

## ТРАНСПЛАСТОМНЫЕ РАСТЕНИЯ

С.Н. Щелкунов<sup>1,2</sup>, Ю.М. Константинов<sup>3</sup>, Е.В. Дейнеко<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики  
Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия,  
e-mail: deineko@bionet.nsc.ru; snshchel@rambler.ru;

<sup>2</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,  
Новосибирск, Россия

<sup>3</sup> Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, Россия

В обзоре освещены основные принципы создания транспластомных растений, структурные особенности генетических конструкций, предназначенных для встраивания в геном хлоропластов. Рассматриваются основные итоги успешной трансформации и экспрессии чужеродных генов в хлоропластах. Обосновывается перспективность данного метода для существенного повышения уровня синтеза чужеродного белка в транспластомных растениях.

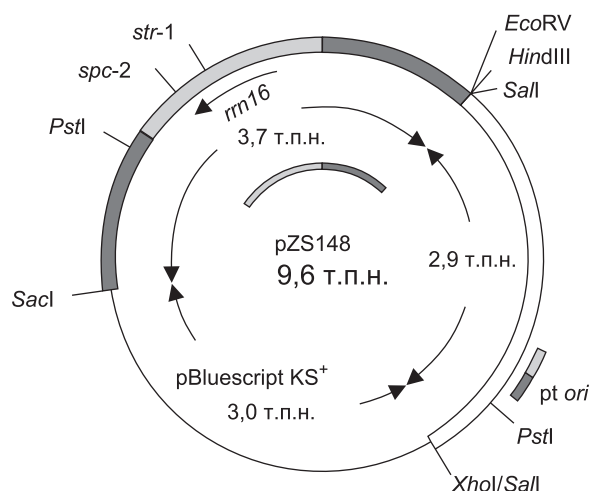
**Ключевые слова:** хлоропласты, хлоропластная трансформация, биобаллистика, гомологичная рекомбинация, пластом.

Многочисленные работы показывают, что полученные классическими методами трансгенные растения с интеграцией целевого гена в хромосомы ядра клетки продуцируют обычно чужеродный белок на низком уровне (Щелкунова, Щелкунов, 2008; Shchelkunov, Shchelkunova, 2010). Существенного повышения уровня синтеза чужеродного белка можно добиться увеличением дозы гена, однако в хромосомной ДНК множественные повторы нестабильны. Преодолеть это затруднение удастся при использовании трансгенной системы хлоропластов (пластид).

Пластиды находятся в большом количестве в клетках разных органов и тканей растений. Геном пластид – пластома – кольцевая молекула двухцепочечной ДНК размером 120–180 тыс. пар нуклеотидов (т.п.н.). Несмотря на небольшие размеры пластома пластидная ДНК составляет 10–20 % от всей ДНК клетки. Достаточно высокая доля пластидной ДНК по отношению к ядерной ДНК достигается тем, что пластиды полиплоидны, и каждая из них содержит от 10 до 100 пластома. В единичной клетке зрелого листа число пластид может достигать 100, т. е. каждая такая клетка содержит до 10 тыс. пластидных геномов. Хотя в растении каждая клетка любого типа содержит идентичные пластидные

геномы, данные органеллы в разных тканях растения значительно различаются по морфологии и функциям. Листья и зеленые ткани содержат фотосинтезирующие хлоропласты, зрелые плоды и цветы – пигментированные хромопласты, клубни и другие запасующие органы – амилопласты или элайопласты, а другие незеленые ткани включая корни – лейкопласты (Maliga, 2003).

Принципиальную возможность введения и стабильной интеграции экзогенной ДНК в пластидный геном продемонстрировали Дж. Бойнтон с соавт. (Boynton *et al.*, 1988) на примере одноклеточной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*. В 1990 г. З. Сваб, П. Хайдукевич и П. Малига описали первую стабильную трансформацию пластид высших растений (Svab *et al.*, 1990). Листья табака *Nicotiana tabacum* обстреливали микрочастицами вольфрама, на поверхности которых была адсорбирована ДНК гибридной плазмиды pZS148 (рис. 1). Данная плазида была получена встройкой в клонирующий вектор *E. coli* pBluescript фрагмента пластидной ДНК мутантной линии табака, высокоустойчивой к антибиотикам спектиномицину и стрептомицину за счет мутаций в гене *rrn16* 16S рибосомной РНК (мутации *spc-2* и *str-1* соответственно, см.



**Рис. 1.** Вектор плазмидной трансформации pZS148. Состоит из последовательности плазмиды pBluescript (тонкая линия), SacI-EcoRV фрагмента плазмидной ДНК, содержащей ген 16S рибосомной РНК (16SrDNA), и фрагмента плазмидной ДНК с областью начала репликации (pt ori).

str-1 и spc-1 – мутации в гене 16SrDNA, обуславливающие устойчивость к стрептомицину и спектиномицину соответственно.

