

Ю. В. Шелудько¹, Я. Р. Сіндаровська¹, І. М. Герасименко¹, М. О. Банникова¹,
З. М. Олевинська², М. Я. Співак², М. В. Кучук¹

¹Інститут клітинної біології і генетичної інженерії НАН України, Київ

²Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ

AGROBACTERIUM-ОПОСЕРЕДКОВАНА ТРАНЗІЄНТНА ЕКСПРЕСІЯ: ПЕРСПЕКТИВНИЙ ПІДХІД ДЛЯ МАСШТАБНОЇ ПРОДУКЦІЇ РЕКОМБІНАНТНИХ БІЛКІВ У РОСЛИНАХ

Анотація: *Agrobacterium*-опосередкована транзїєнтна експресія чужорїдних генїв в рослинах дає можливість швидко отримувати препаративнї кїлькостї рекомбїнантних бїлків. З використанням гена репортерного бїлка GFP розроблено методику ефективної транзїєнтної експресїї генїв *in planta*, проведено вїдбїр видїв рослин, найбїльш придатних для транзїєнтної експресїї рекомбїнантних бїлків, та отримано препаративнї кїлькостї репортерного бїлка. Проведено інфїльтрацію рослин *N. benthamiana* та *N. excelsior* лїніями агробактерїї, якї мїстили векторнї конструкції для транзїєнтної експресїї генїв інтерферону або соматотропїну людини. Доведено присутнїсть рекомбїнантних інтерферону та соматотропїну в сумарних екстрактах бїлків та доведено ідентичнїсть отриманого рекомбїнантного соматотропїну з стандартним соматотропїном методами їмуноферментного та електрофоретичного аналізїв. Показано наявнїсть бїологїчної активностї інтерферону або соматотропного гормону людини у зразках екстрактїв рослин, в яких було експресовано конструкції, що мїстили вїдповїднї гени.

Ключовї слова: бїотехнологїя, транзїєнтна експресія, рекомбїнантнї бїлки, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana excelsior*, *Agrobacterium*.

1. СУЧАСНЕ ПОЛОЖЕННЯ І ПЕРСПЕКТИВИ РИНКУ ФАРМАЦЕВТИЧНИХ БІЛКІВ

У сучаснїй медицинї широко використовують препарати, одержанї з використанням сучасних методїв бїотехнологїї; попит на ряд фармацевтично цїнних речовин зростає разом з поширенням сфери їхнього застосування. До таких препаратїв належать антибїотики, стероїди, моноклональнї антитїла рїзних типїв, деякї ферменти і гормони людини, інтерферон та багато їнших. Вони застосовуютьсї для лїкування або/та дїагностики багатьох бактерїальних та вїрусних захворювань, онкологїчних хвороб або хвороб, пов'язаних з порушенням обміну речовин. Об'єм продажу рекомбїнантного альбумїну, який виробля-

етьсї компанїєю Enzon (США), у грошовому вимїрї складав приблизно 4,5 млрд дол. США (далї – дол.), соматотропїну (компанїї Genentech (США) та Eli Lilly (США)) – 2,3 млрд дол., їнсуліну (компанїя Eli Lilly) – 1,4 млрд дол. на рїк. Протягом останнїх рокїв ринок моноклональних антитїл зрїс з 3 млрд дол. в 2002 р. до сьогоднї майже вдвїчі; в 2008 р. очїкуетьсї 8 млрд дол. В цїлому, експерти оцїнюють кїлькїсть наявних та тих, що з'являтьсї найближчим часом, фармацевтичних продуктів бїлкової природи приблизно в 1 200 одиниць. Об'єм продажу їх складав 42 млрд дол. у 2005 р. і, за прогнозами експертїв, зросте до 100 млрд дол. у 2010 р. [1].

Особливий їнтерес для сучасної фармакологїї представляє бїотехнологїчне виробництво терапевтично цїнних бїлків людини,

оскільки, з одного боку, такі препарати мають винятково широку область застосування в медицині, з іншого – обмежене природне джерело одержання робить їх цінними продуктами на всесвітньому фармацевтичному ринку. Виробництвом рекомбінантних білків, включаючи інтерферон та соматотропін, займаються такі компанії: Genentech (США), Amgen (США), Eli Lilly (США), Crucell (Нідерланди), Vivalis (Франція) та ін.

Соматотропін або гормон росту людини – це білок, який синтезується у гіпофізі та є необхідним для нормального формування кісток. Структура білка є видоспецифічною, тому для лікування хворих з недостатністю цього гормону можна використовувати тільки гормон росту людини. На сьогодні рекомбінантний соматотропін в Україні не виробляється і в клініках використовують дорогі імпортовані препарати. Необхідно зазначити, що деякі фармакологічно цінні білки (включаючи соматотропін та інтерферон) втратять патентний захист у найближчі роки або вже втратили його. Це ще раз підкреслює необхідність налагодження їх промислового виробництва в Україні.

Інтерферони являють собою перспективний і надзвичайно цінний об'єкт для біотехнологічного виробництва. Це група білків, які здатні індукувати як локальні, так і системні антивірусні та антибактеріальні реакції в клітинах людини. Лейкоцитарний інтерферон (інтерферон- α) пригнічує вірус герпесу, а також використовується для терапії гепатиту В та С. Крім того, інтерферони інгібують проліферацію клітин, що робить їх, таким чином, потенційно протипухлинним засобом, і модулюють імунну систему [2–4]. Сучасний ринок продажу рекомбінантного інтерферону досить великий (близько 6 млрд дол. у 2004 р.), але витрати на його процесінг *in vitro* в бактеріальних системах і подальшу очистку роблять цей білок досить дорогим товаром на світовому ринку фармацевтичних препаратів. В Ук-

раїні в 2000 р. об'єм продажу інтерферону становив близько 200 000 дол. і продовжує збільшуватися разом із збільшенням загального фармацевтичного ринку [5].

2. ПОРІВНЯЛЬНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ СИСТЕМ ДЛЯ ЕКСПРЕСІЇ РЕКОМБІНАНТНИХ БІЛКІВ

Незважаючи на приклади успішного використання мікроорганізмів для масштабної продукції білків із застосуванням технологій рекомбінантних ДНК (компанії Eli Lilly та Genentech вже давно розробили протоколи виробництва рекомбінантного інсуліну та соматотропіну за допомогою *Escherichia coli* [6, 7]), такий метод має ряд недоліків. Так, кінцевий продукт може значно відрізнитися від одержаного з бактерії, що впливає на фармакологічну активність та якість препарату. Білки, які звичайно синтезуються клітинами людини у глікозилізованій формі (напр., еритропоетин та ін.) не глікозилуються бактеріями; прокариотичні системи біосинтезу не завжди здатні синтезувати нативні форми білка; високий рівень бактеріальної експресії часто супроводжується внутрішньоклітинним пакуванням білків, що призводить до втрати їхньої активності.

Нещодавно було показано можливість отримання рекомбінантного соматотропіну людини із молока мишей та кіз з використанням вектора на основі аденовірусу [8]. Проте слід зазначити, що використання клітин тварин для отримання рекомбінантних білків є звичайно дуже дорогим методом і часто не виправдовує витрат. Крім того, собівартість продукту підвищується через необхідність очищувати білки від бактеріальних ендотоксинів або вірусів тварин [9, 10]. Тому виключно перспективним шляхом для отримання комерційних кількостей терапевтично цінних білків стала розробка методів їх гетерологічної експресії у рослинах і рослинних клітин-

них системах, що має певні переваги у порівнянні з іншими технологіями, а саме:

- рослинні системи більш економічні, ніж індустріальні комплекси, які використовують біореактори;
- технології вирощування рослин на полях в індустріальних масштабах і їх збору розроблені і доступні, що гарантує фактично необмежене джерело рослинного матеріалу;
- стадія очищення може бути вилучена, коли рослинні тканини, які містять рекомбінантні білки, використовуються у їжу (їстівні вакцини);
- рослини здатні направляти продукти експресії у внутрішньоклітинні компартменти, що забезпечує їх стабільність;
- можлива експресія рекомбінантного білка у хлоропластах, що дозволяє акумулювати надзвичайно високу кількість продукту, порівнянну з бактеріальними системами;
- ризик забруднення бактеріальними токсинами чи потенційними патогенами людини мінімальний.

Використання рослинних систем для виробництва фармацевтично цінних білків є не тільки новою, але й безумовно економічно вигідною технологією у порівнянні з іншими системами, в тому числі з трансгенними тваринами або культурою тваринних клітин. Вартість рекомбінантних антитіл при рівні експресії порядку 50 мг/кг рослинної біомаси складає близько 100 дол. за 1 г, у порівнянні з 1 000 дол. за 1 г білків, одержаних з трансгенних тварин, або 5 000 дол. за 1 г білків, одержаних з культури клітин ссавців [10]. Подібні дані наводить також Дав [11], порівнюючи різні експресійні системи: оціночна вартість 1 г сирого продукту, який містить рекомбінантні білки, складає 150 дол. при використанні культури клітин ссавців, 1–2 дол. – молока або яєць трансгенних тварин та 0,05 дол. – рослинних систем експресії. Щодо бактеріальних систем біосинтезу,

то їх основні економічні недоліки часто зводяться до необхідності подальшого процесінгу рекомбінантних еукаріотичних білків. Наприклад, 60 % від загальних витрат при комерційному виробництві інсуліну пов'язані з подальшою *in vitro* модифікацією кінцевого продукту – утворенням дисульфідних містків та відщепленням метіоніну [12].

3. ТРАНЗІЄНТНА ЕКСПРЕСІЯ РЕКОМБІНАНТНИХ БІЛКІВ В РОСЛИНАХ

Попередні дослідження [13–16] показали можливість експресії генів соматотропіну та інтерферону людини в тютюні та картоплі. Проте рівень експресії рекомбінантних білків у рослинах при конститутивній ядерній трансформації був досить низьким, менше 1 % сумарного розчинного білка, що необхідно для отримання комерційної кількості продукту. Подолати цю проблему можна, використавши експресію чужорідних генів у хлоропластах. У цьому випадку рівень експресії може досягати бактеріального рівня і скласти до 47 % сумарного розчинного білка [17]. Але цей метод вимагає значних затрат часу на отримання трансгенних рослин. До того ж, коло видів рослин, для яких було отримано пластидні трансформанти, залишається досить вузьким [18].

Інший підхід, який дає можливість швидко отримати значні кількості рекомбінантних білків, базується на транзійтній експресії перенесених генів в рослинних клітинах без їх стабільної інтеграції в геном. Перспективи і переваги цього методу були описані в [19–21]. Як було показано, транзійтна експресія здійснюється шляхом *Agrobacterium*-опосередкованого введення плазмідних векторів в клітини без їх інтеграції у геном. Експресія введеного трансгена відбувається протягом певного часу, після чого чужорідна ДНК елімінується. Підсилення експресії можна досягти шляхом одночасного введення супресора сайлен-

сінгу чужорідних генів [22]. Таким чином можна швидко отримати значні кількості рекомбінантного білка. Залежно від типу генетичної конструкції, яку використовували для транзійтної експресії, максимальний рівень накопичення білка спостерігався через 4 дні – 1–2 тижні після введення чужорідних генів.

Це може бути надзвичайно важливим у випадку отримання пухлино-специфічних антитіл для лікування онкологічних захворювань, оскільки у цьому випадку час є лімітуючим фактором для отримання рекомбінантного білка. Ще однією безсумнівною перевагою транзійтної експресії є її безпечність з точки зо-

