

УДК 578.2

НОВЫЙ ФИТОВИРУСНЫЙ ВЕКТОР ДЛЯ СУПЕРЭКСПРЕССИИ ЦЕЛЕВЫХ БЕЛКОВ В РАСТЕНИИ

Е.В. Путляев, А.А. Смирнов, Е.А. Лазарева, Г.В. Клинка,
О.В. Карпова, И.Г. Атабеков

(кафедра вирусологии; e-mail: putlegor@mail.ru)

Ранее нами был получен новый вирусный вектор на основе генома вируса мозаики альтернантеры штамма MU, ген целевого белка в составе которого находился под контролем двух субгеномных промоторов. Вирусный вектор обеспечивал суперэкспрессию белка оболочки и ряда целевых белков медицинского назначения в листьях *Nicotiana benthamiana*. В настоящей работе с целью увеличения продукции целевого белка вирусный вектор был модифицирован и ген белка оболочки поставлен под контроль трех субгеномных промоторов. Полученный вирусный вектор (AltMV triple1) также обеспечивал суперэкспрессию целевого белка в агротрансформированных листьях. Содержание целевого белка составляло более 50% от всего растворимого белка клетки. Проведено сравнение эффективности экспрессии целевого белка в листьях *Nicotiana benthamiana*, трансформированных вирусными векторами, содержащими два и три субгеномных промотора потексвирусов.

Ключевые слова: вирусы растений, растительный вирусный вектор, субгеномный промотор.

Современная медицина все шире использует фармакологические препараты на основе рекомбинантных белков [1]. Так, основным компонентом различных вакцин являются иммуногенные белки патогенов человека. Кроме того, для лечения многих заболеваний используются физиологически активные белки — цитокины, гормоны, ферменты и т.д. [1]. Таким образом, современная биотехнологическая промышленность нуждается в эффективном и низком по себестоимости методе производства различных рекомбинантных белков.

По сравнению с другими подходами накопление целевых рекомбинантных белков в растениях имеет ряд существенных преимуществ [2]: растения не требуют сложного оборудования для культивирования и поддержания стерильности, что значительно снижает затраты на производство; растения не имеют общих с человеком патогенов, что обеспечивает высокую биобезопасность конечного продукта и производственного процесса; растения могут обеспечить высокий уровень накопления целевого белка.

Для экспрессии различных целевых белков в растениях чаще всего используют вирусные векторы на основе геномов вирусов растений. Таким образом, создание новых эффективных растительных вирусных векторов является актуальной задачей современной биотехнологии [3].

Целью данной работы было создание нового вирусного вектора на основе генома вируса мозаики альтернантеры для суперэкспрессии целевых белков в растениях.

Материалы и методы

В данной работе использовались штаммы *Escherichia coli* XL-1 Blue (Stratagene, USA) и *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 из коллекции кафедры вирусологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. ДНК-олигонуклеотиды были синтезированы фирмой “Синтол” (Россия). Клонирование рекомбинантной ДНК в клетках *Escherichia coli* XL-1 Blue проводилось с помощью стандартных методов [4]. В работе использовались эндонуклеазы рестрикции фирмы “Сибэнзим” (Россия), ДНК лигаза фага T4 фирмы “Ферментас” (Литва) и наборы реактивов Encyclo PCR kit и Mint universal cDNA synthesis kit фирмы “Евроген” (Россия).

Получение вирусных векторов. Для получения конструкции p(AltMV-triple1) были проведены две ПЦР на матрице p(AltMV-double) с парами праймеров Al2019 (caccagagaccatcagggctct)/Al2022(agaatctgcagaatttgcggagag) и Al2012(gagagagagcttcaggatgattgagcag)/Al2023(gagccctgatggctctctgggtgatgacttttaactaagataagactagg). Полученные продукты (PCR1 и PCR2 соответственно) были слиты в ходе ПЦР с частичным перекрытием матриц с праймерами Al2012/Al2022. Полученный продукт был клонирован в p(AltMV-double) по сайтам узнавания эндонуклеазами рестрикции ApaI и SpeI.

