

УДК 602.6:58

ТРАНЗИЕНТНАЯ ЭКСПРЕССИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО Г-КСФ ЧЕЛОВЕКА В РАСТЕНИЯХ *NICOTIANA BENTHAMIANA* С ПОМОЩЬЮ ВИРУСНОГО ВЕКТОРА, СОЗДАННОГО НА ОСНОВЕ ГЕНОМА ВИРУСА КУСТИСТОЙ КАРЛИКОВОСТИ ТОМАТОВ

Абеуова Л.С.¹, Шолтхоф Г.Б.², Раманкулов Е.М.¹, Манабаева Ш.А.¹

¹Национальный центр биотехнологии

ул. Валиханова, 13/1, Астана, 010000, Казахстан

²Департамент патологии растений и микробиологии, Техасский А&М Университет

2132 TAMU, Колледж Стейшен, TX 77843, США

manabayeva@biocenter.kz

АБСТРАКТ

Использование растений в качестве биофабрик для получения рекомбинантных белков имеет ряд преимуществ по сравнению с рутинно используемыми системами на основе клеток бактерий и млекопитающих. Чужеродные белки в клетках растений могут быть получены путем стабильной трансформации или транзientной экспрессии с помощью вирусных векторов.

Целью исследования являлось создание экспрессионной системы на основе генома *Вируса кустистой карликовости томатов* (ВККТ) для транзientной экспрессии целевого белка рГ-КСФ в растениях. Наличие в геноме ВККТ гена белка р19, ингибирующего посттранскрипционное умолкание генов и повышающего уровень экспрессии для каждого гена в вирусной РНК (в том числе гетерологичных), является существенным преимуществом данной векторной системы. Оценивали потенциал данной векторной системы для эффективной экспрессии рекомбинантного гена, кодирующего Г-КСФ человека в растениях *Nicotiana benthamiana*. Для этого разработан вирусный вектор Т-ВККТ под контролем сильного конститутивного промотора 35S *Вируса мозаики цветной капусты*. В данном векторе ген, кодирующий капсидный белок, был заменен на кодон оптимизированный ген Г-КСФ человека (ген с длиной 570 п.н.), который синтезирован методом ПЦР. Для инфицирования вирусным вектором, 4-5 недельные растения *N. benthamiana* подвергали агроинфильтрации. Полученные результаты подтверждают наличие широких перспектив использования вирусной системы, созданной на основе генома ВККТ, для экспрессии генов различных фармацевтических белков в растениях.

Ключевые слова: вирусный вектор, *Вирус кустистой карликовости томатов*, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор человека, транзientная экспрессия, рекомбинантный белок.

TRANSIENT EXPRESSION OF HUMAN G-CSF IN *NICOTIANA BENTHAMIANA* PLANTS USING A *TOMATO BUSHY STUNT VIRUS* – BASED VECTOR

Abeuova L.S.¹, Scholthof H.B.², Ramankulov E.M.¹, Manabayeva S.A.¹

¹National Center for Biotechnology

13/1, Valikhanov str., Astana, 010000, Kazakhstan

²Department of Plant Pathology and Microbiology, Texas A&M University

2132 TAMU, College Station, TX 77843, USA

manabayeva@biocenter.kz

ABSTRACT

Plants have been proposed as an attractive alternative to mammalian or microbial cell-based systems for pharmaceutical protein production. Foreign proteins can be produced in plants by stable transformation or by transient expression using virus-based vectors. Several plant virus vectors have been developed for transient expression of foreign proteins, including tobacco mosaic virus (TMV), potato virus X (PVX) and tobacco rattle virus (TRV).

The objective of this work was to develop an advanced *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) – based protein production system to produce human G-CSF in non-transgenic plants. A significant advantage of the TBSV vector system is that the TBSV genome encodes the p19 protein, which is capable of inhibiting posttranscriptional silencing and enhancing expression levels for each gene in the viral RNA (including heterologous ones). We evaluated the potential of the TBSV vector system for efficient expression of the recombinant human G-CSF (rhG-CSF) protein in *Nicotiana benthamiana* plants. For this purpose, we developed a TBSV derived viral vector driven by the CaMV 35S promoter that can be delivered as DNA. In this vector, the CP gene was replaced by the codon optimized *G-CSF* (174 a.a., molecular weight 18.6 kDa) gene, which was synthesized by a PCR-based gene synthesis method. The viral vector was delivered into 4-5 week old *N. benthamiana* plants by agroinfiltration. Four days after infiltration, expression of *rhG-CSF* was verified by protein extraction followed by western blot procedures. The preliminary results indicate that the TBSV - based protein production system is suitable for transient production of

biopharmaceuticals in plants.

Keywords: viral vector, *Tomato bushy stunt virus*, human granulocyte colony-stimulating factor, transient expression, recombinant protein.

ВВЕДЕНИЕ

Возможность искусственно включать в геном практически любой интересующий исследователей ген позволила создать огромное количество трансгенных растений, используемых для решения самых различных задач современной биологии, медицины и сельского хозяйства. Однако обычной проблемой является низкий выход рекомбинантного белка, обусловленная им высокая стоимость очистки, а также длительное время, необходимое для создания трансгенных растений-продуцентов [1]. Повышение экономической эффективности использования растений в качестве «биофабрик» – продуцентов белков послужило началом разработки новых технологий продукции в нетрансгенных растениях с высоким уровнем выхода целевых белков. Такие технологии позволяют получать в растениях недорогие и безопасные белки и являются конкурентоспособными альтернативами традиционным методам, основанным на использовании бактерий, дрожжей или клеток животных. Одной из таких технологий является применение систем транзientной экспрессии целевых генов с помощью самореплицирующихся рекомбинантных вирусных векторов [2].

Экспрессия, основанная на вирусных векторах, лишенных капсидного белка, является генетически безопасной, поскольку системная экспрессия и формирование инфекционных вирусных частиц блокированы. Сама идея данного метода состоит в интеграции гена, кодирующего необходимый чужеродный белок, в геном растительного вируса и заражении модифицированным вирусом растительных клеток. При инфекции синтезируются не только собственные белки вируса, но и целевой белок. Амплификация целевого гена при репликации вируса-вектора в клетке растения обеспечивает высокий уровень экспрессии в течение нескольких дней. Продукция рекомбинантного белка в такой системе может достигать до 20% от общего растворимого белка растениях [3]. Достоинством технологии транзientной экспрессии целевых белков в растениях является отсутствие необходимости создания трансгенных растений. Вирусный геном, содержащий целевой ген, включается в бинарный вектор с последующей доставкой его в клетки инфицируемого растения методом агроинокуляции или агроинфильтрации. Более высокая продукция целевых белков достигается с помощью агробактериальной инфильтрации самореплицирующихся вирусных векторов, содержащих ген целевого белка. Такой эффект объясняется: а) способностью вирусного генома к автономной репликации в растительной клетке; б) высокой эффективностью транскрипции; в) защитой экзогенного транскрипта от деградации; г) стабильностью целевого белка.