рис. 1). Предполагали, что гибридная плаزمида проникнет в хлоропласты и произойдет встройка мутантного фрагмента плазмидной ДНК за счет рекомбинации по областям гомологии. Такие растения, содержащие трансгенные пластомеры, предложили называть транспластомными (transplastomic). Транспластомные линии селективировали по нелетальному маркеру устойчивости к спектиномицину. На селективной среде устойчивые клоны имеют зеленую окраску, в то время как чувствительные клоны – белую. Культивирование транспластомных клеток на селективной среде обеспечивает отбор пластид, несущих гены устойчивости к спектиномицину, тогда как пластиды дикого типа элиминируются. Плазмидная трансформация происходит редко, поэтому полагают, что получаемые в результате селекции стабильные транспластомные клоны растения содержат в пластидах идентичные рекомбинантные пластомеры. В первой работе на 148 обстрелянных образцах листьев табака удалось отобрать лишь три транспластомных клона (Svab *et al.*, 1990).

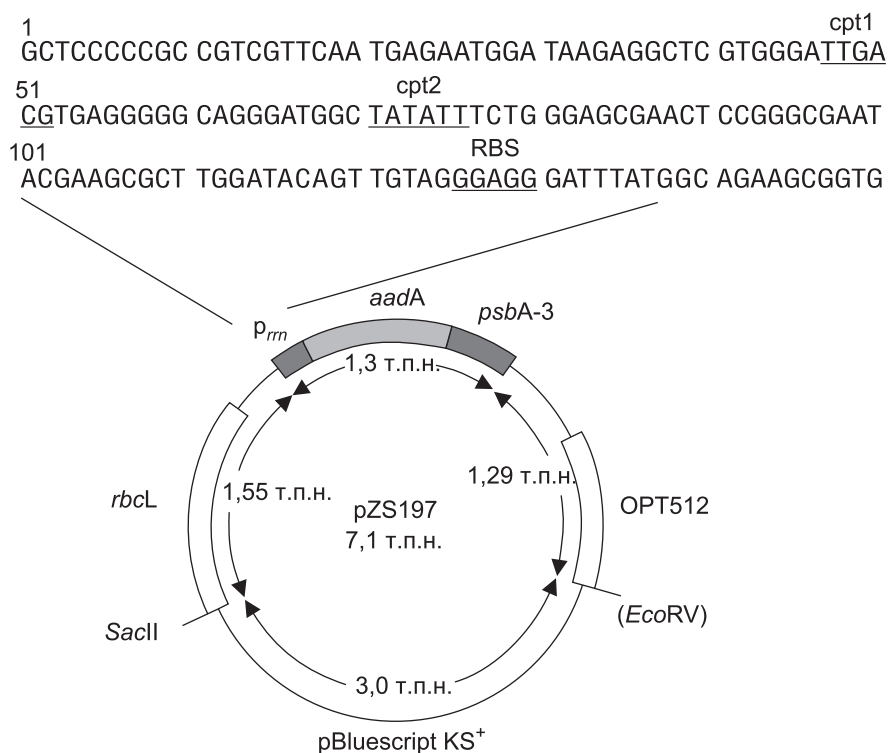
В 1993 г. З. Сваб и П. Малига в качестве селективного использовали бактериальный ген

*aadA* (кодирует аминокликозид 3'-аденилилтрансферазу, инактивирующую спектиномицин и стрептомицин аденилированием), встроенный в гибридную плазмиду в межгенную область сегмента плазмидной ДНК (рис. 2) (Svab, Maliga, 1993). В этом случае выход транспластомных клонов варьировал между 0,5–5 проростков на обстрелянный образец листа табака. В большинстве последующих работ в качестве селективного использовали именно этот ген *aadA*. Дополнительное использование *gfp*-гена зеленого флюоресцентного белка позволяет упростить отбор транспластомных растений и отличать их от спонтанных мутантов, устойчивых к спектиномицину (Jeong *et al.*, 2004).

В 2002 г. Ф. Хуанг с соавт. описали успешное использование кодирующей последовательности гена *aphA-6* аминокликозид фосфотрансферазы из *Acinetobacter baumannii*, находящейся под контролем промотора гена *rrn16*, для отбора транспластомных растений табака на среде с канамицином (Huang *et al.*, 2002).

Векторы плазмидной трансформации представляют собой гибридные плазмиды *E. coli*, содержащие селективный и целевой гены, фланкированные с обеих сторон сегментами плазмидной ДНК (рис. 3). Эти фланкирующие последовательности не обладают какими-либо специальными свойствами, они имеют размер 1–2 тыс. пар нуклеотидов и гомологичны выбранному району пластомеры. Обычно встройку чужеродных генов осуществляют в межгенные участки ДНК пластид, и около двух десятков таких районов интеграции успешно опробованы (Maliga, 2004). Важным отличием транспластомных растений от трансгенных является то, что при плазмидной трансформации трансген интегрируется в один и тот же район плазмидной ДНК, т. е. трансформированные растения идентичны по месту интеграции трансгена. При встройке в ядерные хромосомы трансформанты различаются между собой районами интеграции трансгена (трансгенов).

