

УДК 578.2

УВЕЛИЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ НАКОПЛЕНИЯ ЦЕЛЕВОГО БЕЛКА В РАСТЕНИИ ПУТЕМ ЕГО ЭКСПРЕССИИ ПОД КОНТРОЛЕМ ДВУХ СУБГЕНОМНЫХ ПРОМОТОРОВ В СОСТАВЕ ФИТОВИРУСНОГО ВЕКТОРА*

© 2015 Е.В. Путляев^{1**#}, А.А. Смирнов^{1#}, О.В. Карпова¹,
И.Г. Атабеков^{1,2}

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
биологический факультет, 119991 Москва; факс: +7(495)938-0601,
электронная почта: putlegor@mail.ru

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,
119991 Москва; факс: +7(495)938-3181,
электронная почта: okar@genebee.msu.ru

Поступила в редакцию 30.01.15

После доработки 06.03.15

В ходе данной работы были созданы несколько вирусных векторов, имеющих архитектуру деконструированного вируса и позволяющих экспрессировать гетерологичные белки в организме растений. В качестве основы для создания этих векторов был использован геном вируса мозаики альтернантеры (ВМАльт) линии MU. Первый из серии полученных векторов (AltMV-single) имел структуру, характерную для вирусных векторов этого типа, то есть из генома ВМАльт был удален тройной блок генов, а целевой ген находился под контролем первого субгеномного промотора ВМАльт. Второй, созданный нами вектор (AltMV-double), отличался от AltMV-single наличием двух различных вирусных субгеномных промоторов, контролирующих экспрессию целевого гена. Нами было продемонстрировано, что AltMV-double обеспечивает существенно более высокий уровень аккумуляции целевого белка, чем AltMV-single. Кроме того, нами было выяснено, что для обеспечения наблюдаемого усиления экспрессии требуется наличие и функционирование обоих субгеномных промоторов в составе AltMV-double. На основании представленных данных нами был сделан вывод о том, что описанный в данной работе способ контроля экспрессии целевого гена с помощью двух субгеномных промоторов, использованный при создании вектора AltMV-double, является дополнительной возможностью увеличения эффективности экспрессии целевого гена, осуществляемой фитовирусным вектором.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: вирус мозаики альтернантеры, вирусный вектор, суперпродукция целевого белка, субгеномный промотор.

В настоящее время разработано значительное количество технологий, позволяющих эффективно экспрессировать чужеродные белки в растениях, такие как ферменты, белки-компоненты вакцин, цитокины и другие белки медицинского назначения [1–5]. Эти технологии,

Принятые сокращения: ВМАльт – вирус мозаики альтернантеры; ОРС – открытая рамка считывания; ТБГ – тройной блок генов; чГ-КСФ – гранулоцитарный колоние-стимулирующий фактор человека; сгРНК – субгеномная РНК; СГП – субгеномный промотор транскрипции; БО – белок оболочки; д.п.и. – дней после инъекции; с.л.м. – сырая листовая масса.

* Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Papers in Press, BM 15-029, 12.04.2015.

** Адресат для корреспонденции.

Авторы внесли равный вклад в работу.

предполагающие использование растений в качестве фабрик для производства трансгенных белков, имеют ряд преимуществ, таких как высокий выход конечного продукта, его низкую себестоимость и высокий уровень биобезопасности, в силу отсутствия общих патогенов у животных и растений [5]. Стратегия временной экспрессии часто используется для увеличения продукции рекомбинантного белка. Эта стратегия заключается в том, что целевой ген доставляется в клетки растения с помощью вирусного вектора. Увеличение эффективности продукции трансгенного белка в растениях является важной задачей современной биотехнологии [4].

Представители рода *Potexvirus* (потексвирусы) – группы РНК-содержащих вирусов, имеющих нитевидные вирионы [6, 7], – одни из наи-

более часто используемых для создания вирусных векторов по сравнению с другими растительными вирусами. Геном потексвирусов представлен одноцепочечной молекулой РНК, содержащей 5 открытых рамок считывания (ОРС). Продукт трансляции ОРС1 является вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразой (репликазой) и транскрибируется непосредственно на матрице геномной РНК, остальные 4 ОРС транскрибируются на матрицах 3 специфических субгеномных РНК (сгРНК), синтез которых происходит под контролем трех субгеномных промоторов (СГП). ОРС 2, 3 и 4 принято называть «тройным блоком генов» (ТБГ, [8]), а продукты трансляции этих ОРС соответственно принято обозначать ТБ1 (продукт трансляции сгРНК1), ТБ2 и ТБ3 (трансляция обоих белков происходит на матрице сгРНК2). Данные белки участвуют в процессах межклеточного и системного распространения вируса, не являясь при этом строго необходимыми компонентами вирусной репликации. Белки ТБГ являются транспортными белками вируса, также участвуя в процессах, не связанных напрямую с транспортом [9, 10]. Пятая, последняя ОРС кодирует белок оболочки вирионов (БО), накапливающийся в наибольших количествах по сравнению с другими вирусными белками. Трансляция ОРС5 происходит на матрице сгРНК3.

За последние 20 лет был разработан ряд стратегий, предполагающих использование вирусных векторов, созданных на основе геномов РНК-содержащих фитовирусов, для экспрессии целевых белков в растениях [5]. Одна из наиболее эффективных стратегий получила название «стратегия деконструированного вируса» [4, 5]. Она основывается на том, что доставка векторной кДНК внутрь растительных клеток осуществляется посредством агробактерии, т.н. методом агроинъекции [5], обеспечивающим доставку кДНК почти в 100% клеток, находящихся в зоне агроинъекции. При этом подходе нет необходимости в наличии транспортных белков вируса, поэтому можно удалить кодирующие их ОРС из состава векторной кДНК. В свою очередь, удаление ОРС транспортных белков снимает известные ограничения, накладываемые на размер трансгенной вставки в вектор, а также ликвидирует конкуренцию за клеточные ресурсы между ОРС транспортных белков и целевым геном.