Изучение экспрессии гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) человека в клетках растений, животных, бактерий, дрожжей привело к созданию рекомбинантных аналогов природного человеческого Г-КСФ [4, 5], которые успешно применяются в медицине. Известны два препарата рекомбинантных Г-КСФ человека – филграстим и ленограстим, полученные из клеток *E. coli* и клеток китайского хомячка соответственно. Филграстим состоит из 175 аминокислот, имеет ту же аминокислотную последовательность, что и природный белок, но содержит дополнительный остаток метионина на N-конце молекулы. Ленограстим состоит из 174 аминокислот, его аминокислотная последовательность полностью соответствует таковой природного Г-КСФ человека. Лекарственные препараты, содержащие рекомбинантный человеческий Г-КСФ (рч Г-КСФ), применяются в клинической практике для лечения различных лейкопений, в частности нейтропений, возникающих после химиотерапии, идиопатической, врожденной и циклической нейтропений, для лечения тяжелых инфекций в комбинации с антибиотиками, а также нейтропений у больных СПИДом [6,

7]. Большой биологической активностью обладает короткая форма – длиной 174 а.о. и молекулярным весом 18,6 kDa. Введение экзогенного Г-КСФ вызывает быстрое, специфичное и дозозависимое увеличение нейтрофилов в периферической крови [8, 9].

Г-КСФ оказался эффективен для профилактики и лечения гнойно-септических инфекций в хирургии, т.к. Г-КСФ активизирует различные механизмы защиты организма от инфекции. Г-КСФ также применяют для стимуляции «выброса» стволовых клеток из костного мозга.

Известно, что одним из основных факторов, ограничивающих *Agrobacterium* – опосредованную систему транзientной экспрессии генов и, в частности, экспрессию целевых белков в вирусных системах экспрессии, является развитие посттранскрипционного у молкания генов (ПТУГ). ПТУГ – защитная противовирусная система растения, основанная на специфичном узнавании и деградации вирусной РНК. Транзientная ко-экспрессия целевого гена с геном белка р19 из *Вируса кустистой карликовости томатов* ингибирует посттранскрипционное у молкание генов и повышает уровень экспрессии целевых белков в растениях [10, 11]. Белок р19 является супрессором противовирусной реакции клеток растения-хозяина – «у молкания генов» в составе вирусной РНК. Эффект ингибирования ПТУГ достигается за счет способности белка р19 образовывать комплекс с короткими интерферирующими РНК (киРНК), что блокирует систему передачи сигнала ПТУГ.

В данной работе геном *Вируса кустистой карликовости томатов* использован в качестве автономно реплицирующегося вектора для создания генно-инженерных конструкций, обеспечивающих транзientную экспрессию целевых белков в растениях. Наличие в геноме ВККТ гена белка р19, ингибирующего посттранскрипционное у молкание генов и повышающего уровень экспрессии целевых белков *in planta*, является существенным преимуществом данной векторной системы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе применены методы *Agrobacterium* – опосредованной инфильтрации растений, методы компьютерного анализа нуклеиновых кислот, методы молекулярного клонирования, методы выделения и анализа белков.

Дизайн генома *Вируса кустистой карликовости томатов* для создания экспрессионного вектора

Дизайн генно-инженерной конструкции на основе генома ВККТ, анализ аминокислотной последовательности продукта экспрессии (Г-КСФ человека) выполнен с использованием пакета программ Vector NTI 11.5 (Invitrogen, США). Последовательность гена, кодирующего белок оболочки (БО) и сайты, узнаваемые различными рестриктазами, проанализированы. В результате частичной замены гена БО ВККТ оптимизированной последовательностью гена рчГ-КСФ в геноме ВККТ получен репликон ВККТ-ГКСФ, обеспечивающий транзientную экспрессию рчГ-КСФ в клетках растений. В результате клонирования репликона ВККТ-ГКСФ в бинарный вектор рJL был получен вирусный вектор Т-ВККТ-ГКСФ, содержащий полный геном ВККТ с геном рчГ-КСФ. Полный геном был помещен под контроль сильного конститутивного промотора 35S *Вируса мозаики цветной капусты*, обеспечивающего экспрессию гена рчГ-КСФ в растениях.

Дизайн олигонуклеотидных праймеров для получения нуклеотидных последовательностей гена рчГ-КСФ и синтез последовательности гена рчГ-КСФ *de novo*

Аминокислотная последовательность продукта экспрессии Г-КСФ человека с гексагистидиновой меткой (6xHis) приведена на рисунке 1.

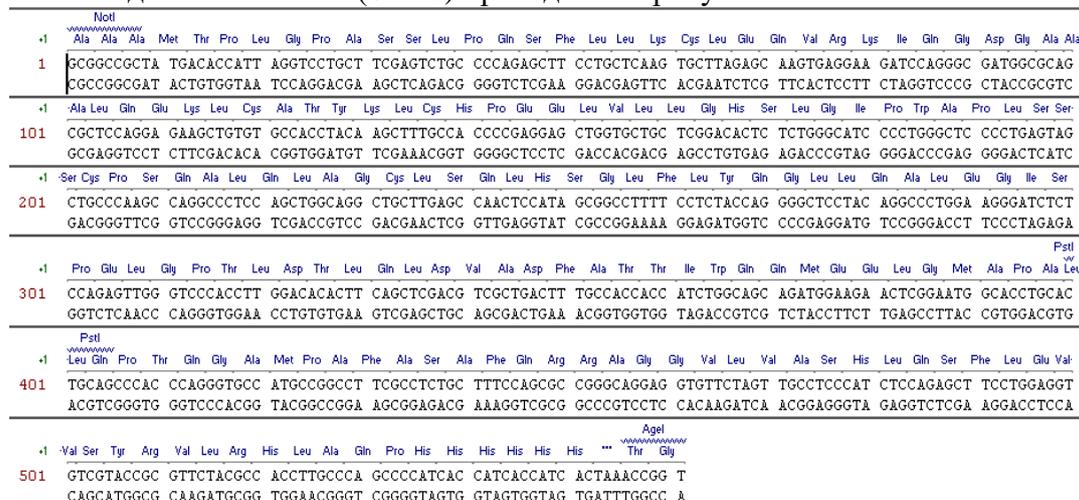


Рис. 1. Аминокислотная и нуклеотидная последовательность гена, кодирующего Г-КСФ человека

Fig. 1. Amino acid and nucleotide sequence of the gene encoding human G-CSF

Аминокислотная последовательность Г-КСФ человека была извлечена из базы данных NCBI (GenBank: M17706.1). Дизайн гена рГ-КСФ выполнен с таким расчетом, чтобы открытая рамка считывания имела состав кодонов, оптимальный для его экспрессии в растениях *N. benthamiana*. Последовательность гексагистидиновой метки служит для того, чтобы чистить белок с помощью хроматографии. Состав кодонов нуклеотидной последовательности гена Г-КСФ человека для улучшенной экспрессии в растениях *N. benthamiana* был оптимизирован с помощью программы DNA2.0 (<http://www.dna20.com>).

Дизайн олигонуклеотидных праймеров для получения кодон оптимизированной нуклеотидной последовательности гена Г-КСФ человека *de novo* проведен с расчетом перекрытия на 10-15 пар нуклеотидов. Праймеры разделены на две группы – (G-CSF 1-12) «внутренние» и (G-CSF 13-14) «фланкирующие» (таблица 1).

