УДК 581.19:57.084.1

ПРИМЕНЕНИЕ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ В МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ РАСТЕНИЙ

© 2010 г. Е. Б. Рукавцова[#], В. В. Алексеева, Я. И. Бурьянов

Филиал УРАН Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142290, Московская обл., Пущино, просп. Науки, 6

Поступила в редакцию 26.05.2009 г. Принята к печати 03.08.2009 г.

Метаболическая инженерия растений направлена на осуществление трансгенными клетками новых биохимических реакций. Эти реакции детерминируются ферментами, кодируемыми чужеродными генами или собственными модифицированными генами. Растения представляют один из наиболее привлекательных объектов для метаболической инженерии. Имея одинаковые пути синтеза основных биологических соединений, растения отличаются поразительным разнообразием своих конечных продуктов: сахаров, ароматических соединений, жирных кислот, стероидных соединений и других биологически активных веществ. РНК-интерференция для изменения метаболических путей является мощным инструментом, позволяющим получать растения с новыми ценными признаками. В настоящем обзоре рассмотрены основные тенденции развития исследований по получению трансгенных растений с измененным метаболизмом.

Ключевые слова: метаболическая инженерия; трансгенные растения; РНК-интерференция.

ВВЕДЕНИЕ

Наиболее эффективной стратегией подавления экспрессии генов (замолкания, сайленсинга) на посттранскрипционном уровне у растений и других организмов является РНК-интерференция (RNA interference, RNAi) [1]. Уже в 1980-х годах, задолго до открытия явления RNAi в генетической инженерии растений для замолкания генов была применена стратегия антисмысловых РНК (asРНК), с помощью которой было достигнуто подавление экспрессии [2, 3]. В дальнейшем было обнаружено, что в клетках трансгенных растений с молчащими чужеродными генами присутствуют смысловые и антисмысловые 21–25-мерные олигорибонуклеотиды, комплементарные соответствующей мРНК, в то время как у трансгенных растений с нормально экспрессируемыми чужеродными генами они отсутствуют [4]. Несколько позднее у *Drosophila* было установлено такое же образование 21–23-мерных дуплексных коротких интерферирующих РНК (siРНК), индуцирующих деградацию целевых мРНК [5, 6].

У всех эукариот механизм замолкания генов последовательно включает несколько реакций. Вирусная инфекция, трансген или двунаправленная транскрипция мобильных генетических элементов вызывает появление в клетке двуцепочечной РНК (dsРНК). На первом этапе белок Dicer, относящийся к семейству РНКазы III, производит нарезание dsРНК на 21–25-членные нуклеотидные фрагменты siРНК. На втором этапе образуются комплексы RISC (RNA-induced silencing complex), состоящие, в основном, из белков семейства Argonaute и siРНК. При

Сокращения: RNAi – РНК-интерференция; dsРНК – двуцепочечные РНК; siРНК – малые интерферирующие РНК; asРНК – антисмысловые РНК.

[#] Автор для связи (тел.: (4967) 33-09-70; факс: (4967) 33-05-27; эл. почта: ruk@fibkh.serpukhov.su).

этом белки семейства Argonaute разрушают одну из цепей дуплексной siРНК, так что в составе RISC остается только антисмысловая цепь siРНК. Комплексы RISC направляются к мРНК-мишени благодаря комплементарному взаимодействию между siРНК и мРНК-мишени. В этом комплексе Argonaute выполняет функцию эндонуклеазы (slicer), расщепляя мРНК-мишень по механизму РНКазы Н [7]. Таким образом, РНК-интерференция представляет собой процесс деградации мРНК в присутствии гомологичных молекул dsРНК. У растений наиболее эффективным путем подавления экспрессии генов служит введение в клетки шпилькообразующих (hairpin) структур, приводящих к образованию dsРНК [8].

В настоящее время расшифрованы геномы многих растений. По предварительным оценкам, геном арабидопсиса содержит 25 тысяч генов, кодирующих белки, а геном риса – 50 тысяч генов [9, 10]. Ключевая задача теперь состоит в том, чтобы идентифицировать функцию каждого из этих генов, а также проанализировать их взаимодействие между собой. Определить функцию гена можно, нарушая его активность и наблюдая за изменениями в фенотипе. Такой процесс называется «обратной генетикой». Раньше инструментом обратной генетики являлись антисмысловые РНК, теперь в основном dsРНК. Таким образом, РНК-интерференция может использоваться в качестве одного из методов функциональной геномики растений. В настоящее время стратегия РНК-интерференции широко используется для целей метаболической инженерии растений. С помощью RNAi можно достигнуть увеличения синтеза целевого метаболита либо уменьшения количества нежелательных веществ в клетках трансгенных растений.

ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫЕ ВЕКТОРНЫЕ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ В РАСТЕНИЯХ

Для подавления экспрессии генов в растениях с помощью РНК-интерференции применяют разнообразные генетические конструкции [8, 11]. Показано, что наиболее эффективна для сайленсинга структура шпильки, когда смысловая и антисмысловая РНК образуют стебель двуцепочечной РНК за счет комплементарности, а между ними находится спейсерный участок одноцепочечной РНК, формирующий петлю. Для эффективной индукции сайленсинга в растениях, шпилькообразная структура РНК, получаемая в результате транскрипции таких конструкций, должна содержать dsРНК, состоящую как минимум из 100 п.о., а наиболее эффективными считаются конструкции с длиной двуцепочечного участка более 300 п.о. Показано, что шпилькообразующие структуры для РНК-интерференции в растениях вызывают подавление экспрессии генов-мишеней у 70–100% трансформантов [12].

Некоторые биотехнологические фирмы разрабатывают специализированные векторные конструкции для РНК-интерференции в растениях. В частности, фирмой “CSIRO” (Австралия)

созданы векторы для трансформации двудольных растений pHANNIBAL и pKANNIBAL [12]. Эти плазмиды имеют в своем составе промотор 35S РНК вируса мозаики цветной капусты (CaMV 35S), интрон и несколько сайтов для встраивания целевого гена в смысловой и антисмысловой ориентациях с обеих сторон от интрона. Векторы pHANNIBAL и pKANNIBAL содержат бактериальные гены устойчивости к ампициллину и канамицину, соответственно. Недостатком является сложность многоэтапного встраивания генов в эти плазмиды.

Иной метод встраивания генов в векторы с применением стратегии рекомбинационного клонирования Gateway® разработан американской фирмой «Invitrogen» [13]. На основе этого метода сконструированы плазмиды pHELLSGATE [12], pWATERGATE и pSTARGATE [14]. Вектор pHELLSGATE содержит промотор CaMV 35S, а в векторе pWATERGATE используется светоиндуцибельный промотор малой субъединицы рибулозо-1,5-бисфосфат-карбоксилазы RbcS. Вектор pSTARGATE специально сконструирован для трансформации однодольных растений и содержит промотор гена убиквитина кукурузы и интрон, а также селективный маркер устойчивости к гигромицину. С помощью векторов этого типа можно определять функции индивидуальных членов семейства генов или генов, участвующих в сложных биохимических путях.