Недавно в нашей лаборатории [13] был описан новый штамм вируса мозаики альтернантеры – ВМАльт-MU (*Alternanthera mosaic virus*, AltMV-MU, GeneBank FJ822136.1), представитель семейства Alphaflexiviridae, рода *Potexvirus* [11, 12]. Геномная молекула РНК ВМАльт (рис. 1, а)

имеет длину 6606 нт и организацию, характерную для потексвирусов [13]. Ранее для создания двукомпонентного вектора для экспрессии целевого белка был использован другой штамм ВМАльт – AltMV-SP [14]. В данной работе описан способ повышения уровня экспрессии целевого гена, обеспечиваемого вирусными векторами, созданными по принципу деконструированного вектора на основе геномов потексвирусов. Предложенный метод заключается в использовании двух последовательно расположенных субгеномных вирусных промоторов для контроля экспрессии целевого гена. Созданы несколько вирусных «деконструированных» векторов на основе генома ВМАльт штамма MU, один из которых позволил достигнуть значительного уровня экспрессии целевого белка в растениях *Nicotiana benthamiana*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Создание векторов на основе последовательности генома ВМАльт. Для создания векторов была использована последовательность кДНК копии генома AltMV-MU [13]. Полная последовательность кДНК копии генома AltMV-MU ранее получена в форме ряда фрагментов, клонированных в плазмиды pBluescript SK+: pAltMV19

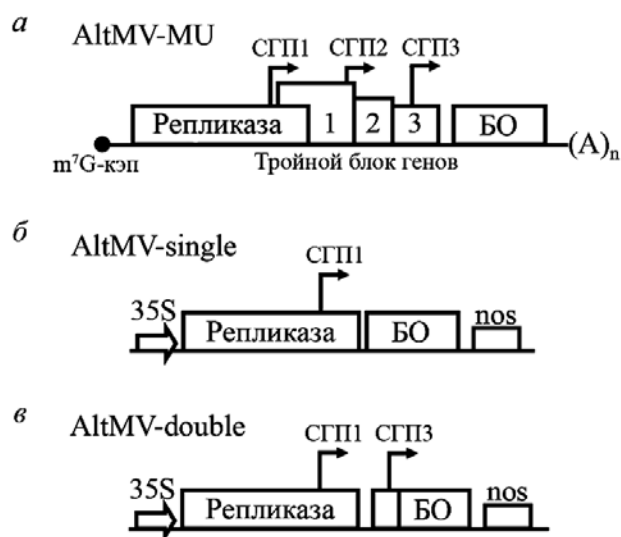


Рис. 1. Схема расположения основных элементов в составе генома ВМАльт-MU и векторов, созданных на основе его последовательности. а – Схема геномной РНК ВМАльт-MU; б – AltMV-single; в – AltMV-double; СГП 1, 2, 3 – предполагаемые промоторы синтеза субгеномных РНК. 35S – промотор транскрипции 35S вируса мозаики цветной капусты. nos – терминатор транскрипции гена нопалинсинтетазы. (A)_n – полиаденيلاتный тракт

(1–1639 нт); pAltMV12 (1292–3446 нт); pAltMV46 (3279–4488 нт); pAltMV33 (4335–5559 нт); pAltMV50 (5479–6606 нт). Порядковые номера первого и последнего нуклеотидов соответствующих фрагментов в геноме AltMV-MU (1–6606 нт, Gen Bank FJ822136.1) указаны в скобках. pPVX201 [14] был использован в качестве ПЦР-матрицы для получения последовательностей 35S промотора транскрипции (35S) вируса мозаики цветной капусты и терминатора транскрипции гена нопалин-синтетазы (nos).

Нуклеотидные последовательности молекул ДНК, использованных при создании векторов

на основе генома AltMV-MU, представлены в табл. 1 с указанием названий олигонуклеотидных праймеров для ПЦР и специфических эндонуклеаз рестрикции. Последовательности нуклеотидов всех праймеров для ПЦР, использованных в работе, приведены в табл. 2.

Для создания AltMV-single (рис. 1, б) фрагмент последовательности генома AltMV-MU (с 4725 по 5762 нт) был удален, а старт-кодон трансляции ТБ1 был заменен с АТГ на АСГ. Полученная таким образом последовательность была вставлена в плазмиду pCambia1300 вместе с полученными ранее последовательностями

Таблица 1. Схема получения промежуточных фрагментов ДНК, использованных для создания вирусных векторов на основе последовательности генома AltMV-MU

Название результирующего фрагмента ДНК	Названия фрагментов ДНК, использованных в реакции	Названия специфических эндонуклеаз рестрикции или специфических олигонуклеотидных праймеров, использованных в соответствующих реакциях специфического расщепления или амплификации
PCR1	pPVX201	AL2015, AL2016
PCR2	AltMV19	AL2021, AL2020
PCR3	PCR1, PCR2	AL2016, AL2020
PCR4	AltMV33	AL2012, AL2011
PCR5	AltMV50	AL2014, AL2013
PCR6	PCR4, PCR5	AL2012, AL2013
Restr1	AltMV19	<i>EcoRI, AfeI</i>
Restr2	AltMV12	<i>AfeI, SphI</i>
Restr3	pPVX201	<i>KpnI, EcoRI</i>
Restr4	AltMV12	<i>BglII, SphI</i>
Restr5	AltMV46	<i>BglII, EcoRV</i>
Restr6	AltMV46	<i>EcoRV, BamHI</i>
Restr7	AltMV33	<i>BamHI, SpeI</i>
PCR7	AltMV33	AL2012, AL2018
PCR8	AltMV50	AL2019, AL2013
PCR9	PCR7, PCR8	AL2012, AL2013
PCR10	AltMV-double	AL2012, AL2038
PCR11	AltMV-double	AL2029, AL2013
Restr8	PCR10	<i>SpeI, SalI</i>
Restr9	PCR11	<i>SalI, KpnI</i>
Restr10	AltMV-double	<i>SpeI</i>
Restr11	Restr10	<i>SalI</i>
Restr12	AltMV-double	<i>KpnI</i>
Restr12	Restr11	<i>SalI</i>
PCR11	AltMV-double	AL2060, AL2061
PCR12	pGEM3Z-hGCSF	AL2051, AL2050
PCRA	AltMV-double	AL2012, AL2038
PCRB	AltMV-double	AL2029, AL2013

Таблица 2. Список названий олигонуклеотидных праймеров, использованных в работе, с приведенными нуклеотидными последовательностями