Таблица 1. Последовательности праймеров для синтеза гена рГ-КСФ

Table 1. Primer sequences designed for the synthesis of rhG-CSF gene

Код Code	Последовательность (5'→3') The sequence (5' → 3')	Длина Length
1	2	3
G-CSF-1	gacaccattaggtcctctgagctctgccccagagcttctctgctcaagtgcttagagc	60
G-CSF-2	cttctcctggagcgtcgccatcgccctggatcttctcacttgcctaaagcacttgag	60
G-CSF-3	cagcgtccaggagaagctgtgtgccacactacaagcttggcaccggaggagctgggtgc	60
G-CSF-4	ctactcaggggagcccaggggatgccagagagtgctccgagcagcaccagctcctcgggg	60
G-CSF-5	gggctcccctgagtagctgcccaagccagccctccagctggcaggctgcttgagccaac	60
G-CSF-6	cagggcctgtaggagcccctgtagaggaaaagccgctatggagttgctcaagcagcc	60
G-CSF-7	ctctacagggccctggaaggatctctccagagtgggtcccacctggacacacttcag	60
G-CSF-8	ccatctgctccagatgggtgggcaagtcagcgcagctcagctgaagtgtgtccaagg	60
G-CSF-9	catctggcagcagatggaagaactcggatggcacctgcactgcagcccaccagggtgc	60
G-CSF-10	cacctcctgcccgctggaagcagagggcgaaggccgcatggcaccctgggtgggc	59
G-CSF-11	cgccggcagggaggtgtctagtgtcctccatctccagagcttctggaggtgtcgtac	60
G-CSF-12	gtgatgtgatggtgatgggctggcgaagtgctgtagaacgcggtacgacacctccag	60

G-CSF-13	gggtgcggccgctatgacaccattagg	27
G-CSF-14	gatgagctcaccggtttagtgatggtgatg	30

«Внутренние» праймеры 100% гомологичны определенному участку рассчитанной последовательности синтезируемого гена, совокупность «внутренних» праймеров покрывает всю длину гена. «Фланкирующие» праймеры предназначены для сборки полноразмерного гена и несут уникальные сайты узнавания рестриктаз *NotI* и *AgeI* для последующего клонирования фрагмента ДНК, синтезированного *de novo*, в плазидах.

Смесь «внутренних» праймеров использовали в I-ом раунде ПЦР, продукт которого подвергали II-ому раунду ПЦР – амплификации, который проводили только с парой «фланкирующих» праймеров. При проведении ПЦР использовалась высокоточная полимераза Pfu (Thermo Scientific, США) (рисунок 2).

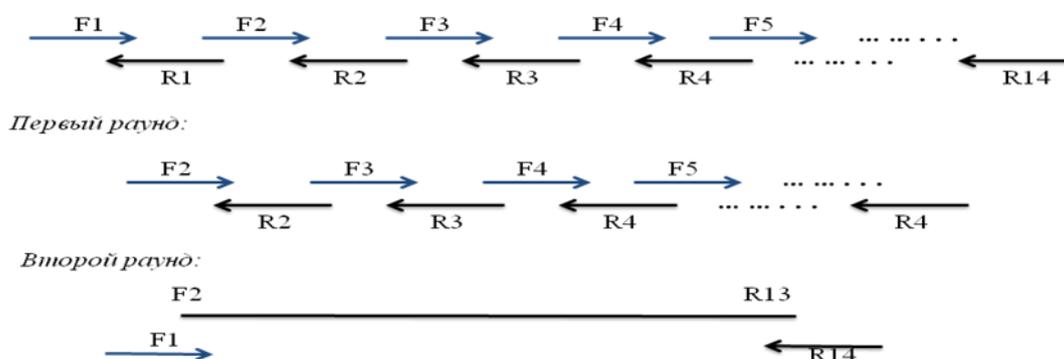


Рис. 2. Схема *de novo* – синтеза гена, кодирующего Г-КСФ человека

Fig. 2. The scheme of *de novo* – synthesis of the gene encoding human G-CSF

***Agrobacterium* – опосредованная инфильтрация растений. Выращивание растений для агроинфильтрации**

Семена *N. benthamiana* проращивали в горшках, содержащих стандартную почву, при 16 ч фотопериоде (освещение люминесцентными лампами 5 кЛк), при температуре воздуха 28-30°C и 70% относительной влажности воздуха. Затем 2-недельные проростки рассадили в отдельные горшки, содержащие стандартную почву в аналогичных условиях. Спустя 4-5 недель, когда растения достигали оптимальной стадии развития, их использовали для агроинфильтрации. На данном этапе растения имели по крайней мере пять полностью сформированных настоящих листьев без видимых бутонов. Для инфильтрации растений использовали штамм *A. tumefaciens* LBA4404, несущий вирусный вектор Т-ВККТ-ГКСФ. Трансформацию клеток *A. tumefaciens* вирусным вектором Т-ВККТ-ГКСФ провели с помощью электропорации. Для инфильтрации использовали 1 мл шприц с суспензией *A. tumefaciens* в буфере ММА (10 mM MES (pH 5,5), 10 mM MgCl₂ и 100 мкМ ацетосирингон). Заполнение мезофильной ткани листа табака бактериальной культурой было видно образованием темно-зеленого сектора. Для того чтобы пропитался весь лист необходимо несколько точек инфильтрации. Инокулированные растения держали при комнатной температуре около суток в защищенном от прямых солнечных лучей месте и через 3 дня после инфильтрации листья собирали для изучения белкового состава.

Выделение и очистка белка рчГ-КСФ методом металло-аффинной хроматографии на Ni²⁺-NTA-агарозе

Растворимые растительные белки экстрагировали в буфер Н (100 mM трис-НСl, рН 7,4, 1 mM ЕДТА, 100 mM NaCl, 0,4 mM фенилметилсульфонилфторид). В связи с тем, что большая часть целевого белка находится в нерастворимой фракции, нерастворимые белки экстрагировали в буфер S (100 mM трис-НСl, рН 7,4, 6 M гуанидин гидрохлорид, 1 mM β -меркаптоэтанол, 1 mM имидазол). Полученный экстракт пропустили через фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Для очистки белка из экстракта растительных клеток был использован метод металло-аффинной хроматографии на ионах никеля (Ni²⁺), с использованием колонок HisTrapFF (General Electric Healthcare). Подготовку колонки осуществляли по инструкции производителя. После подготовки колонку загрузили белковым растительным экстрактом. Очистку белка рчГ-КСФ осуществляли вручную линейным градиентом имидазола, используя в качестве элюирующего агента буфер L (100 mM трис-НСl рН 7,4, 100 mM NaCl, 10-300 mM имидазол).

Определение концентрации белка методом Лоури

Концентрацию растительных белков, выделенных и элюированных в градиенте имидазола, определяли по методу Лоури [12]. Для этого 0,15 мл растительного экстракта испытуемого белка наливали в пробирки, добавляли 0,85 мл mQ воды и 1 мл реагента Лоури (Sigma-Aldrich, США), перемешивали и оставляли при комнатной температуре в течение 10 мин. Затем в каждую пробирку добавляли по 0,5 мл рабочего реагента Фолина-Чокальтеу (Sigma, США). После повторного перемешивания калибровочные пробирки оставили при комнатной температуре в течение 30 мин для развития окраски, затем измерили оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 500 нм.

Изучение белковой фракции растительных экстрактов при помощи белкового электрофореза в ПААГ и Вестерн-блот анализа

Электрофорез проводили в градиенте полиакриламидного геля (4-15%), используя десятилуночные гребенки. Гели окрашивали в растворе красителя (0,04%-ный раствор Кумасси R250 в 10%-ной уксусной кислоте и 20%-ном изопропанол) и отмывали в растворе 10%-ной уксусной кислоты.

