

И.А. АБДЕЕВА¹, И.В. ГОЛДЕНКОВА-ПАВЛОВА¹,
М.В. МОКРЯКОВА¹, Л.В. ВОЛКОВА¹, В.Г. БОГУШ³,
К.В. СИДОРУК³, Н.О. ЮРЬЕВА², В. Г. ДЕБАБОВ³,
Э.С. ПИРУЗЯН¹

¹ Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова
Российской академии наук,

Москва, 119991, ул. Губкина, 3, E-mail: irengold@vigg.ru

² Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева
Российской академии наук, Москва, 127276, Ботаническая ул., 35

³ Федеральное государственное унитарное
предприятие «ГосНИИгенетика»,
Москва, 113545, Дорожный проезд, 1

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ НОВЕЙШИХ БИОТЕХНОЛОГИЙ



Получены трансгенные растения картофеля, экспрессирующие рекомбинантные белки — аналоги белка каркасной нити паутины спидроина 1. Показано, что при переходе от модельных пробирочных растений к реальным сельскохозяйственным культурам сохраняется экспрессия гибридных генов спидроина 1, имеющих повторяющиеся мотивы. При этом эффективность экспрессии синтетических генов спидроинов и уровень накопления их продуктов в растениях зависят от силы промотора, количества повторов, органоспецифичности и вида растения и не зависят от длительности хранения растительного материала. Полученные результаты свидетельствуют о том, что стратегия, основанная на конструировании и экспрессии гибридных белков, в состав которых входит репортерный белок, облегчает отбор и анализ экспрессии гибридных белков в трансгенных организмах и является обоснованной и адекватной при проведении поисковых исследований.

© И.А. АБДЕЕВА, И.В. ГОЛДЕНКОВА-ПАВЛОВА,
М.В. МОКРЯКОВА, Л.В. ВОЛКОВА, В.Г. БОГУШ,
К.В. СИДОРУК, Н.О. ЮРЬЕВА, В. Г. ДЕБАБОВ,
Э.С. ПИРУЗЯН, 2007

Введение. К настоящему времени описано около 34 000 видов пауков, каждый из которых способен производить несколько различных нитей паутины, образующих паутиный шелк. Лучше всего изучены каркасные нити шелка паутины, которые образованы двумя белками — спидроином 1 и 2. Эти белки являются типичными представителями фибриллярных белков.

Литературные данные о структуре последовательностей кДНК и генов белков паутины свидетельствуют о том, что практически все они состоят из большого числа повторяющихся элементов [1—4]. Наличие большого количества повторов в составе генов белков паутины обуславливают структуры этих белков, состоящих из повторяющихся пептидных мотивов (модулей), в которых полиаланиновые блоки чередуются с участками, обогащенными глицином. Выявлены консенсусные последовательности внутри повторяющихся пептидных модулей у многих белков паутины, которые, в свою очередь, повторяются множество раз по всей длине каждого белка.

Белки каркасной нити, благодаря своим структурным особенностям, с одной стороны являются удобными моделями для изучения взаимосвязи между структурой и функциями фибриллярных белков, а с другой стороны представляют собой уникальный биоматериал, сочетающий удивительную прочность и эластичность [5, 6]. Возможность использования этих белков как для фундаментальных, так и прикладных исследований обусловлена тем, что свойства большинства модулей белков паутины изучены достаточно хорошо у различных видов пауков, в результате чего выявлена удивительная корреляция между качественным составом модулей каждого белка и его физическими свойствами — эластичностью и/или прочностью. Таким образом, меняя последовательности исходных модулей и следя за изменениями механо-химических свойств соответствующих фибрилл, можно, с одной стороны, моделировать структурно-функциональные взаимоотношения белков этого типа, а с другой стороны, разрабатывать искусственные белки — аналоги белков паутины с заранее заданными свойствами и создавать на их основе материалы с различным сочетанием свойств прочности и эластичности.

