

УДК 575.113.1:[577.218:633.71]:615.371

Агробактериальная трансформация табака генетическим модулем биосинтеза антималярийного агента артемизинина

© 2020 А.П. ФИРСОВ^{1,*}, Т.Ю. МИТЮШКИНА¹, А.С. ПУШИН¹, А.К. ЦАРЕВА²,
А.М. ВАЙНШТЕЙН³, С.В. ДОЛГОВ¹

¹Филиал Института биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, г. Пушкино, Московская область, 142290

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Биотехнологический факультет, Москва, 119991

³Еврейский университет Иерусалима, Реховот, Израиль, 76100

*e-mail: aleksey_firsov@mail.ru

Поступила в редакцию 19.12.2019 г.
После доработки 11.03.2020 г.
Принята к публикации 19.05.2020 г.

Препараты на основе артемизинина являются наиболее эффективными средствами для лечения малярии. В настоящее время основным источником артемизинина являются растения полыни *Artemisia annua* L. В связи с ограниченностью этого источника значительные усилия направлены на разработку способов получения артемизинина с использованием гетерологичных экспрессионных систем. Целью исследования являлось получение табака, трансформированного генами биосинтетического пути артемизинина, и анализ их транскрипции в гетерологичном растении-хозяине. Растения табака были трансформированы генами артемизининового пути, кодирующими: аморфа-4,11-диен-синтазу, артемизинин-альдегид $\Delta 11(13)$ редуктазу, аморфа-4,11-диен монооксигеназу, цитохром P450 редуктазу из *A. annua* и дрожжевую 3-гидрокси-3-метилглутарил-коэнзим А редуктазу в составе вектора pArtemC; фарнезилдифосфатсинтазу и альдегид-дегидрогеназу 1 из *A. annua* в векторе p2356. В результате трансформации векторами pArtemC и p2356 было получено по две линии трансгенных растений со всеми целевыми генами. Методом ко-трансформации этими векторами были получены трансгенные линии, в геном которых были успешно перенесены пять генов биосинтеза артемизинина, а также два гена биосинтеза его предшественников. Впервые в гетерологичных растениях был полностью реконструирован биосинтетический путь артемизинина. В результате ОТ-ПЦР-анализа показана транскрипция генов артемизининового пути в трансгенных растениях. Полученные результаты будут использованы в исследованиях по разработке экспрессионных систем для производства артемизинина и других небелковых веществ.

Ключевые слова: артемизинин, малярия, метаболическая инженерия, табак, трансгенные растения

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-3-34-45

В настоящее время существует большой теоретический и практический интерес к получению в растительных системах низкомолекулярных веществ небелковой природы, в норме отсутствующих у растений, – различных гормонов, цитотоксических и антибактериальных агентов, анти-опухолевых и антивирусных субстанций и т.п. (так называемый «молекулярный фарминг»).

К числу таких веществ относится артемизинин – терпеновый лактон, содержащийся в растении полынь однолетняя (*Artemisia annua*) и обладающий высокой антималярийной активностью. В настоящее время, комбинированные с артемизинином лекарственные средства, являются наиболее эффективными препаратами для лечения малярии, использование таких препаратов рекомендовано

Список сокращений: БВАР – 6-бензиламинопурин; ИУК – β -индолилуксусная кислота; т.п.н. – тысяч пар нуклеотидов; ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией; РБФК – рибулозобисфосфаткарбоксилаза; СаMV – вирус мозаики цветной капусты, ОП₆₀₀ – оптическая плотность при 600 нм.

резолюцией ВОЗ WHA60.18 (май 2007) и является стандартом лечения во всем мире. Важно отметить, что помимо малярии, артемизинин и его производные также эффективны против некоторых паразитических гельминтов, включая шистосом, а также многих линий человеческих опухолевых клеток [1].

Основным препятствием, сдерживающим использование артемизинина в терапии малярии, является его высокая стоимость. Содержание этого вещества в *A. annua* обычно находится в диапазоне 0,01–0,8% от сухого веса, что недостаточно для обеспечения глобальной потребности в содержащих его лекарствах. Улучшение агротехники и селекция *A. annua* пока не привели к существенному улучшению выхода артемизинина, что вызвало значительный интерес к разработке методов его получения в гетерологичных растениях-продуцентах.

Путь биосинтеза артемизинина в *A. annua* к настоящему времени подробно изучен [2–4] (рис. 1). Артемизинин, как и другие терпеноиды, синтезируется из двух предшественников, изопентилдифосфата (IPP) и диметилаллилдифосфата (DMAPP). IPP и DMAPP конденсируются фарнезилдифосфатсинтазой (FPPS/FPS) в фарнезилдифосфат (FPP, фарнезилпирофосфат), общий предшественник C15-сесквитерпеноидов [2, 5] FPP превращается аморфа-4,11-диен-синтазой (ADS) в аморфа-4,11-диен (AD). Далее аморфа-4,11-диен гидроксيليруется в артемизининовый спирт, который окисляется до соответствующего альдегида, эти этапы осуществляются посредством аморфадие-монооксигеназы (CYP71AV1). Помимо CYP71AV1, окисление артемизининового спирта осуществляется также алкоголь-дегидрогеназой ADH1. На следующем этапе образовавшийся артемизининовый альдегид с помощью $\Delta 11(13)$ -редуктазы (DBR2) восстанавливается до дигидроартемизининового альдегида и, далее, окисляется альдегид-дегидрогеназой (ALDH1) до дигидроартемизининовой кислоты. Под действием этого же фермента происходит окисление артемизининового альдегида до артемизининовой кислоты. Окисление дигидроартемизининового альдегида до дигидроартемизининовой кислоты в дрожжах может катализироваться CYP71AV1 [6, 7]. Финальным шагом является спонтанная фотоиндуцированная ферментативная конверсия дигидроартемизининовой кислоты в артемизинин и артемизининовой кислоты в артеаннуин В.

Впервые артемизинин в гетерологичной системе был получен Farhi et al. [8]. Растения табака трансформировали агробактериальным методом; накопление целевого вещества состави-

ло 0,0068 мг/г сухого веса листьев. В стабильно трансформированном мхе *Physcomitrella patens* содержание артемизинина достигало 0,2 мг/г сухого веса [9]. Максимальное количество рекомбинантного артемизинина было получено в двойных трансформантах табака – гены биосинтеза артемизинина были перенесены в геном, а гены мевалонатного пути (путь MVA) – в пластом. Накопление целевого продукта в этом исследовании составляло до 0,8 мг/г сухого веса листьев [10]. В экспериментах с использованием транзientной экспрессии генов биосинтетического пути артемизинина его содержание в растениях было невысоким – 0,003 мг/г сухого веса в листьях *N. benthamiana* [11].

Хотя эти исследования подтвердили принципиальную возможность продукции артемизинина в гетерологичных растениях, его содержание в тканях продуцента было низким. Это могло быть обусловлено как дефицитом предшественников, так и недостаточным уровнем экспрессии ферментов артемизининового пути. Выявление этапов, лимитирующих биосинтез артемизинина в гетерологичных растениях-продуцентах, может быть осуществлено с помощью методов комбинаторной инженерии метаболических путей.