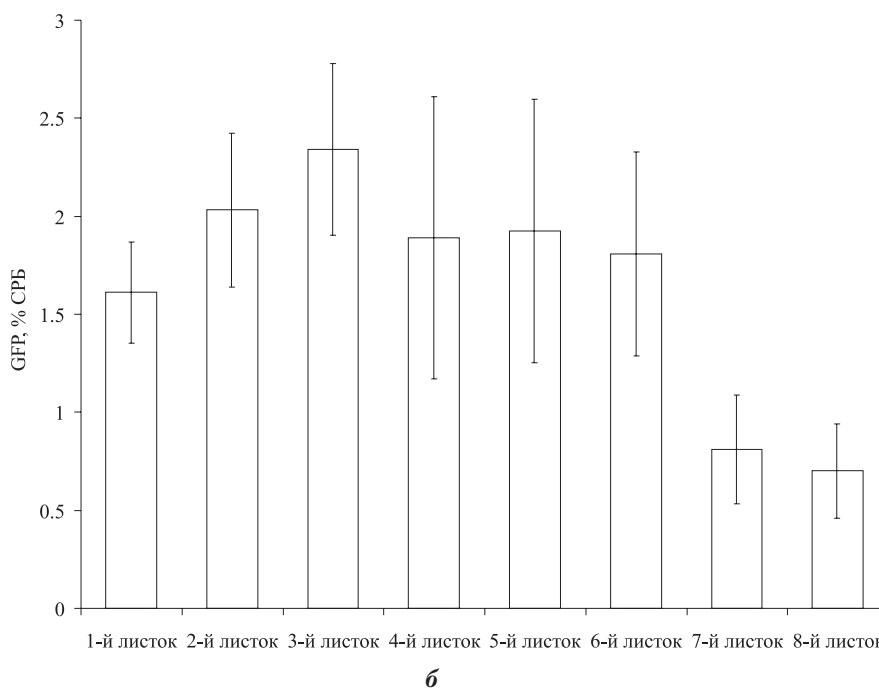
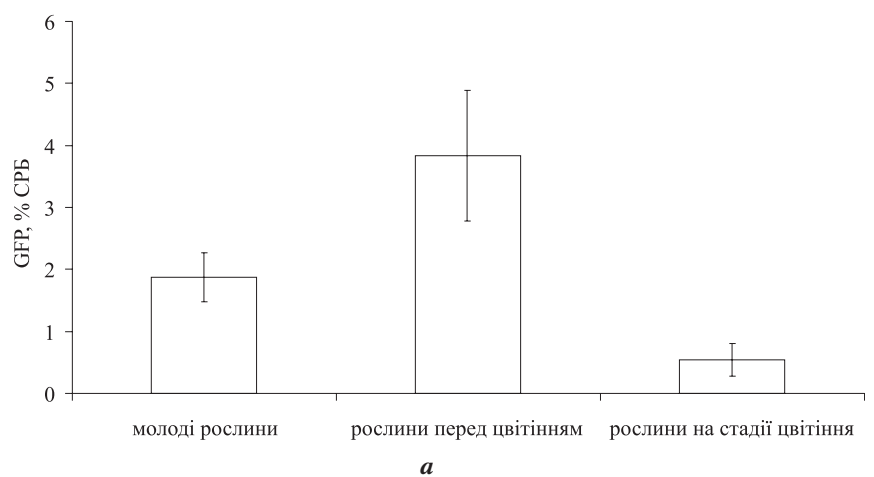


Рис. 1. Вміст репортерного білку GFP: *а* – у листках рослин *N. benthamiana*, які знаходяться на різних стадіях розвитку; *б* – залежність рівня накопичення GFP в *N. benthamiana* від позиції листка рослини. CPB – сумарний розчинний білок

ру небажаного розповсюдження трансгенних організмів, оскільки в цьому випадку не відбувається встроювання чужорідних генів в організм рослини-господаря, які можуть бути передані з пилком. Метод транз'єнтної експресії дає також змогу швидко протестувати різні об'єкти з метою створення високопродуктивних рослинних ліній та оптимізувати умови гетерологічної експресії.

Шляхом транз'єнтної експресії із рослин було отримано великий набір рекомбінантних білків, включаючи фармацевтично цінні білки: соматотропний гормон, аprotинін, інтерферон, рекомбінантний *Yersinia pestis* антиген тощо [21, 23, 24].

4. РОЗРОБКА ПРОТОКОЛУ ДЛЯ ЕФЕКТИВНОЇ ТРАНЗ'ЄНТНОЇ ЕКСПРЕСІЇ ЧУЖОРІДНИХ ГЕНІВ В РОСЛИНАХ

У дослідях по розробці робочої методики ефективної транз'єнтної експресії чужорідних генів в рослинах як модель ми використовували зелений флуоресцентний білок (Green Fluorescent Protein, GFP) [25]. Цей білок тваринного походження здатний до флуоресценції в зеленій області (з максимумом емісії при довжині хвилі 509 нм) при опроміюванні ультрафіолетовим або синім світлом. Відповідну експресійну систему вводили в рослинні клітини шляхом інфільтрації листків суспензією агробактерій (*Agrobacterium tumefaciens*), які містили ген GFP під контролем 35S промотору вірусу мозаїки цвітної капусти (ВМЦК) [26] у складі Т-ДНК бінарного вектора. Для підвищення рівня гетерологічної експресії в листки одночасно вводили ген вірусного супресора сайленсінгу *p19*, що, як було показано, дає можливість збільшити інтенсивність та час транз'єнтної експресії [22].

Останнім часом кілька видів культурних рослин було перевірено як об'єкти для гетерологічної експресії різних типів білків. Серед

них найчастіше використовується тютюн, потім люцерна, картопля, рис (насіння), пшениця (насіння) та ін. [10, 27]. Потенційний щорічний урожай біомаси тютюну може досягати 100 т/га, що дає можливість отримати комерційні кількості продукту навіть при низькому рівні експресії, тоді як зернові культури дають 3–6 т зерна з 1 га щорічно. Інші переваги використання тютюну полягають у легкості генетичного маніпулювання з цією рослиною. Тому як основний об'єкт дослідження ми використовували представників роду *Nicotiana*. Оптимізацію методів введення векторної ДНК у рослинні клітини проводили, використовуючи рослини *N. benthamiana* – модельний вид для дослідів транз'єнтної експресії генів у рослинах [22, 28].

Було визначено стадію розвитку рослин *N. benthamiana*, на якій спостерігається найвищий рівень накопичення репортерного білка GFP. При дослідженнях були перевірені рослини, які знаходилися на трьох різних стадіях розвитку – молоді рослини з 6–8-ма повністю розкритими листками, рослини перед цвітінням та рослини, які інтенсивно цвіли. Встановлено, що найбільший рівень GFP ($3,8\% \pm 1,1\%$ від сумарного розчинного білка) спостерігався у рослин *N. benthamiana* перед цвітінням (рис. 1, а). Було також встановлено залежність рівня накопичення GFP внаслідок транз'єнтної експресії відповідного гена під контролем 35S промотору ВМЦК від положення листка рослини *N. benthamiana*. Експериментально було перевірено вміст GFP у 1-му – 8-му листках від апексу і визначено, що найвищий рівень накопичення репортерного білка спостерігається у 2-му – 4-му листках (рис. 1, б) [29].