Экспрессия белка рчГ-КСФ проверялась методом Вестерн-блот с помощью специфических моноклональных антител к гранулоцитарному колониестимулирующему фактору человека (WH0001440M3-100UG, Sigma-Aldrich). Для этого белки переносились на нитроцеллюлозную мембрану при постоянном напряжении 100 V и силе тока 260 mA в течение 1 часа. Белки после электропереноса блокировали в течение 30 мин в 7% растворе сухого обезжиренного молока (7,0 г порошка обезжиренного сухого молока, 1xТБС/Твин: 50 mM Трис, 200 mM NaCl, 0,5% Твин-20). Мембрану инкубировали в течение 1 часа с первичными антителами против Г-КСФ человека. По окончании инкубации мембрану промывали 3 раза буфером 1xТБС/Твин и переносили в раствор вторичных антител против антител мыши, конъюгированных IgG с щелочной фосфатазой (A5153, Sigma). Отмывали мембрану буфером 1xТБС/Твин 3 раза по 10 минут и визуализировали с помощью фосфатного буфера, с добавлением 5-бром-4-хлор-3-индолил фосфата (BCIP) и нитро-синего тетразола (NTB).

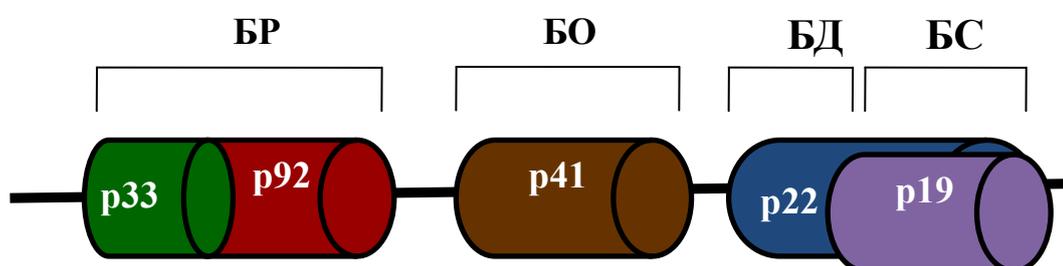
Имуноферментный анализ рчГ-КСФ

Определение концентрации белка рчГ-КСФ иммуноферментным методом проводили в иммунологических планшетах на наборе Elisa kit Human G-CSF (KHC2031, Invitrogen, США). Все необходимые реагенты поставляются в составе набора. Стандарт приготовили

по прописи. Произвели учет результатов с использованием автоматического фотометра для микропланшетов при длине волны 450 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Вирус кустистой карликовости томатов относится к роду *Tombusviridae*. Геном ВККТ представляет собой РНК позитивной полярности длиной около 4800 нт. Геномная РНК ВККТ содержит пять протяжённых открытых рамок считывания и кодирует пять белков: р33 и р92 отвечают за репликацию вируса и транслируются непосредственно с геномной РНК; р41 – белок оболочки транслируется с субгеномной РНК1 и участвует в упаковке вирусного генома. Ген белка р19, известного как супрессор посттранскрипционного у молчания генов, и белка р22, отвечающего за движение вируса, транслируются с другой субгеномной РНК2 (рисунок 3).



р33 и р92 – белки репликации (БР); р41 – белок оболочки (БО); р19 – белок супрессор (БС); р22 – белок движения (БД)

Рис. 3. Геном *Вируса кустистой карликовости томатов*

р92 and р33 – replication proteins; р41 – capsid protein; р19 – silencing suppressor; р22 – movement protein

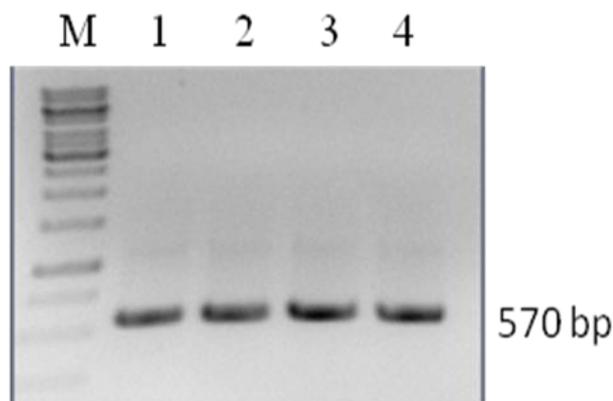
Fig. 3. *Tomato bushy stunt virus* genome

До настоящего времени вектор ВККТ был использован для изучения биологии самого вируса, инфекционного потенциала вируса, при изменении нуклеотидных последовательностей, кодирующих разные вирусные белки, или при отключении его генов в лабораторных условиях. Одна из первых статей о том, что ВККТ может быть инфекционным без участия белка оболочки, была опубликована Scholthof в 1993 году [13], в последующие годы были опубликованы результаты ряда исследований его группы [14, 15] о том, что вирусная РНК ВККТ легко может воспроизводиться в клетках хозяина и может передвигаться из клетки в клетку как рибонуклеопротеиновый комплекс. Получение вирусного вектора на основе генома вируса кустистой карликовости томатов, обеспечивающего транзистентную экспрессию целевого гена, было описано нами ранее [16]. В данной работе в вирусный вектор Т-ВККТ была клонирована последовательность гена рГ-КСФ по сайтам рестрикции *NotI* и *AgeI*.

Синтез последовательности гена Г-КСФ человека *de novo*

Аmplифицирование ДНК с помощью ПЦР обычно требует присутствия матричной ДНК, которая не всегда доступна. Кроме того, естественная последовательность ДНК может не экспрессироваться в чужом организме, что требует оптимизации кодонов для достижения эффективной экспрессии гетерологичного белка в растениях. В результате двухэтапного химического синтеза с помощью ПЦР был синтезирован кодон оптимизированный ген, кодирующий Г-КСФ человека, состоящий из 574 пар

нуклеотидов. На первом раунде проводили амплификацию со смесью внутренних праймеров G-CSF-1 +...G-CSF-12. Продукты первого раунда были использованы в качестве матрицы для амплификации в ПЦР второго раунда с парой фланкирующих праймеров G-CSF-12 + G-CSF-13, содержащих сайты рестрикции *NotI* и *AgeI*. Результаты ПЦР второго раунда показаны на рисунке 4.