Для получения конструкции p(AltMV-triple2) была проведена ПЦР на матрице p(AltMV-double) с парой праймеров Al2012/Al2025 (gtatcaatggaaactaacgggttcagagggttaataaagtgattcgtctttggg). Полученный продукт (PCR3) использовался в качестве матрицы для ПЦР с парой праймеров Al2012/Al2026 (tgctagctgggtgct gacgtcttcgagatcaatggaaactaacgggttc). Продукт реакции (PCR4) ис-

пользовался в качестве матрицы для ПЦР с парой праймеров Al2012/Al2027 (gagccctgatggtctctggtgtgtagctggtgctgacgtctttcg). Полученный продукт (PCR5) был слит с PCR1 с помощью ПЦР с частичным перекрытием матриц с парой праймеров Al2012/Al2022. Итоговый продукт был клонирован в р(AltMV-double) по сайтам узнавания эндонуклеаз рестрикции AраI и SpeI. Структура полученных плазмид была проверена с помощью рестрикционного анализа и секвенирования (Евроген).

Агроинъекция листьев *Nicotiana benthamiana*. Агроинъекцию вирусных векторов в листья *Nicotiana benthamiana* проводили, как описано в работе [5].

Анализ накопления белка оболочки (БО) AltMV-MU в листьях *Nicotiana benthamiana*. На 12-й день после инфильтрации (д.п.и.) листовой материал гомогенизировали в трех объемах 10 мМ Трис-НСl буфера с рН 8,0. Полученный образец центрифугировали при 16 000 g 15 мин при 40°C. К супернатанту (S16 фракция) добавляли равный объем буфера нанесения (200 мМ Трис-НСl с рН 6,8; 8% додецилсульфата натрия; 40% глицерина; 20% β-меркаптоэтанола; 1% бромфенолового синего). Полученный образец прогревали при 95°C 15 мин и анализировали методом электрофореза в градиентном (8—20%) полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-ПААГ). Окрашивали с помощью Ку-массы G-250.

Получение вирусоподобных частиц. На 12 д.п.и. трансформированные вирусным вектором листья гомогенизировали в трех объемах 10 мМ Трис-НСl буфера с рН 8,0. Полученный образец центрифугировали при 16 000 g 15 мин при +4°C. К супернатанту добавляли 20 мМ цитратный буфер с рН 4,0, доводя до концентрации 10 мМ, после чего выдерживали 40 мин при 0°C, далее еще 40 мин при комнатной температуре. Затем добавляли раствор I (20 мМ цитратный буфер с рН 4,0; 20%-й полиэтиленгликоль 6000 (ПЭГ); 5%-й NaCl), доводя до 8% ПЭГ и 2% NaCl. Далее образец выдерживали 15 ч при +5°C, после чего центрифугировали при 16 000 g 15 мин при +5°C. Полученный осадок ресуспендировали в 20 мМ цитратном буфере с рН 4,0. Далее центрифугировали при 16 000 g 15 мин при +5°C. Полученный супернатант анализировали методом просвечивающей электронной микроскопии.

Просвечивающая электронная микроскопия. Исследование препаратов вирусоподобных частиц методом просвечивающей электронной микроскопии проводили, как описано в работе [6].

5'-RACE ОТ-ПЦР. Образование субгеномных РНК при экспрессии вирусного вектора в трансформированных листьях исследовали с помощью метода 5'-RACE ОТ-ПЦР. РНК из трансформированных вирусным вектором листьев (3 д.п.и.) выделяли с помощью реактива "TRI REAGENT" (Molecular research center) по методике производителя. Для получения кДНК копий субгеномных РНК вирусных векторов

выделенную РНК исследовали методом 5'-RACE ОТ-ПЦР с помощью набора реактивов Mint universal cDNA synthesis kit (Евроген) по методике производителя с небольшими изменениями. Так, для синтеза первой цепи кДНК использовали праймер AltMVC-Prev (tgtgtcgactcagtgatggtgatggtgatgctccggtggaggattga), комплементарный последовательности 3'-концевой части гена БО AltMV-MU. Для амплификации двухцепочечной кДНК использовали праймеры AltMV CPrev и "ПЦР праймер М1" (Евроген). Далее продукты 5'-RACE ОТ-ПЦР исследовали методом электрофореза в агарозном геле и определяли их первичную структуру.