Була визначена динаміка транз'єнтної експресії гена репортерного білка GFP під контролем 35S промотору ВМЦК у рослинах *N. benthamiana*. Після введення векторної ДНК у листки рослин *N. benthamiana* накопичення GFP спостерігається з другої доби і досягає максимального рівня на 4–5-у добу,

залишаючись стабільним до 8-ї доби, після чого вміст GFP поступово знижується, що добре збігається з літературними даними [22].

5. ВІДБІР НАЙБІЛЬШ ПРИДАТНИХ ДО ТРАНЗІЄНТНОЇ ЕКСПРЕСІЇ РЕКОМБІНАНТНИХ БІЛКІВ ВИДІВ РОСЛИН РОДУ *NICOTIANA*

Оскільки *N. benthamiana* має невелику біомасу в порівнянні з деякими іншими видами тютюнів, то ми провели пошук серед видів цього роду іншої рослини-хазяїна, яка б сумішчала значну біомасу з високим рівнем транзійентної експресії (Sindarovska et al., 2004). Було перевірено 6 видів цього роду і визначено 3 з них (*N. benthamiana*, *N. excelsior*, *N. exigua*), які демонстрували найвищий рівень накопичення репортерного білка GFP внаслідок транзійентної експресії відповідного гена під контролем 35S промотору ВМЦК ($3,8 \pm 1,1$ %, $2,0 \pm 0,5$ % та $3,7 \pm 1,4$ % від сумарного розчинного білка відповідно). Інші види (*N. debneyi*, *N. maritima*, *N. simulans*) також були здатні до транзійентної експресії GFP, але на нижчому рівні ($0,4 \pm 0,2$ %, $0,3 \pm 0,03$ %, $0,6 \pm 0,2$ % від сумарного розчинного білка відповідно) (рис. 2).

У наступній серії дослідів ген репортерного білка вводили в рослинні клітини в складі генетичних конструкцій, які містили крім гена GFP також гени двох вірусних білків: полімерази, здатної синтезувати копії транскрипту гена GFP, та білка, що забезпечує розповсюдження цих копій по сусідніх рослинних клітинах. Для інфільтрації застосовували систему з трьох векторів, які сумісно вводяться в рослинну клітину; PhiC31 рекомбіназа об'єднувала перенесені частини векторів в один блок. Таку систему для транзійентної експресії було розроблено і доведено її високу ефективність компанією Icon Genetics GmbH (ФРН) [19]. Вищезгадані векторні конструкції було отримано в рамках наукового співробітництва Міжнародного інституту клітинної біології НАН України з компанією Icon Genetics GmbH (ФРН).

Використання системи векторів з елементами вірусного геному дало можливість значно збільшити вміст GFP внаслідок транзійентної експресії відповідного гена у рослинах видів *N. benthamiana* та *N. excelsior* (до $16,2 \pm 11,2$ % та $63,5 \pm 26,8$ % від сумарного розчинного білка відповідно). Ці показники перевищують рівень транзійентної експресії гена GFP під кон-

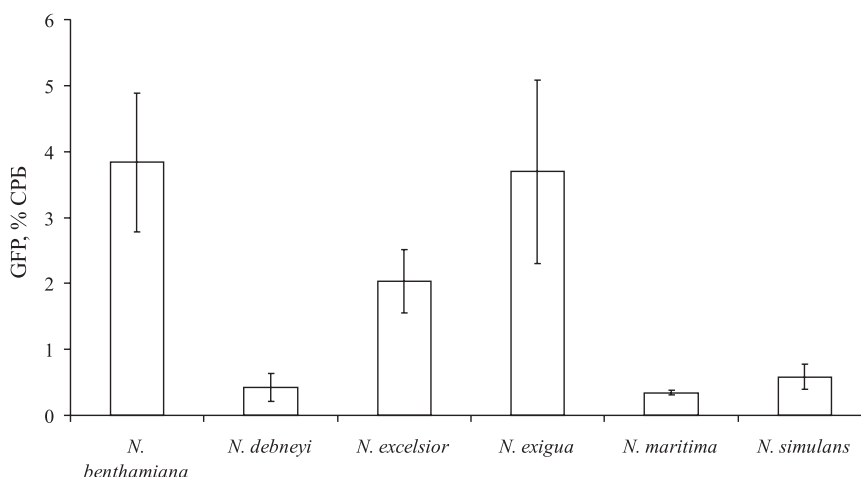


Рис. 2. Вміст репортерного білка GFP у листках рослин роду *Nicotiana* після транзійентної експресії відповідного гена під контролем 35S промотору ВМЦК. СРБ – сумарний розчинний білок

тролем 35S промотору ВМЦК у наведених видах рослин приблизно у 4 та 32 рази відповідно. Значно нижчий вміст репортерного білка при використанні конструкцій з елементами вірусного геному спостерігався у рослинах виду *N. simulans* ($5,0 \pm 2,3$ % від сумарного білка, що у 8 разів більше, ніж при транз'єн-

тній експресії гена GFP під контролем 35S промотору). У рослинах видів *N. debneyi*, *N. exigua* та *N. maritima* при використанні конструкцій з елементами вірусного геному не було виявлено утворення репортерного білка (рис. 3).