Для экспрессии трансгена чаще всего используют сильный плазмидный промотор гена *rrn16* ( $P_{rrn}$ ). Для эффективной трансляции на рибосомах пластид мРНК трансгена должна включать соответствующий участок связывания рибосом на 5'-конце. Наряду с рибосом-связывающими участками некоторых плазмидных ге-



**Рис. 2.** Вектор плазмидной трансформации pZS197. Кодированная последовательность гена *aadA* встроена во фрагмент плазмидной ДНК между генами *rbcL* и *ORF512* под контролем промотора рибосомального оперона пластид  $P_{rii}$  (сверху приведена нуклеотидная последовательность) и ограничена 3'-концевой последовательностью плазмидного гена *psbA*.

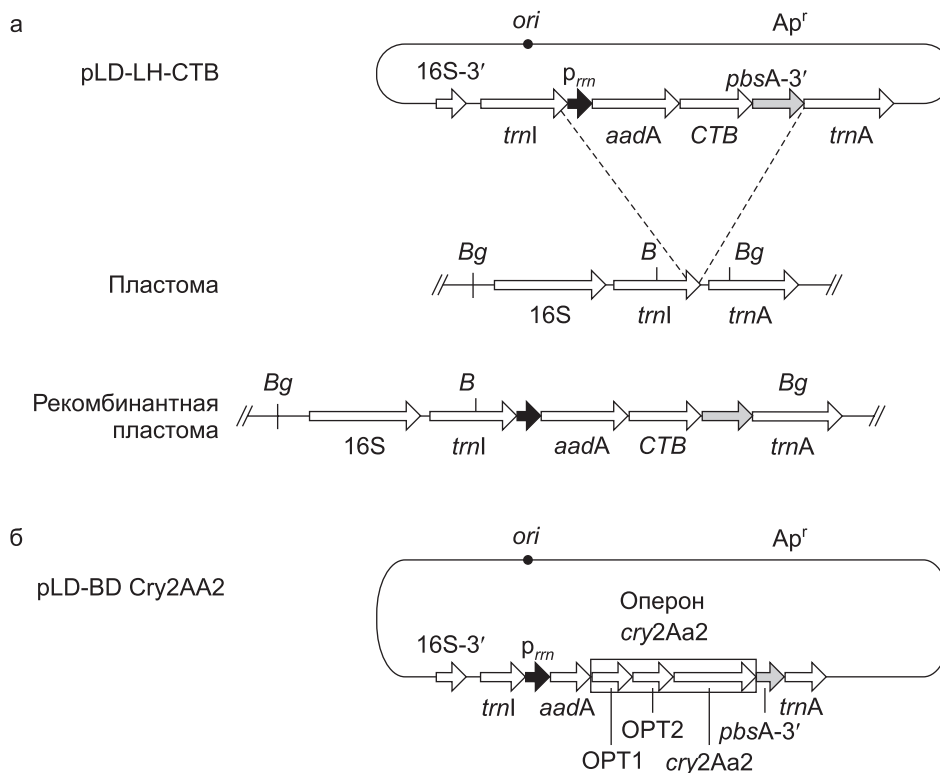
cpt1 и cpt2 – регуляторные области промотора. RBS – участок связывания рибосом.

нов хорошо себя зарекомендовала аналогичная последовательность гена *10* фага T7 (см. ниже). Некодирующий 3'-район гена *psbA* компонента реакционного центра II фотосистемы хлоропластов стабилизирует транскрипты чужеродных генов, поэтому его обычно подстраивают в 3'-концевую часть трансгена, создаваемого для встройки в пластиды (рис. 3). Используют и другие 3'-концевые последовательности плазмидных генов (Maliga, 2004; Daniell, 2006).

На основании результатов анализа транспластомных растений, полученных в разных лабораториях, становится очевидным, что в данной системе можно добиваться продукции целевого чужеродного белка до уровня 1–25% суммарного растворимого белка (ОРБ) растения, а в некоторых случаях даже большей. Мощным толчком к развитию технологии получения рекомбинантных белков на основе хлоропластного генома послужило сообщение о создании транспластомных растений табака

с выходом целевого белка (Cry2Aa2-белок из *Bacillus thuringiensis*) на уровне 45,3% от ОРБ (De Cosa *et al.*, 2001). В настоящее время в литературе имеются сообщения о накоплении в тканях листа транспластомных растений до 72% рекомбинантного белка (проинсулин человека, слитый с холерным В-токсином) от ОРБ (Ruhlman *et al.*, 2010). Авторами данной работы не выявлено негативных корреляций между уровнем накопления рекомбинантного белка и какими-либо нарушениями в росте и развитии растений. В работах других групп исследователей такие нарушения выявлялись: отмечены угнетение роста растения, пожелтение листьев и снижение мужской фертильности (Hasunuma *et al.*, 2008; Waheed *et al.*, 2011).