Результаты и обсуждение

Вирус мозаики альтернантеры (AltMV, ВМАльт) относится к роду *Potexvirus* [7]. Геном вируса состоит из одной молекулы РНК положительной полярности (6606 нт длиной), несущей гены 5 белков — РНК-зависимой РНК-полимеразы, транспортных белков 1, 2, 3 и белка оболочки [8]. В нашей лаборатории был описан новый штамм вируса мозаики альтернантеры AltMV-MU (GeneBank FJ822136.1) [8] (рис. 1, А). Было показано, что выделенный из препарата AltMV-MU БО способен образовывать ВПЧ in vitro в отсутствие вирусной РНК [6].

Ранее нами был получен вирусный вектор (AltMV-double) на основе кДНК-копии геномной РНК AltMV-MU, лишенной тройного блока генов. Ген белка оболочки в составе AltMV-double находился под контролем двух субгеномных промоторов (сгп1 и 3) вируса мозаики альтернантеры. Это первый случай использования двух субгеномных промоторов для контроля одного гена в растительных вирусных векторах. AltMV-double обеспечивал эффективную экспрессию БО AltMV-MU и различных белков медицинского

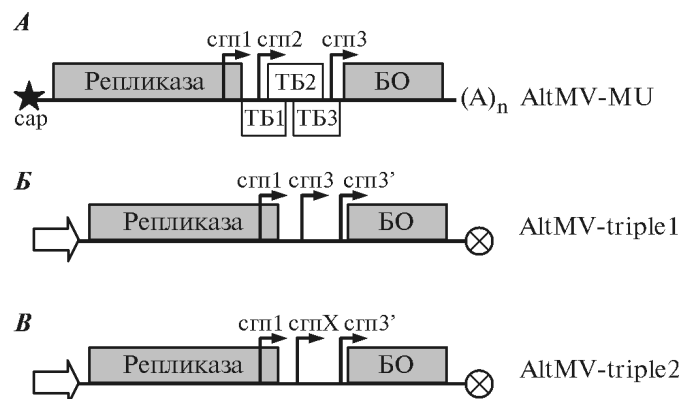


Рис. 1. Схема генома AltMV-MU и созданных на его основе вирусных векторов: А — геном AltMV-MU; Б — AltMV-triple1; В — AltMV-triple2.

ТБ 1, 2, 3 — гены трех транспортных белков; БО — ген белка оболочки; сгп1,2 — вероятное местоположение субгеномных промоторов 1 и 2 соответственно; сгп3,X — субгеномные промоторы 3 AltMV [14] и ХВК [11] соответственно; — 35S промотор вируса мозаики цветной капусты; ⊗ — терминатор гена нопалинсинтазы; (A)_n — поли(А) последовательность

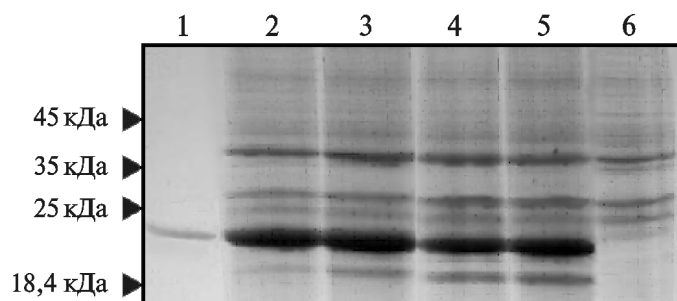


Рис. 2. Изучение экспрессии БО AltMV-MU в листьях *N. benthamiana*, агроинъецированных AltMV-triple1,2 и AltMV-double: 1 — 1 мкг БО AltMV-MU; S16-фракции, выделенные из разных половинок одного листа агроинокулированного: 2 и 3 — AltMV-double и AltMV-triple1 соответственно, 4 и 5 — AltMV-double и AltMV-triple2 соответственно, 6 — только р19. Положение маркеров молекулярной массы показано стрелками. Электрофорез в 8–20% ДСН ПААГ. Окраска Кумасси G-250

назначения в трансформированных листьях *Nicotiana benthamiana*.