М – маркёр длин фрагментов ДНК O'GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas); 1-4 – фрагменты ДНК, несущие целиком ген рчГ-КСФ с линкерами для клонирования

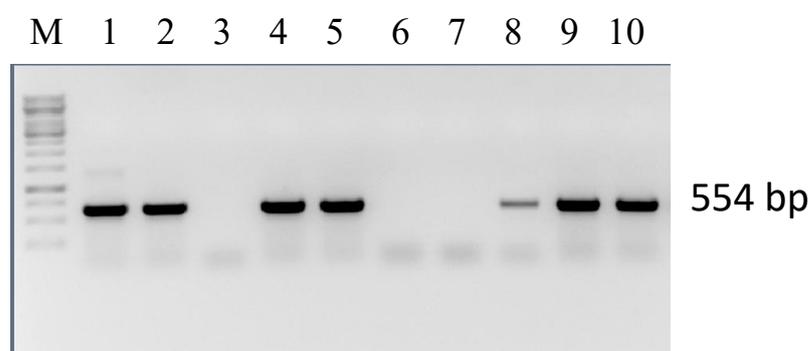
Рис. 4. Электрофореграмма продуктов ПЦР синтеза гена рчГ-КСФ из олигонуклеотидных праймеров

М – DNA size marker O'GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas); 1-4 – DNA fragment carrying the entire gene rhG-CSF with cloning sites

Fig. 4. Electropherogram of PCR synthesized product of rhG-CSF from oligonucleotide primers

Клонирование последовательности гена Г-КСФ человека в плазмиде *E. coli* и подтверждение структуры с помощью секвенирования

Для клонирования гена рчГ-КСФ использовали вектор pRS2, штамм *Escherichia coli* XL-Blue, питательную среду SOC с соответствующими антибиотиками. Продукт амплификации второго раунда был обработан смесью рестриктаз *NotI* и *AgeI*. В этом же эксперименте был приготовлен вектор для клонирования. В качестве векторной молекулы использовали плазмиду pRS2, которую обрабатывали рестриктазами *NotI* и *AgeI* в присутствии фосфатазы SAP. В результате данных процедур была получена ДНК плазмиды pRS2/Г-КСФ, несущая вставку целевого гена рчГ-КСФ. Клоны анализировали на наличие гена рчГ-КСФ с помощью ПЦР. Результаты ПЦР позволили отобрать клоны, содержащие ген рчГ-КСФ. На рисунке 5 представлен электрофорез продуктов ПЦР скрининга, который показал наличие вставки в семи плаزمидях из 10.



М – маркёр длин фрагментов ДНК O'GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas); 1-10 – клоны плазмиды pRS2/G-CSF

Рис. 5. Скрининг клонов плазмиды pRS2/Г-КСФ на наличие гена рчГ-КСФ

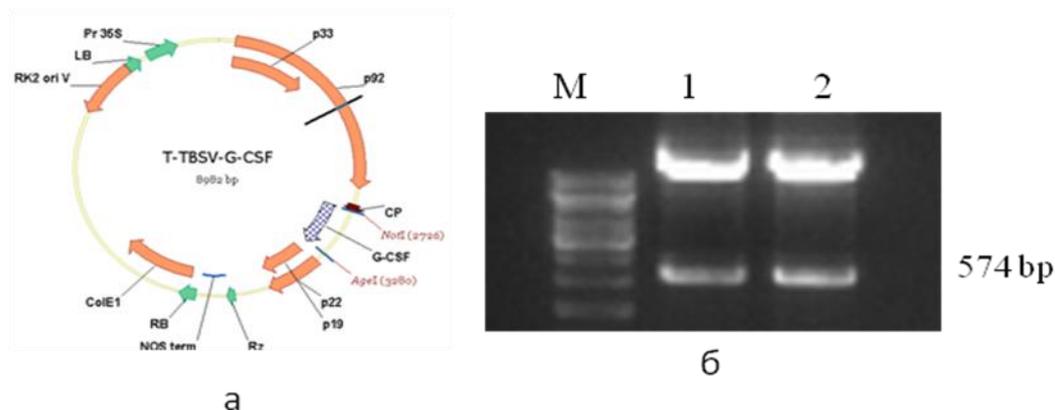
М – DNA size marker O'GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas); 1-10 – plasmid clones pRS2/G-CSF

Fig. 5. Screening of clones pRS2/G-CSF in the presence of the gene rhG-CSF

Было выполнено секвенирование плазмидных ДНК из положительных клонов и выбран клон, в котором последовательности, целевого гена имели правильную структуру. В дальнейшем из плазмиды pRS2/G-CSF целевой ген был вырезан с помощью рестриктаз *NotI* и *AgeI*, очищен из 1% агарозного геля и подготовлен для клонирования (лигирования) в вирусный вектор, обработанный *NotI* и *AgeI*, созданный на основе генома ВККТ.

Встраивание репликона ВККТ-ГКСФ в Ti-плазмиду *A. tumefaciens* под контролем промотора 35S вируса мозаики цветной капусты (CaMV)

Получение генно-инженерной конструкции на основе вирусного генома ВККТ с интегрированным геном, кодирующим рчГ-КСФ для получения транзистентно экспрессирующей системы в растениях, является одной из основных задач данного исследования. Клонирование гена рчГ-КСФ в вирусный вектор проведено по сайтам рестрикции *NotI* и *AgeI*. Из выросших клонов-трансформантов были выбраны клоны, которые использовали для выделения плазмидной ДНК. В результате данных процедур был получен вирусный вектор Т-ВККТ-ГКСФ, содержащий полный геном ВККТ с геном рчГ-КСФ, помещенный под контроль сильного конститутивного промотора 35S вируса мозаики цветной капусты (CaMV), обеспечивающий экспрессию ВККТ-ГКСФ в растениях (рисунок 6а). Правильность собранной конструкции подтверждена рестрикционным анализом (рисунок 6б).



а – вирусный вектор Т-ВККТ-ГКСФ; б – М - маркёр длин фрагментов ДНК O'GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas); 1-2 – клоны плазмиды pRS2/G-CSF

Рис. 6. Вирусный вектор Т-ВККТ-ГКСФ, содержащий полный геном ВККТ с геном рчГ-КСФ, помещенный под контроль сильного конститутивного промотора CaMV 35S, обеспечивающий экспрессию ВККТ-ГКСФ в растениях

a – a viral vector T-TBSV-GCSF; b – M - DNA size marker O'GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas); 1-2 plasmid clones pRS2/G-CSF

Fig. 6. The viral vector T-TBSV-GCSF containing the complete TBSV genome with a gene rhG-CSF placed under the control of a strong constitutive CaMV 35S promoter, providing expression of TBSV-GCSF in plants

Инfiltrация растений с помощью суспензии штамма *Agrobacterium tumefaciens*, несущего рекомбинантную конструкцию T-TBSV-GCSF, в условиях *in planta*

Agrobacterium – опосредованная инfiltrация растений в условиях *in planta* является эффективным методом введения чужеродного гена в клетки растений для транзиторной экспрессии рекомбинантного белка. Метод простой, не требует дорогостоящего оборудования и может быть использован для экспрессии рекомбинантных белков в лабораторном масштабе. Инfiltrацию растений с помощью суспензии штамма *A. tumefaciens*, несущего рекомбинантную конструкцию T-TBSV-GCSF, проводили в условиях *in planta* (рисунок 7).



Рис. 7. Инfiltrация растений *N. benthamiana* с помощью суспензии *A. tumefaciens*, несущей рекомбинантную конструкцию T-TBSV-GCSF в условиях *in planta*

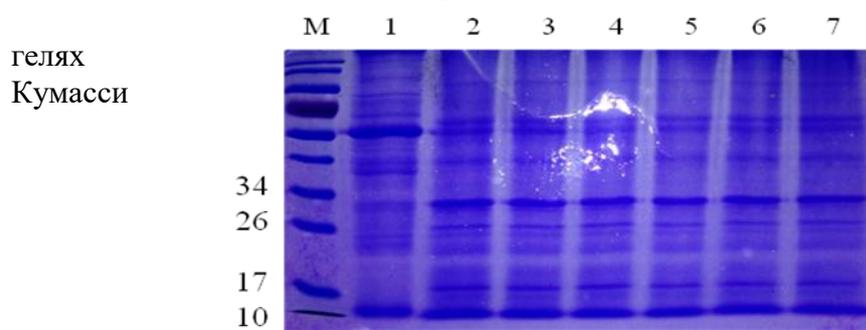
Fig. 7. Infection of *N.benthamiana* plants with *A. tumefaciens* suspension carrying a recombinant construct T-TBSV-GCSF under *in planta* condition

Выделение и очистка белка рГ-КСФ из растительного экстракта

Для выделения рекомбинантного белка из растений через 3 суток из зон агроинfiltrации отбирали пробы растительной ткани. Листовой материал (50 мг) растирали до образования однородной суспензии в экстракционном буфере H в охлажденной фарфоровой ступке. Полученную смесь центрифугировали при 14000 g в течение 45 минут и отбирали супернатант, в котором содержались растворимые белки. Для выделения рекомбинантного белка рГ-КСФ из нерастворимой фракции был использован буфер S.