Кроме того, разработаны векторы для индуцированного выключения экспрессии специфических генов с помощью РНК-интерференции в растениях с помощью дексаметазона [15]. В векторах серии pOpOff используются промотор pOp6 и фактор транскрипции LhGR. Дексаметазон, добавленный в среду с трансформированными растениями, запускает механизм РНК-интерференции. Такая индуцибельная система удобна для определения функций генов, выключение которых приводит к гибели растений.

Плазмидой для индуцибельной РНК-интерференции, содержащей ген фитоендесатуразы (PDS), трансформировали растения арабидопсиса. Через неделю после помещения растений на среду с дексаметазоном происходило фотообесцвечивание листьев многих из трансформантов, что явилось результатом подавления экспрессии гена PDS [15]. Для временного подавления генов с помощью РНК-интерференции можно использовать также плазмидные конструкции, содержащие промоторы генов теплового шока [16].

ИЗМЕНЕНИЕ МЕТАБОЛИЗМА РАСТЕНИЙ, ПРИВОДЯЩЕЕ К УЛУЧШЕНИЮ ИХ ПИЩЕВЫХ КАЧЕСТВ

РНК-интерференцию можно применять для получения растений с улучшенными пищевыми свойствами, например, с измененным составом жирных кислот. С ее помощью было получено более качественное хлопковое масло [17]. Природное масло семян хлопчатника обычно содержит 26% пальмитиновой кислоты (C16:0), 15% олеиновой кислоты (C18:1) и 58%

линолевой кислоты (C18:2). Фермент Δ12-десатураза (FAD2-1) превращает олеиновую кислоту в полиненасыщенные жирные кислоты (рис. 1). При подавлении активности Δ12-десатуразы содержание олеиновой кислоты в масле повысилось до 77%. При выключении Δ9-десатуразы (SAD-1) количество стеариновой кислоты в хлопковом масле превысило содержание пальмитиновой кислоты и было на 40% выше по сравнению с нетрансформированными растениями. Скрещиванием полученных трансгенных растений хлопчатника с подавленной экспрессией генов десатураз получены растения с высоким содержанием стеариновой и олеиновой кислот в масле (до 40%). Этот признак стабильно поддерживался в потомстве.

Модифицированные семена хлопчатника могут служить источником белка, поскольку его содержание в них достигает 22%. Хлопковая отрасль промышленности могла бы обеспечить производство примерно 10 млн тонн белка в год и удовлетворить потребности в нем 500 млн человек. Однако семена хлопчатника содержат госсипол – опасный полифункциональный яд. Госсипол служит хлопчатнику защитой против насекомых и патогенов. Выведение хлопчатника без госсипола с помощью обычной селекции, а также с использованием антисмысловых РНК не дало эффекта, так как хлопчатник стал уязвим к инфекционным болезням [18]. Лишь недавно американским исследователям удалось снизить уровень госсипола в семенах хлопчатника с помощью РНК-интерференции. Для этого использовали конструкцию, содержащую ген кадиненсинтазы (фермента, синтезирующего госсипол) под контролем семяспецифичного промотора [19].

При многих болезнях (сердечно-сосудистые заболевания, рак кишечника, ожирение) очень важна диета, включающая в себя злаковые с большим содержанием неперевариваемой ферментами клетчатки. Крахмал, содержащийся в зернах злаковых, состоит из смеси двух полимеров – амилозы и амилопектина. В отличие от амилозы, цепи амилопектина сильно разветвлены. При приготовлении пищи амилоза формирует комплексы, устойчивые к перевариванию. Синтез амилозы контролируется ферментом GBSS (гранулсвязанная крахмальная синтаза). Синтез амилопектина контролируется многими ферментами, в том числе SBE (глюканветвящий фермент). Двудольные и однодольные растения различаются изоформами SBE. У картофеля две таких изоформы – SBEI и SBEII. Для создания картофеля, содержащего более 50% амилозы, понадобилась супрессия обеих форм SBE [20]. У однодольных найдено три изоформы фермента – SBEI, SBEIIa и SBEIIb. У кукурузы мутант по SBEIIb содержал 50–90% амилозы [21], в то время как супрессия SBEI или SBEIIa не давала никакого эффекта [22, 23]. Пшеница – гексаплоидная культура, то есть содержит шестикратный набор хромосом. Гены SBE находятся в разных сочетаниях во всех трех геномах. РНК-интерференция является эффективным инструментом для подавления экспрессии генов одновременно во всех локусах. Одновременный сайленсинг обоих генов SBEIIa и SBEIIb (но не одного) привел к повышению

содержания амилозы в зернах пшеницы до 70% [24]. Эксперименты по кормлению крыс такой пшеницей подтвердили ее диетическую ценность.

Получена кукуруза с повышенным содержанием лизина, у которой был подавлен катаболизм лизина в эндосперме [25] и наряду с этим введен бактериальный ген дигидродипиколинатсинтазы *CordapA* из *Corynebacterium glutamicum* [26]. Это привело к 100-кратному увеличению синтеза лизина в зернах кукурузы по сравнению с нетрансформированными растениями.

Некоторые исследователи с целью улучшения вкусовых свойств картофеля и батата и создания клубней без амилозы подавили ряд ферментов, участвующих в биосинтезе крахмала, с помощью РНК-интерференции [27, 28], другие таким же методом стремились получить растения с высоким содержанием амилозы [29, 30]. В результате были получены растения с высоким и низким содержанием амилозы [31].

Одним из важных пищевых растений в странах Африки, Южной Азии и Южной Америки является маниок (кассава). Недостатком этого растения является способность накапливать в клубнях цианогенные гликозиды лиманарин и лотаустралин. С помощью РНК-интерференции удалось подавить синтез цианогликозидов в клубнях на 92% путем сайленсинга генов *CYP79D1* и *CYP79D2*, кодирующих цитохромы P450 [32]. В листьях большинства полученных линий трансгенных растений количество цианогенных гликозидов составило менее 1% от уровня растений дикого типа.

Получены растения томата, в которых ингибировали, вместе или по отдельности, активность генов клеточной стенки полигалактуроназы (*LePG*) и экспанзина (*LeExp1*), что улучшило консистенцию и вязкость томатного сока и пасты [33]. РНК-интерференция оказалась полезной и для получения плодов томата с повышенным содержанием каротиноидов и флавоноидов за счет ингибирования экспрессии различных генов [34–36]. Ингибирование гена халконсинтазы привело, с одной стороны, к снижению уровня флавоноидов в плодах томата, а с другой – к получению партенокарпических (безкосточковых) плодов [37]. Последний подход может быть полезен в биотехнологии для создания бессемянных плодов и ягод.