Исходным субстратом для синтеза артемизинина является фарнезилдифосфат (FPP). Повышение уровня FPP путём сверхэкспрессии FPPS вело к существенному увеличению накопления артемизинина в трансгенных растениях *A. annua* – в 1,3 раза в экспериментах Han et al. [12] и до 3,5 раз в исследовании Vanuyai et al. [13]. Другим лимитирующим этапом биосинтеза артемизинина является, по-видимому, образование его непосредственного предшественника – дигидроартемизининовой кислоты окислением дигидроартемизининового альдегида альдегид-дегидрогеназой ALDH1. Так, в исследовании Tang et al. [14] сверхэкспрессия гена ALDH1 вела к более, чем трёхкратному возрастанию накопления артемизинина в трансгенных растениях *A. annua* – с 7,9 мг/г до 25,3 мг/г сухого веса растения.

Основной трудностью, лимитирующей применение методов инженерии метаболических путей, является то, что синтез низкомолекулярных небелковых веществ осуществляется в ходе длинных биохимических цепочек, часто включающих 5–7 различных этапов и регулируемых соответствующими генетическими модулями. Таким образом, для получения веществ небелковой природы требуется перенос в геномы растений-продуцентов нескольких гетерологичных генов. К настоящему времени методы мультигенной трансформации разработаны для ряда модельных и легко трансформируемых сельскохозяйственных растений.

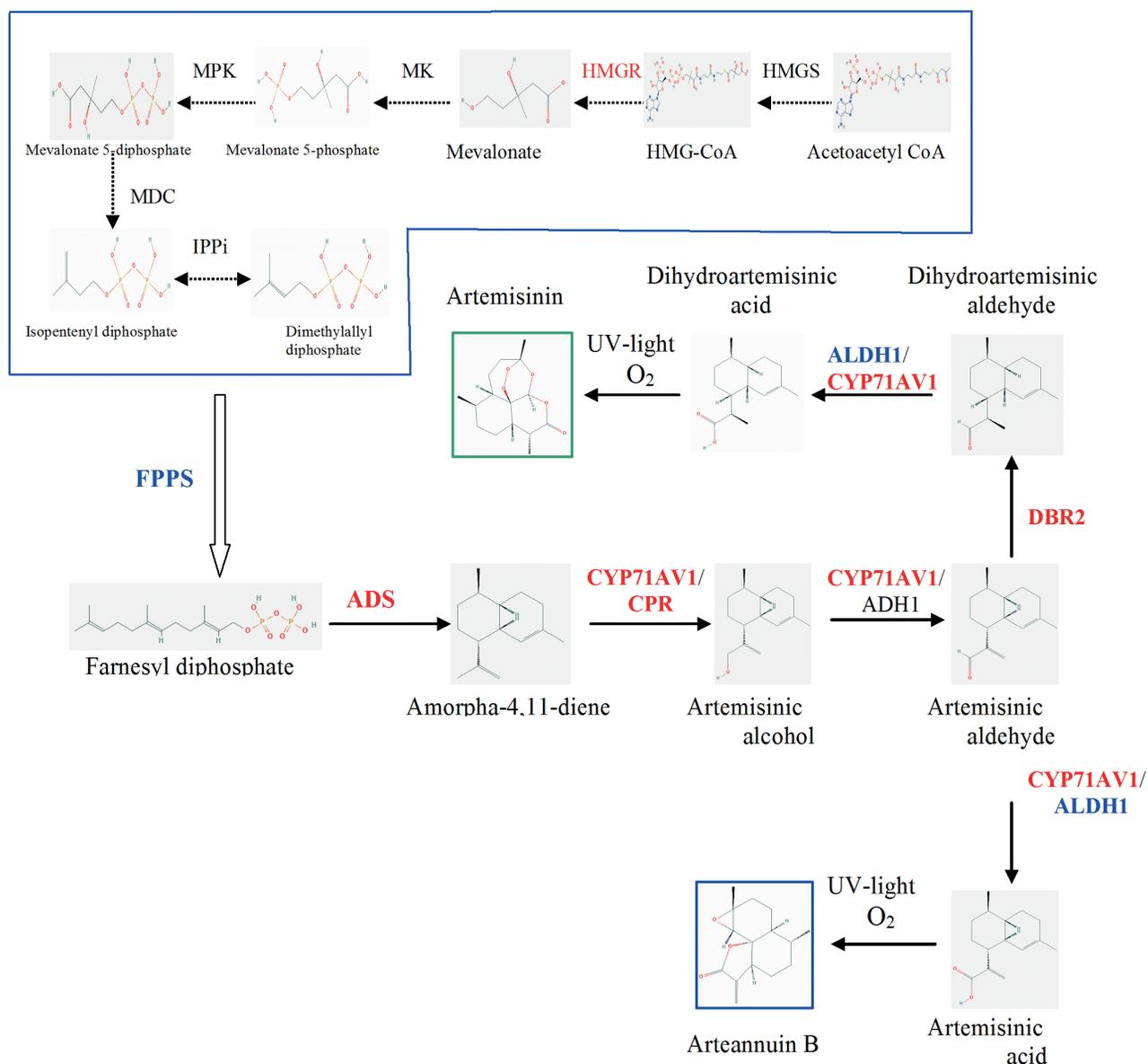


Рис. 1. Путь биосинтеза артемизинина в *A. annua*: ADS - аморфа-4,11-диен-синтаза; CYP71AV1 – аморфа-4,11-диен монооксигеназа; ADH1 – алкоголь дегидрогеназа; DBR2 - альдегид Δ11 (13) редуктаза; ALDH1 – альдегид дегидрогеназа. Путь биосинтеза мевалоновой кислоты (MVA) показан в синей рамке: HMGS – 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА-синтаза; HMGR – 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА-редуктаза; МК – мевалонат киназа; МПК – мевалонат-5-фосфаткиназа; MDC – мевалонат-5-дифосфат декарбоксилаза; IPPi – изопентенилдифосфат-изомеразы; FPS, фарнезил дифосфат синтаза. Гены биосинтеза артемизинина, клонированные в векторе pArtemC, показаны красным цветом, в векторе p2356 – синим.

Fig. 1. Artemisinin biosynthesis pathway in *A. annua*: ADS – amorpha-4,11-diene synthase; CYP71AV1 – amorpha-4,11-diene monooxygenase; ADH1 – alcohol dehydrogenase; DBR2 – aldehyde Δ11 (13) reductase; ALDH1 – aldehyde dehydrogenase. The mevalonic acid biosynthesis pathway (MVA) is shown in a blue box: HMGS – 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase; HMGR – 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase; MK – mevalonate kinase; IPC – mevalonate-5-phosphate kinase; MDC – mevalonate-5-diphosphate decarboxylase; IPPi – isopentenyl diphosphate isomerase; FPS, –farnesyl diphosphate synthase. Artemisinin biosynthesis genes cloned in pArtemC vectors are shown in red.