Оскільки біомаса листків *N. excelsior* та *N. exigua* значно перевищує таку у *N. benth-*

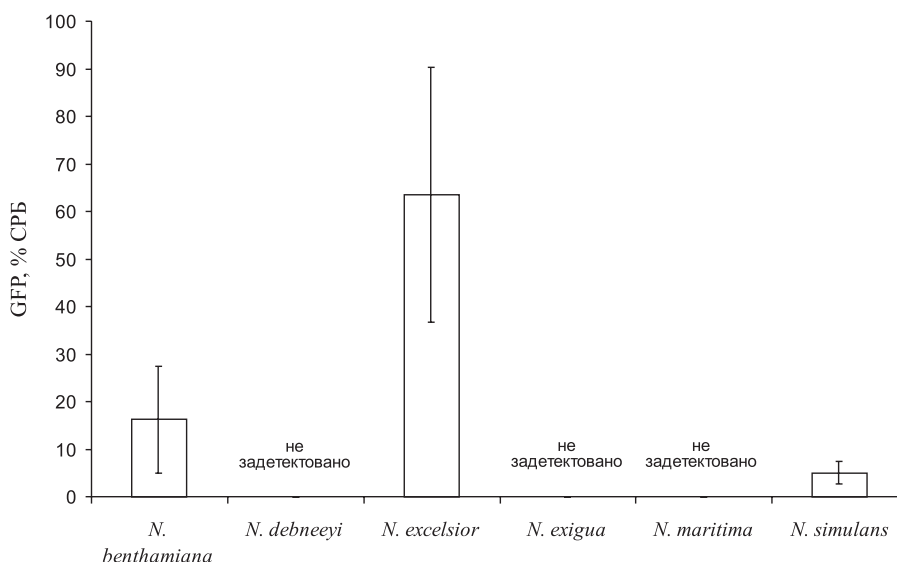


Рис. 3. Вміст репортерного білка GFP у листках рослин роду *Nicotiana* після транз'єнційної експресії відповідного гена з використанням генетичних конструкцій з елементами вірусного геному. СРБ – сумарний розчинний білок

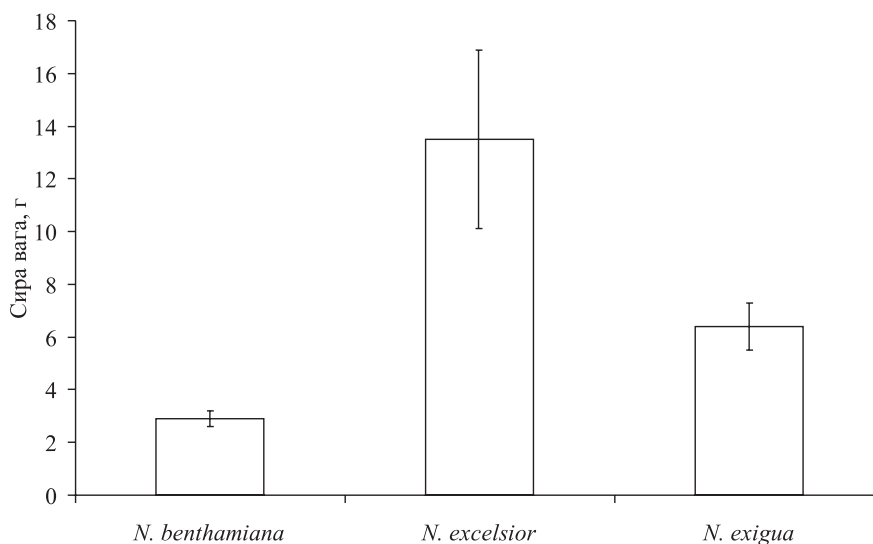


Рис. 4. Порівняння корисної біомаси листків *N. excelsior*, *N. exigua* та *N. benthamiana*

miana (рис. 4), то ці два види можуть бути використані як альтернативні об'єкти для отримання рекомбінантних білків шляхом транз'єнтної експресії. Більше того, високий рівень накопичення репортерного білка спостерігався у *N. excelsior* при використанні обох типів експресійних систем.

6. ІДЕНТИФІКАЦІЯ РЕПОРТЕРНОГО БІЛКА

Для ідентифікації репортерного білка проводили розділення білків методом електрофорезу в поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію. Розчини білків змішували з буфером для зразків і наносили у лунки гелю без попередньої денатурації кип'ятінням. Репортерний білок GFP спостерігали безпосередньо після закінчення електрофорезу, освітлюючи гель ультрафіолетовим та синім світлом за допомогою ручної лампи. Для візуалізації інших білків гель забарвлювали реактивом Кумасі [30].

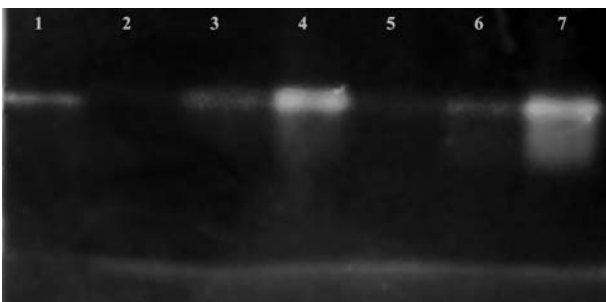


Рис. 5. Розділення екстрактів рослин роду *Nicotiana* методом електрофорезу (електрофорез проводився без теплової денатурації зразків): 1 – стандартний GFP; 2 – екстракт контрольної рослини *N. benthamiana*; 3 – екстракт рослини *N. benthamiana*, в якій транз'єнтно експресували ген GFP під контролем 35S промотору ВМЦК; 4 – екстракт рослини *N. benthamiana*, в яку було введено генетичні конструкції з елементами вірусного геному; 5 – екстракт контрольної рослини *N. excelsior*; 6 – екстракт рослини *N. excelsior*, в якій транз'єнтно експресували ген GFP під контролем 35S промотору ВМЦК; 7 – екстракт рослини *N. excelsior*, в яку було введено генетичні конструкції з елементами вірусного геному

Електрофоретичний аналіз сумарних екстрактів білків контрольних (інфільтрованих агробактеріями, які не містили вектора з геном GFP) та дослідних рослин видів роду *Nicotiana* довів, що у контрольних рослинах не міститься GFP, тоді як репортерний білок, отриманий внаслідок транз'єнтної експресії, має таку ж молекулярну масу, як і стандартний GFP (рис. 5).

7. ПРЕПАРАТИВНА ЕКСПРЕСІЯ РЕПОРТЕРНОГО БІЛКА У РОСЛИНАХ

З метою отримання максимально можливої кількості виходу репортерного білка GFP з однієї рослини за розробленим протоколом було проведено інфільтрацію цілих рослин *N. benthamiana* і *N. excelsior* генетичними конструкціями з елементами вірусного геному ([19], див. також розділ 5). Суспензію агробактерій (максимальну кількість) вводили у 1-й–5-й листки від апексу. Рослинний матеріал збирали на 18-у добу після інфільтрації.