Большинство аллергенных белков схожи по структуре и на них вырабатываются одинаковые антитела IgE. Аллергии на антигены березовой пыльцы сопутствует перекрестная реактивность на близкие по структуре белки яблок, поэтому пациенты, страдающие этим видом аллергии, вынуждены ограничивать или исключать яблоки из питания. РНК-интерференция применена для создания трансгенных растений яблони с плодами, обладающими пониженной аллергенностью. С помощью этой стратегии был подавлен синтез основного аллергена яблони Mal d 1 [38]. Испытания, проведенные на трех пациентах, страдающих перекрестной аллергией

на березовую пыльцу и яблоки, подтвердили сниженную аллергенность трансгенных растений. Это открывает большие возможности для создания гипоаллергенных продуктов питания.

Таким образом, с помощью РНК-интерференции можно значительно улучшить пищевые свойства многих растений. РНК-интерференция является одной из самых перспективных стратегий получения трансгенных растений с повышенной биологической безопасностью из-за отсутствия у них чужеродных белков. В то же время следует учитывать необходимость анализа нового метаболома трансгенных растений, так как в них может произойти нежелательный побочный количественный сдвиг синтеза некоторых метаболитов.

ИЗМЕНЕНИЕ БИОСИНТЕЗА АЛКАЛОИДОВ В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ

РНК-интерференцию можно использовать для получения новых лекарственных средств из растений. Опийный мак – известный источник морфина и кодеина, которые образуются в результате множества ферментативных реакций из *L*-тирозина (рис. 2). Фермент кодеинонредуктаза (COR) превращает кодеинон в кодеин, который после деметилирования превращается в морфин. С помощью РНК-интерференции все семь членов семейства ферментов COR удалось заблокировать, в результате в маке стал накапливаться ретикулин и его метилированные производные – компоненты лекарства для лечения малярии. Это оказалось довольно неожиданным, поскольку синтез этих интермедиатов находится на восемь стадий выше [39]. Этими же исследователями было проведено выключение синтеза и других алкалоидов в разных частях мака с помощью антисмысловых РНК [40] и РНК-интерференции [41] за счет подавления других ферментов, участвующих в биосинтезе морфина.

Использование РНК-интерференции помогло создать табак с повышенным содержанием никотина, но не содержащий канцерогены [42–44]. В табаке никотин может деметилироваться, в результате чего образуется норникотин (рис. 3). Норникотин является предшественником канцерогена *N*-нитрозонорникотина. За превращение никотина в норникотин ответственны белки семейства цитохромов P450. Подавление с помощью РНК-интерференции одного из этих генов этих белков *CYP82E4*, кодирующего никотиндеметилазу, привело к тому, что никотин в листьях почти не превращался в норникотин. Ингибирование с помощью РНК-интерференции гена другого фермента, путресцин-*N*-метилтрансферазы, привело к снижению содержания никотина в листьях табака разных линий на 9.1–96.7% по сравнению с контролем [45].

Японские исследователи пытаются создать трансгенные растения кофе с зернами, не содержащими кофеина. Кофеин образуется из аденина в результате девяти реакций с участием различных метилтрансфераз (рис. 4). Ген теобромин синтазы (7-*N*-метилксантинметилтрансфераза, CaMXMT1) – одной из метилтрансфераз, участвующих в синтезе кофеина, был выключен с использованием как антисмысловых РНК, так и РНК-

интерференции [46–48]. Содержание кофеина и теобромина в трансгенных растениях резко уменьшилось, хотя и было различным в разные сезоны. В то же время никаких побочных вредных веществ в зернах кофе не образовывалось.

ИЗМЕНЕНИЕ ОКРАСКИ ЦВЕТКОВ С ПОМОЩЬЮ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ

Изменение окраски цветков трансгенных растений обычно достигается введением в растения смысловых, антисмысловых РНК и интерферирующих форм РНК, непосредственно связанных с генетическим детерминированием путей биосинтеза антоциановых пигментов – дигидрофлавонолредуктазы [49], халконсинтазы [50–52] и халконизомеразы [53]. Подобный эффект впервые достигнут за счет экспрессии антисмысловой формы гена *hmg1* [54], прямо не участвующего в биосинтезе антоцианов. Этот ген кодирует один из ключевых ферментов биосинтеза изопреноидов в цитоплазме растений – 3-гидрокси-3-метилглутарил-CoA–редуктазу. У трансгенных растений табака с подавленным синтезом мевалоновой кислоты были изменены цвет и форма цветков. Если нетрансформированные растения и растения с геном *hmg1* в смысловой ориентации имели цветки темно-розового цвета, то цветки трансгенных растений с антисмысловой формой гена были бледно-розовыми. Кроме того, венчики этих цветков отличались своей формой от цветков контрольных растений. Экспрессия антисмысловой формы гена *hmg1* привела также к мужской стерильности полученных растений, что можно использовать в селекционно-генетической практике.

Японскими исследователями совместно с австралийскими (фирмы «Suntory» и «Florigene») созданы первые в мире голубые розы [55]. Обычной селекцией до сих пор не удавалось придать розам голубой оттенок, поскольку основным у них является красный пигмент. Один из генов, кодирующих красный пигмент роз, – дигидрофлавонолредуктаза (DFR). Для подавления этого гена использовали РНК-интерференцию. Затем в розы генно-инженерными методами встроили ген *F3’5’H* из анютиных глазок, ответственный за синтез синего пигмента дельфинидина, и ген *DFR* из ириса. В результате получили розы с голубоватыми лепестками. Цветки с более насыщенной голубой окраской можно будет получить, понизив кислотность лепестков, ингибирующую голубой пигмент. Сейчас проводится поиск таких генов. Генетически модифицированные голубые розы планируют выпустить на рынок в Японии в 2009 году. Помимо голубых роз в Австралии успешно созданы и голубые гвоздики [56].

СОЗДАНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ С ИЗМЕНЕННЫМ СОСТАВОМ ДРЕВЕСИНЫ

Экстракция лигнина из древесины является высокоэнергозатратной стадией в технологии бумажного производства. При этом используются вредные для окружающей среды химические вещества, а отходы лигнина трудно утилизируются микроорганизмами. Изменение количественного содержания либо качественного состава лигнина – одна из важных задач современной лесной биотехнологии.

Лигнин представляет собой смесь полимеров, содержащихся в клеточных стенках сосудистых растений. Древесина лиственных пород содержит до 25% лигнина, а хвойных – до 35%. Биохимические пути биосинтеза лигнина и ферменты, участвующие в них, частично охарактеризованы [57, 58]. Лигнины являются производными трех гидроксикоричных спиртов – *п*-кумарового, кониферилового и синапилового (монолигнолов), отличающихся степенью метоксилирования. Монолигнолы дают начало трем типам лигнинов – *п*-гидроксифениловым (H), гваяколовым (G) и сирингиловым (S) (рис. 5). Кроме трех основных монолигнолов полимеры лигнина содержат и другие фенилпропаноидные соединения [59]. У различных растений преобладают разные виды лигнинов. Твердая древесина покрытосеменных двудольных растений содержит в основном лигнины типов G и S, а мягкая древесина голосеменных состоит из G-лигнинов и небольшого количества H-единиц [60].