В данной работе с целью дальнейшего увеличения уровня продукции целевых белков в растениях AltMV-double был модифицирован. Получен новый вирусный вектор (AltMV-triple1) на основе кДНК-копии геномной РНК AltMV-MU, лишенной тройного блока генов (рис. 1, Б). Для увеличения уровня экспрессии ген белка оболочки в составе AltMV-triple 1 находился под контролем трех субгеномных промоторов (сгп1 и двух сгп3). Аналогично AltMV-double данная конструкция была клонирована в бинарный вектор pCambia1300(CAMBIA) под контроль 35S промотора вируса мозаики цветной капусты и терминатора гена нопалин-синтазы (nos-терминатор). AltMV-triple1 был агроинъецирован в листья растения *Nicotiana benthamiana*. Для увеличения уровня накопления целевого белка все агроинъекции проводились в присутствии рекомбинантной агробактерии, несущей ген р19-супрессор умолкания генов вируса кустистой карликовости томатов [9]. Результаты исследования S16 фракции, выделенной из листьев трансформированных AltMV-triple1 (рис. 2, дорожка 3), свидетельствуют об эффективном накоплении БО ВМАлт. Количество целевого белка составляло более 50% от всех растворимых белков клетки (определяли, как описано в работе [3]).

Однако уровни экспрессии БО AltMV-MU в агроинъецированных AltMV-triple1 и AltMV-double листьях *Nicotiana benthamiana* близки (рис. 2, дорожки 3, 2). Таким образом, добавление третьего субгеномного промотора в состав вирусного вектора не привело к существенному увеличению уровня экспрессии целевого белка.

Из литературных данных известно, что повторяющиеся последовательности геномов вирусных векторов могут выщепляться вследствие репликативной рекомбинации [10]. Данный факт может быть причиной отсутствия значительного увеличения эффективности экспрессии БО AltMV-MU в транс-

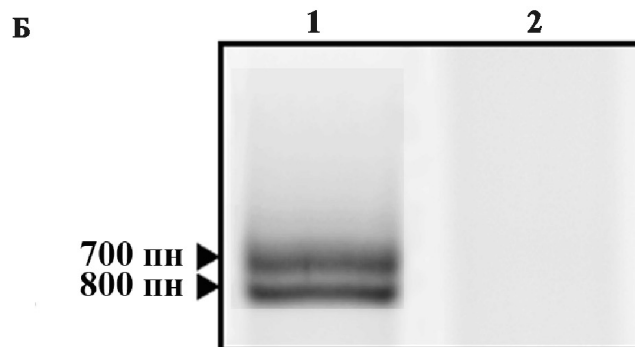
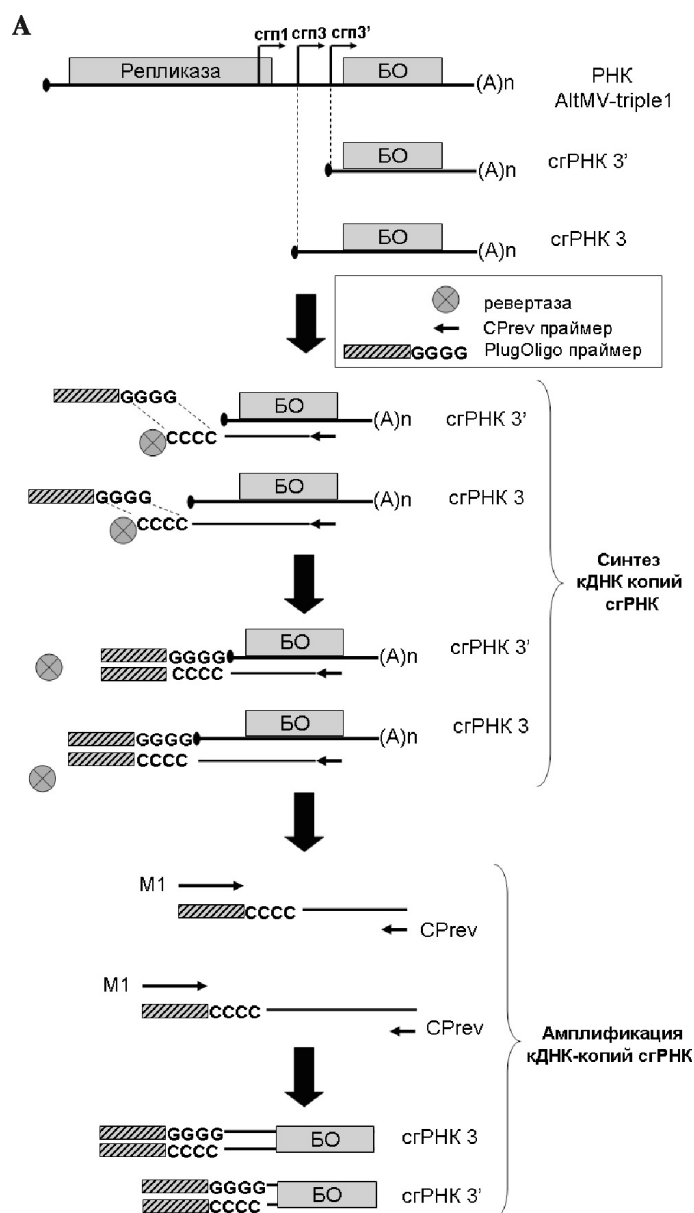