Запропонована нами схема очищення репортерного білка з рослин включає такі стадії:

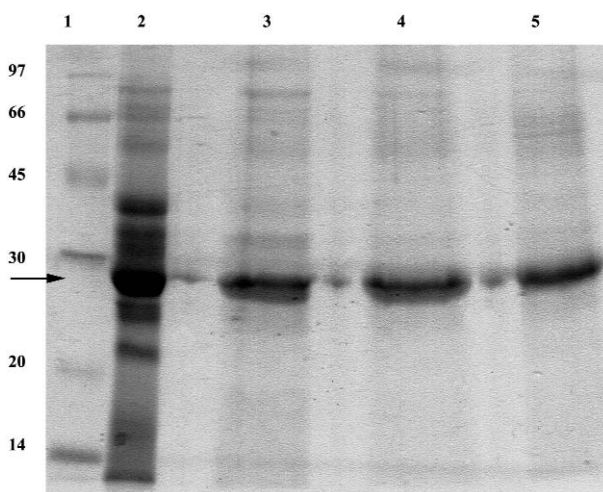


Рис. 6. Електрофоретичне розділення білків фракцій із найбільшим вмістом GFP після аніонообмінної хроматографії: 1 – стандартні маркерні білки; 2 – білковий екстракт до нанесення на колонку; 3 – фракція 110–115 мл; 4 – фракція 120–125 мл; 5 – фракція 130–135 мл. GFP позначено стрілкою

- екстракція білків з тканини листків 0,1 М калій-фосфатним буфером ($pH = 7,8$);
- фракціонування за допомогою сульфату амонію;
- аніонообмінна хроматографія.

На стадії висолювання білка сульфатом амонію (50–70 % насичення) коефіцієнт очищення складав приблизно 2. Подальше хроматографічне очищення з використанням аніонообмінної хроматографії на колонці Q-Sepharose FF (Amersham) дало можливість отримати майже чистий білок GFP (більше 95 %), що було доведено методом електрофорезу у поліакріламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію (рис. 6). Таким чином, нами було отримано близько 15 мг репортерного білка GFP.

8. ПРОВЕДЕННЯ ТРАНЗІЄНТНОЇ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ СОМАТОТРОПІНУ ТА ІНТЕРФЕРОНУ В ОРАНЖЕРЕЙНИХ РОСЛИНАХ

Для транз'єнтної експресії гена соматотропного гормону людини та інтерферону ми використовували протокол, який було розроблено для репортерного білка GFP [29, 31]. Оскільки два види тютюнів (*N. benthamiana* та *N. excelsior*) показали високий рівень накопичення репортерного білка у випадку, коли експресію проводили з використанням конструкцій, які містили елементи вірусного геному, то оранжерейні рослини цих двох видів було використано як основні рослини-господарі для транз'єнтної експресії гена соматотропного гормону людини та інтерферону.

З метою отримання максимальної кількості білка з однієї рослини було проведено інфільтрацію цілих рослин *N. benthamiana* і *N. excelsior* генетичними конструкціями з елементами вірусного геному ([19]; див. також розділ 5), що містили замість гена GFP гени соматотропіну або інтерферону. Суспензію агро-

бактерій (максимально можливу кількість) вводили у 1-й–5-й листки від апексу. Для контролю ефективності транз'єнтної експресії в один із листків було інфільтровано конструкцію з геном репортерного білка GFP. Рослинний матеріал збирали на 18-у добу після інфільтрації. Свіжу або заморожену рідким азотом тканину листків екстрагували і отриманий екстракт використовували для електрофоретичного визначення білків, хроматографічного розділення, імуноферментного аналізу або визначення біологічної активності.

Електрофоретичний аналіз сумарних екстрактів білків контрольних та дослідних рослин *N. benthamiana* показав, що, як і у випадку із експресією репортерного білка, після інфільтрації спостерігається зміна спектра білків, які синтезуються в рослині, зменшується концентрація основного рослинного білка – рібубозобісфосфаткарбоксілази-оксигенази. Було також відмічено наявність на доріжках з білковими екстрактами з інфільтрованих рослин білків, які мають таку ж молекулярну масу, як і стандартний соматотропін та інтерферон. У контрольних екстрактах такі білки не спостерігалися. Аналогічні дані було отримано при інфільтрації рослин іншого, перспективного з точки зору проведення транз'єнтної експресії, виду *Nicotiana* – *N. excelsior*, який також показував високий рівень накопичення маркерного білка.

Слід зазначити, що накопичення рекомбінантного соматотропіну та інтерферону, отриманого шляхом транз'єнтної експресії, в тканині листків виявилось нижчим від накопичення репортерного білка GFP. Такий факт можна пояснити більшою токсичністю даних білків для рослинної клітини у порівнянні із GFP, який було спеціально адаптовано для успішної експресії в рослинах [25]. Це підтверджується й тим фактом, що у рослин, інфільтрованих *Agrobacterium* з генетичними конструкціями, які містили ген соматотропіну людини, було відзначено значний рівень некротизації інфільтрованих ділянок.

Наявність рекомбінантного соматотропіну в екстрактах рослинної тканини було також підтверджено імуноферментним аналізом. В результаті на електрофореграмі на доріжках з попередньо нанесеними екстрактами білків інфільтрованих рослин було виявлено гібридизацію білку з антитілами до людського соматотропіну. У контрольних же екстрактах гібридизація не спостерігалася.

Були проведені оцінки біологічної активності рекомбінантних соматотропіну та інтерферону [32], отриманих шляхом транзійентної експресії, і показана наявність біологічної активності у зразках екстрактів рослин, інфільтрованих як конструкціями з геном інтерферону, так і конструкціями для експресії соматотропного гормону людини. Отримані результати показують, що рекомбінантні соматотропін і інтерферон, отримані шляхом транзійентної експресії відповідних генів у рослинах, можуть бути використані для потреб фармакологічної промисловості разом з аналогами, які мають інше джерело походження.