С помощью генной инженерии растений можно манипулировать различными этапами биосинтеза мономеров лигнина. Первоначально эксперименты по изменению состава лигнина проводились в основном на модельных растениях табака с использованием стратегии антисмысловых РНК, косупрессии и РНК-интерференции. Показано подавление активности различных ферментов фенилпропаноидного пути – циннамоил-CoA–редуктазы (CCR), превращающей CoA-производные *п*-кумаровой, кофейной, феруловой и других кислот в соответствующие альдегиды [61–66], дегидрогеназы коричного спирта (CAD), которая проводит восстановление альдегидов до спиртов – конечную реакцию образования монолигнолов [61–64, 66–69], 4-кумарат-CoA–лигазы (4CL), связывающей *п*-кумаровую кислоту с ацетил-CoA [70, 71], *О*-метилтрансферазы кофейной кислоты (COMT), переносящей метильные остатки на мономеры [65, 68, 72]. Ингибирование этих ферментов приводило к снижению содержания лигнина в клетках трансгенных растений табака, что показало перспективность применения данной стратегии для создания трансгенных деревьев.

Одними из первых работ по получению трансгенных гибридов тополя с измененным содержанием лигнина были исследования по подавлению с помощью asРНК активности нескольких ферментов, участвующих в биосинтезе лигнина. У деревьев со сниженной активностью фермента CAD переработка древесины сульфатным методом (процесс Крафта) облегчалась, поскольку улучшались солюбилизация и фрагментация лигнина за счет

модификации его структуры [73–76]. При этом древесина становилась красной или красно-коричневой за счет накопления остатков конифирилового альдегида [77]. Измененный цвет древесины может являться преимуществом в мебельной промышленности, поскольку такая древесина не требует окрашивания.

Подавление активности *O*-метилтрансферазы кофейной кислоты (CAOMT или COMT) также приводило к изменению окраски древесины и при этом уменьшалось содержание S-лигнина, что является недостатком при производстве бумаги [75, 78].

Изменение активности фермента кофеоил-CoA–*O*-метилтрансферазы (CCoAOMT) с использованием asРНК в клетках трансгенного тополя привело к значительному снижению уровня лигнина – на 60–70% по сравнению с нетрансформированными растениями [57], при этом одинаково снизилось содержание как гваяколовых (G), так и сирингиловых (S) лигнинов.

Ингибирование фермента 4CL с использованием косупрессии приводило к снижению содержания лигнина в древесине осины на 45% [79]. Подавление активности CCR также уменьшало содержание лигнина, но при этом нарушалось строение клеточных стенок – изменялся комплекс лигнина с целлюлозой, что приводило к уменьшению роста деревьев тополя [80].

С помощью РНК-интерференции в клетках гибрида тополя была подавлена активность *п*-кумароил-CoA−гидроксилазы (C3’H, цитохром-P450-зависимая оксигеназа) [81]. Наблюдали значительное, до 55%, снижение содержания лигнина в клеточных стенках. Поскольку C3’H катализирует стадию биосинтеза лигнина, общую для G- и S-форм, для исследователей явилось неожиданностью уменьшение количества только G-лигнина, в то время как содержание S-лигнина в древесине осталось на прежнем уровне. Интересно, что в трансгенных деревьях накапливались фенилглюкозиды, что может обеспечивать тополям хорошую защиту от насекомых и грибов [82]. Такую стратегию метаболической инженерии можно использовать для получения биотоплива, древесины и бумаги, не применяя пестициды для защиты деревьев от вредителей.

Большинство исследований трансгенных тополей сначала проводили в теплицах, а затем начались испытания в открытом грунте. Основные испытания сделаны исследователями из Франции, Бельгии, Великобритании и Швеции. Показано, что тополя с подавленным синтезом CAD или COMT, культивируемые в течение четырех лет на плантациях, оставались здоровыми и по виду не отличались от нетрансгенных [76]. Древесина деревьев со сниженной активностью CAD оказалась более пригодна для получения бумаги, поскольку для делигнификации потребовалось значительно меньшее количество химикатов.

Интересным исследованием является подавление с помощью asРНК гена лакказы *lac3* у трансгенных растений тополя [83]. Лакказы, или *п*-дифенол:O2-оксидоредуктазы (КФ 1.10.3.2),

представляют собой медьсодержащие гликопротеины, имеющиеся у многих организмов, включая бактерии, грибы, насекомые и растения. Недавно появились доказательства участия лакказ в биосинтезе лигнина, что основано на их способности окислять предшественники лигнина (*n*-гидроксикоричные спирты), а также на их локализации в клеточных стенках ксилемы [84, 85]. Ингибирование гена лакказы не повлияло на общий рост и развитие деревьев тополя. Не изменились ни содержание лигнина, ни соотношение его форм, однако у одного из трансгенов в 2–3 раза повысилось содержание растворимых фенолов в ксилеме, а также деформировались клетки волокон ксилемы [83]. Возможно, дальнейшие генно-инженерные эксперименты с использованием генов лакказ позволят создать деревья с измененным составом древесины.

Исследования на хвойных растениях немногочисленны. Получены растения норвежской ели с подавленным синтезом CCR за счет введения антисмысловой формы гена [86]. Эти растения отличались от нетрансгенных только по обхвату ствола. Общее содержание лигнина было снижено незначительно, однако количество H-лигнина снизилось на 34%.

Недавно получены трансгенные растения сосны *Pinus radiata* со сниженной активностью 4-кумарат-CoA–лигазы (4CL), что привело к появлению карликового фенотипа «бонсай» [87]. Древесина трансгенных деревьев отличалась оранжево-бурым цветом и заметными морфологическими изменениями в строении древесины. Количество лигнина в клеточных стенках уменьшилось на 50%, причем в большей степени S-формы по сравнению с G-формой. Химическая обработка 5-летних трансгенных сосен показала, что свойства древесины, необходимые для получения бумаги, улучшились, хотя большим недостатком явилось уменьшение размера деревьев.

Таким образом, генетическая инженерия растений путем модификации путей биосинтеза лигнина позволяет получать трансгенные деревья с целенаправленно измененным составом древесины. Такие деревья планируют в ближайшем будущем культивировать на искусственных лесных плантациях. Вместе с тем следует учитывать возможность отрицательных последствий уменьшения количества лигнина в древесине растений. Лигнины придают клеточным стенкам прочность, делают их непроницаемыми для воды, таким образом, они регулируют транспорт воды и питательных веществ по сосудистой системе. Лигнины также нужны для защиты растений от фитопатогенов [88].