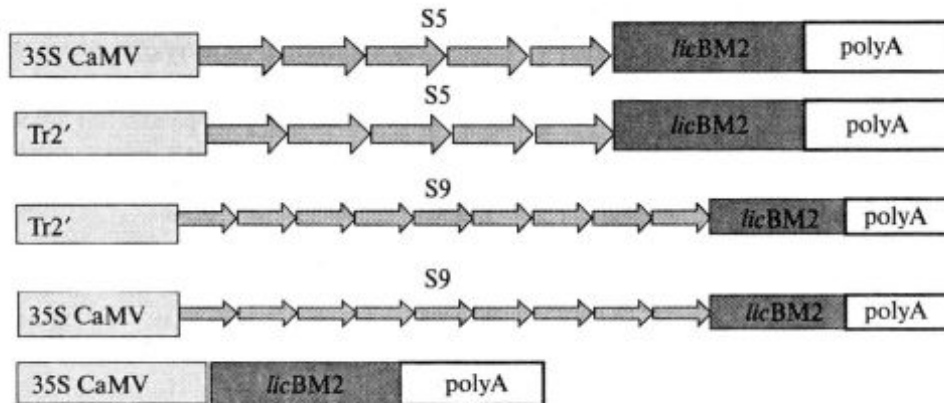


Рис. 1. Схема каскада экспрессии для трансформации растений табака: 35S CaMV — сильный конститутивный промотор 35S РНК вируса мозаики цветной капусты; Tr2' — слабый конститутивный промотор из области Т-ДНК *Agrobacterium tumefaciens*; S5 и S9 — пять и девять повторов гена спидроина 1; licBM2 — ген, кодирующий репортерный белок лихеназы, polyA — область полиаденилирования

В связи с этим ряд исследователей попытались выделить кДНК природных генов и/или получить генно-инженерные аналоги генов, кодирующих белки паутины, и разработать эффективные системы экспрессии этих белков. Использование для этих целей бактерий не привело, однако, к значительным успехам: выход целевого продукта был невелик, синтезировать белки размером более 1000 аминокислотных остатков оказалось невозможным из-за преждевременного терминирования прованил трансляции, клонированные гены были нестабильны вследствие своей периодической природы [7, 8]. Несколько лучшие показатели были достигнуты в случае использования дрожжей *Pichia pastoris*. Однако в этом случае успех ограничивала проблема дорогостоящих ферментаций и сложной процедуры выделения искомого белка из клеток-продуцентов [9]. В связи с изложенным поиск и разработка новых эффективных систем экспрессии генов, кодирующих белки шелка паутины, являются актуальным направлением исследований. В качестве такой системы экспрессии могут быть предложены растения. Известно, что растения в своем геноме стабильно поддерживают собственные большие гены с прямыми повторами и эффективно синтезируют собственные сложные белки типа фибриллярных. Кроме того, растения в качестве продуцентов обладают такими преимуществами, как наличие высокоэффективных методов транс-

формации, разработанных для многих видов растений, отлаженная технология сбора, хранения и переработки растительного материала до их использования, простота масштабирования производства. Помимо этого, использование природных полимеров позволит снизить токсичную нагрузку, оказываемую высокотехнологическими производствами, на природу. По расчетам немецких ученых себестоимость производства рекомбинантных фибриллярных белков с помощью трансгенных растений в 6–7 раз ниже, чем с помощью микробиологического синтеза [10].

Исходя из этих соображений, нами была предпринята попытка получения трансгенных растений табака, экспрессирующих рекомбинантные белки — аналоги белка каркасной нити паутины спидроина 1 паука *Nephila clavipes* [11]. Модельные растения табака были выбраны для того, чтобы показать принципиальную возможность синтеза рекомбинантных аналогов белков паутины в растениях. Для поискового исследования мы использовали новую стратегию. В качестве трансляционной использовали репортерную систему, основанную на термостабильной лихеназе, которая была разработана в лаборатории функциональной геномики ИОГен РАН [12]. Чем привлекательна именно эта репортерная система? Прежде всего, для репортерной системы лихеназы нами разработаны высокочувствительные методы количественного и качественного опреде-