Рис. 3. Анализ crPHK, синтезируемых AltMV-triple1 в листьях *N. benthamiana*, методом 5'-RACE ОТ-ПЦР:

А — схема эксперимента, Б — анализ продуктов 5'-RACE ОТ-ПЦР. Исследовали РНК, выделенную из листьев агроинъецированных: 1 — AltMV-triple1, 2 — только р19.

Положение маркеров молекулярной массы указано стрелками. Электрофорез в 1%-м агарозном геле. Окраска бромидом этидия

формированных AltMV-triple1 листьях по сравнению с AltMV-double. Для проверки этой гипотезы один из сгп3 AltMV-triple1 был заменен на гетерологичный сгп3 X-вируса картофеля (ХВК) [11]. Идентичность последовательностей сгп3 AltMV-MU и ХВК составляла 30,2%, что уменьшало вероятность их рекомбинационного выщепления. Полученный вирусный вектор был назван AltMV-triple2 (рис. 1, *В*). Исследование S16 фракции агроинъецированных AltMV-triple2 листьев *Nicotiana benthamiana* методом электрофореза ДСН-ПААГ показало эффективное накопление БО AltMV-MU (рис. 2, дорожка 5). Однако уровни экспрессии БО AltMV-MU в трансформированных AltMV-double и AltMV-triple2 листьях были близки (рис. 2, дорожки 4, 5).

Для того чтобы выяснить, все ли сгп в составе вирусного вектора обеспечивают инициацию транскрипции, были исследованы состав и первичная структура субгеномных (сг) РНК, образующихся в зараженных AltMV-triple1 листьях. Для этого выделенную из трансформированных листьев РНК анализировали методом 5'-RACE ОТ-ПЦР (быстрая амплификация 5'-концов кДНК с помощью обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции) (схема представлена на рис. 3, *А*). Исследование методом электрофореза в агарозном геле позволило детектировать два продукта 5'-RACE ОТ-ПЦР, соответствующих исходя из электрофоретической подвижности сгРНК 3 и 3' AltMV-triple1 (рис. 3, *Б*, дорожка 1). Анализ нуклеотидной последовательности полученных фрагментов ДНК подтвердил этот вывод (данные не представлены). Продукт, соответствующий сгРНК1, зафиксировать не удалось. Это свидетельствует о том, что эффективность накопления сгРНК1 в трансформированных вирусным вектором листьях значительно ниже, чем сгРНК3 и 3'. Исходя из полученных данных можно сделать вывод, что сгп3 и 3' обес-

печивают синтез субгеномных РНК при экспрессии AltMV-triple1. Представленные данные также свидетельствуют об отсутствии эффективного рекомбинационного выщепления повторяющихся сгп3 и 3' при экспрессии AltMV-triple1 в листьях *Nicotiana benthamiana*.

Таким образом, добавление третьего субгеномного промотора в состав AltMV-triple1 не привело к существенному увеличению уровня экспрессии БО AltMV-MU. Причиной такого эффекта может являться низкий уровень накопления сгРНК1 при экспрессии вирусного вектора в листьях *Nicotiana benthamiana*.

Вирусоподобные частицы (ВПЧ), образованные белками оболочки различных растительных вирусов, широко используются в современной биотехнологии [12]. Так, одним из перспективных подходов для производства вакцин является создание ВПЧ, несущих на своей поверхности антигенные детерминанты различных патогенов [13]. Подобные вакцинные препараты отличается высокая иммуногенность и биобезопасность.

На следующем этапе работы была изучена возможность образования ВПЧ в экстрактах трансформированных AltMV-triple1 листьев *Nicotiana benthamiana*. Препараты выделенных ВПЧ исследовали методом просвечивающей электронной микроскопии. Исходя из полученных результатов (рис. 4, *А*) можно сделать вывод, что количество экспрессированного AltMV-triple1 БО AltMV-MU достаточно для эффективного образования ВПЧ. Полученные ВПЧ близки по морфологии к нативным вирионам AltMV-MU (рис. 4, *А*, *Б*). Таким образом, AltMV-triple1 может быть использован для накопления целевых белков в растении и получения ВПЧ, активно применяющихся в современной нанобиотехнологии для разработки новых вакцин и наноматериалов.