Наиболее просто удается осуществлять трансформацию хлоропластов и отбор транспластомных растений табака. Поэтому большая часть исследований пока выполнена на этом растении. Однако по мере увеличения числа



**Рис. 3.** Гибридные плазмиды пластидной трансформации для направленной встройки гена субъединицы В холерного токсина (а) и оперона *cry2Aa2* белка токсина Bt (б) в пластоми.

Схема направленной интеграции приведена в «а».

лабораторий, вовлеченных в развитие перспективного направления создания транспластомных растений, стала возможной трансформация пластид арабидопсиса *Arabidopsis thaliana* (Sikdar *et al.*, 1998), картофеля *Solanum tuberosum* (Sidorov *et al.*, 1999), томатов *Lycopersicon esculentum* ((Ruf *et al.*, 2001), рапса *Brassica napus* (Hou *et al.*, 2003), салата *Lactuca sativa* (Lelivelt *et al.*, 2005), сои *Glycine max* (Peltier *et al.*, 2004), капусты *Brassica oleracea* (Liu *et al.*, 2007), моркови *Daucus carota* (Kumar *et al.*, 2004) и других растений (Cardi *et al.*, 2010). На примере транспластомной сои показано, что рекомбинантная пластома стабильно наследовалась в течение шести поколений (Dufourmantel *et al.*, 2006). Перенос данной методологии на разные сельскохозяйственные культуры обеспечит значительный прогресс в создании растений-продуцентов различных белков медицинского и биотехнологического применения.

Важной особенностью пластид является возможность экспрессии в них оперонов (набора генов, находящихся под контролем единого

промотора) и трансляции белков с полицистронных мРНК, что характерно для прокариот, но не реализуется у эукариот (в том числе в ядре клеток растений) (del Campo, 2009). Недавно было обнаружено, что в полицистронных мРНК в хлоропластах наиболее эффективно обычно транслируется 5'-концевой ген, а для эффективной инициации трансляции последующих генов в ряде случаев может быть необходим эндонуклеазный процессинг такой мРНК с формированием моноцистронных мРНК (Drechsel, Bock, 2011).

Рассмотрим примеры успешной экспрессии чужеродных генов в транспластомных растениях табака. В 2001 г. Х. Даниэл с сотр. создали векторную конструкцию, в которой между фланкирующими пластидными генами табака *trnI* и *trnA* под контроль промотора  $P_{rrn}$  тандемно встроили кодирующие последовательности генов *aadA* (селективный маркер) и *CTB* (субъединица В холерного токсина) (рис. 3, а). Перед каждой кодирующей последовательностью ввели синтетические рибосом-связываю-

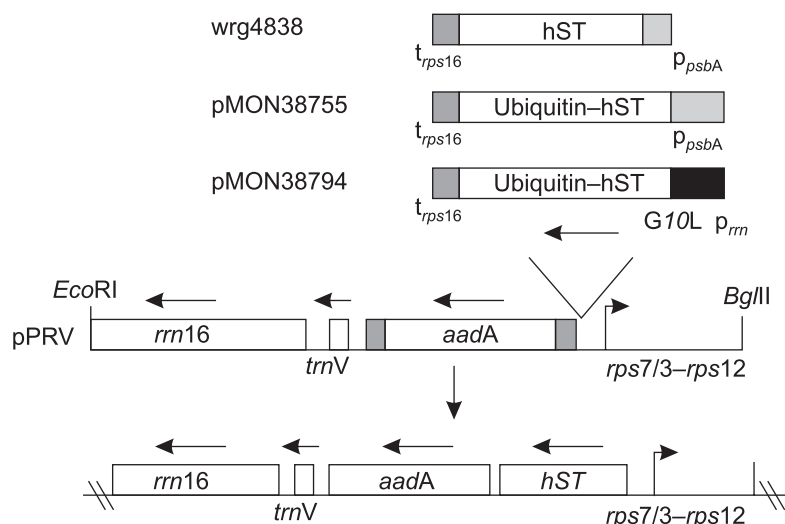
щие участки, а для стабилизации чужеродного транскрипта в 3'-концевой части конструкции встроили нетранслируемую 3'-область гена *psbA*. После рекомбинационной встройки в пластом (рис. 3, а) отбирали на селективной среде транспластомные растения табака. Установлено, что рекомбинантный СТВ-белок в транспластомных растениях эффективно синтезировался, собирался в функциональные олигомеры и был антигенно идентичен очищенному природному СТВ. Уровень накопления рекомбинантного СТВ-белка в листьях табака составил 4,1 % суммарного растворимого белка, что в 400 раз выше по сравнению с уровнем накопления этого же белка у трансгенных растений табака при интеграции трансгена в ядерный геном (Daniell *et al.*, 2001).