В заключение можно отметить, что в настоящее время описано получение многих видов трансгенных растений с измененным метаболизмом путем применения технологии антисмысловых и интерферирующих РНК. Эффективность синтеза определенных метаболитов зачастую может зависеть от выбора конкретного растения-продуцента. Для пищевого

назначения создание генно-модифицированных растений определяется задачами количественного содержания целевых продуктов и конкретных вторичных метаболитов. К созданию растений-продуцентов биологически активных веществ фармацевтического назначения предъявляются требования легкости выделения из них метаболитов, а также низкой стоимости получаемых препаратов. Получение биотоплива и бумаги из древесины трансгенных деревьев с измененным синтезом лигнинов позволит снизить загрязнение окружающей среды.

РНК-интерференция является мощным инструментом в создании растений-продуцентов новых ценных метаболитов и промышленного сырья. Такие трансгенные растения имеют перспективы стать безопасными и экономически выгодными объектами для получения разнообразных биологически активных веществ.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 09-04-00980.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hammond S.M., Caudy A.A., Hannon G.J.* // Nat. Rev. Genet. 2001. V. 2. P. 110–119.
2. *Ecker J.R., Davis R.W.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 5372–5376.
3. *Зинкевич В.Е., Богдарина И.Г., Рукавцова Е.Б., Мърхова М.И., Бурьянов Я.И., Баев А.А.* // Докл. АН СССР. 1988. Т. 300. С. 727–730.
4. *Hamilton A.J., Baulcombe D.C.* // Science. 1999. V. 286. P. 950–952.
5. *Zamore P.D., Tuschl T., Sharp P.A., Bartel D.P.* // Cell. 2000. V. 101. P. 25–33.
6. *Zilberman D., Cao X., Jacobsen S.E.* // Science. 2003. V. 299. P. 716–719.
7. *Hutvagner G., Simard M.J.* // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2008. V. 9. P. 22–32.
8. *Smith N.A., Singh S.P., Wang M.-B., Stoutjesdijk P.A., Green A.G., Waterhouse P.M.* // Nature. 2000. V. 407. P. 319–320.
9. The Arabidopsis Genome Initiative // Nature. 2000. V. 408. P. 796–815.
10. *Wang X., Shi X., Hao B., Ge S., Luo J.* // New Phytologist. 2005. V. 165. P. 937–946.
11. *Waterhouse P.M., Graham M.W., Wang M.B.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 13959–13964.
12. *Wesley S.V., Helliwell C., Smith N.A., Wang M.B., Rouse D.T., Liu Q., Gooding P.S., Singh S.P., Abbott D., Stoutjesdijk P.A., Robinson S.P., Gleave A.P., Green A.G., Waterhouse P.M.* // Plant J. 2001. V. 27. P. 581–590.
13. http://www.invitrogen.com
14. http://www.pi.csiro.au/rnai/vectors.htm
15. *Wielopolska A., Townley H., Moore I., Waterhouse P., Helliwell C.* // Plant Biotechnol. J. 2005. V. 3. P. 583–590.
16. *Masclaux F.G., Charpenteau M., Takahashi T., Pont-Lezica R., Galaud J.-P.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004. V. 321. P. 364–369.
17. *Liu Q., Singh S.P., Green A.G.* // Plant Physiol. 2002. V. 129. P. 1732–1743.
18. *Townsend B.J., Poole A., Blake C.J., Llewellyn D.J.* // Plant Physiol. 2005. V. 138. P. 516–528.
19. *Sunilkumar G., Campbell L.M., Puckhaber L., Stipanovic R.D., Rathore K.S.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 18054–18059.
20. *Schwall G.P., Safford R., Westcott R.J., Jeffcoat R., Tayal A., Shi Y.C., Gidley M.J., Jobling S.A.* // Nat. Biotechnol. 2000. V. 18. P. 551–554.
21. *Garwood D.L., Shannon J.C., Creech R.G.* // Cereal Chem. 1976. V. 53. P. 355–364.
22. *Blauth S.L., Yao Y., Klucinec J.D. Shannon J.C., Thompson D.B., Guiltinan M.J.* // Plant Physiol. 2001. V. 125. P. 1396–1405.
23. *Blauth S.L., Kim K.-N., Klucinec J., Shannon J.C., Thompson D., Guiltinan M.* // Plant Mol. Biol. 2002. V. 48. P. 287–297.
24. *Regina A., Bird A., Topping D., Bowden S., Freeman J., Barsby T., Kosar-Hashemi B., Li Z., Rahman S., Morell M.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 3546–3551.
25. *Houmard N.M., Mainville J.L., Bonin C.P., Huang S., Luethy M.H., Malvar T.M.* // Plant Biotechnol. J. 2007. V. 5. P. 605–614.
26. *Frizzi A., Huang S., Gilbertson L.A., Armstrong T.A., Luethy M.H., Malvar T.M.* // Plant Biotechnol. J. 2008. V. 6. P. 13–21.

27. *Heilersig H.J., Loonen A., Bergervoet M., Wolters A.M., Visser R.G.* // Plant Mol. Biol. 2006. V. 60. P. 647–662.

28. *Otani M., Hamada T., Katayama K., Kitahara K., Kim S.H., Takahata Y., Suganuma T., Shimada T.* // Plant Cell Rep. 2007. V. 26. P. 1801–1807.

29. *Andersson M., Melander M., Pojmark P., Larsson H., Bulow L., Hofvander P.* // J. Biotechnol. 2006. V. 123. P. 137–148.

30. *Shimada T., Otani M., Hamada T., Kim S.H.* // Plant Biotechnol. 2006. V. 23. P. 85–90.

31. *Kitahara K., Hamasuna K., Nozuma K., Otani M., Hamada T., Shimada T., Fujita K., Suganuma T.* // Carbohydrate Polymers. 2007. V. 69. P. 233–240.

32. *Jørgensen K., Bak S., Busk P.K., Sørensen C., Olsen C.E., Puonti-Kaerlas J., Møller B.L.* // Plant Physiol. 2005. V. 139. P. 363–374.

33. *Kalamaki M.S., Harpster M.H., Palys J.M., Labavitch J.M., Reid D.S., Brummell D.A.* // J. Agric. Food Chem. 2003. V. 51. P. 7456–7464.

34. *Davuluri G.R., van Tuinen A., Mustilli A.C., Manfredonia A., Newman R., Burgess D., Brummell D.A., King S.R., Palys J., Uhlig J., Pennings H.M., Bowler C.* // Plant J. 2004. V. 40. P. 344–354.

35. *Liu Y., Roof S., Ye Z., Barry C., van Tuinen A., Vrebalov J., Bowler C., Giovannoni J.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. P. 9897–9902.

36. *Van der Rest B., Danoun S., Boudet A.-M., Rochange S.F.* // J. Exp. Bot. 2006. V. 57. P. 1399–1411.

37. *Schijlen E.G.W.M., de Vos C.H.R., Martens S., Martens S., Jonker H.H., Rosin F.M., Molthoff J.W., Tikunov Y.M., Angenent G.C., van Tunen A.J., Bovy A.G.* // Plant Physiol. 2007. V. 144. P. 1520–1530.