Так, в геном *Arabidopsis thaliana* удалось перенести 10 различных генов в составе одной Т-ДНК размером 28,5 т.п.н. [15], а в вид люцерны *Medicago truncatula* – 8 генов, важных для симбиоза с ризобиями (размер Т-ДНК 74 т.п.н.; [16]). В исследовании Fujisawa et al. [17] растения *Brassi-*

ca napus были трансформированы семью генами биосинтеза каротиноидов. В этом исследовании гены биосинтеза каротиноидов были перенесены в геном рапса на одной Т-ДНК размером 17 т.п.н. Десять генов устойчивости к насекомым в составе Т-ДНК размером 32 т.п.н. были успешно

перенесены в геном кукурузы, экспрессия гетерологичных генов в полученных растениях была подтверждена [18].

Для целей метаболической инженерии может быть более удобным перенос в растения генетического модуля биосинтеза целевого продукта не в составе одной большой Т-ДНК, а в составе нескольких Т-ДНК меньшего размера. Такой перенос может быть осуществлён, в частности, методом ко-трансформации, когда экспланты трансформируются одновременно несколькими векторами. Другими подходами являются трансформация ранее полученных и охарактеризованных линий, несущих гены биосинтетического модуля (или их часть), векторами с другими изучаемыми генами (двойная трансформация), либо получение набора трансгенных линий, каждая из которых несёт часть генетического модуля, с последующим получением гибридов между ними. Эти подходы позволяют обеспечить большую гибкость исследований, комбинируя различные сочетания генов биосинтеза целевого продукта и его предшественников. Кроме того, два последних подхода позволяют использовать в исследованиях линии с максимальной экспрессией гетерологичных генов, минимизируя, тем самым, эффект положения Т-ДНК.

Целью исследования являлось получение растений табака, трансформированных генами пути биосинтеза артемизинина, и анализ транскрипции перенесённых генов для последующего создания растений-продуцентов с использованием указанных выше подходов. В связи с этим решались следующие задачи: (1) получение трансгенных растений табака, трансформированных генами пути биосинтеза артемизинина (аморфа-4,11-диен-синтазы (*ADS*), аморфадиен-монооксигеназы (*CYP71AV1*), $\Delta 11(13)$ -редуктазы (*DBR2*), цитохром P450 редуктазы (*CPR*) и дрожжевой 3-гидрокси-3-метил-глутарил-коэнзим А редуктазы (*tHMGR*)) в составе вектора pArtemC; (2) получение растений, трансформированных геном биосинтеза предшественника артемизинина фарнезилдифосфатсинтазы (*FDPS*) и геном артемизининового пути альдегид-дегидрогеназы (*ALDH1*), клонированными в векторе p2356; (3) получение ко-трансформантов-растений трансформированных одновременно векторами pArtemC и p2356, (4) оценка транскрипции гетерологичных генов в трансгенных линиях.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Векторы для трансформации растений

В экспериментах по трансформации табака были использованы векторы pArtemC и p2356. В векторе pArtemC под контролем сильных кон-

ститутивных промоторов были клонированы гены биосинтеза артемизинина *ADS*, *CYP71AV1*, *DBR2*, *CPR* из *A. annua* и дерегулированный ген *tHMGR* из дрожжей [8]. Ген *tHMGR* был использован для увеличения накопления предшественников артемизинина из мевалонатного пути. Ген *ADS* был клонирован без сигнальной последовательности, накопление аморфа-4,11-диена происходило в цитозоле клетки. В качестве селективного маркера использовался ген устойчивости к канамицину *nptII*.

Нуклеотидные последовательности кДНК генов *FDPS* и *ALDH1* были клонированы с использованием ОТ-ПЦР. Суммарная РНК была выделена из листьев тепличных растений *A. annua* с помощью набора для выделения РНК Quantum-Prep AquaPure RNA Isolation Kit (BioRad, США). Полученную РНК дополнительно очищали от примесей ДНК путем обработки ДНКазой (Thermo Fisher Scientific, США). Обратную транскрипцию осуществляли с использованием фермента M-MuLV RT и праймера oligo d (T)₁₈ в соответствии с указаниями производителя (Thermo Fisher Scientific). Амплификация целевых последовательностей осуществлялась методом ПЦР, для амплификации кДНК гена *FDPS* были использованы праймеры FDPS-F и FDPS-R, гена *ALDH1* – праймеры ALDH1-F и ALDH1-R (табл. 1). Для дизайна праймеров были использованы нуклеотидные последовательности мРНК *FDPS* и *ALDH1 A. annua*, представленные в базе данных GenBank (ID U36376.1 и FJ809784.1, соответственно). В последовательности праймеров были добавлены сайты рестрикции XhoI и ApaI (подчеркнуты, табл. 1).

Для амплификации целевых последовательностей была использована Pfu-ДНК полимеразы (Thermo Fisher Scientific). Реакционная смесь содержала кДНК (100 нг), прямой и обратный праймеры (по 0,5 мкМ каждого) и 1,0 ед. полимеразы; объем реакционной смеси 25 мкл. Реакцию ПЦР проводили в следующих условиях: начальная денатурация – 5 мин, 95 °С; денатурация – 30 с, 94 °С; отжиг праймеров – 30 с, 55 °С; элонгация – 120 с, 72 °С; циклов амплификации – 35.

Последовательности кДНК генов *FDPS* и *ALDH1* были клонированы в вектор для экспрессии в растениях pRCS2-bar. Этот вектор содержит в последовательности Т-ДНК ген устойчивости к фосфинотрицину *bar* под контролем промотора и терминатора гена октопин-синтазы *A. tumefaciens*; и группу редко встречающихся сайтов рестрикции, что позволяет клонировать в вектор экспрессионные кассеты из промежуточных векторов серии pSAT [19].

Режимы ПЦР и нуклеотидные последовательности праймеров, использованных в исследовании
PCR regimes and primer nucleotide sequences used in the study

Праймер	Нуклеотидная последовательность, 5' → 3'	Целевая последовательность	Длина амплифицируемого фрагмента, п.н.	Температура отжига, °С	Время элонгации, с
Праймеры для ПЦР – анализа трансгенных растений					
ADS	F ctatccttcgcaagaccctcc R tgatcaatctcccgtcaaatga	35S CaMV промотор ADS	488	55	40
tHMGR	F acacctaataagtccaacatgg R tgatactacgagagcgggtg	<i>tHMGR</i>	1011	56	60
CYP71AV1	F atgaagagtatactaaaagcaatggcactc R ctagaacttggaacgagtaacaactca	<i>CYP71AV1</i>	1488	60	90
CPR	F atgcaatcaacaactccgtaagtatt R ttaccatacatcacggagatatcttc	<i>CPR</i>	2115	60	120
DBR2	F tgatgcagctcacaagaaggggc R tccccctgagccacagcttgaacc	<i>DBR2</i>	732	62	60
ALDH1	F <u>ctcgagatgagctcagagctaatggaa</u> R <u>gggcccttaagccacggggaatcata</u>	<i>ALDH1</i>	1500	55	60
FDPS	F <u>ctcgagatgcttactactacgtcaatctataag</u> R <u>gggccctactctgcctctgtagatcttag</u>	<i>FDPS</i>	1032	60	60
NPTII	F tgctctgatccgcccgtgtcc R gcatgcgcgccttgagcctgg	<i>npII</i>	381	63	30
BAR	F tgcaccatgtcaccacta R acagcgaccacgctctgaa	<i>bar</i>	311	58	45
virB	F ggctacatcgaagatcgtatgaatg R gactatagcgatggttacgatgtgac	<i>virB A. tumefaciens</i>	670	60	45
Праймеры для ОТ-ПЦР- анализа трансгенных растений*					
ADS	F ggaagagctcagccatgtgt R caggttagcaccgccagtaa	<i>ADS</i>	496	60	40
tHMGR	F gcctataacaccaacgggca R cgctgccttggttattcacg	<i>tHMGR</i>	229	60	60
CYP71AV1	F accctccactacccttggtt R ggctccaggacacatccttc	<i>CYP71AV1</i>	242	60	90
CPR	F gtggagactgggctctttc R ctttgcatcaccgcaaca	<i>CPR</i>	154	60	120
DBR2	F aaccacgttacacggctgat R ctagttaaccaccgagca	<i>DBR2</i>	136	60	60
Actin	F tggccgatggtgagatattc R tgcggtagtggtaacatgtaac	актин <i>N. tabacum</i>	617	60	60

