



**Росичка англійська (*Drosera anglica*), родина Росичкові (*Droseraceae*).
Фото Олександра Масікова (м. Луцьк).
Конкурс наукових фотографій “Наука й інновації — суспільству”**

МОЛЕКУЛЯРНЕ ФЕРМЕРСТВО: ЗМІНЮЄМО ГУМОВІ ЧОБОТИ НА ГУМОВІ РУКАВИЧКИ

*"І він висловив думку, що той,
хто знайде спосіб зростити два кукурудзяних початки
або два колоски там, де досі ріс один,
послугує людству краще і зробить для своєї країни більше добра,
ніж усі політичні діячі разом"*

*Джонатан Свіфт — ірландський поет і сатирик,
"Мандри Гуллівера"*



Микола Кучук
докт. біол. наук.,
гол. наук. співр.
Інституту клітинної
біології та генетичної
інженерії НАН
України,
заст. директора
Міжнародного
інституту клітинної
біології НАН України

Життя на планеті Земля — це життя на основі фотосинтезу, тобто на основі життя рослин. Приблизно 10 — 8 тисяч років тому наші пращури навчилися вирощувати культурні рослини, чим дали поштовх розвитку цивілізації землеробства. Зараз стало звичайним вживати рослини в їжу, годувати зерном і сіном своїх тварин, вдягатися в рослинні тканини (правда, усе рідше і рідше, тому дуже це цінуємо), будувати з дерев будинки, спалювати їх у печах, щоб одержати тепло й енергію, прикрашати квітами і зеленими галявинами своє життя, і, нарешті, боротися за їхньою допомогою з хворобами, створюючи на основі рослин медичні препарати для лікування.

Зберегло свої традиції народне лікування, невід'ємною частиною якого є збір лікувальних трав та приготування їх відварів для поліпшення самопочуття. Однією складових лікування на наукових засадах є одержання з рослин очищених, дорогих, але високоефективних препаратів. Рослини створили усі лікувальні речовини задовго до появи людини. І хоча необхідно шукати нові і нові препарати в дикій природі, постає питання: чи не можна саму рослину "спрямувати" на шлях синтезу необхідних ліків, тобто перетворити рослину в маленький біосинтезуючий реактор?

Сучасна фармацевтика вже близько 30 років синтезує білки, необхідні для лікування гормональних, онкологічних, серцево-судинних захворювань. Білки кодуються генами. Гени можна переносити із одних організмів у інші. Ця технологія називається "генною інженерією", а отримані організми генетично "модифікованими" чи "трансгенними".

Синтез білків відбувається в трансгенних мікроорганізмах. І порівняно недавно для їхнього синтезу почали використовувати клітини ссавців і комах. Можна зауважити: "А навіщо це? Хочу мати ліки з природних джерел!" Будь ласка, але пам'ятайте, що природний препарат не завжди повністю сумісний з людським організмом (напр., свинячий інсулін все-таки поступається перед людським), а іноді природним джерелом заміників органів може виступати тільки плацента чи абортвані людські ембріони. Щодо вартості таких ліків, то іноді вона просто поза межам для звичайного громадянина, особливо в нашій країні. Це ще раз підтверджує, що без генної інженерії не обійтись, бо лише вона дає можливість формувати білок з одного організму в клітині іншого, причому у великих обсягах. Тому виробництво рекомбінантних білків, тобто отриманих шляхом генної інженерії, це — велика частина сучасної біотехнології, що приносить величезні прибутки (млрд дол. США).

А як же рослини? З виробничої і біологічної точок зору в них є цілий ряд переваг перед бактеріями і тваринними клітинами. Рослини, наприклад, "уміють" синтезувати багато білків з повним набором функцій, як, наприклад, моноклітинні антитіла, чого зовсім "не вміють" бактерії. Рослини швидше розмножуються, і їх вирощування коштує набагато менше, ніж робота з культурою тваринних клітин. Крім того, з біологічної точки зору рослини безпечніші, тому що не містять вірусів і пріонів, які є специфічні для людини і можуть міститися в препаратах, виготовлених із клітин ссавців. Немає в рослинах і ендотоксинів, котрі є в бактеріальних клітинах. Уже більше 15 років учені намагаються створити на основі рослин системи біосинтезу рекомбінантних фармацевтичних білків. Навіть назву придумали для цього роду людської діяльності — молекулярне фермерство ("molecular farming").

