекций осуществляется трансформация у дрозофилы и растений (ячмень, капуста).

Метод состоит в прямом введении ДНК в цитоплазму или ядра протопластов растительных клеток с помощью стеклянной микрокапиллярной пипетки, управляемой микроманипулятором, и применим для трансформации любых протопластов и одноклеточных систем с высокой степенью эффективности. Важной особенностью метода является использование геля из легкоплавкой агарозы для удержания протопластов растительных клеток во время микроинъекции и последующего культивирования. Методом микроинъекции получены трансформанты табака, петунии, рапса, ячменя.

Активно используется технология макроинъекции раствора ДНК в семяпочку растения для получения трансформированного потомства. При этом отрезается рыльце, и раствор ДНК, содержащей трансгенную конструкцию, наносится на обрезанный конец столбика только что опыленного цветка. Модификацией технологии может быть инъекция суспензии агробактерий или раствора ДНК-векторов вместе с пылью растения в соцветия без

удаления рыльцев. Метод макроинъекции успешно применен для получения трансформантов риса, пшеницы, сои, петунии и других растений [7].

Ультразвук

Воздействие ультразвуком увеличивает проницаемость мембран, стимулируя перенос ДНК в протопласты растительных клеток, суспензии клеток и explants растений. Explants суспендируются в нескольких миллилитрах среды в микроцентрифужной пробирке; после добавления ДНК-векторов и быстрого перемешивания образцы подвергаются воздействию ультразвуком, затем клетки переносят в среду культивирования. Частота ультразвука и продолжительность воздействия определяют эффективность трансформации. Метод применён для исследования временной экспрессии трансгена, стабильности трансформации растений. Обработка ультразвуком используется для увеличения эффективности агробактериальной трансформации путем нанесения микроповреждений растительным клеткам и тканям [7].

Липосомы

Катионные липосомы представляют собой положительно заряженные сферические структуры из липидного бислоя, несущие в своей полости молекулы рекомбинантной ДНК. Липосомы эффективно поглощаются протопластами растительных клеток в ходе эндоцитоза, обеспечивая перенос чужеродных молекул ДНК в клетки. Эффективность процесса определяется размером липосом, при этом применение липосом большого размера обеспечивает более высокую эффективность трансформации. Метод применим для введения в растительные клетки различных по структуре ДНК-векторов, в том числе векторов на основе вирусных геномов. Данный метод успешно применен для введения трансгенных конструкций в клетки риса, пшеницы, картофеля. Успешную трансформацию клеток табака УАС векторами, несущими чужеродные фрагменты ДНК большого размера, в составе липосом провели, используя для введения частиц в клетки метод биолистики.

Трансформация протопластов с помощью полиэтиленгликоля

Трансформация протопластов с помощью полиэтиленгликоля - метод разработан для введения трансгенных конструкций в протопласты растительных клеток и применим для трансформации различных культур растений, в том числе устойчивых к агробактериальной трансформации.

Полиэтиленгликоль (гидрофильный длинноцепочечный полимер) стимулирует поглощение небольших векторных ДНК (4-12 т.п.н.) протопластами и обеспечивает хороший уровень трансформации при незначительном повреждении клеток [7].

Отсутствие эффективных технологий регенерации полноценных растений из протопластов ограничивает применение данного метода.

Перенос генов в растения с помощью вирусов

подавляющее большинство вирусов растений являются РНК содержащими вирусами, геном которых представлен одноцепочечной молекулой РНК, реплицирующейся в цитоплазме клетки-хозяина. Вирусная геномная РНК накапливается в растительных клетках до высоких концентраций, что открывает возможность конструировать на основе вирусных геномов многокопийные экспрессирующие векторы.

Экспрессирующие векторы для синтеза чужеродных белков в клетках растений сконструированы на основе геномов вируса табачной мозаики, мозаики коровьего гороха и ряда других вирусов

Геномы ДНК-содержащих вирусов – каулимовирусов и геминивирусов. К первым относится вирус мозаики цветной капусты (CaMV), геном которого представлен кольцевой двухцепочечной молекулой ДНК размером 8024 п.н. Из восьми генов только два несмежных несущественны для развития вируса. Их замена позволяет внедрять фрагменты ДНК длиной лишь в несколько сотен пар нуклеотидов. В растительных экспрессирующих векторах широко используют сильные промоторы вируса CaMV – промоторы гена 35S рРНК и гена VI [7].