ления активности репортерного белка, не требующие больших затрат времени, а также дорогостоящего оборудования и реагентов [13]. Метод качественного определения активности лихеназы — метод зимограмм — позволяет точно определять молекулярную массу как самой лихеназы, так и гибридных белков, в состав которых она входит, поскольку при проведении ПААГ электрофореза в денатурирующих условиях она способна ренатурировать после денатурации и проявлять свою активность. Кроме этого, нами было показано, что лихеназа сохраняет все свои основные свойства при значительных достройках в С- и N-концевых областях белка [13]. Изучение экспрессии перенесенных гибридных генов в растениях табака показало, что растения способны поддерживать в своем геноме и экспрессировать синтетические гены белков паутины, и являются, таким образом, подходящими продуцентами рекомбинантных аналогов белков шелка паутины. Настоящее исследование было проведено для выяснения следующих вопросов: изменится ли уровень экспрессии синтетических генов и стабильность их белковых продуктов при переходе от модельных пробирочных растений к сельскохозяйственным культурам и насколько стабильны эти белки при хранении сельскохозяйственных культур?

Выяснение этих фундаментальных вопросов является важным и необходимым условием для проведения дальнейших биотехнологических разработок. В качестве продуцентов белков спидроинов нами были выбраны растения картофеля. Такой выбор обусловлен наличием разработанных методов трансформации; возможностью наработки биомассы; сохранением стабильного уровня экспрессии трансгена в поколениях этих растений (это обусловлено гемизиготным состоянием трансгена в этих растениях в силу их вегетативного размножения).

Материалы и методы. Использовали растения картофеля *Solanum tuberosum* сорта Десница и Юбилей Жукова. Агробактериальную трансформацию растений картофеля проводили по разработанному нами методу из микроклубней. Отбор трансформантов и дальнейшее их поддержание осуществляли на среде МС с

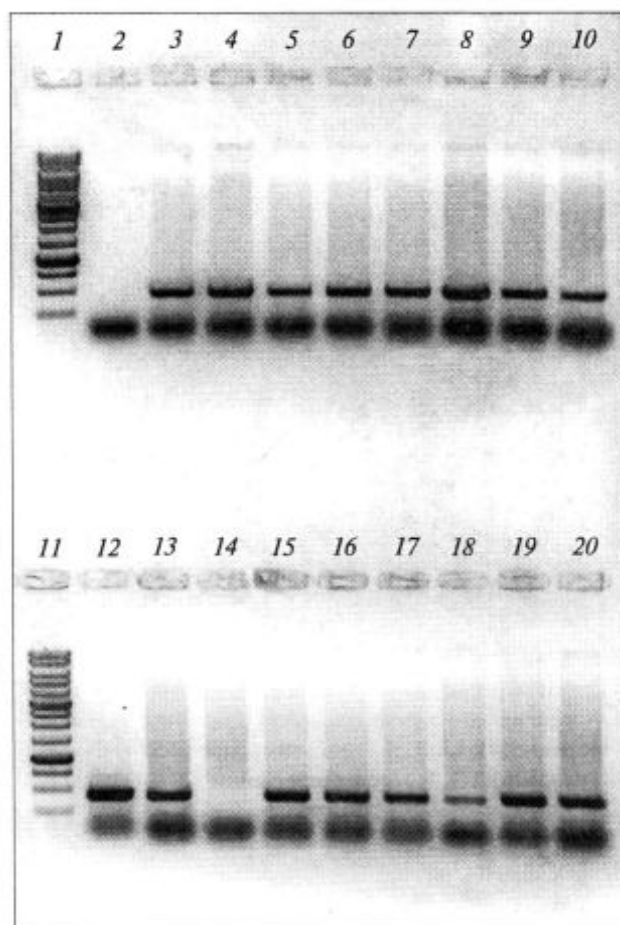


Рис. 2. Анализ геномной ДНК контрольного растения (дорожка 2) и первичных трансформантов картофеля методом ПЦР с праймерами на ген лихеназы: 8, 19 — растения линии S5; 14 — контрольное растение, экспрессирующее ген *npt II*, 17 — растение линии T5; 9, 10, 13, 18, 20 — растения линии S9; 15 — растение линии S17; 12 — растение линии T9; 6, 7 — растения линии LicB; 4, 5 — растения линии L-LicB; 3 — положительный контроль