Для оценки эффективности экспрессии гена рГ-КСФ измеряли содержание рекомбинантного цитокина при помощи белкового электрофореза и Вестерн-блот анализа. Растительные белковые экстракты были нанесены на полиакриламидный гель и окрашивание белков в

проведено красителем (рисунок 8).



М – маркер молекулярного веса, размеры полос указаны в килодальтонах; 1 – негативный контроль (белковый экстракт из здоровых растений); 2-7 – белковые экстракты, полученные из листьев *N. benthamiana*, инокулированные вирусом-вектором T-TBSV-GCSF

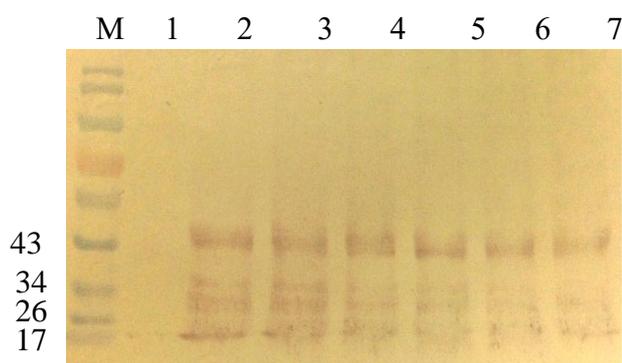
Рис. 8. Полиакриламидный гель, окрашенный Кумасси R-250

М – marker molecular weights, bands are indicated sizes in kilodaltons; 1-6 – protein extracts from *N. benthamiana* leaves, inoculated with viral vector T-TBSV-GCSF

Fig. 8. Polyacrylamide gel stained with Coomassie R-250

Экспрессия белка рчГ-КСФ была подтверждена Вестерн-блот анализом с помощью специфических моноклональных антител к гранулоцитарному колониестимулирующему фактору человека (рисунок 9). Полученные результаты продемонстрировали, что использованный протокол для выделения белка и апробированный нами метод количественной оценки эффективности экспрессии, основанный на использовании агроинфильтрации листьев *N. benthamiana*, позволяет с высокой достоверностью предсказать эффективность систем транзientной экспрессии гетерологичного гена в растениях при использовании вирусного вектора на основе ВККТ. Дополнительные полосы с молекулярной массой около 26-43 кДа, окрашиваемые антителами к hG-CSF, представляют собой, по-видимому, высокомолекулярные олигомеры рекомбинантного белка.

Очистку белка рчГ-КСФ осуществляли вручную, линейным градиентом имидазола.



М – маркер молекулярных масс; 1 – негативный контроль (белковый экстракт из здоровых растений); 2-7 – белковые экстракты, полученные из листьев *N. benthamiana*, инокулированные вирусом-вектором T-TBSV-GCSF

Рис. 9. Вестерн-блот анализ с помощью специфических моноклональных антител к гранулоцитарному колониестимулирующему фактору человека

M – molecular weight marker; 1 – negative control (proteins extracted from noninfected plants); 2-7 – proteins extracted from *N. benthamiana* leaves inoculated with viral vector T-TBSV-GCSF

Fig. 9. Western blot analysis with monoclonal antibodies specific for human granulocyte colony stimulating factor

Определение концентрации белка методом Лоури. Для построения калибровочной кривой использовали стандартный белок (Protein standart, Fluka-P5619, Sigma) с известной концентрацией. Исходя из полученных данных, построили калибровочную кривую для стандартного белка.

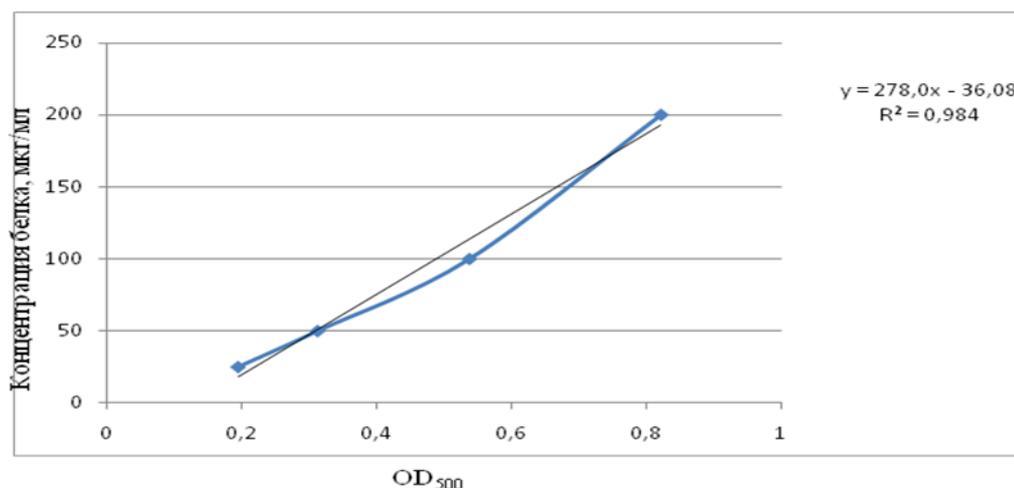


Рис. 10. Калибровочная кривая для стандартного белка

Fig. 10. The calibration curve depicting signal intensity on the concentration of the standard protein

Данные, приведенные в таблице 2, свидетельствуют, что концентрация собранного белка рГ-КСФ, измеренная по методу Лоури, варьирует от 83,8 до 810,7 мкг. Наибольший выход рекомбинантного белка отмечен при концентрации имидазола 75 мМ.

Таблица 2. Измерение концентрации белка рГ-КСФ, собранного в линейном градиенте имидазола

Table 2. Measurement of rhG-CSF concentration that is obtained with a linear imidazole gradient

Концентрация имидазола, mM Concentration of imidazole, mM	Оптическая плотность Optical density	Концентрация белка, мкг/мл Protein concentration, μg/ml
25	0,175	83,8
50	0,414	527,0
75	0,567	810,7
100	0,424	545,5
200	0,335	380,5
300	0,236	196,9

Далее фракции, содержащие рГ-КСФ, объединяли и диализовали против натрий-фосфатного буфера (рН 7,4), полученный препарат белка использовали для дальнейшего анализа.

Определение концентрации рчГ-КСФ иммуноферментным методом проводили в иммунологических планшетах на наборе Elisa kit Human G-CSF (Invitrogen, США). Все необходимые реагенты поставляются в составе набора, концентрацию белка рчГ-КСФ определяли по прописи производителя.