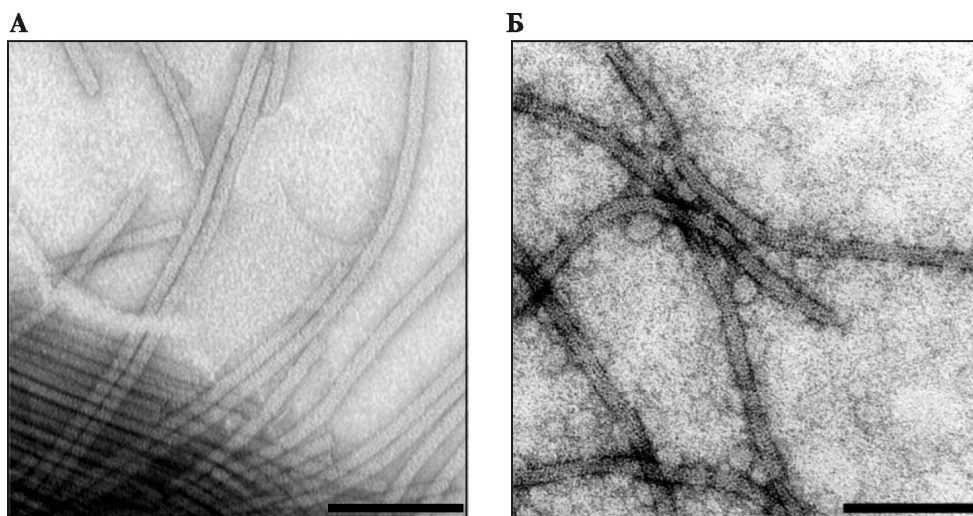


Рис. 4. Исследование методом просвечивающей электронной микроскопии:

А — ВПЧ образованных БО AltMV-MU экспрессированным AltMV-triple1 в листьях *N. benthamiana*; *Б* — нативных вирионов AltMV-MU. Масштабная линейка 100 нм. Образцы контрастированы 2%-м уранилацетатом

Выводы

1. Получен новый вирусный вектор на основе генома вируса мозаики альтернантеры штамм МУ. Целевой ген в составе вирусного вектора находился под контролем трех субгеномных промоторов. Это первый случай использования трех субгеномных промоторов для экспрессии одного гена в растительных вирусных векторах.

2. Вирусный вектор обеспечивал суперэкспрессию белка оболочки вируса мозаики альтернантеры в листьях *Nicotiana benthamiana*. Количество образующегося белка было достаточным для эффективного образования ВПЧ.

3. Добавление третьего субгеномного промотора, контролирующего целевой ген, в состав вирус-

ного вектора не привело к существенному увеличению уровня экспрессии целевого белка. Показано, что эффективность накопления субгеномной РНК 1 вирусного вектора в трансформированных листьях *Nicotiana benthamiana* значительно ниже, чем субгеномных РНК3 и 3'.

* * *

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (номер проекта мол_а_вед 12-04-33228) и Федеральной целевой программы “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” (соглашение 8564).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Crommelin D.J., Storm G., Verrijk R., Leede L., Jiskoot W., Hennink W.E. Shifting paradigms: biopharmaceuticals versus low molecular weight drugs // Inter. J. Pharm. 2003. Vol. 266. N 1—2. P. 3—16.
2. Lico C., Chen Q., Santi L. Viral vectors for production of recombinant proteins in plants // J. Cell Physiol. 2008. Vol. 216. N 2. P. 366—377.
3. Gleba Y., Klimyuk V., Marillonnet S. Viral vectors for the expression of proteins in plants // Curr. Opin. Biotechnol. 2007. Vol. 18. N 2. P. 134—141.
4. Sambrook J., Russel D. Molecular cloning: A laboratory manual. N.Y.: CSHL Press, 2001.
5. Zvereva A.S., Petrovskaya L.E., Rodina A.V., Frolova O.Y., Ivanov P.A., Shingarova L.N., Komarova T.V., Dorokhov Y.L., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P., Atabekov J.G. Production of biologically active human myelocytokines in plants // Biochemistry (Mosc). 2009. Vol. 74. N 11. P. 1187—1194.
6. Mukhamedzhanova A.A., Smirnov A.A., Arkhipenko M.V., Ivanov P.A., Chirkov S.N., Rodionova N.P., Karpova O.V., Atabekov J.G. Characterization of Alternanthera mosaic virus and its Coat Protein // Open Virol. J. 2011. Vol. 5. P. 136—140.
7. Hammond J., Reinsel M.D., Maroon-Lango C.J. Identification and full sequence of an isolate of Alternanthera mosaic potexvirus infecting *Phlox stolonifera* // Arch. Virol. 2006. Vol. 151. N 3. P. 477—493.
8. Ivanov P.A., Mukhamedzhanova A.A., Smirnov A.A., Rodionova N.P., Karpova O.V., Atabekov J.G. The complete nucleotide sequence of Alternanthera mosaic virus infecting