9. ВИСНОВКИ

Agrobacterium-опосередкована транзійентна експресія чужорідних генів у рослинах дає змогу швидко отримувати препаративні кількості рекомбінантних білків. Використовуючи репортерний білок GFP, ми розробили методику ефективної транзійентної експресії генів *in planta*, провели відбір видів рослин, найбільш придатних для транзійентної експресії рекомбінантних білків. Було протестовано 6 видів роду *Nicotiana* і визначено 3 з них (*N. benthamiana*, *N. excelsior*, *N. exigua*), які демонстрували найвищий рівень накопичення репортерного білка GFP внаслідок транзійентної експресії відповідного гена під контролем 35S промотору ВМЦК та/або внаслідок транзійентної експресії векторних конструкцій з елементами вірусного геному. Нами було доведено ідентичність отриманого рекомбінантного біл-

ка зі стандартним GFP методами флюорометричного та електрофоретичного аналізів. Запропоновано схему очищення репортерного білка GFP з рослин методами рідинної хроматографії, включаючи преципітацію сульфатом амонію й іонообмінну хроматографію та отримано препаративні кількості репортерного білка.

Нами також проведено масштабну інфільтрацію рослин *N. benthamiana* та *N. excelsior* лініями агробактерії, які містили конструкції з елементами вірусного геному для транзійентної експресії генів інтерферону та соматотропіну людини. Показано присутність рекомбінантних інтерферону та соматотропіну в сумарних екстрактах білків та доведено ідентичність отриманого рекомбінантного соматотропіну зі стандартним соматотропіном методами імуноферментного та електрофоретичного аналізів. В екстрактах білків рослин, інфільтрованих як конструкціями, які містили ген інтерферону, так і конструкціями для експресії соматотропного гормону людини, була виявлена наявність відповідної біологічної активності. Таким чином, розроблена методика дає можливість швидко отримувати препаративні кількості рекомбінантних білків (включаючи фармакологічно цінні білки) з рослин.

Робота була проведена в рамках проєктів: "Розробка методів та одержання препаративних кількостей фармакологічно цінних білків людини шляхом їх гетерологічної експресії в рослинних системах" (договір з МОН України ДП/148-2003 від 26.06.2003 р.); "Одержання препаративних кількостей фармакологічно цінних білків людини шляхом їх транзійентної експресії в рослинних системах" (договір з НАН України № 15к від 25.03.2004 р.); "Розробка технології препаративного одержання фармацевтичних рекомбінантних білків в рослинах на прикладі соматотропіну людини" (договір з НАН України № 26 від 01.08.2005 р.).

ЛІТЕРАТУРА

1. **Knablein J.** Plant-based expression of biopharmaceuticals. // In: Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine, 2nd Edition. – Ed.: Robert A. Meyers., 2005. – Wiley-VCH Verlag, Weinheim. – Vol. 10. – P. 385–410.
2. **Yanai Y., Sanou O., Kayano T., Ariyasu H., Yamamoto K., Yamauchi H., Ikegami H., Kurimoto M.** Analysis of the antiviral activities of natural IFN-alpha preparations and their subtype compositions. // J. Interferon Cytokine Res. – 2001. – Vol. 21. – P. 835–841.
3. **Yasuda S., Huffman J. H., Smeed D. E., Sidwell R. W., Miyata K.** Spectrum of virus inhibition by consensus interferon YM643. // Antivir. Chem. Chemother. – 2000. – Vol. 11. – P. 337–341.
4. **Sen G. C.** Viruses and interferons. // Ann. Rev. Microbiol. – 2001. – Vol. 55. – P. 255–281.
5. **Чумак В., Шевченко К.** Структура вітчизняного фармацевтичного ринку. // Держава і економіка. – 2001. – № 9. – С. 46–50.
6. **Becker G. W., Hsiung H. M.** Expression, secretion and folding of human growth hormone in *Escherichia coli*. // FEBS. – 1986. – Vol. 204. – P. 145–150.
7. **Пикап Д.** Медицина і біотехнологія. / В: Біотехнологія. Принципи і застосування. І. Хиггинс, Д. Бест, Д. Джонс (ред.). – М.: Мир, 1988. – С. 325–349.
8. **Sanchez O., Toledo J. R., Rodryguez M. P., Castro F. O.** Adenoviral vector mediates high expression levels of human growth hormone in the milk of mice and goats. // J. Biotechnol. – 2004. – Vol. 114. – P. 89–97.
9. **Fischer R., Hoffmann K., Schillberg S., Emans N.** Antibody production by molecular farming in plants. // J. Biol. Regul. Homeost. Agents. – 2000. – Vol. 14. – P. 83–92.
10. **Daniell H., Streatfield S. J., Wycoff K.** Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. // Trends in Plant Sci. – 2001. – Vol. 6. – P. 219–226.
11. **Dove A.** Unkorking the biomanufacturing bottleneck. // Nat. Biotechnol. – 2002. – Vol. 20. – P. 777–779.
12. Computer-aided process analysis and economic evaluation for biosynthetic human insulin production: a case study. // Biotechnol. Bioeng. – 1995. – Vol. 48. – P. 529–541.
13. **Edelbaum O., Stein D., Holland N., Gafni Y., Livneh O., Novick D., Rubinstein M., Sela I.** Expression of active human interferon-beta in transgenic plants. // J. Interferon Res. – 1992. – Vol. 12. – P. 449–453.
14. **Staub J. M., Garcia B., Graves J., Hajdukiewicz P. T. J., Hunter P., Nehra N., Paradkar V., Schlittler M., Carroll J. A., Spatola L., Ward D., Ye G., Russell D. A.** High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. // Nat. Biotechnol. – 2000. – Vol. 18. – P. 333–338.
15. **Ohya K., Matsumura T., Ohashi K., Onuma M., Sugimoto C.** Expression of two subtypes of human IFN-alpha in transgenic potato plants. // J. Interferon Cytokine Res. – 2001. – Vol. 21. – P. 595–602.
16. **Sawahel W. A.** The production of transgenic potato plants expressing human alpha-interferon using lipofectin-mediated transformation. // Cell Mol. Biol. Lett. – 2002. – Vol. 7. – P. 19–29.
17. **De Cosa B., Moar W., Lee S-B., Miller M., Daniell H.** Hyper-expression of the Bt Cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. // Nat. Biotechnol. – 2001. – Vol. 19. – P. 71–74.
18. **Maliga P.** Progress towards commercialization of plastid transformation technology. // Trends Biotechnol. – 2003. – Vol. 21. – P. 20–28.
19. **Marillonnet S., Giritich A., Gils M., Kandzia R., Klimyuk V., Gleba Y.** In planta engineering of viral RNA replicons: efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium*. // PNAS. – 2004. – № 101. – P. 6852–6857.
20. **Marillonnet S., Thoeringer C., Kandzia R., Klimyuk V., Gleba Y.** Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. // Nat. Biotechnol. – 2005. – Vol. 23. – P. 718–723.
21. **Gleba Y., Klimyuk V., Marillonnet S.** Magniflection – a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. // Vaccine. – 2005. – Vol. 23. – P. 2042–2048.
22. **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.
23. **Gils M., Kandzia R., Marillonnet S., Klimyuk V., Gleba Y.** High-yield production of authentic human growth hormone using a plant virus-based expression system. // Plant Biotech. J. – 2005. – Vol. 3. – P. 613–620.
24. **Santi L., Giritich A., Roy C. J., Marillonnet S., Klimyuk V., Gleba Y., Webb R., Arntzen C. J., Mason H. S.** Protection conferred by recombinant *Yersinia pestis* antigens produced by a rapid and highly scalable plant expression system. // PNAS. – 2006. – Vol. 103. – P. 861–866.
25. **Chiu W., Niwa Y., Zeng W., Hirano T., Kobayashi H., Sheen J.** Engineered GFP as a vital reporter in plants. // Curr. Biol. – 1996. – Vol. 6. – P. 325–330.
26. **Jefferson R. A., Kavanagh T. A., Bevan M. W.** GUS fusion: b-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. // EMBO J. – 1987. – Vol. 6. – P. 3901–3907.