Название олигонуклеотидного праймера	Нуклеотидная последовательность
AL2011	5'- cttgaggaaatggagtgacatgaggtaataaagtattcgtctttgggaag-3'
AL2012	5'- gagagagagcttcaggatgattgagcag-3'
AL2013	5'-gccggtaccttttttttttttttttttttttttttttttttcgtaaatag-3'
AL2014	5'- atgtccactccatttctcaagtcac-3'
AL2015	5'-ggttcctttgctttgtttgctttacttttctcctcctccaatgaaatgaact-3'
AL2016	5'- ccgctagagtcacatggaggagcacgacac-3'
AL2017	5'-gtaatcgatctcctcgaaagggcaaatggactttcggctcctttgctttgtttgctttgctt-3'
AL2018	5'- agagccctgatggtctctggtggaggtaataaagtattcgtctttgggaag-3'
AL2019	5'- caccagagaccatcagggtct-3'
AL2020	5'-catggaattctagctcgtatgctggggtg-3'
AL2021	5'- gtaaagcaagcaaaacaagcaaggaacc-3'
AL2022	5'-agaatctgcagaatttcgggagag-3'
AL2023	5'- gagccctgatggtctctggtggatgacttttaactaagataagactagg-3'
AL2024	5'-gagccctgatggtctctggtggaggaaatggagtgacgtgatgac-3'
AL2025	5'-gtatcaatggaaacttaaccgttcagaggtaataaagtattcgtctttggg-3'
AL2026	5'-tgctagctggtgctgacgtcttcgagtatcaatggaaacttaaccgttca-3'
AL2027	5'-gagccctgatggtctctggtgctgactggtgctgacgtctttcg-3'
AL2038	5'-atgaaggcaataactagtagttc-3'
AL2029	5'-cgaggcatgcatgaaggcaataactagtagttc-3'
AL2050	5'-gcttggcgcgccatgacaccattaggtctgcttcg-3'
AL2051	5'-cgttcctaggttagtgatggtgatggtgatgggctgggcaagg-3'
AL2060	5'-gatggggcccaccactgttaggc-3'
AL2061	5'-gatgactagtttaagtcaggaggaggagaagtttaaaacttttctcc-3'

35S и pos, как показано на рис. 1, б. С этой целью четыре фрагмента ДНК были вставлены в участок плазмиды pCambia1300 между сайтами рестрикции *XbaI-EcoRI*: **Subcl1**, расщепленный эндонуклеазами *XbaI* и *SphI*; **Subcl2** – эндонуклеазами *SphI* и *BamHI*; **PCR6** – эндонуклеазами *BamHI* и *KpnI*; **Restr3**. Чтобы получить конструкцию **Subcl1**, плазида pSL1180 была расщеплена *XbaI* и *SphI*, после чего лигирована с фрагментами Restr1, Restr2 и PCR3, расщепленными *XbaI* и *EcoRI*. Другая конструкция, **Subcl2**, была получена путем реакции лигирования плазмиды pSL1180, расщепленной *SphI* и *SpeI*, с фрагментами Restr4,5,6,7.

Конструкция AltMV-double была также получена на основе последовательности генома AltMV-MU путем удаления его фрагмента (с 4725 по 5762 нт), мутационной замены старт-кодона OPC ТБ1 (ATG to ACG) и вставки в плазмиду pCambia1300 совместно с 35S и pos, как это ранее было описано для AltMV-single. Для соз-

дания AltMV-double следующие фрагменты ДНК были вставлены в регион плазмиды pCambia1300 между сайтами расщепления эндонуклеазами *XbaI-EcoRI*: **Subcl1**, расщепленный *XbaI* и *SphI*; **Subcl2**, расщепленный *SphI* и *BamHI*; PCR9, расщепленный *BamHI* и *KpnI*; Restr3.

Вектор AltMV-double* был создан на основе последовательности вектора AltMV-double путем замены G(4683)A, осуществленной с помощью ПЦР, т.е. фрагмент PCR11 был расщеплен *ApaI* и *SpeI*, а затем вставлен в регион *ApaI-SpeI* конструкции AltMV-double.

Для создания вектора на основе последовательности AltMV-double, позволяющего экспрессировать в растениях гранулоцитарный колоние-стимулирующий фактор человека (AltMV-d-gcsf и чГ-КСФ, соответственно), фрагмент нуклеотидной последовательности AltMV-double (с 5961 по 6382 нт) был замещен OPC, представляющей собой последовательность, кодирующую чГ-КСФ с дополнительной последова-

тельностью, кодирующей сайт расщепления энтерокиназой [15] и шесть гистидиновых остатков на 3'-конце. Эта последовательность была получена из конструкции pGEM3Z-hGCSF, использованной в работе Зверевой и соавт. [15]. В соответствии с работой Комаровой и соавт. [16], с 3'-стороны от вставки были оставлены 100 нт из ОРС БО в целях увеличения эффективности экспрессии целевого гена. Инициаторный кодон ATG ОРС БО ВМАльт был заменен на кодон ACG. Схема получения конструкции AltMV-d-gcsf состоит из трех частей. Конструкция pAl3016 была получена следующим образом: последовательность PCRA была расщеплена *SpeI* и *SalI*, а PCRB расщеплена *SalI* и *KpnI*, после чего продукты расщепления обеих последовательностей были клонированы в регион *KpnI*–*SpeI* плазмиды pSL1180. Далее, pAl3017 была получена путем вставки фрагментов Restr9 и Restr11 в регион AhiI–*KpnI* конструкции pAl3016. Для получения финальной конструкции AltMV-d-gcsf, последовательность PCR12 была вставлена в регион AscII–AvrII конструкции pAl3017.

Агроинъекция вирусных векторов в листья растений *Nicotiana benthamiana* осуществлялась согласно протоколу, описанному в [15]. Трансформацию проводили в клетки штамма GV3101. Трансформированные бактериальные клетки были инкубированы в течение ночи при 26° в питательной среде 2YT с содержанием рифампицина (50 мг/л), канамицина (50 мг/л) и гентамицина (25 мг/л). Ночную культуру центрифугировали 5 мин при 5000 g, после чего осадок ресуспендировали в буфере для агроинъекции (10 mM MgSO₄, 10 mM MES-NaOH, pH 5,5) до достижения значения показателя светопоглощения A₆₀₀ = 0,2. Для увеличения эффективности аккумуляции целевого белка все векторы агроинъектировали в паре с дополнительным вектором, экспрессирующим белок p19 томбусвируса – супрессор посттранскрипционного умолкания генов [17]. Суспензии трансформированных агробактерий инъектировали в листья *N. benthamiana* посредством шприца со снятой иглой.