38. *Gilissen L.J., Bolhaar S.T., Matos C.I., Rouwendal G.J., Boone M.J., Krens F.A., Zuidmeer L., van Leeuwen A., Akkerdaas J., Hoffmann-Sommergruber K., Knulst A.C., Bosch D., van de Weg W.E., van Ree R.* // J. Allergy Clin. Immunol. 2005. V. 115. P. 364–369.

39. *Allen R.S., Millgate A.G., Chitty J.A., Thisleton J., Miller J.A., Fist A.J., Gerlach W.L., Larkin P.J.* // Nat. Biotechnol. 2004. V. 22. P. 1559–1566.

40. *Frick S., Chitty J.A., Kramell R., Schmidt J., Allen R.S., Larkin P.J., Kutchan T.M.* // Transgenic Res. 2004. V. 13. P. 607–613.

41. *Allen R.S., Miller J.A.C., Chitty J.A., Fist A.J., Gerlach W.L., Larkin P.J.* // Plant Biotechnol. J. 2008. V. 6. P. 22–30.

42. *Siminszky B., Gavilano L., Bowen S.W., Dewey R.E.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. P. 14919–14924.

43. *Gavilano L.B., Coleman N.P., Burnley L.E., Bowman M.L, Kalengamaliro N.E, Hayes A., Bush L., Siminszky B.* // J. Agric Food Chem. 2006. V. 54. P. 9071–9078.

44. *Lewis R.S., Jack A.M., Morris J.W., Robert V.J., Gavilano L.B., Siminszky B., Bush L.P., Hayes A.J., Dewey R.E.* // Plant Biotechnol. J. 2008. V. 6. P. 346–354.

45. *Wang P., Liang Z., Zeng J., Li W., Sun X., Miao Z., Tang K.* // J. Biosci. 2008. V. 33. P. 177–184.

46. *Ogita S., Uefuji H., Yamaguchi Y., Koizumi N., Sano H.* // Nature. 2003. V. 423. P. 823.

47. *Ogita S., Uefuji H., Morimoto M., Sano H.* // Plant Mol. Biol. 2004. V. 54. P. 931–941.

48. *Ashihara H., Zheng X.-Q., Katahira R., Morimoto M., Ogita S., Sano H.* // Phytochemistry. 2006. V. 67. P. 882–886.

49. *Meyer P., Heidmann I., Forkmann G., Saedler H.* // Nature. 1987. V. 330. P. 677–678.

50. *van der Krol A.R., Mur L.A., de Lange P., Mol J.N., Stuitje A.R.* // Plant Mol. Biol. 1990. V. 14. P. 457–466.
51. *Courtney-Gutterson N., Napoli C., Lemieux C., Morgan A., Firoozabady E., Robinson K.E.* // BioTechnology. 1994. V. 12. P. 268–271.
52. *Nakatsuka T., Pitaksutheepong C., Yamamura S., Nishihara M.* // Plant Biotechnol. Rep. 2007. V. 1. P. 251–257.
53. *Nishihara M., Takashi N., Saburo Y.* // FEBS Lett. 2005. V. 579. P. 6074–6078.
54. *Поройко В.А., Рукавцова Е.Б., Орлова И.В., Бурьянов Я.И.* // Генетика. 2000. Т. 36. С. 1200–1205.
55. *Katsumoto Y., Fukuchi-Mizutani M., Fukui Y., Brugliera F., Holton T.A., Karan M., Nakamura N., Yonekura-Sakakibara K., Togami J., Pigeaire A., Tao G.-Q., Nehra N.S., Lu C-Y., Dyson B.K., Tsuda S., Ashikari T., Kusumi T., Mason J.G., Tanaka Y.* // Plant Cell Physiol. 2007. V. 48. P. 1589–1600.
56. http://www.florigene.com.
57. *Zhong R., Morrison W.H.III, Himmelsbach D.S., Poole F.L.II, Ye Z.-H.* // Plant Physiol. 2000. V. 124. P. 563–577.
58. *Bhuiyan N.H., Selvaraj G., Wei Y., King J.* // J. Exp. Bot. 2009. V. 60. P. 509–521.
59. *Boerjan W., Ralph J., Baucher M.* // Annu. Rev. Plant Biol. 2003. V. 54. P. 519–546.
60. *Baucher M., Monties B., van Montagu M., Boerjan W.* // Crit. Rev. Plant Sci. 1998. V. 17. P. 125–197.
61. *Halpin C., Knight M.E., Foxon G.A., Campbell M.M., Boudet A.M., Boon J.J., Chabbert B., Tollier M., Schuch W.* // Plant J. 1994. V. 6. P. 339–350.
62. *Piquemal J., Lapierre C., Myton K., O'Connell A., Schuch W., Grima-Pettenati J., Boudet A.-M.* // Plant J. 1998. V. 13. P. 71–83.
63. *Chabannes M., Barakate A., Lapierre C., Marita J.M., Ralph J., Pean M., Danoun S., Halpin C., Grima-Pettenati J., Boudet A.M.* // Plant J. 2001a. V. 28. P. 257–270.
64. *Chabannes M., Ruel K., Yoshinaga A., Chabbert B., Jauneau A., Joseleau J.-P., Boudet A.-M.* // Plant J. 2001b. V. 28. P. 271–282.
65. *Pincon G., Chabannes M., Lapierre C., Pollet B., Ruel K., Joseleau J.-P., Boudet A.M., Legrand M.* // Plant Physiol. 2001. V. 126. P. 145–155.
66. *O'Connell A., Holt K., Piquemal J., Grima-Pettenati J., Boudet A., Pollet B., Lapierre C., Petit-Conil M., Schuch W., Halpin C.* // Transgenic Res. 2002. V. 11. P. 495–503.
67. *Hibino T., Takabe K., Kawazu T., Shibata D., Higuchi T.* // Biosci. Biotechnol. Biochem. 1995. V. 59. P. 929–931.
68. *Abbott J.C., Barakate A., Pincon G., Legrand M., Lapierre C., Mila I., Schuch W., Halpin C.* // Plant Physiol. 2002. V. 128. P. 844–853.
69. *Damiani I., Morreel K., Danoun S., Goeminne G., Yahiaoui N., Marque C., Kopka J., Messens E., Goffner D., Boerjan W., Boudet A.M., Rochange S.* // Plant Mol. Biol. 2005. V. 59. P. 753–769.
70. *Kajita S., Katayama Y., Omori S.* // Plant Cell Physiol. 1996. V. 37. P. 957–965.
71. *Kajita S., Hishiyama S., Tomimura Y., Katayama Y., Omori S.* // Plant Physiol. 1997. V. 114. P. 871–879.
72. *Ni W., Paiva N.L., Dixon R.A.* // Transgenic Res. 1994. V. 3. P. 120–126.

73. *Baucher M., Chabbert B., Pilate G., van Doorsselaere J., Tollier M.-T., Petit-Conil M., Cornu D., Monties B., van Montagu M., Inze D., Jouanin L., Boerjan W.* // Plant Physiol. 1996. V. 112. P. 1479–1490.