*Для анализа транскрипции генов *FDPS* и *ALDH1* использовали те же праймеры, что и для ПЦР- анализа. *F* – прямой праймер, *R* – обратный праймер. Подчеркнуты сайты *XhoI* и *Apal*, для клонирования последовательностей *ALDH1* и *FDPS* в вектор p2356

*For the analysis of *FDPS* and *ALDH1* genes transcription, the same primers were used as for PCR. *F* – forward primer, *R* – reverse primer. *XhoI* and *Apal* sites used for cloning the *ALDH1* and *FDPS* sequences into the p2356 vector are underlined.

Полученные после ПЦР последовательности кДНК *FDPS* и *ALDH1* обрабатывали рестриктазами XhoI и AраI. кДНК *FDPS* была клонирована в промежуточный вектор pSAT7A под контроль промотора гена актина *A. thaliana* и терминатора гена агропин-синтазы *A. tumefaciens*; кДНК гена *ALDH1* – в промежуточный вектор pSAT6A под контроль промотора и терминатора гена малой субъединицы РБФК [19]. После секвенирования были отобраны клоны, содержащие вставки, последовательности которых полностью соответствовали ожидаемым.

Кассета, содержащая последовательность *ALDH1*, была вырезана из вектора pSAT6A с помощью рестриктазы P1-PspI и клонирована в вектор pRCS2-bar по этому же сайту. Экспрессионная кассета, содержащая последовательность *FDPS* была вырезана с помощью рестриктаз AgeI и NotI из промежуточного вектора pSAT7A, липкие концы были достроены с помощью фрагмента Кленова (Thermo Fisher Scientific). Вектор pRCS2-bar, уже содержащий экспрессионную кассету *ALDH1*, обрабатывался рестриктазой I-Sce, полученные липкие концы были достроены, после чего вектор и кассета с последовательностью *FDPS* были лигированы друг с другом. В результате был получен вектор p2356, который был использован для трансформации растений. Экспрес-

сионные кассеты векторов pArtemC и p2356 представлены на рис. 2. Векторы были перенесены в штамм *A. tumefaciens* ЕНА105.

Агробактериальная трансформация табака

В экспериментах по генетической трансформации был использован табак сорта Petite Havana SR1, трансформацию растений проводили по модифицированному методу Horsch [20]. Агробактерии культивировали в течение 16 ч в жидкой среде LB, содержащей 20 мг/л спектиномицина и 50 мг/л стрептомицина. Листовые экспланты размером 1,5x1,5 см инкубировали в суспензии агробактерий в безгормональной среде Мурасиге-Скуга (МС) (ОП₆₀₀ суспензии равна 1,0) в течение 20 минут, подсушивали 5–7 мин на фильтровальной бумаге в токе воздуха ламинара и переносили на чашки Петри с агаризованной средой МС с 1 мг/л ВАР и 0,1 мг/л ИУК. После ко-культивации с агробактериями в течение 2 сут, экспланты переносили на среду этого же состава, содержащую дополнительно 500 мг/л цефатаксима, 50 мг/л канамицина (трансформация вектором pArtemC) или 2 мг/л фосфинотрицина (трансформация вектором p2356). Культивацию на этих средах проводили до появления адвентивных побегов. Устойчивые к селективному антибиотику побеги размером 1–1,5 см отделяли от эксплантов и

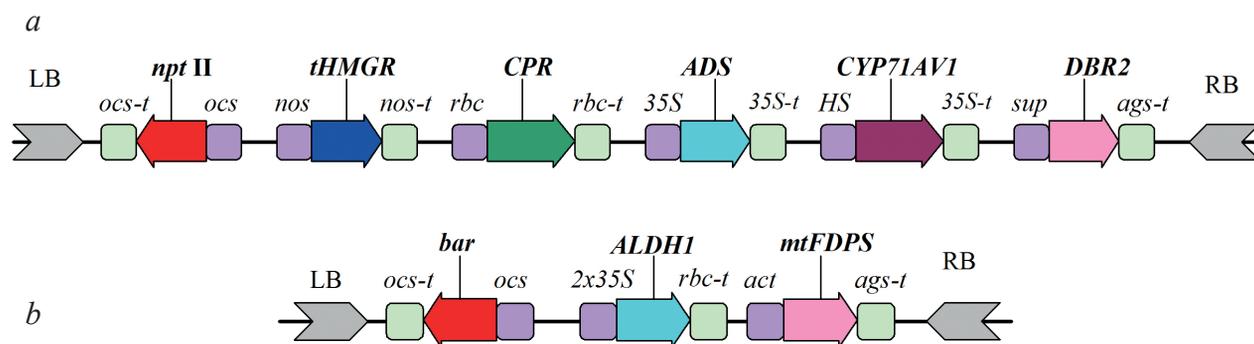


Рис. 2. Схема экспрессионных кассет векторов pArtemC (a) и p2356 (b) использованных для трансформации табака. *tHMGR* – дрожжевая 3-гидрокси-3-метилглутарил-коэнзим А редуктаза, *CPR* – цитохром P450 редуктаза, *ADS* – аморфа-4,11-диен-синтаза, *CYP71A1* – аморфа-4,11-диен монооксигеназа, *DBR2* – альдегид Δ11(13)-редуктаза, *FDPS* – фарнезилдифосфатсинтаза, *ALDH1* – альдегид-дегидрогеназа. Пурпурным цветом показаны промоторы, светло-зелёным – терминаторные последовательности: *ocs* (*ocs-t*) – октопин-синтазный промотор (терминатор); *nos* (*nos-t*) – нопалин-синтазный промотор (терминатор); *rbc* (*rbc-t*) – промотор гена малой субъединицы РБФК (терминатор); *35S* (*35S-t*) – 35S промотор CaMV (терминатор); *HS* – промотор белка теплового шока 18.1; *sup* – суперпромотор Sup (терминатор); *2x35S* – двойной 35S промотор вируса мозаики цветной капусты; *act* – актиновый промотор *A. thaliana*; *ags-t* – терминатор агропин-синтазы. LB и RB – левый и правый граничные повторы T-DNA.