добавлением 50—100 мкг/мл канамицинсульфата. Молекулярно-биологический анализ первичных трансформантов растений проводили с использованием методов ПЦР, а также количественных и качественных методов определения активности лихеназы. Белковые лизаты для определения активности лихеназы получали разрушением клеток в 50 мМ трис-НСl, рН 8,0 ультразвуком, с последующим центрифугированием при 12000 g в течение 30 мин для получения осветленных препаратов. Количественное определение лихеназной активнос-

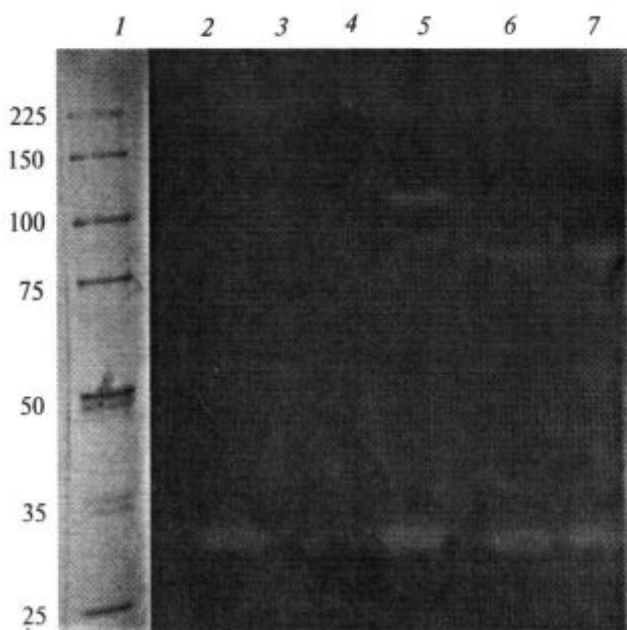


Рис. 3. Зимограмма белковых экстрактов, полученных из листьев растений картофеля (по вертикали — кДа): 1 — маркер молекулярных масс; 2 — линия контрольных растений LicB; 3 — растения линии S17; 4 — растения линии S9; 5 — растения линии S5; 6 — растения линии T5

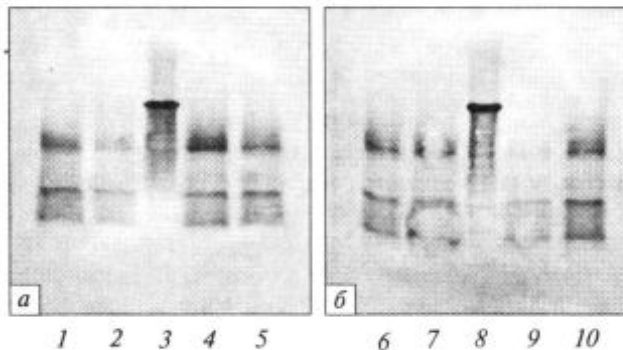


Рис. 4. Вестерн-блот гибридизация гибридных белков, выделенных из трансгенных растений картофеля: 1, 4, 5, 6, 10 — белковые экстракты из разных трансгенных растений линии S9; 3 и 8 — контроль (белок спидроина, выделенный из дрожжей, 10 мкг); 2 — белковые экстракты из трансгенного растения линии T5, 9 — белковые экстракты из трансгенного растения линии S5

ти в растительных белковых лизатах проводили по модифицированной нами методике, описанной [14]. За единицу активности принимали количество фермента, образующее 1 мкмоль восстанавливающих сахаров за 1 мин.

Зимограммы получали разделением белков в 10 % или в 8—16 % ДСН-ПААГ, содержащем субстрат лишениан, с последующим окрашиванием гелей 0,5%-ным раствором Конго красного (Sigma) и отмыванием в 1 М NaCl.