Выделение белка оболочки AltMV-MU из агроинъектированных листьев растений. Инфицированные листья анализировали через определенное количество дней после агроинъекции (д.п.и.). Собранные образцы листьев гомогенизировали в 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, после чего центрифугировали при 16 000 g в течение 15 мин. Полученный супернатант (фракция S16) использовали для дальнейшего анализа.

Изучение транскрипционной активности субгеномных промоторов. Образование субгеномных РНК в агроинъектированных листьях было проанализировано методом 5'-Step-out RACE

(обратной транскрипции с добавлением 5'-концевого фрагмента известной нуклеотидной последовательности и последующей ПЦР). Образцы листьев *Nicotiana benthamiana*, трансформированных вирусными векторами, собирали для исследования на 3 д.п.и. Собранные образцы замораживали в жидком азоте, гомогенизировали и выделяли тотальную РНК с помощью TRI REAGENT (Molecular Research Center, США) в соответствии с протоколом производителя. кДНК копии сгРНК были получены методом 5'-Step-out RACE (Mint Universal cDNA Synthesis Kit, «Евроген», Россия) согласно протоколу, представленному производителем с незначительными изменениями: первая цепь кДНК была синтезирована с использованием олигонуклеотидного праймера AltMVCPrev (tgtgtcgcactcagtgatggatggtgat gctccgggtggaggattga), комплементарного 3'-концевому участку гена БО AltMV-MU. Двучепочечная кДНК была амплифицирована с использованием олигонуклеотидных праймеров AltMV CPrev и M1 («Евроген», Россия). Продукты реакции 5'-Step-out RACE были проанализированы методом электрофореза в агарозном 1%-ном геле. Разделенные таким образом продукты реакции были выделены из агарозного геля, после чего их нуклеотидная последовательность была определена («Евроген», Россия).

Выделение и очистка рекомбинантного чГ-КСФ из агроинъектированных листьев растений. Для выделения целевого белка, имеющего на N-конце шесть дополнительных гистидинов, образцы агроинъектированных листьев замораживали в жидком азоте и измельчены в ступке до порошкообразного состояния и ресуспендированы в буфере А («Qiagen», Германия), выдержаны 4 ч при комнатной температуре и центрифугированы при 16 000 g 15 мин при 15°. Аликвоты супернатантов были собраны для анализа количества содержащегося в них неочищенного целевого белка. Хроматографическую очистку остального объема супернатанта проводили на Ni²⁺-нитрилотриацетатной агарозе согласно протоколу производителя (QIA expressionist, «Qiagen», Германия).

Анализ количества накапливаемого в растениях рекомбинантного чГ-КСФ. Образцы неочищенного и подвергнутого грубой очистке целевого белка, полученные из агроинъектированных листьев, анализировали методом электрофореза в ДСН-ПААГ (окраска Кумасси, Brilliant Blue G-250). Далее, с помощью геле-документирующей системы ChemiDoc™ XRS Plus («Bio-Rad», США) было получено цифровое изображение геля и рассчитано относительное количество белка в составе соответствующих окрашенных полос с помощью пакета компьютерных программ TotalLab Quant («TotalLab Ltd», Англия).

**РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ
И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

Экспрессия БО ВМАльт в растениях с помощью AltMV-double. В качестве основного принципа создания нового вирусного вектора на основе кДНК-копии генома ВМАльт была избрана концепция «деконструированного вируса», согласно которой из исходной последовательности вирусного генома были удалены гены транспортных белков (рис. 1, а, б, в). Данная стратегия была избрана в силу ее высокой биобезопасности (5). В качестве первого вектора был создан вектор «AltMV-single», имевший устройство, аналогичное подобным векторам, созданным на основе генома потексвирусов [16]. В последовательности AltMV-single ген БО был расположен таким образом, что его экспрессия контролировалась СГП1 (рис. 1, б). В целях повышения эффективности экспрессии целевого белка был также создан вектор, получивший название «AltMV-double», особенностью конструкции которого были два СГП – СГП1 и СГП3, ранее описанные в работе Лима с соавт. [18], – расположенные последовательно друг за другом и контролирующие экспрессию целевого гена (рис. 1, в).

Векторы AltMV-double и AltMV-single были агроинъецированы в листья *N. benthamiana*. В качестве модельного гена интереса был использован ген БО ВМАльт (рис. 1, б, в). Количество экспрессированного в растениях целевого белка было измерено на 8, 9, 13 д.п.и. методами ДСН-ПААГ электрофореза (рис. 2, а) и Вестерн-блоттинга с антисывороткой к БО ВМАльт (рис. 2, б). В результате было показано, что при анализе фракции S16 инфицированных листьев методом электрофореза в геле присутствует широкая полоса белка, соответствующая по молекулярной массе БО ВМАльт (22 кДа). Также из полученных данных можно сделать вывод о том, что AltMV-double обеспечивает значительно более высокий уровень экспрессии целевого гена (рис. 2, а, дорожки 4, 5, б), чем AltMV-single (рис. 2, а, дорожки 2, 3).

Для определения количества БО ВМАльт, экспрессируемого в листьях растений, агроинъецированных AltMV-double, ряд последовательных разведений фракции S16 был исследован методом электрофореза в ДСН-ПААГ (окраска Кумаси). Согласно полученным данным, максимальное количество БО ВМАльт, экспрессированное с помощью вектора AltMV-double в листьях *N. benthamiana*, составило ~5,5 мг целевого белка в 1 г сырой листовой массы (с.л.м.). В соответствии с данными, представленными в работах [4] и [19], полученное количество целе-

вого белка составляет ~50% от всего растворимого белка тканей листа. Для сравнения, количество того же белка, экспрессируемое исходным вирусом AltMV-MU в инфицированных листьях, составляет ~340 мкг на 1 г [20]. Таким образом, предлагаемый подход, состоящий в одновременном использовании двух субгеномных промоторов для контроля экспрессии одного целевого гена является эффективным для достижения суперэкспрессии гена БО в растении *N. benthamiana*.