Fig. 2. The expression cassettes of pArtemC (a) and p2356 (b) vectors used for tobacco transformation. *tHMGR* – yeast 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, *CPR* – cytochrome P450 reductase, *ADS* – amorpha-4,11-diene synthase, *CYP71A1* – amorpha-4,11-diene monooxygenase, *DBR2* – aldehyde Δ11 (13)-reductase, *FDPS* – farnesyl diphosphate synthase, *ALDH1* – aldehyde dehydrogenase. The promoters are shown in purple, terminator sequences are shown in light green: *ocs* (*ocs-t*) – octopine synthase promoter (terminator); *nos* (*nos-t*) – nopaline synthase promoter (terminator); *rbc* (*rbc-t*) – Rubisco small subunit gene promoter (terminator); *35S* (*35S-t*) – 35S promoter CaMV (terminator); *HS* – promoter of heat shock protein 18.1; *sup* – super promoter Sup (terminator); *2x35S* – double 35S promoter of cauliflower mosaic virus; *act* – actin promoter of *A. thaliana*; *ags-t* – agropin synthase terminator. LB and RB – left and right T-DNA boundary repeats.

культивировали на среде МС, содержащей 1 мг/л ВАР и 50 мг/л канамицина (вектор pArtemC) или 2 мг/л фосфинотрицина (вектор p2356). Когда пролиферирующие побеги достигали размера 3–4 см, их укореняли на безгормональной среде МС, содержащей соответствующий селективный агент. Двойные трансформанты были получены методом ко-трансформации. Для этого суспензии агробактериальных штаммов с векторами p2356 и pArtemC (ОП₆₀₀ каждой суспензии равна 2,0) смешивали вместе в соотношении 1:1. Полученной смесью агробактерий трансформировали листовые экспланты табака, как описано выше. Регенерацию, селекцию и укоренение трансформантов вели в присутствии двух селективных агентов – 50 мг/л канамицина и 2 мг/л фосфинотрицина.

Укоренившиеся растения без признаков токсического действия канамицина и/или фосфинотрицина анализировали методом ПЦР на присутствие генов *nptII* и *bar*. Предварительно изучаемые линии проверялись на отсутствие агробактериальной контаминации. Далее трансгенные растения адаптировали к условиям роста *in vivo* и культивировали в теплице до проведения дальнейших исследований.

Анализ интеграции и транскрипции целевых генов в трансгенных растениях

Интеграция целевых генов в геном растений изучалась методом ПЦР-анализа. Геномную ДНК табака выделяли из листьев устойчивых к селективным антибиотикам и нетрансформированных растений в соответствии с методом Dellaporta et al. [21]. До проведения экспериментов растения культивировались в теплице в течение 2 мес. Растения предварительно тестировали на отсутствие агробактериальной контаминации с использованием праймеров *virBF* и *virBR* (табл. 1), которые специфичны к области *virB A. tumefaciens*.

Аmplification целевых последовательностей проводили с использованием полимеразы DreamTaq (Thermo Fisher Scientific) в рекомендованном производителем буфере. Реакционная смесь содержала геномную ДНК (200 нг), прямой и обратный праймеры (по 0,5 мкМ каждого) и 1,0 ед. полимеразы DreamTaq; объем реакционной смеси 25 мкл. Реакцию проводили в следующих условиях: начальная денатурация – 5 мин, 95 °С; денатурация – 30 с, 94 °С; отжиг праймеров – 30 с, температура – как указано в табл. 1; время элонгации – как указано в табл. 1, 72 °С; циклов амплификации – 30. Последовательности праймеров, использованных для детекции целевых генов в трансгенных растениях, и режимы ПЦР представлены в табл. 1.

Транскрипция гетерологичных генов в трансгенных растениях изучалась методом ОТ-ПЦР-анализа. Суммарная РНК была выделена из листьев растений с помощью набора для выделения РНК QuantumPrep AquaPure RNA Isolation Kit (BioRad, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Полученную РНК дополнительно очищали от примесей ДНК путем обработки ДНКазой (Thermo Fisher Scientific). Обратную транскрипцию осуществляли с использованием фермента M-MuLV RT (Thermo Fisher Scientific) и праймера oligo d(T)₁₆ в соответствии с указаниями производителя. Полученные препараты кДНК анализировали с помощью ПЦР на наличие целевых последовательностей. Амплификация целевых последовательностей проводилась с использованием полимеразы DreamTaq (Thermo Fisher Scientific) в рекомендованном производителем буфере. Реакционная смесь содержала кДНК (200 нг), прямой и обратный праймеры (по 0,5 мкМ каждого, табл. 1) и 1,0 ед. полимеразы; объем реакционной смеси 25 мкл. Реакцию ПЦР проводили в следующих условиях: начальная денатурация – 5 мин, 95 °С; денатурация – 30 с, 94 °С; отжиг праймеров – 30 с, 60 °С (55 °С для кДНК *FDPS* и *ALDH1*); элонгация – 30 с (90 с для *FDPS* и *ALDH1*), 72 °С; циклов амплификации – 35.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Агробактериальная трансформация табака

Растения табака были трансформированы векторами pArtemC и p2356, и ко-трансформированы этими же векторами. Регенерация побегов, устойчивых к селективным агентам, начиналась спустя 20–25 дней после трансформации. В среднем, на одном регенерирующем экспланте возникало 1,6 адвентивных побега, часть из них погибала в течение культивирования на среде пролиферации. Побеги, достигшие размера 3,0–4,0 см, укореняли на безгормональной среде МС, содержащей соответствующий селективный агент. Укоренившиеся растения анализировали методом ПЦР на присутствие селективных генов. Амплификация фрагментов генов *nptII* или *bar* ожидаемой длины наблюдалась во всех линиях, демонстрирующих нормальный рост и укоренение в присутствии соответствующих селективных агентов (табл. 2). Трансгенные растения, которые культивировались в теплице до проведения дальнейших исследований, не отличались по своим морфологическим показателям и характеристикам роста от контрольных нетрансформированных растений. В результате трансформации вектором pArtemC было получено 7 линий канамицин-устойчивых

растений, вектором p2356 – 2 линии, устойчивые к фосфинотрицину. Двойная трансформация векторами pArtemC и p2356 привела к получению 6 линий, устойчивых одновременно и к канамицину, и к фосфинотрицину (табл. 2).

Анализ интеграции и транскрипции целевых генов в трансгенных растениях

Анализ интеграции целевых генов в геном трансгенных растений был выполнен с помощью ПЦР. В линиях, трансформированных вектором pArtemC, амплификация фрагментов, соответствующих всем целевым генам – *ADS*, *CYP71AV1*, *DBR2*, *CPR* и *tHMGR* – наблюдалась только в двух линиях – pArtemC-1 и pArtemC-2. В остальных изученных линиях происходил неполный перенос Т-ДНК вектора, количество перенесённых в геном табака генов было равно двум – линия pArtemC-4 или четырёх – линии pArtemC-3, -5, -6, -7 (табл. 2). Частота переноса генов, расположенных ближе к селективному гену *nptII* была выше. Так, перенос гена *tHMGR* наблюдался во всех полученных линиях, соседний ген *CPR* детектировался в 6 линиях из семи полученных, *ADS* и *CYP71AV1* – в четырёх. Ген *DBR2*, расположенный рядом с правым граничным повтором Т-ДНК, переносился с высокой частотой и детектировался во всех линиях. Таким образом, в результате трансформации табака вектором pArtemC было получено две линии –

pArtemC-1 и pArtemC-2 – трансформированные всеми пятью целевыми генами.