Перші роботи в області молекулярного фермерства стосувалися одержання трансгенних рослин із вбудованими генами антитіл, фармацевтичних білків, вакцин. На підставі цих робіт було показано, що рослини дійсно



Накопичення зеленого флюоресціюючого білка в листках австралійського тютюну через тиждень після ін'єкції спеціальної генетичної конструкції. Червоним світлом флюоресціюють неін'єкційовані листки

накопичують цілком функціональні білки, в тому числі й антитіла. Крім того, ці роботи дали поштовх новому напрямку — створенню їстівних вакцин.

Рослини можуть синтезувати деяку кількість білка — поліпептиду, що несе антигенну детермінанту, здатну викликати імунну відповідь. Сам по собі такий білок зовсім позбавлений патогенних властивостей, тому що це — не бактерія і не вірус, а всього лише частина протеїну, який у природі знаходиться на поверхні патогена. Цей поліпептид і буде рекомбінантною вакциною, на відміну від традиційних вакцин — ослаблених чи убитих мікроорганізмів вірусів, котрі відомі від часів Пастера.

Це відбувається тому, що після виникнення імунної відповіді на цей білок людський організм здатний боротися і з самими бактеріями та вірусами, які мають таку антигенну мітку на своїй поверхні. Виявляється, що в деяких випадках такий білок-вакцину можна і не очищувати, а досить з'їсти банан, яблуко, листочок салату, котрі містять цей

поліпептид, щоб отримати імунітет проти певних хвороб. Американська компанія "Prodigene" навіть створила комерційний продукт — сухий сніданок з кукурудзи, що містить вакцину проти діареї, яку викликають деякі штами кишкової палички. У зв'язку з загрозою біологічного тероризму опрацьовуються подібні проекти по створенню їстівних рослинних вакцин проти сибірської виразки, холери, чуми тощо.

Іноді трансгенні рослинні клітини не вирощують до цілих рослин, а культивують у стерильних умовах на штучному живильному середовищі подібно до мікроорганізмів чи тваринних клітин. Таким шляхом компанія Dow AgroSciences (США) розробила вакцину від хвороби Ньюкасла у птахів і готується до її продажу, а ізраїльська компанія Protalix у передклінічних іспитах перевіряє фермент глюкоцереброзидазу, що виробляється трансгенними клітинами моркви. Такий фермент є ключовим у ферментно-замінній терапії хвороби Гоше. Ця спадкова хвороба виражається в різкому зниженні

розумових здібностей, однак при регулярному прийомі препарату відбувається повне відновлення за умови довічного застосування. Річна вартість такого препарату, отриманого з плаценти, оцінюється в 300—400 тисяч дол. США для одного хворого, але синтез ферменту в рослинних клітинах дає можливість значно знизити цю ціну.

Однак молекулярне фермерство на основі трансгенних рослин ще не одержало широкого розвитку в зв'язку з рядом обставин. У Європі поки що існує певне упередження проти самого поняття "трансгенні рослини", зокрема це приводить до появи проектів з вирощування в Ісландії (подалі від континенту) трансгенного ячменю для виробництва рекомбінантних білків. Однак упередження не є найголовнішою перешкодою для розвитку генної інженерії.

Генна інженерія в Європі займає почесне місце і на заводах великих європейських фармацевтичних компаній виробляються рекомбінантні білки в клітинах мікроорганізмів чи ссавців. Основна проблема полягає в іншому — низький рівень вмісту необхідного продукту (близько 1 % і менше від загального об'єму білка) та відносно тривалий час від одержання перших рослин до масового виробництва.