Трансформация с помощью агробактерий.

Почвенные грамотрицательные бактерии рода *Agrobacterium* обладают природной способностью в местах поранения двудольных растений переносить в растительные клетки определенный сегмент Т-ДНК своих мегаплазмид с последующей интеграцией данного сегмента в геном растительных клеток. Клетки, трансформированные Т-ДНК, приобретают способность к неограниченному, нерегулируемому росту, что вызывает формирование опухолевых заболеваний.

Бактериальные мегаплазмиды – Ti-плазмиды и Ri-плазмиды.

Ключевое различие между плазмидой Ti и Ri состоит в том, что Плазмида Ti кодируется генами, вызывающими болезнь коронковой желчи, в то время как плазмида Ri кодируется генами болезни волосистой корня растений.

Основные этапы агробактериальной трансформации

I – активация хеморецептора VirA;

II – фосфорилирование фактора транскрипции VirG, экспрессия генов *vir*-области;

III – внесение одностороннего разрыва в районе правой границы (RB) T-ДНК, репликация с вытеснением T-цепи;

IV – связывание с T-цепью VirE2 и транспорт комплекса T-цепи к поре;

V – прохождение T-цепи в комплексе с белками в растительную клетку;

VI – интеграция T-ДНК в хромосому растительной клетки.

Исследование механизма переноса T-ДНК из *A. tumefaciens* в растительные клетки показало, что трансформация растений агробактериями определяется тремя генетическими элементами: генами вирулентности *chv* в составе хромосомы *Agrobacterium*; областью T-ДНК, окруженной правой (RB) и левой (LB) границами, и генами вирулентности *vir* в составе агробактериальных Ti-плазмид

Вскоре после переноса T-комплекса в ядро растительной клетки происходит синтез комплементарной T-цепи с образованием двухцепочечной формы T-ДНК, что инициирует экспрессию генов в составе свободного T-ДНК сегмента, неинтегрированного в хромосомы растения. Данное явление получило название «временная экспрессия». Точный механизм встраивания T-ДНК в ядерный геном растений не выяснен. Предполагается, что стабильная интеграция T-ДНК в хромосомы растения происходит в ходе негомологичной (незаконной) рекомбинации при участии ферментов систем репликации и репарации растительной клетки, а также белков VirD2 и VirE2

T-ДНК, фланкированная правым и левым концевыми повторами, и гены вирулентности *vir* могут находиться в агробактерии на двух разных совместимых плаزمидах (в транс-положении).

Рекомбинантную неонкогенную (не содержащую генов ферментов синтеза фитогормонов и опинов) T-ДНК, клонируют в клетках *E. coli* в составе небольших плазмидных векторов с широким кругом хозяев, что позволяет манипулировать данными векторами в клетках *E. coli* и *A. tumefaciens*.

Такая Ti-плазида, содержащая гены вирулентности *vir*, обеспечивает все функции переноса рекомбинантной T-ДНК, но собственной T-ДНК не содержит и потому называется «обезоруженной».

Совместимые T-ДНК вектор и «обезоруженная» T_i-плазмида составляют бинарную векторную систему: плазмиду, содержащую рекомбинантную T-ДНК, называют бинарным вектором, а «обезоруженную» T_i-плазмиду, несущую гены *vir*, помощником (хелпером).

Поскольку интеграция T-ДНК в геном растения происходит с большой точностью по правой границе и с меньшей – по левой, целевой ген чаще располагают у правой (RB) границы T-ДНК, а селективный маркерный ген – ближе к левой границе (LB) [7].

CRISPR / Cas9

Инструмент CRISPR / Cas9 превосходит другие программируемые нуклеазы, такие как ZFNs и TALENs, своей простотой и высокой эффективностью. Для адаптации этой технологии ко многим видам растений были созданы различные векторные системы CRISPR/Cas9, специфичные для растений.

Системы CRISPR-Cas - это система состоящая из двух основных блоков: CRISPR-кассеты и прилегающего к ней кластера генов *cas*. Кассета — это блок прямых почти палиндромных («зеркальных») повторов размером 24–48 пар нуклеотидов. Между этими повторами находятся спейсеры — уникальными вставками примерно такой же длины.