При трансформации растений вектором p2356 было получено две трансгенные линии. В обеих линиях детектировались целевые гены – *ALDH1* и *FDPS*, так же, как и селективный ген *bar* (табл. 2). Ко-трансформация эксплантов табака векторами pArtemC и p2356 привела к получению 6 линий трансгенных растений (табл. 2). Во всех полученных линиях детектировались селективные гены *nptII* и *bar* (рис. 3). Амплификация целевых генов *DBR2*, *ADS*, *CYP71AV1*, *CPR* и *tHMGR* также наблюдалась во всех изученных линиях. Необходимо отметить, что в образцах ДНК как из трансгенных, так и нетрансформированных контрольных растений, отмечена амплификация фрагмента, соответствующего *ADS*. Однако, размер этого фрагмента был больше ожидаемого. Мы предполагаем, что это является результатом амплификации последовательности ДНК табака, гомологичной гену *ADS A. annua*. Последовательности генов *ALDH1* и *FDPS* также детектировались во всех полученных линиях. Таким образом двойная трансформация привела к получению шести линий растений, трансформированных генами пути биосинтеза артемизинина и его предшественника фарнезилдифосфата. Результаты экспериментов по трансформации растений табака представлены в табл. 3.

Таблица 2

ПЦР-анализ интеграции целевых генов в геном трансгенных растений
PCR analysis of the target genes integration into the genome of transgenic plants

Вектор/Линия	Ген								
	<i>nptII</i>	<i>bar</i>	<i>ADS</i>	<i>tHMGR</i>	<i>CYP71AV1</i>	<i>CPR</i>	<i>DBR2</i>	<i>ALDH1</i>	<i>FDPS</i>
pArtemC-1	+	нт	+	+	+	+	+	нт	нт
pArtemC-2	+	нт	+	+	+	+	+	нт	нт
pArtemC-3	+	нт	+	+	-	+	+	нт	нт
pArtemC-4	+	нт	-	+	-	-	+	нт	нт
pArtemC-5	+	нт	-	+	+	+	+	нт	нт
pArtemC-6	+	нт	+	+	-	+	+	нт	нт
pArtemC-7	+	нт	-	+	+	+	+	нт	нт
2356-1	нт	+	нт	нт	нт	нт	нт	+	+
2356-2	нт	+	нт	нт	нт	нт	нт	+	+
(pArtemC+2356)-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
(pArtemC+2356)-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
(pArtemC+2356)-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
(pArtemC+2356)-4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
(pArtemC+2356)-5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
(pArtemC+2356)-6	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Примечание: нт – не тестировали
 Note: нт – not tested

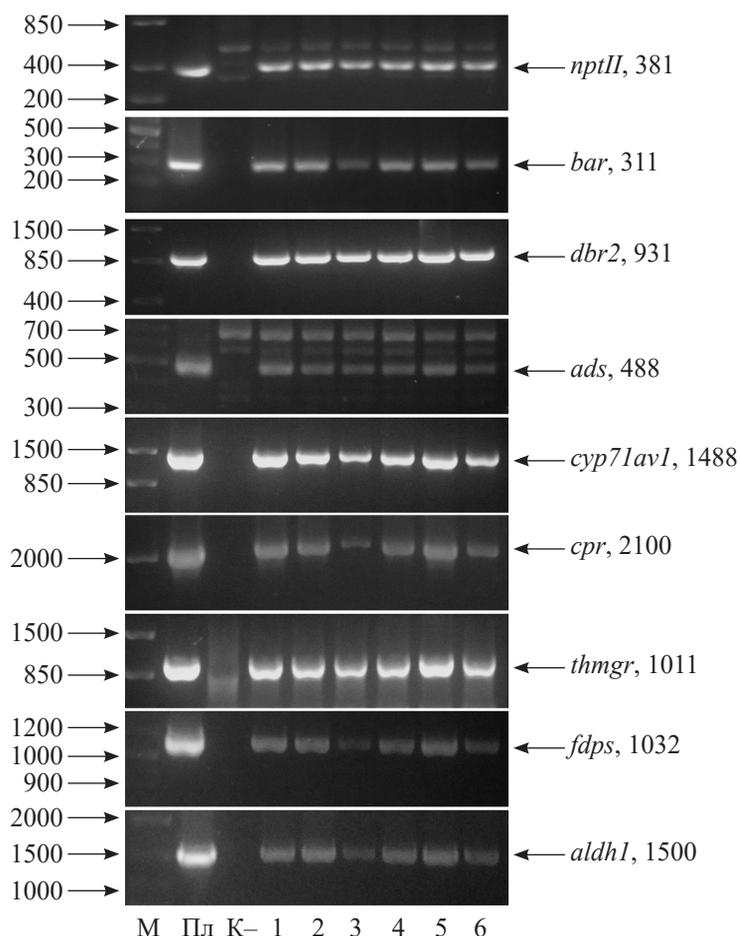


Рис. 3. ПЦР- анализ трансгенных растений табака, полученных в результате ко-трансформации векторами pArtemC и p2356. *DBR2* – альдегид $\Delta 11(13)$ -редуктаза; *ADS* – аморфа-4,11-диен-синтаза; *CYP71AV1* – аморфа-4,11- диен монооксигеназа; *CPR* – цитохром P450 редуктаза; *tHMGR* – дрожжевая 3-гидрокси-3-метилглутарил-коэнзим А редуктаза; *FDPS* – фарнезилдифосфатсинтаза; *ALDH1* – альдегид-дегидрогеназа. Пл – ДНК плазмид pArtemC или p2356, положительный контроль; К – нетрансформированное растение, отрицательный контроль. Цифрами обозначены трансгенные линии. М – маркер молекулярной массы, п.н. Указан ожидаемый размер амплифицируемых фрагментов, п.н.

Fig. 3. PCR analysis of transgenic tobacco plants obtained after co-transformation with pArtemC and p2356 vectors. *DBR2* – aldehyde $\Delta 11(13)$ reductase; *ADS* – amorpha-4,11-diene synthase; *CYP71AV1* – amorpha-4,11-diene monooxygenase; *CPR* – cytochrome P450 reductase; *tHMGR* – yeast 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase; *FDPS* – farnesyl diphosphate synthase; *ALDH1* – aldehyde dehydrogenase. P – DNA plasmids pArtemC or p2356, positive control; K – non-transformed plant, negative control. The numbers indicate transgenic lines. M – marker of molecular weight, bp. The expected size of the amplified fragments is indicated, bp.

Транскрипция генов биосинтеза артемизинина изучалась в линиях двойных трансформантов табака. В результате ОТ-ПЦР-анализа была показана амплификация фрагментов ожидаемой длины во всех шести трансгенных линиях, в нетрансформированных растениях амплификации фрагментов соответствующей кДНК не обнаружено (рис. 4). В изученных линиях наблюдалась транскрипция всех целевых генов.