74. *Lapierre C., Pollet B., Petit-Conil M., Toval G., Romero J., Pilate G., Leple J.-C., Boerjan W., Ferret V., de Nadai V., Jouanin L.* // Plant Physiol. 1999. V. 119. P. 153–163.

75. *Jouanin L., Goujon T., de Nadai V., Martin M.-T., Mila I., Vallet C., Pollet B., Yoshinaga A., Chabbert B., Petit-Conil M., Lapierre C.* // Plant Physiol. 2000. V. 123. P. 1363–1373.

76. *Pilate G., Guiney E., Holt K., Petit-Conil M., Lapierre C., Leple J.C., Pollet B., Mila I., Webster E.A., Marstorp H.G., Hopkins D.W., Jouanin L., Boerjan W., Schuch W., Kornu D., Halpin C.* // Nat. Biotechnol. 2002. V. 20. P. 607–612.

77. *Higuchi T., Ito T., Umezawa T., Hibino T., Shibata D.* // J. Biotechnol. 1994. V. 37. P. 151–158.

78. *Tsai C.J., Popko J.L., Mielke M.R., Hu W.J., Podila G.K., Chiang V.L.* // Plant Physiol. 1998. V. 117. P. 101–112.

79. *Hu W.J., Harding S.A., Lung J., Popko J., Ralph J., Stokke D.D., Tsai C.J., Chiang V.L.* // Nat. Biotechnol. 1999. V. 17. P. 808–812.

80. *Leple J.C., Dauwe R., Morreel K., Storme V., Lapierrre V., Naumann A., Kang K.Y., et al.* // Plant Cell. 2007. V. 19. P. 3669–3691.

81. *Coleman H.D., Park J.Y., Nair R., Chapple C., Mansfield S.D.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. P. 4501–4506.

82. *Hjalten J., Lindau A., Wennstrom A., Blomberg P., Witzell J., Hurry V., Ericson L.* // Basic Appl. Ecol. 2006. V. 8. P. 434–443.

83. *Ranocha P., Chabannes M., Chamayou S., Danoun S., Jauneau A., Boudet A.-M., Goffner D.* // Plant Physiol. 2002. V. 129. P. 145–155.

84. *Driouich A., Laine A.C., Vian B., Faye L.* // Plant J. 1992. V. 2. P. 13–24.

85. *Bao W., O'Malley D.M., Whetten R., Sederoff R.R.* // Science. 1993. V. 260. P. 636–638.

86. *Wadenback J., von Arnold S., Egertsdotter U., Walter M.H., Grima-Pettenati J., Goffner D., Gellerstedt G., Gullion T., Clapham D.* // Transgenic Res. 2008. V. 17. P. 379–392.

87. *Wagner A., Donaldson L., Kim H., Phillips L., Flint H., Steward D., Torr K., Koch G., Schmitt U., Ralph J.* // Plant Physiol. 2009. V. 149. P. 370–383.

88. *Nicholson R.L., Hammerschmidt R.* // Ann. Rev. Phytopathol. 1992. V. 30. P. 369–389.

Рис. 1. Схема биосинтеза жирных кислот у хлопчатника.

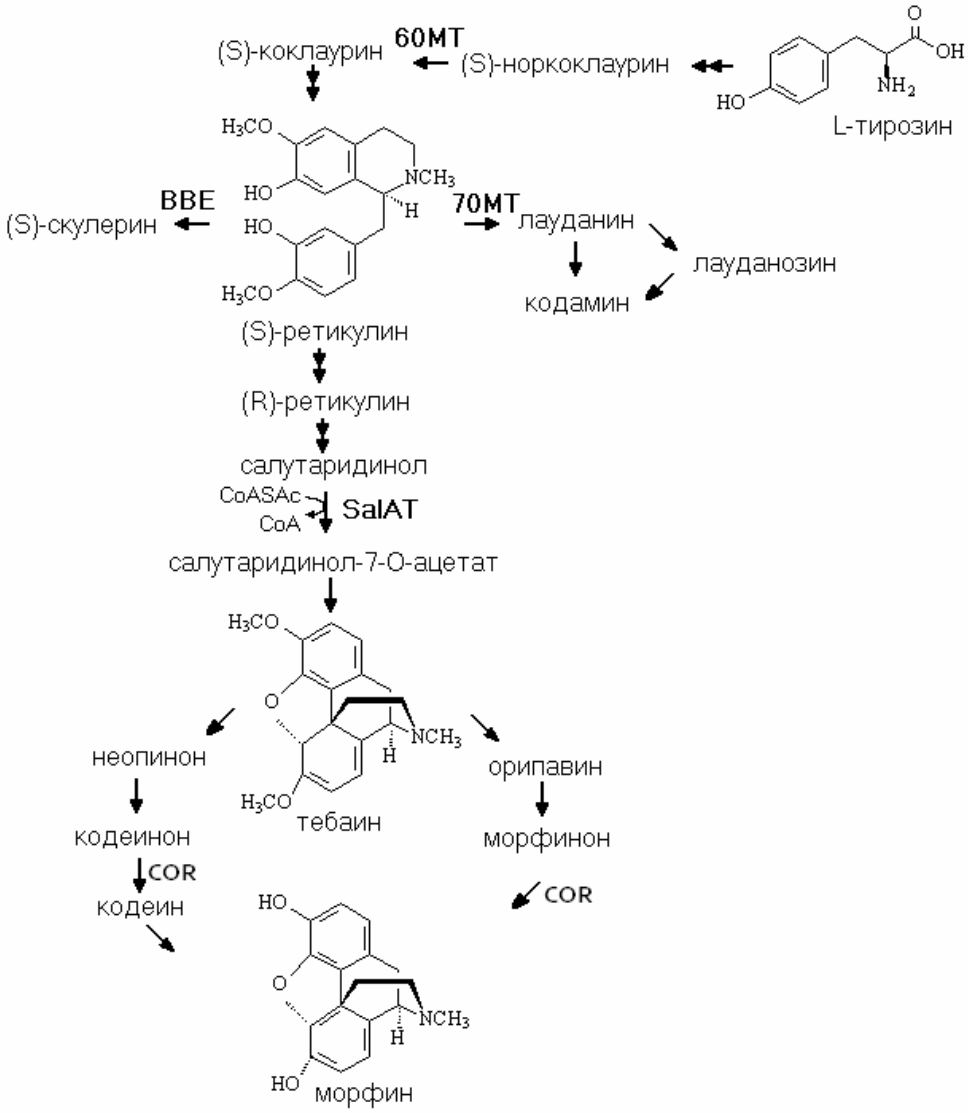

Рис. 2. Схема биосинтеза морфина. 60MT – норкоклаурин-6-*O*-метилтрансфераза, SalAT – салутаридинол-7-*O*-ацетилтрансфераза, 70MT – (*R*,*S*)-ретикулин-7-*O*-метилтрансфераза, BBE – фермент берберинового мостика, COR – кодеинонредуктаза.