На рисунках представлены средние арифметические величины и стандартные ошибки, полученные при обработке результатов пяти независимых экспериментов, если не указано особо.

Результаты исследований и их обсуждение. В работе по трансформации растений картофеля использовали три сорта растений отечественной селекции — Юбилей Жукова, Жуковский ранний, Десница. При получении трансформантов картофеля использовали стеблевые и клубневые экспланты растений и экспрессионные векторы, несущие гибридные гены, которые содержат различное число повторяющихся мотивов синтетического гена, слитых в рамке считывания с последовательностью репортерного гена лишениазы, под контролем различных регуляторных элементов (рис. 1). Растительные экспрессионные векторы были получены нами ранее [11].

Проведенные исследования показали, что эффективность трансформации растений картофеля зависит как от векторной конструкции, использованной в работе, так и от происхождения экспланта (клубневой или стеблевой). Так, более высокий процент первичных трансформантов растений картофеля, отобранных по лишениазной активности, получен при использовании клубневых эксплантов для всех использованных конструкций. При этом эффективность трансформации при использовании конструкций S9 была на порядок выше, чем при использовании конструкций S5, и составила 0,08 и 0,61 соответственно. Сравнительный анализ данных по эффективности трансформации используемых в работе сортов картофеля позволил сделать заключение, что лучшие показатели по эффективности трансформации растений картофеля были получены для сорта Юбилей Жукова.

Полученные регенеранты растений картофеля всех линий, устойчивые к канамицину, были проанализированы с помощью метода определения активности лишениазы по образованию комплекса субстрат — Конго красный.

Проведенные исследования позволили отобрать первичные трансформанты, которые экспрессируют перенесенные гибридные гены. Для того чтобы показать, что в составе геномов первичных трансформантов растений картофеля присутствуют последовательности перенесенных генов, их геномная ДНК была проанализирована методом ПЦР. Следует отметить, что проведение ПЦР с использованием праймеров к последовательности генов спидроина I не представляется возможным вследствие периодической структуры генов и больших протяженных GC-богатых участков, поэтому ПЦР проводили с использованием праймеров к последовательности гена лихеназы как составной части гибридных генов. Следует отметить, что у всех первичных трансформантов, отобранных первоначально на селективной среде с канамицином, а затем по активности лихеназы, выявлены ПЦР-фрагменты соответствующего размера, в то время как у первичных трансформантов, устойчивых к канамицину, но не проявивших лихеназной активности, аналогичные ПЦР-фрагменты не выявлены (рис. 2). Таким образом, в проведенных экспериментах мы показали, что в геноме первичных трансформантов растений картофеля присутствует последовательность репортерного гена лихеназы как составная часть гибридных генов.

Для доказательства того, что в первичных трансформантах растений картофеля синтезируются рекомбинантные белки с молекулярными массами, соответствующими размерам гибридных белков, белковые экстракты первичных трансформантов были проанализированы методом зимограмм (рис. 3). Методом зимограмм были выявлены полосы активности фермента у первичных трансформантов картофеля, которые соответствовали теоретически рассчитанным молекулярным массам гибридных белков (80 кДа — для гибридного белка, который содержит пять повторов спидроина I, слитого с лихеназой, и 122 кДа — для гибридного белка, который содержит девять повторов спидроина I, слитого с лихеназой). Соответствие молекулярных масс выявляемых гибридных белков теоретически ожидаемым свидетельствует о том, что геном растений картофеля способен стабильно поддерживать

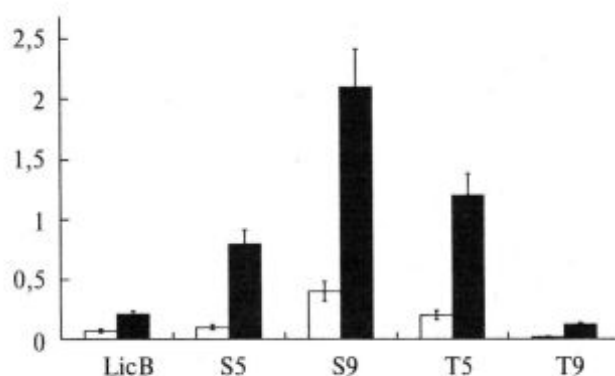


Рис. 5. Содержание рекомбинантных белков в клубнях и листьях трансгенных растений картофеля, выращенных в грунте. Светлые столбики отражают содержание белка в клубнях, темные столбики — в листьях; по вертикали — процент суммарного растворимого белка