В недавней работе Лима с соавт. [21] была представлена новая векторная система, созданная на основе последовательности генома ВМАльт. Описанный в этой работе вектор предназначен для доставки внутрь клеток растения с помощью агробактерии, а транскрипция РНК вектора происходит под контролем двух промоторов транскрипции – 35S и Т7. Несмотря на свою эффективность, данный вектор требует дополнительной экспрессии РНК-полимеразы Т7 в трансформируемых клетках, в то время как вектор AltMV-double для его экспрессии требует только наличия репликазы ВМАльт, ген которой присутствует в составе вектора. Ванг с соавт. [22] создали на основе последовательности генома

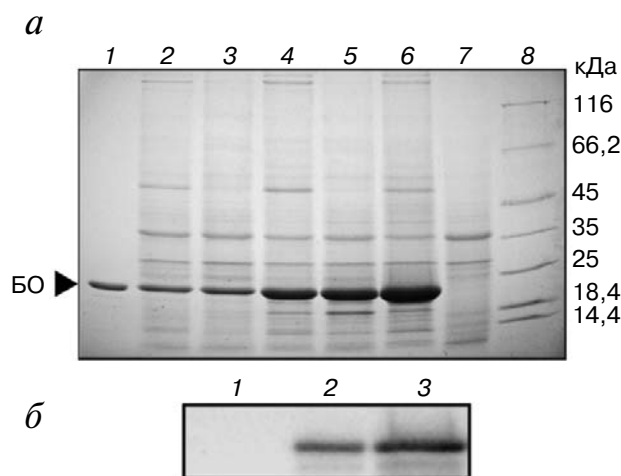


Рис. 2. Кинетика экспрессии БО ВМАльт в листьях *Nicotiana benthamiana*, агроинъецированных векторами AltMV-single и AltMV-double (а): 1) 1 мкг БО ВМАльт (положительный контроль); фракция S16, полученная из листьев, агроинъецированных: 2) AltMV-single, 8 д.п.и.; 3) AltMV-single, 9 д.п.и.; 4) AltMV-double, 8 д.п.и.; 5) AltMV-double, 9 д.п.и.; 6) AltMV-double, 13 д.п.и.; 7) только P19 (отрицательный контроль); 8) маркеры мол. массы приведены в кДа; 8–20%-ный ДСН-ПААГ, окраска Кумаси R-250. Вестерн-блоттинг с антисывороткой к БО ВМАльт (б): 1) отрицательный контроль – фракция S16 листьев, агроинъецированных P19; 2) положительный контроль – 0,2 мкг БО ВМАльт; 3) фракция S16 листьев, агроинъецированных вектором AltMV-double

ХВК вектор рСаРVХ760-ГFР, который имеет в своем составе три различных СГП (в т.ч. один СГП ВТМ), расположенных на 3'-конце последовательности генома ХВК и разделенных мультиклональными сайтами. Следует отметить, что три СГП, содержащиеся в конструкции рСаРVХ760-ГFР были использованы авторами с целью экспрессии нескольких целевых генов одновременно в одном растении, а не как способ усиления экспрессии единственного целевого гена. В упомянутой работе не приводятся данные, позволяющие судить о функциональ-

ности каждого из трех СГП в случае, когда в состав вектора клонирован единственный целевой ген, а также не представлено данных о количестве целевого белка, аккумулируемого конструкцией рСаРVХ760-ГFР [22].

Оба субгеномных промотора в составе вектора **AltMV-double** являются функциональными. Нами была проведена серия экспериментов, результаты которых позволяют судить о причинах повышения уровня экспрессии БО при использовании AltMV-double. Анализ сгРНК, образующихся в ходе репликации векторов AltMV-single и