Другая интересная работа была выполнена с целью экспрессии в хлоропластах табака оперона *cry2Aa2 Bacillus thuringiensis*, направляющего синтез инсектицидного белка **Vt** и его упаковку в виде кубических кристаллов. Поскольку при получении трансгенных растений в ядре клетки с одной конструкции можно экспрессировать лишь один ген, вначале с помощью агробактериальной трансформации были созданы трансгенные растения, продуцирующие индивидуальный белок **Vt** в растворимой форме и умеренном количестве даже после перекодировки бактериального гена под часто встречаемые триплеты в генах растений (Estruch *et al.*, 1997). Продуктивность по белку **Vt** удалось значительно повысить (до 3–5 % суммарного растворимого белка листьев) при создании транспластомных растений табака, экспрессирующих в хлоропластах индивидуальный ген *cry2Aa2* (McBride *et al.*, 1995). В другой работе под контролем промотора  $P_{\text{tm}}$  были встроены последовательности гена *aadA* и оперона *cry2Aa2* (рис. 3, б). Во встроеном опероне *orf1* и *orf2* кодируют шаперон, который сворачивает белок **Vt** так, что он формирует протеолитически стабильные кубические кристаллы. Накопление бактериального белка в листьях транспластомного табака, экспрессирующего бактериальный оперон (без перекодировки), достигало величины 45,3 % суммарного растворимого белка (Kota *et al.*, 1999; De Cosa *et al.*, 2001). Стабильная продукция **Vt** токсина в хлоропластах растения на столь высоком

уровне приводит к увеличению токсичности трансгенных растений для вредных насекомых и может предотвратить развитие среди них **Vt-устойчивости**.

Рекордной продуктивности по чужеродному белку удалось достичь в транспластомных растениях табака при встройке в хлоропластный геном гена бактериофагового лизина, являющегося гидролазой бактериальной клеточной стенки (Oey *et al.*, 2009a, b). **Лизины являются белками**, высокоустойчивыми к действию бактериальных протеаз, что, по-видимому, обеспечивает высокий уровень накопления этого фермента при биосинтезе в хлоропластах. Хлоропласты не имеют клеточной стенки, характерной для прокариотической клетки, поэтому лизин не оказывает на них губительного воздействия. В листьях транспластомного табака бактериофаговый лизин **PlyGBS** накапливался до 70 % (!) суммарного растворимого белка растения (Oey *et al.*, 2009b). **Получаемые таким образом фаговые лизины могут быть важны для разработки технологии получения новых белковых антибиотиков для лечения пневмонии и других бактериальных инфекций**.

Первая работа, в которой удалось добиться высокой продукции человеческого белка в транспластомных растениях, выполнена Дж. Стауб с соавт. (Staub *et al.*, 2000). Хлоропласты табака трансформировали тремя гибридными конструкциями (рис. 4), экспрессирующими человеческий соматотропин (**hST**), являющийся терапевтически важным белком. В плаزمиде *wtg4838* и **pMON38755** кодирующая последовательность **hST** (синтетическая, с кодировкой для успешной экспрессии в бактериях) соединена с промотором и 5'-некодирующим районом плазмидного гена *psbA*, а в плазмиде **pMON38794** – с промотором  $P_{\text{tm}}$  и 5'-некодирующей областью гена *10* фага T7 (*G10L*). Все гибридные конструкции содержали 3'-мРНК стабилизирующий элемент из гена *rps16* белка малой субъединицы рибосом хлоропластов (рис. 4). В плаزمиде **pMON38755** и **pMON38794** кодирующая последовательность **hST** была слита в правильной рамке трансляции с последовательностью, кодирующей убиквитин. Слитые белки убиквитина расщепляются специфичной убиквитиновой протеазой сразу после С-концевого остатка глицина убиквитина. Это свойство позволяет



**Рис. 4.** Схема интеграции в хлоропластную ДНК гибридных конструкций, экспрессирующих человеческий соматотропин (hST).

осуществлять продукцию рекомбинантных белков без метионинового остатка на N-конце. Сравнительный анализ продукции hST в трансформированных растениях табака (табл. 1) показал, что трансформация хлоропластов приводит к многократному увеличению синтеза рекомбинантного белка. Кроме того, на уровень продукции hST в транспластомных растениях существенное влияние может оказывать структура 5'-некодирующей области создаваемого трансгена.

На основании вышерассмотренных работ становится очевидным, что транспластомные растения можно рассматривать как наиболее перспективную платформу для эффективной продукции протективных антигенов патогенных агентов различной природы (табл. 2) и создания на их базе съедобных вакцин (Щелкунова, Щелкунов, 2008; Zhou *et al.*, 2008; Rigano *et al.*, 2009; Cardi *et al.*, 2010; Davoodi-Semiromi *et al.*, 2010; Shchelkunov, Shchelkunova, 2010).