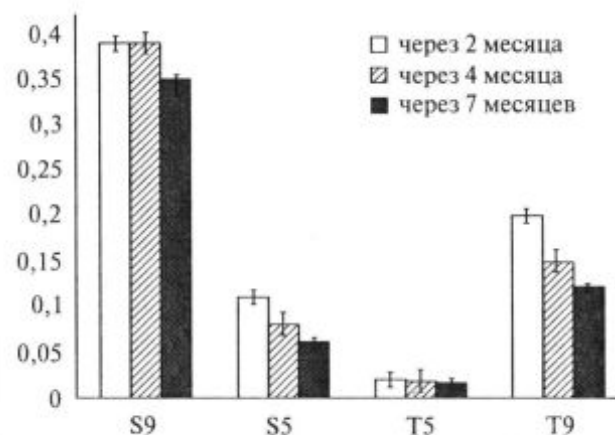


Рис. 6. Содержание гибридных белков в клубнях трансгенных растений картофеля в процессе хранения; по вертикали — уровень накопления белка, %

в своем составе гены спидроина I, и в растениях картофеля происходит синтез рекомбинантных белков — спидроина I. Для подтверждения того, что гибридные белки содержат последовательности белков — аналогов белков шелка паутины, белковые экстракты трансгенных растений картофеля были проанализированы методом Вестерн-блот гибридизации (рис. 4).

Для изучения экспрессии гибридных генов в клубневой ткани растений картофеля нами были получены микроклубни, которые проанализированы на наличие лихеназной активности качественным методом с использованием Кон-

го красного. В микроклубнях всех линий трансгенных растений выявлена активность лихеназы (данные не приводятся). Далее микроклубни трансгенных и контрольных растений были высажены в закрытый грунт и выращены в условиях теплицы. Следует отметить, что морфология трансгенных и контрольных растений как надземной части, так и клубней была схожей.

В растительном материале, полученном из клубней и листьев контрольного и трансгенных растений, было определено содержание гибридных белков спидроина 1 (рис. 5). Из представленных результатов видно, что содержание гибридных белков спидроина 1 в клубнях трансгенных растений ниже, чем в листьях этих же растений.

Для того чтобы выяснить, насколько стабильны гибридные белки при хранении клубней трансгенных растений картофеля, было определено содержание этих белков (по активности лихеназы) через 2, 4 и 7 мес хранения клубней при +4 °С (рис. 6). Как видно из представленных данных, содержание гибридных белков в клубнях трансгенных растений картофеля в период хранения достоверно не изменяется. Эти данные свидетельствуют о преимуществах использования растений в качестве биофабрик для наработки гетерологичных белков, а именно способности их длительного хранения.

Таким образом, нами показано, что при переходе от модельных пробирочных растений к реальным сельскохозяйственным культурам сохраняется экспрессия гибридных генов спидроина 1, имеющих повторяющиеся мотивы. При этом эффективность экспрессии синтетических генов спидроинов и уровень накопления их продуктов в растениях зависят от силы промотора, количества повторов, органоспецифичности и вида растения и не зависят от длительности хранения растительного материала.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что стратегия, основанная на конструировании и экспрессии гибридных белков, в состав которых входит репортерный белок, облегчает отбор и анализ экспрессии гибридных белков в трансгенных организмах и является обоснованной и адекватной при проведении поисковых исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы Президиума РАН «Динамика генофондов растений, животных и человека», РФФИ (06-04-81009-Бел_а, 05-04-49186-а, 04-04-81039-Бел_а) и гранта «Ведущие научные школы» НШ-4202.2006.4.