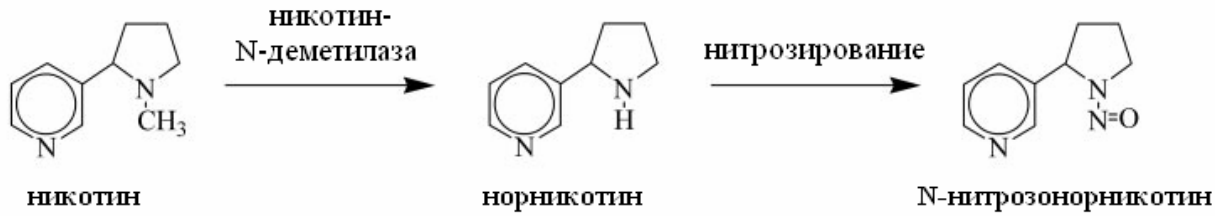

Рис. 3. Схема превращения никотина в нитрозонорникотин.

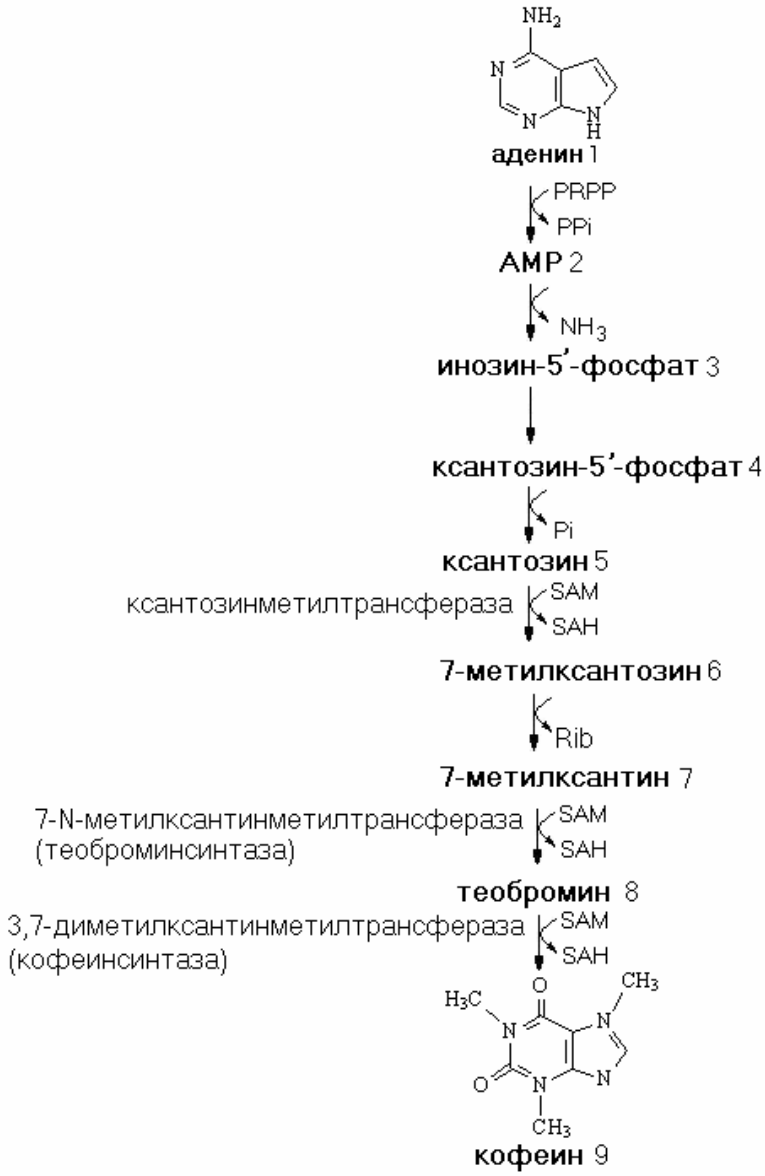

Рис. 4. Схема биосинтеза кофеина. PRPP – фосфорибозилпирофосфат, PP_i – пирофосфат, SAM – *S*-аденозилметионин, SAH – *S*-аденозилгомоцистеин.

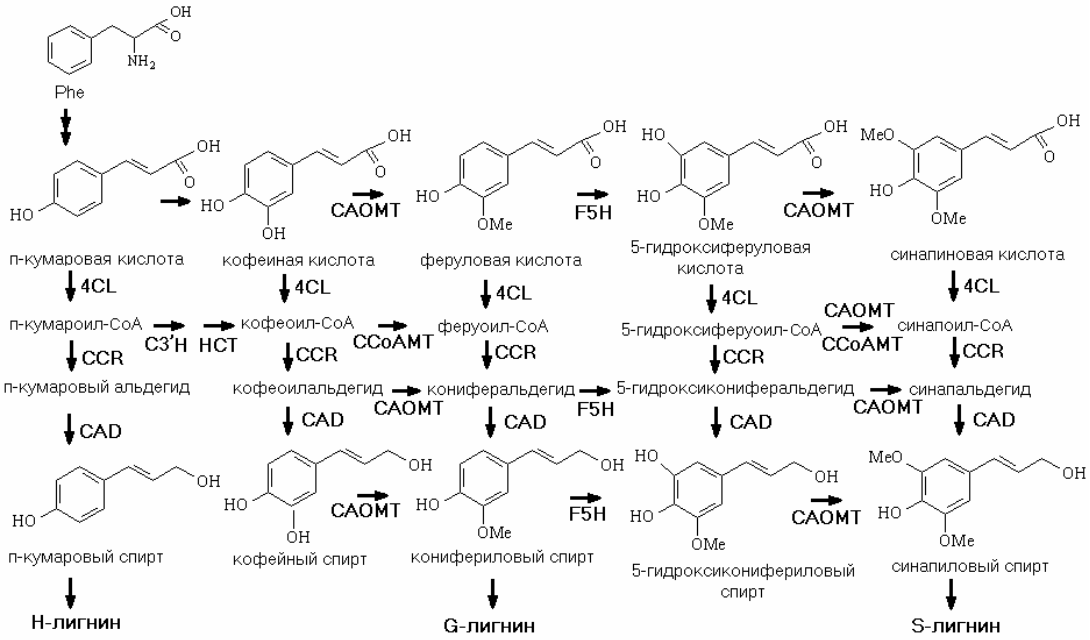

Рис. 5. Схема фенилпропаноидного пути биосинтеза лигнинов. 4CL – 4-кумарат-CoA–лигаза, CCR – циннамоил-CoA–редуктаза, CAD – дегидрогеназа коричного спирта, CAOMT – *O*-метилтрансфераза кофейной кислоты, CCoAOMT – кофеоил-CoA–*O*-метилтрансфераза, C3'H – *n*-кумароил-CoA–гидроксилаза, F5H – ферулат-5-гидроксилаза, HCT – *n*-гидроксициннамоил-CoA–редуктаза.