Экспериментально показано, что в хлоропластный геном табака можно встраивать фрагменты чужеродной ДНК размером до 50 тыс. п.н. (Adachi *et al.*, 2007), что потенциально может обеспечить создание транспластомных растений с улучшенными или измененными метаболическими путями, контролируемые полицистронными оперонами. Первый пример создания таких растений реализован при встройке в хлоропластный геном табака

**Таблица 1**  
Продукция химерного hST  
в трансгенных и транспластомных  
растениях (Kota *et al.*, 1999)

Плаزمид	Локализация трансгена	Продукция белка, кодируемого трансгеном, % ОРБ*
wrg4776	ядро клетки	0,004 – 0,008
wrg4838	хлоропласты	0,2
pMON38755	хлоропласты	1,0
pMON38794	хлоропласты	7,0

\* ОРБ – общий растворимый белок.

бактериального оперона размером 7 тыс. п.н., состоящего из трех генов, направляющих биосинтез биodeградируемого полиэфира полигидроксипитурата (Lossl *et al.*, 2003, 2005; Arai *et al.*, 2004). Однако в данном случае не всегда наблюдалось стабильное наследование получаемых транспластомных растений (Lossl *et al.*, 2003, 2005).

В некоторых случаях сверхсинтез рекомбинантных белков в хлоропластах может приводить к формированию в них этими белками телец включения (Millan *et al.*, 2003), что довольно часто наблюдается и при сверхсинтезе рекомбинантных белков в бактериальных клетках.

Таким образом, трансгенная система хлоропластов позволяет достичь высокой дозы

Таблица 2

Примеры продукции антигенов патогенных агентов в транспластомных растениях  
(Staub *et al.*, 2000; Lelivelt *et al.*, 2005; Oey *et al.*, 2009a, b)

Белок	Патоген	Вид растения	Уровень продукции, % ОРБ*
Бактериальные антигены			
CTB	<i>Vibrio cholerae</i>	табак	4,1
TetC	<i>Clostridium tetani</i>	табак	25
LT-B	<i>Escherichia coli</i>	табак	2,5
PAg	<i>Bacillus anthracis</i>	табак	18,1
CaF1-LcrV	<i>Yersinia pestis</i>	табак	14,8
OspA	<i>Borrelia burgdorferi</i>	табак	10
CTB-AMA1	<i>Vibrio cholera, Plasmodium falciparum</i>	табак	13,2
CTB-AMA1	<i>Vibrio cholera, Plasmodium falciparum</i>	салат	7,3
CTB-MSP1	<i>Vibrio cholera, Plasmodium falciparum</i>	табак	10,1
CTB-MSP1	<i>Vibrio cholera, Plasmodium falciparum</i>	салат	6,1
Вирусные антигены			
VP1	Вирус ящура	табак	3
VP-βGUS	Вирус ящура	табак	51
CTB-2L21	Парвовирус собак	табак	31,1
L1	Вирус папилломы человека	табак	24
p24	Вирус иммунодефицита человека	табак	4,5
p24-Nef	Вирус иммунодефицита человека	табак	40
A27L	Вирус осповакцины	табак	18

\* ОРБ – общий растворимый белок.

чужеродного гена, что при оптимально сконструированном трансгене обеспечивает очень эффективную продукцию целевого белка. Более того, способность пластид осуществлять экспрессию оперонов позволяет создавать искусственные опероны (рис. 3, 4) и в перспективе станет возможным относительно просто вводить новые метаболические пути в растения, улучшая их потребительские свойства. Важной особенностью пластид является то, что они передаются по материнской линии и обычно не содержатся в пыльце. Поэтому транспластомные растения по сравнению с обычными трансгенными растениями более безопасны для окружающей среды, так как в них предотвращается неконтролируемое распространение трансгена в другие растения (Ruf *et al.*, 2007). Поскольку интеграция в пластоому происходит в результате гомологичной рекомбинации, отобранные клоны одинаковы и отсутствует эффект

положения гена, характерный для случайной встройки трансгена при ядерной трансформации растений. В пластидах не наблюдается сайленсинг (замолкание) трансгена, поэтому его экспрессия стабильно сохраняется в последующих поколениях.

Итак, хлоропласты растений являются наиболее привлекательной системой экспрессии, в том числе для молекулярного биофарминга (molecular farming). Однако создание транспластомных растений сопряжено с рядом проблем, одна из которых связана с достаточно продолжительным периодом культивирования клеток на среде с антибиотиками, что связано со снижением их регенерационного потенциала и возникновением спонтанных мутаций устойчивости к антибиотикам. Ранее нами установлено, что устойчивость к спектиномицину клеток растений при их отборе на среде с антибиотиком может быть обусловлена спонтанными

мутациями в гене *rrn16* хлоропластного генома (Филипенко и др., 2011). Снижение регенерационной способности клеток в культуре *in vitro* влечет за собой целый ряд проблем, связанных с восстановлением полноценных растений из отдельных клеток. В связи с этим при создании транспластомных растений представляется чрезвычайно важной разработка методов отбора и сортировки клеток на начальных этапах переноса чужеродных генов в пластомеры растений. Возможность введения дополнительного этапа разделения клеток после проведения биобаллистической трансформации с использованием проточной цитофотометрии показана нами при создании транспластомных растений табака.