Частота трансформации в нашем исследовании, рассчитанная как отношение числа устойчивых к селективным антибиотикам линий к количеству трансформированных эксплантов (табл. 3), составила 28%, 8% и 24%, соответственно. Частота

переноса всех целевых генов составляла 8% от числа трансформированных эксплантов при трансформации векторами pArtemC и p2356, и 24% при ко-трансформации pArtemC и p2356. Необходимо отметить, что в части трансформационных событий наблюдался неполный перенос Т-ДНК вектора pArtemC (размером около 14 т.п.н.). Чаще всего наблюдались делеции генов *ADS* и *CYP71AV1*, локализованных в средней части Т-ДНК. В тоже время, перенос селективного гена *nptII*, примыкающих к нему генов *tHMGR* и *CPR*, и локализованного непосредственно у правого граничного повтора гена *DBR2*, детектировался во всех полученных линиях (табл. 2). Это может быть связано с повышенной

Результаты экспериментов по трансформации табака генами биосинтеза артемизинина

The results of experiments on the transformation of tobacco with artemisinin biosynthesis genes

	Вектор		
	pArtemC	2356	pArtemC+2356
Трансформировано эксплантов	25	25	25
Эксплантов с регенерантами	11	10	12
Адвентивных побегов на одном регенерирующем экспланте	1,7	1,5	1,6
Высажено линий регенерантов на среду пролиферации с селективными антибиотиками	17	15	15
Высажено линий регенерантов на среду укоренения с селективными антибиотиками	12	10	11
Укоренилось на среде с селективными антибиотиками, линий	7	3	6
Линий регенерантов без признаков токсического действия селективных антибиотиков	7	2	6
Линий с генами устойчивости к селективным антибиотикам	7 (<i>nptII</i>)	2 (<i>bar</i>)	6(<i>nptII+bar</i>)
Линий со всеми целевыми генами	2	2	6
Линий с транскрипцией всех целевых генов	нт	нт	6

Примечание: нт – не тестировали

Note: нт – not tested

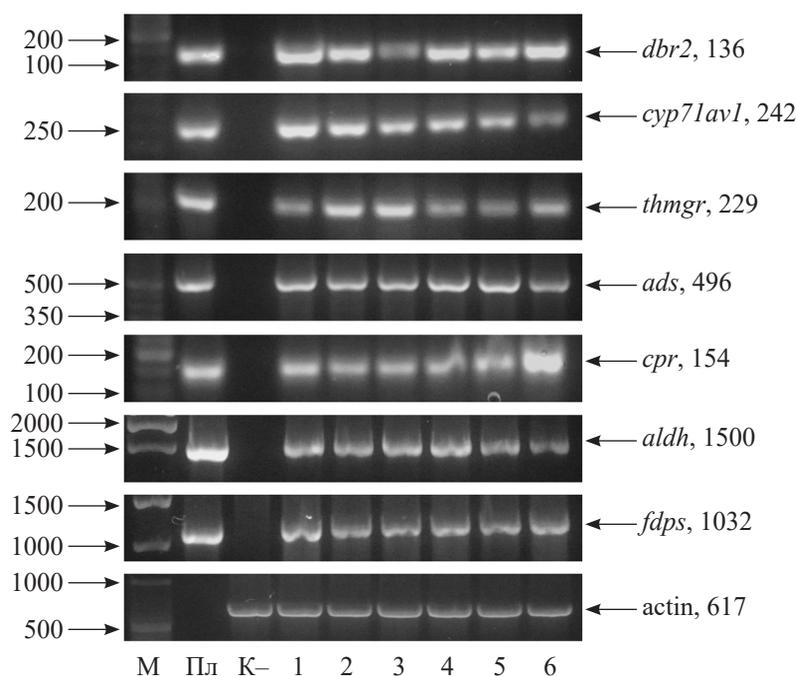


Рис. 4. Анализ транскрипции генов артемизининового пути в растениях табака, ко-трансформированных векторами pArtemC и p2356. *DBR2* – альдегид $\Delta 11(13)$ -редуктаза; *ADS* – аморфа-4,11-диен-синтаза; *CYP71AV1* – аморфа-4,11-диен монооксигеназа; *CPR* – цитохром P450 редуктаза; *tHMGR* – дрожжевая 3-гидрокси-3-метилглутарил-коэнзим А редуктаза; *FDPS* – фарнезилдифосфатсинтаза; *ALDH1* – альдегид-дегидрогеназа. Пл – ДНК плазмид pArtemC или p2356, положительный контроль; К – нетрансформированное растение, отрицательный контроль; актин – ген актина табака, контроль обратной транскрипции. Цифрами обозначены трансгенные линии. М – маркер молекулярной массы, п.н. Указан ожидаемый размер амплифицируемых фрагментов, п.н.

Fig. 4. Transcription analysis of artemisinin pathway genes in tobacco plants co-transformed with pArtemC and p2356 vectors. *DBR2* – aldehyde $\Delta 11(13)$ reductase; *ADS* – amorpha-4,11-diene synthase; *CYP71AV1* – amorpha-4,11-diene monooxygenase; *CPR* – cytochrome P450 reductase; *tHMGR* – yeast 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase; *FDPS* – farnesyl diphosphate synthase; *ALDH1* – aldehyde dehydrogenase. Pl – DNA plasmids pArtemC or p2356, positive control; K- – non-transformed plant, negative control; actin – tobacco actin gene, reverse transcription control. The numbers indicate transgenic lines. M – molecular weight marker, bp. The expected size of the amplified fragments is indicated, bp.

вероятностью образования петлеобразных структур в длинной Т-ДНК вектора рArtemС и, соответственно, с делецией этого участка в процессе переноса Т-ДНК в растительную клетку или её интеграции в геном [22, 23].

В результате исследования нами были получены линии трансгенных растений со всеми целевыми генами. Методом ко-трансформации были получены линии, в геном которых были перенесены все пять генов пути биосинтеза артемизинина (*ADS*, *CYP71AV1*, *CPR*, *DBR2* и *ALDH1*), что позволило впервые осуществить полную реконструкцию этого пути в гетерологичных растениях. Кроме того, для повышения уровня накопления артемизинина в эти же линии были перенесены гены биосинтеза его предшественника фарнезилдифосфата – *tHMGR* и *FDPS*.