Необхідно знайти спосіб збільшення накопичення потрібного білка в рослинах і скоротити час від створення генетичної конструкції до одержання кінцевого продукту. Віруси рослин — ось можливий вихід. Після потрапляння вірусної РНК у клітину рослини відбувається стрімке накопичення вірусних білків. Віруси переносяться із однієї клітини в іншу. Ніякої генетичної трансформації самої рослини не потрібно.

Кілька років знадобилося вченим з компанії Large Scale Biology (США), щоб створити систему виробництва рекомбінантних білків на основі вірусу тютюнової мозаїки. За допомогою цієї системи удалося одержати персоналізовані вакцини для лікування однієї із злоякісних лімфом у людей.

Зараз випробовується вакцина для профілактики захворювань на кішках. Для виробництва білків цим способом був побудований завод у штаті Кентуккі, відомому своїми великими тютюновими плантаціями. Тютюн не для паління — ось гасло цієї компанії.

Однак і цей спосіб виробництва білків у рослинах не позбавлений проблем і обмежень. Основний недолік — маленький розмір вірусних частинок, куди повинен запаковуватися необхідний продукт. Це обмежує об'єм білка, що нас цікавить. Наприклад, одержати повноцінні антитіла у рослинах таким способом неможливо. Та й робота з вірусом (нехай і рослинним) викликає певне занепокоєння.

Рішення цих проблем знаходилося десь поруч. І воно знайшлося. А чи не можна об'єднати систему генетичної трансформації рослин з вірусною системою синтезу білка? Причому так, щоб від трансформації збереглася тільки система доставки ДНК у рослинну клітину (можливо, без самої трансформації рослинного генома), а від вірусів тільки синтез білка (можливо, без утворення вірусних частин). Природний "генний інженер" у випадку рослин — це бактерія *Agrobacterium tumefaciens*. За її допомогою отримано багато трансгенних рослин, що уже вирощуються у світі на площі більше 80 млн гектарів. На основі плазмиди — маленької кільцевої молекули ДНК, узятій в цій бактерії, були створені спеціальні системи переносу генетичної інформації в рослини-вектори. Історія створення векторів для генетичної трансформації рослин нараховує вже більш 20 років.

Одна з найцікавіших таких технологій — система транз'єнної експресії генів у листах рослин — створена українськими вченими у співпраці з іноземними дослідниками.



Зліва направо:
Віктор Клімюк — науковий директор компанії Icon Genetics,
Юрій Глеба — директор Міжнародного інституту клітинної біології НАН України, засновник та керівник компанії Icon Genetics,
Микола Кучук — заступник директора Міжнародного інституту клітинної біології НАН України

Як працює ця технологія? У вектор були вбудовані спеціальні послідовності ДНК, що кодували вірусну РНК-полімеразу (це фермент, що зчитує інформацію і синтезує так звану інформаційну РНК-матрицю для синтезу білка). У конструкцію був також вбудований цікавий для нас ген, що кодує білок під контролем спеціальних послідовностей, які згодом будуть упізнаватися вірусною РНК-полімеразою. Ця генетична конструкція може переноситися в клітини рослини за допомогою механізмів, які існують у *Agrobacterium*. Передбачалося, що така система може працювати в рослинній клітині і без вбудовування в геном рослини, а відразу після того, як ДНК вектора потрапить в ядро клітини. Зчитування гена й утворення білкового продукту називається експресією, а якщо така експресія відбувається без вбудовування чужорідного гена, котрий трансформується в геном організму, то говорять, що це транзйентна, тобто тимчасова, скороминуча експресія. В принципі, транзйентна експресія може відбуватися з будь-якою генетичною конструкцією, що потрапила всередину ядра клітини. Кількість білка, що утвориться в результаті такої експресії, невелика, і раніше ніхто з дослідників не ставив собі завданням використовувати це явище для практичних цілей. Однак включення вірусної РНК-полімерази у векторну конструкцію, оптимізація структури самої конструкції, вибір рослинного хазяїна привели до справжньої революції.