Работа выполнена при поддержке гранта № 7 интеграционных междисциплинарных проектов СО РАН.

### Литература

- Филипенко Е.А., Сидорчук Ю.В., Дейнеко Е.В. Спонтанные мутации в гене *rrn16* хлоропластного генома, обуславливающие устойчивость к спектиномицину, у каллусных линий *Daucus carota* // Генетика. 2011. Т. 47. № 1. С. 41–47.
- Щелкунова Г.А., Щелкунов С.Н. Съедобные вакцины на основе трансгенных растений // Молекуляр. медицина. 2008. № 2. С. 3–12.
- Adachi T., Takase H., Tomizawa K.-I. Introduction of a 50 kbp DNA fragment into the plastid genome // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2007. V. 71. P. 2266–2273.
- Arai Y., Shikanai T., Doi Y. *et al.* Production of polyhydroxybutyrate by polycistronic expression of bacterial genes in tobacco plastid // Plant Cell Physiol. 2004. V. 45. P. 1176–1184.
- Boynton J.E., Gillham N.W., Harris E.H. *et al.* Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles // Science. 1988. V. 240. P. 1534–1537.
- Cardi T., Lenzi P., Maliga P. Chloroplasts as expression platforms for plant-produced vaccines // Expert Rev. Vaccines. 2010. V. 9. P. 893–911.
- Daniell H. Production of biopharmaceuticals and vaccines in plants via the chloroplast genome // Biotechnol. J. 2006. V. 1. P. 1071–1079.
- Daniell H., Lee S.-B., Panchal T., Wiebe P.O. Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts // J. Mol. Biol. 2001. V. 311. P. 1001–1009.
- Davoodi-Semiromi A., Schreiber M., Nallapali S. *et al.* Chloroplast-derived vaccine antigens confer dual immunity against cholera and malaria by oral or injectable delivery // Plant Biotechnol. J. 2010. V. 8. P. 223–242.
- De Cosa B., Moar W., Lee S.B. *et al.* Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of inner crystals // Nat. Biotechnol. 2001. V. 19. P. 71–74.
- del Campo E.M. Post-transcriptional control of chloroplast gene expression // Gene Regulation and Systems Biol. 2009. V. 3. P. 31–47.
- Drechsel O., Bock R. Selection of Shine-Dalgarno sequences in plastids // Nucl. Acids Res. 2011. V. 39. P. 1427–1438.
- Dufourmantel N., Tissot G., Garcon F. *et al.* Stability of soybean recombinant plastome over six generations // Transgenic Res. 2006. V. 15. P. 305–311.
- Estruch J.J., Carozzi N.B., Desai N. *et al.* Transgenic plants: an emerging approach to pest control // Nat. Biotechnol. 1997. V. 15. P. 137–141.
- Hasunuma T., Miyazawa S., Yoshimura S. *et al.* Biosynthesis of astaxanthin in tobacco leaves by transplastomic engineering // Plant J. 2008. V. 55. P. 857–868.
- Hou B.-K., Zhou Y.-H., Wan L.-H. *et al.* Chloroplast transformation in oilseed rape // Transgenic Res. 2003. V. 12. P. 111–114.
- Huang F.-C., Klaus S.M.J., Herz S. *et al.* Efficient plastid transformation in tobacco using the *aphA-6* gene and kanamycin selection // Mol. Genet. Genomics. 2002. V. 268. P. 19–27.
- Jeong S.-W., Jeong W.-J., Woo J.-W. *et al.* Dicistronic expression of the green fluorescent protein and antibiotic resistance genes in the plastid for selection and tracking of plastid-transformed cells in tobacco // Plant Cell Rep. 2004. V. 22. P. 747–751.
- Kota M., Daniell H., Varma S. *et al.* Overexpression of the *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry2Aa2 protein in chloroplasts confer resistance to plants against susceptible and Bt-resistant insect // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. P. 1840–1845.
- Kumar S., Dhingra A., Daniell H. Plastid-expressed betaine aldehyde dehydrogenase gene in carrot cultured cells, roots, and leaves confers enhanced salt tolerance // Plant Physiol. 2004. V. 136. P. 2843–2854.
- Lelivelt C., McCabe M., Newell C. *et al.* Stable plastid transformation in lettuce (*Lactuca sativa* L.) // Plant Mol. Biol. 2005. V. 58. P. 763–774.
- Liu C.W., Lin C.-C., Chen J., Tseng M.-J. Stable chloroplast transformation in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata L.) by particle bombardment // Plant Cell Rep. 2007. V. 26. P. 1733–1744.
- Lossl A., Bohmert K., Harloff H. *et al.* Inducible transactivation of plastid transgenes: expression of the