27. Fischer R., Emans N. Molecular farming of pharmaceutical proteins. // *Transgenic Res.* – 2000. – Vol. 9. – P. 279–299.
28. McCormick A. A., Kumagai M. H., Hanley K., Turpen T. H., Hakim I., Grill L. K., Tuse D., Levy S., Levy R. Rapid production of specific vaccines for lymphoma by expression of the tumor-derived single-chain Fv epitopes in tobacco plants. // *PNAS.* – 1999. – Vol. 96. – P. 703–708.
29. Sheludko Y. V., Sindarovska Y. R., Gerasymenko I. M., Bannikova M. A., Kuchuk N. V. Comparison of several *Nicotiana* species as hosts for high-scale *Agrobacterium*-mediated transient expression. // *Biotech. Bioeng.* – 2006. (in press).
30. Blakesly R. W., Boezi J. A. A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using Coomassie Brilliant Blue G250. // *Anal. Biochem.* – 1977. – Vol. 82. – P. 580–582.
31. Sindarovska Y. R., Sheludko Y. V., Gerasymenko I. M., Bannikova M. A., Komarnytskyi I. K., Kuchuk N. V. Transgenic plants regenerated from hairy roots of *Nicotiana benthamiana*: a promising host for transient expression of foreign proteins. // *Tsitol. Genet.* – 2005. – Vol. 39 (N 6). – P. 9–14.
32. Goodwin C. J., Holt S. J., Downes S., Marshall N. J. Microculture tetrazolium assays: a comparison between two new tetrazolium salts, XTT and MTS. // *J. Immunol. Meth.* – 1995. – Vol. 179. – P. 95–103.

Ю. В. Шелудко, Я. Р. Синдаровская, И. М. Герасименко, М. А. Банникова, З. М. Олевинская, Н. Я. Спивак, Н. В. Кучук. **АГРОБАКТЕРИУМ-ОПОСРЕДОВАННАЯ ТРАНЗИЕНТНАЯ ЭКСПРЕССИЯ: ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ПОДХОД ДЛЯ МАСШТАБНОЙ ПРОДУКЦИИ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ В РАСТЕНИЯХ.**

Аннотация: *Agrobacterium*-опосредованная транзистентная экспрессия чужеродных генов в растениях позволяет быстро получать препаративные количества рекомбинантных белков. С использованием гена репортерного белка GFP нами была разработана методика эффективной транзистентной экспрессии генов *in planta*, проведена селекция видов растений, наиболее пригодных для транзистентной экспрессии, и получены препаративные количества репортерного белка. Нами была также проведена инфильтрация растений *N. benthamiana* и *N. excelsior* агробактериями, содержащими векторные конструкции для транзистентной экспрессии генов интерферона или соматотропина человека. Показано присутствие рекомбинантного интерферона и соматотропина в суммарных экстрактах белков и доказана идентичность полученного рекомбинантного соматотропина со стандартным соматотропином методами иммуноферментного и электрофоретического анализов. Продемонстрировано также наличие биологической активности в образцах экстрактов растений, в которых были экспрессированы конструкции, содержащие ген интерферона или соматотропного гормона человека.

Ключевые слова: биотехнология, транзистентная экспрессия, рекомбинантные белки, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana excelsior*, *Agrobacterium*.

Y. V. Sheludko, Y. R. Sindarovska, I. M. Gerasymenko, M. A. Bannikova, Z. M. Olevynska, M. Y. Spivak, N. V. Kuchuk. **AGROBACTERIUM-MEDIATED TRANSIENT EXPRESSION: A PERSPECTIVE APPROACH FOR HIGH-SCALE PRODUCTION OF RECOMBINANT PROTEINS IN PLANTS.**

Abstract: *Agrobacterium*-mediated transient expression of foreign genes in plants allows fast obtaining of preparative amounts of recombinant proteins. The manuscript describes optimization of transient expression protocol *in planta* using a green fluorescent protein (GFP) as a reporter protein, selection of the optimal host species and purification of the preparative amount of the reporter protein. Using the developed protocol we have expressed in *N. benthamiana* and *N. excelsior* vector systems harboring interferon or human somatotropin genes. The identity of recombinant interferon and somatotropin with the standards has been proved with electrophoretic and immunoblotting analyses. The corresponding biological activities have been found in the crude protein extracts of plants infiltrated with constructions containing interferon or somatotropin gene.

Keywords: biotechnology, transient expression, recombinant proteins, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana excelsior*, *Agrobacterium*.

Надійшла до редакції 28.03.06