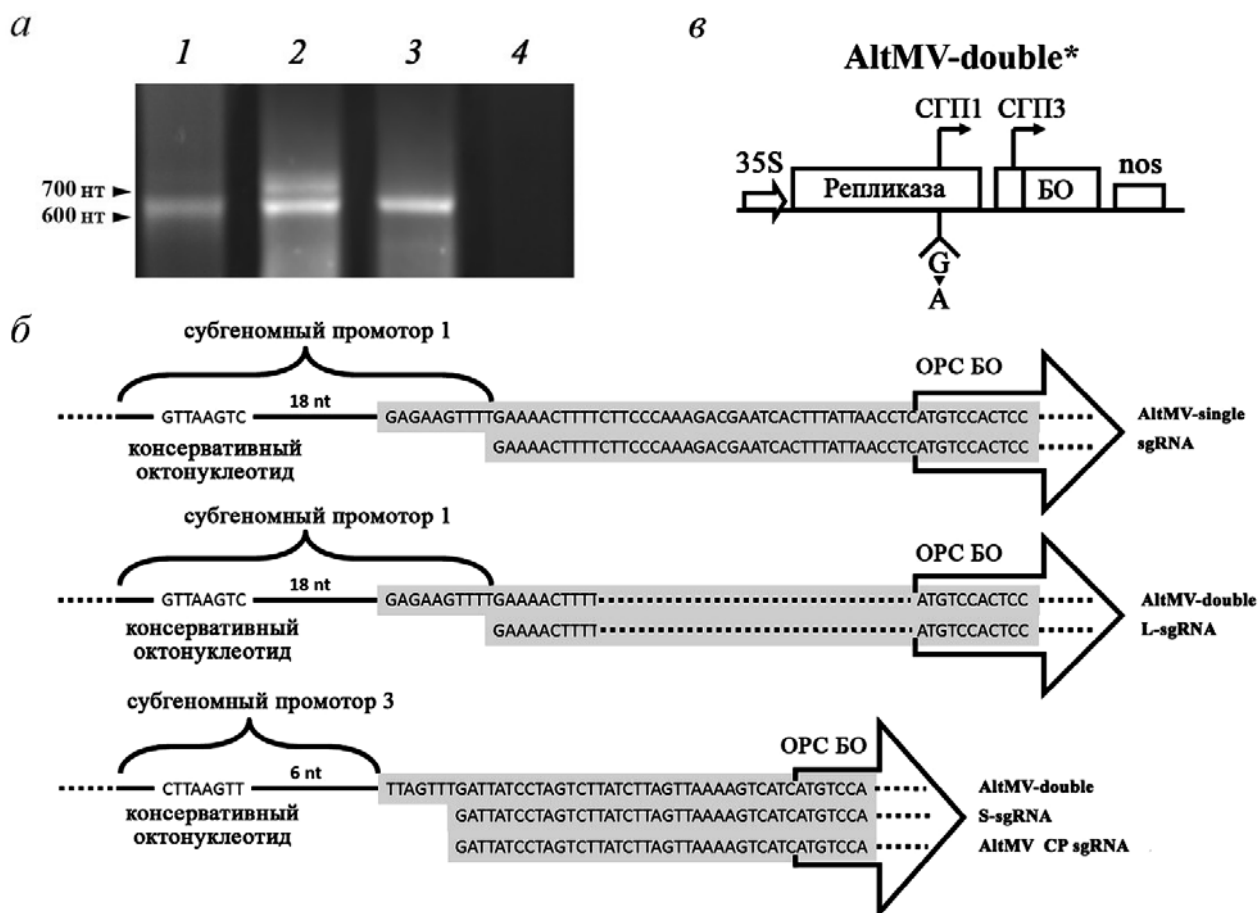


Рис. 3. Анализ трансляционной активности СГП вектора AltMV-double. *а* – Исследование методом электрофореза в 1%-ном агарозном геле продуктов 5'-Step-out RACE ОТ-ПЦР РНК, выделенной из листового материала, агроинъецированного 1) AltMV-single, 2) AltMV-double, 3) AltMV-double*, 4) P19; *б* – выравнивание нуклеотидных последовательностей продуктов реакций 5'-Step-Out RACE ОТ и образцов РНК, выделенных из листьев агроинъецированных растений *N. benthamiana*: серым цветом выделены участки совпадения сравниваемых последовательностей; на схеме отдельно указаны консервативные октануклеотиды, характерные для СГП потексвирусов. Фрагменты последовательностей AltMV-single и AltMV-double выравнены с фрагментами последовательностей кДНК-копий, соответствующих 5'-концевым участкам сгРНК, образуемых этими векторами в ходе их репликации в листьях растений. Нуклеотидная последовательность AltMV-single выравнена с последовательностью единственной сгРНК, образуемой этим вектором (верхняя схема). Фрагменты последовательности AltMV-double выравнены с последовательностями L- и S-sgRNA (центральная и нижняя схемы соответственно). Также в нижнюю схему выравнивания добавлена последовательность сгРНК ВМАльт, содержащей OPC5 и полностью идентичной по последовательности S-sgRNA AltMV-double; *в* – схематическое изображение основных элементов конструкции AltMV-double* с заменой нуклеотида, соответствующего точке старта транскрипции сгРНК, контролируемой СГП1

AltMV-double в клетках растения, был произведен методом 5'-Step-out RACE ОТ-ПЦР с последующим установлением первичной структуры полученных кДНК-копий сгРНК. Результаты, представленные на рис. 3, а указывают, что в ходе амплификации AltMV-double одновременно образуются две сгРНК различной длины, в то время как при амплификации AltMV-single образуется лишь одна сгРНК. Выравнивание полученных последовательностей кДНК копий сгРНК с последовательностью генома соответствующих векторов показало (рис. 3, б), что старт транскрипции более длинной сгРНК AltMV-double (L-sgRNA, 740 нт) располагается в районе последовательности вектора, соответствующем предполагаемому СГП1, а старт транскрипции более короткой сгРНК AltMV-double (S-sgRNA, 637 нт) совпадает с районом, соответствующим СГП3. Полученный результат позволяет сделать вывод о том, что оба СГП, находящиеся в составе AltMV-double, являются транскрипционно активными.

Для исследования необходимости наличия двух транскрипционно активных СГП в составе AltMV-double для поддержания высокого уровня экспрессии целевого белка, была создана дополнительная конструкция AltMV-double*, полученная путем блокирования транскрипционной активности СГП1 в составе последовательности AltMV-double (рис. 3, в). Транскрипционная инактивация СГП1 была достигнута путем мутационной замены гуанилатного остатка в составе СГП1, соответствующего первому гуанилатному остатку последовательности L-sgRNA, аналогично тому, как это было сделано ранее для ХВК [24]. Исследование сгРНК, образуемых AltMV-double* методом 5'-Step-out RACE, и определение установления первичной структуры полученных кДНК-копий сгРНК показали присутствие единственной формы сгРНК – S-sgRNA (рис. 3, а, дорожка 3). Сравнение относительных количеств БО, продуцируемого векторами AltMV-single, AltMV-double и AltMV-double* на 4, 5, 7 д.п.и. (рис. 4), показало, что AltMV-double* поддерживает существенно более высокий уровень экспрессии целевого белка, по сравнению с AltMV-single. В то же время, согласно полученным результатам, AltMV-double* демонстрирует значительно более низкую эффективность экспрессии целевого белка, по сравнению с AltMV-double. Полученные данные указывают на необходимость наличия обоих СГП в функциональном состоянии для обеспечения высокой эффективности накопления целевого белка в растениях вектором AltMV-double.

Экспрессия гетерологичного (человеческого) целевого белка в растениях с помощью вектора

AltMV-double. В экспериментах, приведенных выше, БО ВМАльт был использован в качестве модельного целевого белка, удобного для сравнения эффективности его экспрессии с помощью векторов AltMV-single и AltMV-double. Для изучения экспрессии гетерологичного не-вирусного белка в растениях с помощью AltMV-double использовали гранулоцитарный колоние-стимулирующий фактор человека (чГ-КСФ, КСФ3). Недавно были описаны случаи успешной экспрессии цитокинов человека в растениях с помощью векторов, созданных на основе геномов РНК-содержащих фитовирусов [15, 25]. Мы сравнили результаты, опубликованные в этих работах, с количеством чГ-КСФ, экспрессированного в растениях с помощью AltMV-double. Для экспрессии чГ-КСФ *in planta* нами был создан вектор AltMV-d-gcsf путем частичной замены гена БО в составе AltMV-double на последовательность, кодирующую чГ-КСФ и слитую с 3'-конца с последовательностью, кодирующей шесть гистидиновых оснований. Экспрессированный чГ-КСФ был выделен из агроинъецированных вектором листьев методом металл-хелатной афинной хроматографии. Анализ хроматографического профиля методом ДСН-ПААГ электрофореза (окраска красителем Кумасси) (рис. 5, а) и методом Вестерн-блоттинга