Методом ОТ-ПЦР-анализа подтверждена транскрипция генов артемизининового пути во всех полученных линиях ко-трансформантов. На следующем этапе исследований будет проведен анализ накопления рекомбинантного артемизинина в трансгенных растениях. Полученные нами результаты открывают дальнейшие перспективы для исследований в области получения артемизинина в гетерологичных системах с использованием подходов метаболической инженерии растений.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа была выполнена при поддержке гранта Российского Научного Фонда №19-14-00190 с использованием уникальной научной установки «Фитотрон» рег. № 2-2.9.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ho W., Peh H., Chan T., et al. Artemisinins: pharmacological actions beyond anti-malarial. *Pharmacol Ther.*, 2014, 142(1), 126–39. doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.12.001
2. Brown G. The biosynthesis of artemisinin (Qinghaosu) and the phytochemistry of *Artemisia annua* L. (Qinghao). *Molecules*, 2010, 15, 7603–7698. doi: 10.3390/molecules15117603
3. Ikram NKVK., Simonsen HT. A Review of Biotechnological Artemisinin Production in Plants. *Front Plant Sci.*, 2017, 8:1966. doi: 10.3389/fpls.2017.01966.
4. Tu Y. Metabolic Engineering of *Artemisia annua* L. Chapter 8. In: From *Artemisia annua* L. to Artemisinins. The Discovery and Development of Artemisinins and Antimalarial Agents. Chemical Industry Press, 2017, 163–208. doi: 10.1016/B978-0-12-811655-5.00008-8
5. Wen W., Yu R. Artemisinin biosynthesis and its regulatory enzymes: progress and perspective. *Pharmacogn. Rev.*, 2011, 5:189–194. doi: 10.4103/0973-7847.91118
6. Teoh K., Polichuk D., Reed D., et al. *Artemisia annua* L. (Asteraceae) trichome-specific cDNAs reveal CYP71AV1, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the antimalarial sesquiterpene lactone artemisinin. *FEBS Lett.*, 2006, 580(5), 1411–1416. doi: 10.1016/j.febslet.2006.01.065
7. Teoh K., Polichuk D., Reed D., et al. Molecular cloning of an aldehyde dehydrogenase implicated in artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua*. *Botany*, 2009, 87(6), 635–642. doi: 10.1139/B09-032
8. Farhi M., Marhevka E., Ben-Ari J, et al. Generation of the potent anti-malarial drug artemisinin in tobacco. *Nat Biotechnol.*, 2011, 29(12), 1072–1074. doi: 10.1038/nbt.2054
9. Ikram N., Beyraghdar Kashkooli A., Peramuna A., et al. Stable production of the antimalarial drug artemisinin in the moss *Physcomitrella patens*. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2017, 5:47. doi: 10.3389/fbioe.2017.00047
10. Malhotra K., Subramaniyan M., Rawat K., et al. Compartmentalized metabolic engineering for artemisinin biosynthesis and effective malaria treatment by oral delivery of plant *Cells. Mol. Plant.*, 2016, 9(11), 1464–1477. doi: 10.1016/j.molp.2016.09.013
11. Wang B., Kashkooli A., Sallets A., et al. Transient production of artemisinin in *Nicotiana benthamiana* is boosted by a specific lipid transfer protein from *A. annua*. *Metab. Eng.*, 2016, 38, 159–169. doi: 10.1016/j.ymben.2016.07.004
12. Han J., Liu B., Ye H., et al. Effects of overexpression of the endogenous farnesyl diphosphate synthase on the artemisinin content in *Artemisia annua* L. *J. Integr. Plant Biol.*, 2006, 48(4), 482–487. doi: 10.1111/j.1744-7909.2006.00208.x
13. Banyai W., Kirdmanee C., Mii M., et al. Overexpression of farnesyl pyrophosphate synthase (FPS) gene affected artemisinin content and growth of *Artemisia annua* L. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 2010, 103(2), 255–265. doi: 10.1007/s11240-010-9775-8
14. Tang K.X., Chen Y.F., Shen Q., et al. Overexpression ALDH1 gene increased artemisinin content in *Artemisia annua* L. Shanghai Jiao Tong University, China. Patent CN201210014242.7, 22 August 2012, 2012c.
15. Collier R., Thomson J.G., Thilmony R. A versatile and robust *Agrobacterium*-based gene stacking system generates high-quality transgenic *Arabidopsis* plants. *The Plant Journal*, 2018, 95(4), 573–583. doi: 10.1111/tpj.13992
16. Untergasser A., Bijl G.J., Liu W., et al. One-step *Agrobacterium* mediated transformation of eight genes essential for rhizobium symbiotic signaling using the novel binary vector system pHUGE. *PLoS One*, 2012, 7(10):e47885. doi: 10.1371/journal.pone.0047885
17. Fujisawa M., Takita E., Harada H., et al. Pathway engineering of *Brassica napus* seeds using multiple key enzyme genes involved in ketocarotenoid formation. *J Exp Bot.*, 2009, 60(4), 1319–1332. doi: 10.1093/jxb/erp006.

18. Ward J., Xu J., Lamb J., et al. The use of *Agrobacterium tumefaciens* to deliver ten genes on a single vector to corn. The 9th International Plant Molecular Biology (IPMB) Congress 2009, 2009, poster #1364.
19. Chung SM, Frankman EL, Tzfira T (2005) A versatile vector system for multiple gene expression in plants. *Trends Plant Sci* 10(8):357–61. doi: 10.1016/j.tplants.2005.06.001
20. Horsch R.B., Fry J.E., Hofmann N.L., et al. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 1985, 227, 1229–1231.
21. Dellaporta S.L., Wood J., Hicks J.B. A plant DNA mini-preparation version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1983, 1, 19–21.
22. Tzfira T., Lacroix B., Citovsky V. Nuclear Import of *Agrobacterium* T-DNA. In: *Madame Curie Bioscience Database* [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000–2013.
23. Gelvin S.B. Integration of *Agrobacterium* T-DNA into the Plant Genome. *Annu Rev Genet.* 2017, 51:195–217. doi: 10.1146/annurev-genet-120215-035320.

Agrobacterium Transformation of Tobacco with a Genetic Module of Antimalarial Agent Artemisinin Biosynthesis

A.P. FIRSOV^{1,*}, T.Yu. MITIUCHKINA¹, A.S. PUSHIN¹, A.K. TZAREVA², A.M. VAINSTEIN³, and S.V. DOLGOV¹

¹*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Pushchino Branch, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Oblast, 142290 Russia*

²*Faculty of Biotechnology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

³*Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, 76100 Israel*

*e-mail: aleksey_firsov@mail.ru

Received December 19, 2019

Revised March 11, 2020

Accepted May 19, 2020

Abstract—Artemisinin-based medicines are the most effective treatment for malaria. To date, the wormwood plants (*Artemisia annua* L.) are the main source of artemisinin. Due to the limited nature of this source, considerable efforts are directed towards the development of methods for artemisinin production via heterologous expression systems. We used in this study agrobacterial transformation to transfer the genetic module of the artemisinin biosynthesis pathway into plants and then analyzed its transcription in a heterologous host. Tobacco plants were transformed with the artemisinin biosynthesis genes encoding amorpha-4,11-diene synthase, artemisin-aldehyde $\Delta 11(13)$ reductase, amorpha-4,11-diene monooxygenase, cytochrome P450 reductase from *A. annua* and yeast 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase cloned in the pArtemC vector; farnesyl diphosphate synthase and aldehyde dehydrogenase were used to transform the plants as parts of vector p2356. As a result of transformation with the pArtemC and p2356 vectors, in two transgenic lines with all target genes were obtained. Five genes of artemisinin biosynthesis and two genes of biosynthesis of its precursors were successfully transferred into the genome of transgenic tobacco lines as a result of the co-transformation with abovementioned vectors. Thus, the entire artemisinin biosynthesis pathway was first reconstructed in heterologous plants: the transcription of the artemisinin biosynthesis genes in the tobacco plants was shown via RT-PCR. The obtained results will be used in further research on expression systems for the production of artemisinin and other non-protein substances in heterologous host plants.

Key words: artemisinin, malaria, metabolic engineering, tobacco, transgenic plants

Funding—This work was supported by a Grant from the Russian Science Foundation no. 19-14-00190.

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-3-34-45