Таблица 3. Определение концентрации белка рчГ-КСФ иммуноферментным методом

Table 3. Determination rhG-CSF concentration using ELISA

Лунка Hole	Оптическая плотность Optical density	Концентрация рчГ-КСФ (пг/мл) Concentration of rhG-CSF (pg/ml)	Концентрация имидазола, мМ Concentration of imidazole, mM
A1	1.523	2500.000	стандарт
B1	0.958	1250.000	стандарт
C1	0.535	625.000	стандарт
D1	0.353	312.000	стандарт
E1	0.280	156.000	стандарт
A9	0.215	17.096	супернатант
C9	0.266	126.082	25
D9	0.418	423.786	50
E9	0.639	778.664	75
F9	1.029	1407.080	100
G9	0.488	544.170	200
H9	0.458	492.577	300

Полученные препараты белка замораживали при -70°C и использовали для изучения биологической активности рекомбинантного белка Г-КСФ человека.

ВЫВОДЫ

Растительные системы имеют большой потенциал для продукции рекомбинантных белков. Такие белки применяют в клинической медицине, с их помощью создают новые препараты, они являются компонентами наночастиц различного назначения. Эффективный синтез рекомбинантных белков зависит не только от используемых систем экспрессии, но и от конструкции экспрессирующего вектора и от метода введения рекомбинантных ДНК в клетки. В связи с этим являлось интересным изучение генома (ВККТ) в качестве автономно реплицирующегося вектора для создания генно-инженерных конструкций, обеспечивающих транзистентную экспрессию целевых белков в растениях.

Для получения генно-инженерной конструкции проведен дизайн вирусного генома ВККТ и получен ген рекомбинантного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека (рчГ-КСФ), кодон оптимизированный для экспрессии в клетках растений *N. benthamiana*, длиной 574 пар нуклеотидов. Полученный ген рчГ-КСФ клонирован в вирусный вектор Т-ВККТ, под контролем сильного конститутивного промотора 35S вируса мозаики цветной капусты (CaMV), обеспечивающего экспрессию ВККТ-ГКСФ в растениях. Правильность собранной конструкции подтверждена рестрикционным анализом. Разработана система транзистентной экспрессии рчГ-КСФ в растениях *in planta* при помощи рекомбинантной конструкции Т-TBSV-GCSF, созданной на основе генома ВККТ, с помощью инфицирования растений методом агроинфильтрации. Белковый состав растительных экстрактов изучен методом

электрофоретического разделения белков в ПААГ и экспрессия белка рГ-КСФ подтверждена Вестерн-блот анализом с помощью специфических моноклональных антител к гранулоцитарному колониестимулирующему фактору.

Таким образом, в результате проделанной работы разработана технология транзientной экспрессии целевого белка рГ-КСФ в растениях при помощи рекомбинантной конструкции Т-TBSV-GCSF, созданной на основе генома ВККТ, с помощью *Agrobacterium* – опосредованной инфильтрации растений *N. benthamiana*. При этом была достигнута интеграция вирусной РНК в растительные клетки и транзientная экспрессия белка рГ-КСФ *in planta*, обеспечивающая достаточно высокий уровень синтеза – 250 мг/кг листьев. Разработанная технология позволяет получить рекомбинантный белок высокой чистоты, что подтверждает наличие широких перспектив использования вирусной системы, основанной на геноме ВККТ, для экспрессии генов различных фармацевтических белков в растениях.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках гранта 0807/ГФ «Разработка технологии транзientной продукции целевых белков в растениях» на 2012-2014 годы по бюджетной программе 055, финансируемый Комитетом науки Министерства образования и науки Республики Казахстан

ЛИТЕРАТУРА

1. Gleba Y., Klimyuk V., Marillonnet S. Viral vectors for the expression of proteins in plants // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2007. – Vol. 18. – P. 134-141.
2. Scholthof H.B., Scholthof K-B.G. Plant virus gene vectors for transient expression of foreign proteins in plants // *Annual Review of Phytopathology*. – 1996. – Vol. 34. – P. 299-323.
3. Scholthof K.B., Mirkov T.E., Scholthof H.B. Plant virus gene vectors: biotechnology applications in agriculture and medicine // *Genetic Engineering (NY)*. – 2002. – Vol. 24. – P. 67-85.
4. Nagata S. Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor // *Nature*. – 1986. – Vol. 319. – P. 415-418.
5. Komatsu Y., Matsumoto T. et al. Cloning of granulocyte colony-stimulating factor cDNA from human macrophages and its expression in *Escherichia coli* // *Japanese journal of cancer research*. – 1987. – Vol. 78. – P. 1179-1181.
6. Anaissie E., Vartivarian S., Bodey G.P. et al. Randomized comparison between antibiotics alone and antibiotics plus granulocyte macrophage colony stimulating factor (*E. coli* derived) in cancer patients with neutropenia // *Amer. J. Med.* – 1996. – Vol. 100. – P. 17-23.
7. Molineux G. Pegfilgrastim: using pegylation technology to improve neutropenia support in cancer patients // *Anti-cancer drugs*. – 2003. – №14(4). – P. 259-264.
8. Welte K., Platzer E. et al. Purification and biochemical characterization of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1985. – Vol. 82. – P. 1526-1530.
9. Hartung T., Docke W.D., Gantner F., Krieger G., Sauer A., Stevens P., Volk H.D., Wendel A. Effect of granulocyte colony-stimulating factor treatment on ex vivo blood cytokine response in human volunteers // *Blood*. – 1995. – Vol. 85. – P. 2482-2489.
10. Voinnet O., Rivas S., Mestre P., Baulcombe D. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus // *The Plant Journal*. – 2003. – Vol. 33. – P. 949-956.

11. Arzola L., Chen J., Rattanaporn K., Maclean J. M., McDonald K. A. Transient co-expression of post-transcriptional gene silencing suppressors for increased in planta expression of a recombinant anthrax receptor fusion protein // *Int. J. Mol. Sci.* – 2011. – Vol. 12. – P. 4975-4990.

12. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193. – P. 265-275.

13. Scholthof H.B., Morris T.J., Jacson A.O. The capsid protein gene of Tomato bushy stunt virus is dispensable for systemic movement and can be replaced for localized expression of foreign genes // *Molecular plant – microbe interactions.* – 1993. – Vol. 6. – P. 309-322.

14. Scholthof H.B., Scholthof K-B.G. Plant virus gene vectors for transient expression of foreign proteins in plants // *Annu. Rev. of Phytopathol.* – 1996. – Vol. 34. – P. 299-323.

15. Qiu W., Scholthof H.B. Effects of inactivation of the coat protein and movement genes of Tomato bushy stunt virus on early accumulation of genomic and subgenomic RNAs // *Journal of General Virology.* – 2001. – Vol. 82. – P. 3107-3114.

16. Каиржанова А.Д., Абекова А.О., Манабаева Ш.А. Получение вирусного вектора на основе генома вируса кустистой карликовости томатов, обеспечивающий транзистентную экспрессию GFP в клетках растений // *Актуальные вопросы современной науки: материалы VI Международной научной конференции.* – СПб., 2013. – С. 55-61.

REFERENCES

1. Gleba Y., Klimyuk V., Marillonnet S. Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 2007, vol. 18, pp. 134-141. <http://doi:10.1016/j.copbio.2007.03.002>, PMID: 17368018.