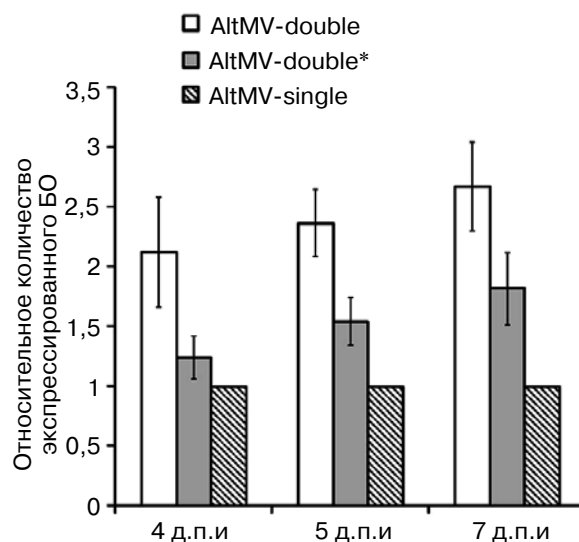


Рис. 4. На диаграмме представлены относительные количества БО ВМАльт, аккумулированные в листьях с помощью векторов AltMV-single, AltMV-double и AltMV-double* в агроинъецированных листьях *N. benthamiana*, измеренные на 4, 5, 7 д.п.и. Количество БО ВМАльт экспрессированного в листьях с помощью вектора AltMV-single в каждый из проанализированных дней принят за 1. Погрешность измерения соответствует 95%-ному доверительному интервалу средних значений измеряемых величин ($n = 3$)

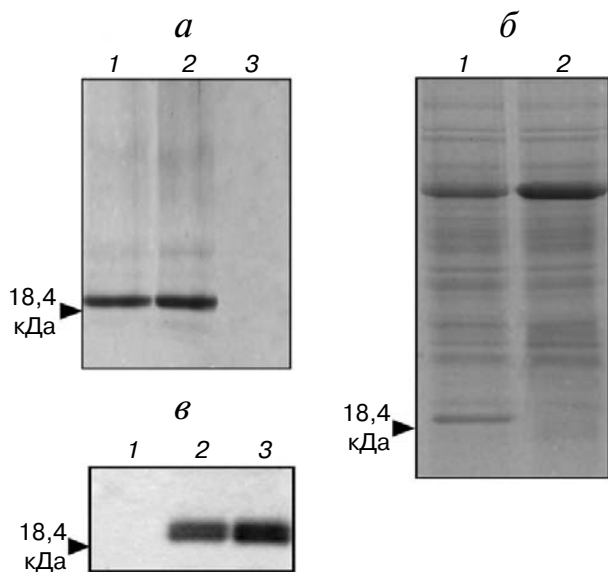


Рис. 5. Анализ экспрессии чГ-КСФ в листьях растений *Nicotiana benthamiana*, агроинъецированных AltMV-d-gcsf. Реконбиантный белок был выделен методом металл-хелатной аффинной хроматографии на Ni-NTA агарозе и проанализирован методами: *а* – 8–20%-ный ДСН-ПААГ с окрашиванием Кумасси: 1, 2) лист, агроинъецированный AltMV-d-gcsf, 3) лист, агроинъецированный P19; *б* – Вестерн-блоттинг с антисывороткой к чГ-КСФ, экспрессированному в клетках *E. coli*: 1) лист, агроинъецированный P19, 2) 0,4 мкг чГ-КСФ, экспрессированного в клетках *E. coli*, 3) чГ-КСФ, экспрессированный в листьях, агроинъецированных AltMV-d-gcsf; *в* – анализ накопления чГ-КСФ в фракции S16 листьев *Nicotiana benthamiana* методом 8–20%-ного ДСН-ПААГ с окрашиванием Кумасси: 1) лист, агроинъецированный AltMV-d-gcsf; 2) лист, агроинъецированный P19. Стрелкой указана мол. чГ-КСФ

с антисывороткой к чГ-КСФ, экспрессированному в клетках бактерий (рис. 5, б), выявил присутствие чГ-КСФ (18,4 кДа). Количество очищенного чГ-КСФ составило 400 мкг целевого белка в 1 г с.л.м. Эффективность накопления

целевого белка была исследована в составе фракции растворимого белка из неочищенных экстрактов инфицированных листьев (рис. 5, в). Согласно полученным данным, эффективность накопления целевого белка составила до 590 мкг неочищенного чГ-КСФ в 1 г с.л.м., или до 5,5% от всего растворимого белка в белковом экстракте. Таким образом, рассчитанная нами эффективность выделения чГ-КСФ составила ~73%.

Согласно имеющейся на сегодняшний день информации, представленной в научной литературе, данный результат является одним из наиболее высоких на сегодняшний день для чГ-КСФ, экспрессированного в растении с помощью фитовирусного вектора. Ранее были опубликованы данные, свидетельствующие о накоплении 100 мкг очищенного и 400 мкг неочищенного чГ-КСФ в 1 г с.л.м. [15], а также 19 мкг неочищенного ГМ-КСФ (гранулоцитарный макрофагарный КСФ) в 1 г суммарного растворимого белка клетки, что составляет приблизительно 160 мкг целевого белка в 1 г с.л.м. [25]. Эти данные служат подтверждением того, что AltMV-double является мощным экспрессионным вектором, который позволяет достигать высоких уровней экспрессии целевого белка в растениях. Мы считаем, что описанный в представленной работе подход, предполагающий одновременный контроль экспрессии целевого гена с помощью нескольких субгеномных промоторов, является перспективным в силу своей эффективности и простоты. В то же время возможность применения этого подхода к СГП других групп вирусов требует дополнительного изучения.

Авторы выражают благодарность П.А. Иванову за предоставленную кДНК-копию генома AltMV-MU, а также кДНК-копию мРНК чГ-КСФ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-24-00007).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Boehm, R. (2007) Bioproduction of therapeutic proteins in the 21st century and the role of plants and plant cells as production platforms, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1102**, 121–134.
- Larrick, J.W., and Thomas, D.W. (2001) Producing proteins in transgenic plants and animals, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **12**, 411–418.
- Mett, V., Farrance, C.E., Green, B.J., and Yusibov, V. (2008) Plants as biofactories, *Biologicals*, **36**, 354–358.
- Gleba, Y.Y., Klimyuk, V., and Marillonnet, S. (2007) Viral vectors for the expression of proteins in plants, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **18**, 134–141.
- Gleba, Y.Y., Tuse, D., and Giritch, A. (2014) Plant viral vectors for delivery by *Agrobacterium*, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **375**, 155–192.
- Verchot-Lubicz, J., Ye, C.M., and Bamunusinghe, D. (2007) Molecular biology of potexviruses: recent advances, *J. Gen. Virol.*, **88**, 1643–1655.
- Park, M.R., Seo, J.K., and Kim, K.H. (2013) Viral and nonviral elements in potexvirus replication and movement and in antiviral responses, *Adv. Virus Res.*, **87**, 75–112.
- Morozov, S.Y., and Solovyev, A.G. (2003) Triple gene block: modular design of a multifunctional machine for plant virus movement, *J. Gen. Virol.*, **84**, 1351–1366.
- Tilsner, J., Linnik, O., Wright, K.M., Bell, K., Roberts, A.G., Lacomme, C., Santa Cruz, S., and Oparka, K.J. (2012) The TGB1 movement protein of Potato virus X reorganizes actin and endomembranes into the X-body, a viral replication factory, *Plant Physiol.*, **158**, 1359–1370.