Portulaca grandiflora represents a new strain distinct from phlox isolates // Virus Genes. 2010. Vol. 42. N 2. P. 268—271.

9. 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 // Plant J. 2003. Vol. 33. P. 949—956.

10. Sempere R.N., Gómez P., Truniger V., Aranda M.A. Development of expression vectors based on pepino mosaic virus // Plant Methods. 2011. Vol. 7. N 6.

11. Chapman S., Kavanagh T.A., Baulcombe D.C. Potato virus X as a vector for gene expression in plants // Plant J. 1992. Vol. 2. N 4. P. 549—557.

12. Singh P., Gonzalez M.J., Manchester M. Viruses and their uses in nanotechnology // Drug develop. res. 2006. Vol. 67. N 1. P. 23—41.

13. Leclerc D., Beauseigle D., Denis J., Morin H., Pare C., Lamarre A., Lapointe R. Proteasome-independent major histocompatibility complex class I cross-presentation mediated by papaya mosaic virus-like particles leads to expansion of specific human T cells // J. Virol. 2007. Vol. 81. P. 1319—1326.

14. Lim H.S., Vaira A.M., Reinsel M.D., Bae H., Bailey B.A., Domier L.L., Hammond J. Pathogenicity of Alternanthera mosaic virus is affected by determinants in RNA-dependent RNA polymerase and by reduced efficacy of silencing suppression in a movement-competent TGB1 // J. Gen. Virol. 2010. Vol. 91. N 1. P. 277—287.

Поступила в редакцию
13.09.12

NEW PHYTOVIRAL VECTOR FOR SUPEREXPRESSION OF TARGET PROTEINS IN PLANTS

E.V. Putlyaev, A.A. Smirnov, E.A. Lazareva, G.V. Klink, O.V. Karpova, I.G. Atabekov

Previously, we obtained a new viral vector, based on the Alternanthera mosaic virus strain MU (AltMV-MU). The gene of interest was placed under control of two subgenomic promoters (sgp). Viral vector provided the superexpression of target proteins in *Nicotiana benthamiana*. In the present work, to increase the level of protein expression this viral vector was modified and the coat protein gene was placed under control of three sgp. The new viral vector provided superexpression of pro-

tein of interest in plants and its amount was more than 50% of the total soluble protein of cells. The comparison of the target protein expression efficiency in plants transformed by viral vectors contained two and three sgp, was done.

Key words: *plant virus, plant viral vector, subgenomic promoter.*

Сведения об авторах

Путляев Егор Валерьевич — аспирант 2-го года кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-903-184-51-40; e-mail: putlegor@mail.ru

Смирнов Александр Алексеевич — канд. биол. наук, ст. преподаватель кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-916-939-81-93, 8-495-939-33-47; e-mail: smirovir@gmail.com

Лазарева Екатерина Алексеевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-53-67; e-mail: lazareva-katrina@mail.ru

Клинк Галина Викторовна — аспирантка 1-го года биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-33-47; e-mail: galkaklink@gmail.com

Карпова Ольга Вячеславовна — докт. биол. наук, проф. кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-53-67; e-mail: okar@genebee.msu.ru

Атабеков Иосиф Григорьевич — докт. биол. наук, акад. РАН, зав. кафедрой вирусологии биологического факультета МГУ, НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова. Тел.: 8-495-939-53-67; e-mail: atabekov@genebee.msu.ru