Для того щоб простежити накопичення необхідного продукту в рослинній клітині, потрібний репортер, тобто речовина, накопичення якої можна легко зафіксувати, бажано візуально. Як такий репортер найчастіше використовують ген білка, виявлений у медузи. Цей білок здатний флуоресцювати при висвітленні його ультрафіолетом, і тому його називають GFP, що в перекладі з англійського значить — зелений флуоресцюючий білок. Ген цього білка був включений у вектор, так що надалі будь-який інший ген, який кодує інший білок, міг би бути використаний замість нього. В принципі, майже всі рослини можуть бути потенційними донорами для таких генетичних конструкцій. Але найкращі результати поки що виходять у випадку використання деяких родичів тютюну родом з Австралії. Так, у листах одного з австралійських тютюнів, що були оброблені спеціальною векторною конструкцією, через один — два тижні майже всі рослинні білки зникали і накопичувався (до 80 %) GFP. Тобто весь процес збирання білків

ЛІТЕРАТУРА

1. Marillonnet S., Giritich A., Gils M., Kanzia R. Klimyuk V., Gleba Y. (2004) In planta engineering of viral RNA replicons: efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium*. PNAS 101:6852 — 6857.
2. Marillonnet S., Thoeringer C., Kandzia R., Klimyuk & Y. Gleba (2005) Systemic *Agrobacterium tumefaciens* — mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants Nature Biotechnology, Vol 23, P. 718 — 723.

переключився на біосинтез потрібного нам протеїну. Оброблені рослини випромінювали смарагдове сяйво, коли на них направляли ультрафіолетове світло. Необхідно відзначити, що звичайні рослини флуоресцюють червоним світлом.

Система транзйентної експресії генів у листках рослин була перевірена для найрізноманітніших рекомбінантних білків. Звичайно, одних білків накопичувалося більше, інших — менше, але принцип працював як для невеликих за розміром протеїнів (наприклад, людський інтерферон), так і для зовсім величезних (повнорозмірні антитіла), що включають малий і великий поліпептидні ланцюги. Після підрахунку виявилось, що з 1 кг рослинної біомаси можна очистити від 1 до 4 — 5 г потрібного продукту. А деякі фармацевтичні білки дуже і дуже дорогі. Росте рослинка в горщику, а в кожному листочку товару на тисячу доларів.

А ще таким способом можна синтезувати вакцини. Причому в епоху швидко змінних біологічних загроз і збудників хвороб, що постійно мутують, такий підхід за дуже короткий час дає можливість організувати виробництво необхідних вакцин.

Кому саме належить авторство цієї технології? Хоча наука не має меж, у вчених є батьківщина. Статті, що розповіли про цю технологію, були надруковані в Доповідах Національної Академії Наук США (PNAS) і *Нейчур Біотехнології* (Nature Biotechnology) [1, 2]. Половина авторського колективу — представники України разом з керівником цих робіт Юрієм Юрійовичем Глебою — директором Інституту клітинної біології і генетичної інженерії Національної академії наук України. Завдяки тісним зв'язкам інституту з компанією *Icon Genetics* ці досягнення відразу стали використовуватися в Україні для розробки способів виробництва фармацевтичних білків. За допомогою цієї технології в Києві були синтезовані перші партії препаратів антивірусного інтерферону та гормону росту — соматотропіну — і показана їхня біологічна еквівалентність.

На закінчення хочеться підкреслити, що технологія, описана вище, — це, хоча і дуже вдалий, але всього лише один із прикладів сучасного молекулярного фермерства. Поєднання генної інженерії і рослинництва — один з головних напрямків сучасної біотехнології. Він уже не тільки приносить мільярдні прибутки ведучим західним країнам, але також дає надію навіть не найбагатшим людям мати доступ до сучасних медичних препаратів за прийнятними цінами.