10. Bayne, E.H., Rakitina, D.V., Morozov, S.Y., and Baulcombe, D.C. (2005) Cell-to-cell movement of potato potexvirus X is dependent on suppression of RNA silencing, *Plant J.*, **44**, 471–482.
11. Geering, A.D., and Thomas, J.E. (1999) Characterisation of a virus from Australia that is closely related to papaya mosaic potexvirus, *Arch. Virol.*, **144**, 577–592.
12. Hammond, J., Reinsel, M.D., and Maroon-Lango, C.J. (2006) Identification and full sequence of an isolate of *Alternanthera* mosaic potexvirus infecting *Phlox stolonifera*, *Arch. Virol.*, **151**, 477–493.
13. Ivanov, P.A., Mukhamedzhanova, A.A., Smirnov, A.A., Rodionova, N.P., Karpova, O.V., and Atabekov, J.G. (2010) The complete nucleotide sequence of *Alternanthera* mosaic virus infecting *Portulaca grandiflora* represents a new strain distinct from phlox isolates, *Virus Genes*, **42**, 268–271.
14. Baulcombe, D.C., Chapman, S., and Santa-Cruz, S. (1995) Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections, *Plant J.*, **7**, 1045–1053.
15. 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., and Atabekov, J.G. (2009) Production of biologically active human myelocytokines in plants, *Biochemistry (Moscow)*, **74**, 1187–1194.
16. Komarova, T.V., Skulachev, M.V., Zvereva, A.S., Schwartz, A.M., Dorokhov, Yu.L., and Atabekov, J.G. (2006) New viral vector for efficient production of target proteins in plants, *Biochemistry (Moscow)*, **71**, 846–850.
17. Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., and Baulcombe, D. (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus, *Plant J.*, **33**, 949–956.
18. Lim, H.S., Vaira, A.M., Reinsel, M.D., Bae, H., Bailey, B.A., Domier, L.L., and Hammond, J. (2010) 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.*, **91**, 277–287.
19. Marillonnet, S., Thoeringer, C., Kandzia, R., Klimyuk, V., and Gleba, Y. (2005) Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants, *Nature Biotechnol.*, **23**, 718–723.
20. Mukhamedzhanova, A.A., Smirnov, A.A., Arkhipenko, M.V., Ivanov, P.A., Chirkov, S.N., Rodionova, N.P., Karpova, O.V., and Atabekov, J.G. (2011) Characterization of *Alternanthera* mosaic virus and its Coat Protein, *Open Virol. J.*, **5**, 136–140.
21. Lim, H.S., Vaira, A.M., Domier, L.L., Lee, S.C., Kim, H.G., and Hammond, J. (2010) Efficiency of VIGS and gene expression in a novel bipartite potexvirus vector delivery system as a function of strength of TGB1 silencing suppression, *Virology*, **402**, 149–163.
22. Wang, Y., Cong, Q.Q., Lan, Y.F., Geng, C., Li, X.D., Liang, Y.C., Yang, Z.Y., Zhu, X.P., and Li, X.D. (2014) Development of new potato virus X-based vectors for gene over-expression and gene silencing assay, *Virus Res.*, **191**, 62–69.
23. Kim, K.-H., and Hemenway, C.L. (1999) Long-distance RNA–RNA interactions and conserved sequence elements affect potato virus X plus-strand RNA accumulation, *RNA*, **5**, 636–645.
24. Kim, K.-H., and Hemenway, C. (1997) Mutations that alter a conserved element upstream of the potato virus X triple block and coat protein genes affect subgenomic RNA accumulation, *Virology*, **232**, 187–197.
25. Zhou, F., Wang, M.L., Albert, H.H., Moore, P.H., and Zhu, Y.J. (2006) Efficient transient expression of human GM-CSF protein in *Nicotiana benthamiana* using potato virus X vector, *App. Microbiol. Biotechnol.*, **72**, 756–762.

DOUBLE SUBGENOMIC PROMOTER CONTROL FOR A TARGET GENE SUPEREXPRESSION BY A PLANT VIRAL VECTOR

**E. V. Putlyaev^{1*}, A. A. Smirnov¹, O. V. Karpova¹,
J. G. Atabekov^{1,2}**

¹ *M. V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology,
Moscow 119991, Russia; fax: +7(495)938-0601, E-mail: putlegor@mail.ru*

² *M. V. Lomonosov Moscow State University, A.N. Belozersky Institute
of Physico-Chemical Biology, Moscow 119991, Russia;
fax: +7(495)938-3181, E-mail: okar@genebee.msu.ru*

Received January 30, 2015

Revision received March 06, 2015

Several new deconstructed vectors based on a potexvirus genome sequence for efficient expression of heterologous proteins in plants were designed. The first obtained vector (AltMV-single), based on the *Alternanthera mosaic virus* (AltMV) strain MU genome, bears a typical architecture for deconstructed plant viral vectors, i. e. a triple gene block was deleted from the viral genome, and the model gene of interest was placed under control of the first viral subgenomic promoter. To enhance the efficiency of expression, maintained by the AltMV-single, another vector (AltMV-double) was designed. In the AltMV-double, the gene of interest was controlled by two viral subgenomic promoters located sequentially without a gap upstream of the target gene. We found that AltMV-double provided a significantly higher level of accumulation of the target protein in plants than AltMV-single. Moreover, our data clearly show the requirement for the presence and functioning of both the subgenomic promoters for the demonstrated high level of target protein expression by AltMV-double. Taken together, our results describe an additional possible way to enhance the efficiency of transient protein expression maintained in plants by a plant viral vector.

Key words: *Alternanthera mosaic virus*, viral vector, protein overexpression, subgenomic promoter