- R. eutropha phb* operon in transplastomic tobacco // Plant Cell Physiol. 2005. V. 46. P. 1462–1471.
- Lossl A., Eibl C., Harloff H.-J. *et al.* Polyester synthesis in transplastomic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.): significant contents of polyhydroxybutyrate are associated with growth reduction // Plant Cell Rep. 2003. V. 21. P. 891–899.
- Maliga P. Progress towards commercialization of plastid transformation technology // Trends Biotechnol. 2003. V. 21. P. 20–28.
- Maliga P. Plastid transformation in higher plants // Ann. Rev. Plant Biol. 2004. V. 55. P. 289–313.
- McBride K.E., Svab Z., Schaaf D.J. *et al.* Amplification of a chimeric *Bacillus* gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco // Biotechnol. 1995. V. 13. P. 362–365.
- Millan A.F.-S., Mingo-Castel A., Miller M., Daniell H. A chloroplast transgenic approach to hyper-express and purify human serum albumin, a protein highly susceptible to proteolytic degradation // Plant Biotechnol. J. 2003. V. 1. P. 71–79.
- Oey M., Lohse M., Kreikemeyer B., Bock R. Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic // Plant J. 2009b. V. 57. P. 436–445.
- Oey M., Lohse M., Scharff L.B. *et al.* Plastid production of protein antibiotics against pneumonia via a new strategy for high-level expression of antimicrobial proteins // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2009a. V. 106. P. 6579–6584.
- Peltier G., Ferullo J.-M., Tissot G. Generation of fertile transplastomic soybean // Plant Mol. Biol. 2004. V. 55. P. 479–489.
- Rigano M.M., Manna C., Giulini A. *et al.* Transgenic chloroplasts are efficient sites for high-yield production of the vaccinia virus envelope protein A27L in plant cells // Plant Biotechnol. J. 2009. V. 7. P. 577–591.
- Ruf S., Hermann M., Berger I.J. *et al.* Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit // Nat. Biotechnol. 2001. V. 19. P. 870–875.
- Ruf S., Karcher D., Bock R. Determining the transgene containment level provided by chloroplast transformation // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. P. 6998–7002.
- Ruhlman T., Verma D., Samson N., Daniell H. The role of heterologous chloroplast sequence elements in transgene integration and expression // Plant Physiol. 2010. V. 152. P. 2088–2104.
- Shchelkunov S.N., Shchelkunova G.A. Plant-based vaccines against human hepatitis B virus // Expert Rev. Vaccines. 2010. V. 9. P. 947–955.
- Sidorov V.A., Kasten D., Pang S.-Z. *et al.* Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker // Plant J. 1999. V. 19. P. 209–216.
- Sikdar S.R., Serino G., Chaudhuri S., Maliga P. Plastid transformation in *Arabidopsis thaliana* // Plant Cell Rep. 1998. V. 18. P. 20–24.
- Staub J.M., Garcia B., Graves J. *et al.* High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts // Nat. Biotechnol. 2000. V. 18. P. 333–338.
- Svab Z., Hajdukiewicz P., Maliga P. Stable transformation of plastids in higher plants // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 8526–8530.
- Svab Z., Maliga P. High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P. 913–917.
- Waheed M.T., Thönes N., Müller M. *et al.* Transplastomic expression of a modified humanpapillomavirus L1 protein leading to the assembly of capsomeres in tobacco: a step towards cost-effective second-generation vaccines // Transgenic Res. 2011. V. 20. P. 271–282.
- Zhou F., Badillo-Corona J.A., Karcher D. *et al.* High-level expression of human immunodeficiency virus antigens from the tobacco and tomato plastid genomes // Plant Biotechnol. J. 2008. V. 6. P. 897–913.

## TRANSPLASTOME PLANTS

S.N. Shchelkunov<sup>1,2</sup>, Yu.M. Konstantinov<sup>3</sup>, E.V. Deineko<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia,

e-mail: [deineko@bionet.nsc.ru](mailto:deineko@bionet.nsc.ru), [snshchel@rambler.ru](mailto:snshchel@rambler.ru);

<sup>2</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia;

<sup>3</sup> Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, SB RAS, Irkutsk, Russia

### Summary

Fundamentals of the development of transplastome plants and structural features of genetic constructs for incorporation into chloroplast genomes are reviewed. Major achievements in the transformation and expression of alien genes in chloroplasts are considered. The potential of this method for significant increase in the production of alien proteins in transplastome plants is substantiated.

**Key words:** chloroplasts, chloroplast transformation, biolistics, homologous recombination, plastome.