2. Scholthof H.B., Scholthof K-B.G. Plant virus gene vectors for transient expression of foreign proteins in plants. *Annual Review of Phytopathology*, 1996, vol. 34, pp. 299-323. <http://doi:10.1146/annurev.phyto.34.1.299>.

3. Scholthof K.B., Mirkov T.E., Scholthof H.B. Plant virus gene vectors: biotechnology applications in agriculture and medicine. *Genetic Engineering (NY)*, 2002, vol. 24, pp. 67-85. PMID: 12416301.

4. Welte K., Platzer E et al. Purification and biochemical characterization of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, pp. 1526-1530.

5. Hartung T., Docke W.D., Gantner F., Krieger G., Sauer A., Stevens P., Volk H.D., Wendel A. Effect of granulocyte colony-stimulating factor treatment on ex vivo blood cytokine response in human volunteers. *Blood*, 1995, vol. 85, pp. 2482-2489. PMID:7537116.

6. Nagata S. Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colonystimulating factor. *Nature*, 1986, vol. 319, pp. 415-418.

7. Komatsu Y., Matsumoto T. et al. Cloning of granulocyte colony-stimulating factor cDNA from human macrophages and its expression in Escherichia coli. *Japanese journal of cancer research*, 1987, vol. 78, pp. 1179-1181.

8. Anaissie E., Vartivarian S., Bodey G.P. et al. Randomized comparison between antibiotics alone and antibiotics plus granulocyte macrophage colony stimulating factor (E. coli derived) in cancer patients with neutropenia. *Amer. J. Med.*, 1996, vol. 100, pp. 17-23.

9. Molineux G. Pegfilgrastim: using pegylation technology to improve neutropenia support in cancer patients. *Anti-cancer drugs*, 2003, vol. №14(4), pp. 259-264. <http://doi:10.1097/00001813-200304000-00002>, PMID: 12679729.

10. Voinnet O., Rivas S., Mestre P., Baulcombe D. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus.

The Plant Journal, 2003, vol. 33, pp. 949-956. <http://doi:10.1046/j.1365-313X.2003.01676.x>, PMID:12609035.

11. Arzola L., Chen J., Rattanaporn K., Maclean J.M., McDonald K.A. Transient co-expression of post-transcriptional gene silencing suppressors for increased in planta expression of a recombinant anthrax receptor fusion protein. *Int. J. Mol. Sci.*, 2011, vol. 12, pp. 4975-4990. <http://doi:10.3390/ijms12084975>.

12. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, vol. 193, pp. 265-275. PMID:14907713.

13. Scholthof H.B., Morris T.J., Jacson A.O. The capsid protein gene of Tomato bushy stunt virus is dispensable for systemic movement and can be replaced for localized expression of foreign genes. *Molecular plant – microbe interactions.*, 1993, vol. 6, pp. 309-322.

14. Scholthof H.B., Scholthof K-B.G. Plant virus gene vectors for transient expression of foreign proteins in plants. *Annu. Rev. of Phytopathol.*, 1996, vol. 34, pp. 299-323.

15. Qiu W., Scholthof H.B. Effects of inactivation of the coat protein and movement genes of Tomato bushy stunt virus on early accumulation of genomic and subgenomic RNAs. *Journal of General Virology*, 2001, vol. 82, pp. 3107-3114.

16. Kairzhanova A.D., Abekova A.O., Manabaeva Sh.A. Poluchenie virusnogo vektora na osnove genoma virusa kustistoj karlikovosti tomatov, obespechivajushhij tranzientnuju jekspressiju GFP v kletkah rastenij [Preparation of viral-based vector genome of tomato bushy stunt virus providing transient GFP expression in plant cells]. *Aktual'nye voprosy sovremennoj nauki: Materialy VI Mezhdunarodnoj nauchnoj konferencii* [«Actual problems of modern science»: Proceedings of the VI International Scientific Conference]. Saint-Petersburg, Russia, 2013, pp 55-61.

ҚЫЗАНАҚТАРДЫҢ ШОҚ ТҮПТІ ЕРГЕЖЕЙЛІК ВИРУСЫНЫҢ ГЕНОМЫ НЕГІЗІНДЕ ЖАСАЛҒАН ВИРУСТЫ ВЕКТОРДЫҢ КӨМЕГІМЕН *NICOTIANA BENTHAMIANA* ӨСІМДІКТЕРІНДЕГІ АДАМНЫҢ РЕКОМБИНАНТТЫ Г-КСФ ТРАНЗИЕНТТІ ЭКСПРЕССИЯСЫ

Әбеуова Л.С.¹, Шолтхоф Г.Б.², Раманқұлов Е.М.¹, Манабаева Ш.А.¹

¹Ұлттық биотехнология орталығы

Уәлиханов к-сі, 13/1, Астана, 010000, Қазақстан

²Техас Университеті, Өсімдіктердің патологиясы және микробиологиясы департаменты

2132 TAMU, Колледж Стейшен, TX 77843, АҚШ

manabayeva@biocenter.kz

АБСТРАКТ

Рекомбинантты ақуыздар алу үшін биофабрикалар ретінде өсімдіктерді пайдалану әдеттегі сүтқоректілер мен бактериялардың жасушалары негізінде пайдаланылатын кертартпалық жүйелермен салыстырғанда бірқатар артықшылықтарға ие. Өсімдіктер жасушаларындағы бөгде ақуыздар вирустық векторлардың көмегімен трансформация немесе транзистентті экспрессия арқылы алынуы мүмкін.

Зерттеудің мақсаты өсімдіктердегі рчг-КСФ мақсатты ақуызының транзистентті экспрессиясы үшін *Қызанақтардың шоқ түпті ергежейлік вирусы* (ҚШЕВ) геномының негізінде экспрессиялық жүйе құру болды. ҚШЕВ геномында ингибициялаушы гендердің

посттранскрипциялық үнсіздігін тежейтін және вирустық РНҚ-да әрбір ген үшін (соның ішінде гетерологиялықтардың) экспрессия деңгейін арттыратын р19 ақуыз генінің болуы осы векторлық жүйенің елеулі артықшылығы болып табылады. *Nicotiana benthamiana* өсімдіктеріндегі адамның Г-КСФ-ын кодтайтын, рекомбинантты геннің тиімді экспрессиясы үшін осы векторлық жүйенің әлеуетін бағаланды. Бұл үшін *Түрлі түсті қырыққабаттың мозаикасы вирусының* 35S күшті конститутивтік промоторының бақылауымен Т-ҚШЕВ вирустық векторын әзірленді. Бұл векторда капсидтік ақуызды кодтайтын ген ПТР әдісімен синтезделген, адам Г-КСФ-ы оңтайландырылған ген (ұзындығы 174 а.о. ген) кодонына алмастырылған. Вирустық векторды жұқтыру үшін 4-5 апталық *N. Benthamiana* өсімдіктері агроинфльтрациядан өткізілді. Алынған нәтижелер өсімдіктердегі әр түрлі фармацевтикалық ақуыздар гендерінің экспрессиясы үшін ҚШЕВ геномы негізінде жасалған вирустық жүйені пайдаланудың болашағы зор екендігін дәлелдейді.

Негізгі сөздер: вирустық вектор, *Қызанақтардың шоқ түпті ергежейлік вирусы*, адамның гранулоцитарлық колонияынталандырушы факторы, транзиентті экспрессия, рекомбинантты ақуыз.