Гены *cas* кодируют белки, отвечающие за встраивание новых спейсеров и уничтожению агентов с идентичными спейсерам последовательностям (протоспейсерами). Функцию уничтожения выполняют Cas-белки, называемые эффекторными. В зависимости от типа эффекторов все CRISPR-системы разделяют на два класса: у I класса мишень уничтожается мультибелковым комплексом, а у II — одним крупным белком. Далее эти классы подразделяются на шесть типов. Большинство эффекторов атакует ДНК, лишь один — исключительно РНК, редкие — обе молекулы.

Для решения инженерных задач больше всего подходит система II типа, относящаяся ко II классу, — она самая простая. Именно ее эффекторный белок называется Cas9 [1].

Существует стратегия редактирования генома растений без использования ДНК путем трансфекции предварительно собранных комплексов очищенного белка Cas9 и синтезированной sgRNA в протопласты растений. Эта стратегия особенно полезна для вегетативно размножаемых растений для создания линий, не содержащих трансгенов.

Для получения трансгенных растений, несущих целевые мутации, можно использовать биолистическую трансформацию каллусов и незрелых эмбрионов для интеграции конструкций экспрессии Cas9 и sgRNA в геномы растений и получения наследуемых мутаций.

Поскольку метод трансформации, опосредованный *Agrobacterium*, является наиболее эффективным для многих растений, большинство применений CRISPR / Cas9 в растениях используют этот метод для интеграции Т-ДНК, несущих как кассеты экспрессии Cas9, так и sgRNA, в геномы растений. Редактирование генома арабидопсиса обычно использует опосредованную агробактериями цветочную дип-трансформацию. В отличие от этого, для других однодольных и двудольных растений, таких как рис, кукуруза, табак, томаты, картофель и тополь, подходы к редактированию генома на основе CRISPR / Cas9 обычно используют опосредованную *Agrobacterium* стабильную трансформацию каллуса, незрелых эмбрионов или других тканей. Кроме того, подход агрофильтрации использовался для введения ДНК вируса табачной погрешки, несущей кассету экспрессии sgRNA, в табак, трансформированный Cas9 [2].

Вывод

Есть много способов редактировать геном растений, проверенным методом является использование агробактерий и CRISPR / Cas9 которые имеют множество модификаций для разных растений.

Список литературы

1. Коротаев А. Просто о сложном: CRISPR/Cas // Биомолекула [Электронный ресурс]. URL: <https://biomolecula.ru/articles/prosto-o-slozhnom-crispr-cas> (дата обращения: 15.01.2023).
2. Ma X. [и др.]. CRISPR/Cas9 Platforms for Genome Editing in Plants: Developments and Applications // *Molecular Plant*. 2016. № 7 (9). С. 961–974.
3. Трансдукция — Студопедия [Электронный ресурс]. URL: https://studopedia.ru/7_26433_transduktsiya.html (дата обращения: 15.01.2023).
4. Генные кассеты Генная экспрессионная кассета фрагмент [Электронный ресурс]. URL: <https://present5.com/gennye-kassety-gennaya-ekspressionnaya-kasseta-fragment/> (дата обращения: 15.01.2023).
5. Биология для студентов - 56. Трансформация у прокариот. Значение [Электронный ресурс]. URL: <https://vseobiology.ru/mikrobiologiya/1811-56-transformatsiya-u-prokariot-znachenie> (дата обращения: 15.01.2023).
6. Электропорация // StudFiles [Электронный ресурс]. URL: <https://studfile.net/preview/9144919/page:6/> (дата обращения: 15.01.2023).
7. Генетическая инженерия растений. Учебное пособие.pdf [Электронный ресурс]. URL: [http://iweb.vyatsu.ru/document/material/49/06.03.01%20Биология/Генная%20инженерия/Генетическая%20инженерия%20растений.%20Учебное%20пособие.pdf#:~:text=Природной%20способностью%20в%20местах%20поранения,галлом%20\(в%20случае%20индукции%20опухоли](http://iweb.vyatsu.ru/document/material/49/06.03.01%20Биология/Генная%20инженерия/Генетическая%20инженерия%20растений.%20Учебное%20пособие.pdf#:~:text=Природной%20способностью%20в%20местах%20поранения,галлом%20(в%20случае%20индукции%20опухоли) (дата обращения: 15.01.2023).