SUMMARY. Transgenic potato plants have been created which express recombinant proteins, analogues of spidroin 1, the protein of the cobweb skeleton thread. Expression of the hybrid spidroin 1 genes possessing some repeated sequences retains both in the model test-tube-growing plants and in the crops. Expression level of the synthetic spidroin 1 genes and the level of accumulation of their products in plants depend on the type of promoter, number of repeats, organ specificity and plant species but not on the duration of plant material storage. The results show that the strategy based on construction and expression of hybrid proteins which include the reporter protein makes it easier to select and analyse expression of hybrid proteins in transgenic organisms.

РЕЗЮМЕ. Отримано трансгенні рослини картоплі, що експресують рекомбінантні білки — аналоги білка каркасної нитки павутини спідроїна 1. Показано, що при переході від модельних пробірочних рослин до реальних сільськогосподарських культур зберігається експресія гібридних генів спідроїна 1, які мають мотиви, що повторюються. При цьому ефективність експресії синтетичних генів спідроїнів та рівень накопичення їхніх продуктів у рослинах залежать від сили промотора, кількості повторів, органоспецифічності та виду рослини і не залежить від тривалості зберігання рослинного матеріалу. Одержані результати свідчать про те, що стратегія, заснована на конструюванні та експресії гібридних білків, до складу яких входить репортерний білок, полегшує відбір та аналіз експресії гібридних білків у трансгенних організмах і є обґрунтованою та адекватною при проведенні пошукових досліджень.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Hinman M.B., Stauffer S.L., Lewis R.V.* Mechanical and chemical properties of certain spider silks // *Silk Polymers: Materials Science and Biotechnology* / Eds D. Kaplan. — Washington : ACS Books, 1994. — P. 222—233.
2. *Guerrette P.A., Ginzinger D.G., Weber B.H.F., Gosline J.M.* Silk properties determined by gland-specific expression of spider fibroin gene family // *Science*. — 1996. — 272. — P. 112—115.
3. *Hayashi C.Y., Lewis R.V.* Evidence from flagelliform silk cDNA for the structural basis of elasticity and mo-

- dular nature of spider silks // *J. Mol. Biol.* — 1998. — 275. — P. 773—784.
4. *Gatesy J., Hayashi C., Motriuk D., Woods J., Lewis R.* Extreme diversity, conservation, and convergence of spider silk fibroin sequences // *Science.* — 2001. — 291. — P. 2603—2605.
 5. *Silk Polymers: Materials Science and Biotechnology / Eds D. Kaplan et al.* — Washington: ACS Books, 1994. — 370 p.
 6. *Gosline J., Guerette P., Ortlep C., Savage K.* The mechanical design of spider silks: from fibroin sequence to mechanical function // *J. Exp. Biol.* — 1999. — 302. — P. 3295—3303.
 7. *Winkler S., Szela S., Avtges P., ValLuzzi R., Kirschner D.A., Kaplan D.* Designing recombinant spider silk proteins to control assembly // *Int. J. Biol. Macromol.* — 1999. — 24. — P. 265—270.
 8. *Fahnestock S.R., Irwin S.L.* Synthetic spider dragline silk proteins and their production in *Escherichia coli* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 1997. — 47. — P. 23—32.
 9. *Fahnestock S.R., Bedzyk L.A.* Production of synthetic spider dragline silk protein in *Pichia pastoris* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 1997. — 47. — P. 33—39.
 10. *Scheller J., Guhrs K.-H., Grosse F., Conrad U.* Production of spider silk proteins in tobacco and potato // *Nature Biotechnol.* — 2001. — 19. — P. 573—577.
 11. *Пирузян Э.С., Бозуш В.Г., Сидорук К.В., Голденкова И.В., Мусийчук К.А., Дебабов В.Г.* Конструирование синтетических генов, кодирующих белки — аналоги белка каркасной нити паутины спидроина I, и их экспрессия в растениях табака // *Молекуляр. биология.* — 2003. — 37, № 4. — С. 654—662.
 12. *Piruzian E.S., Goldenkova I.V., Mysiychuk K.A. et al.* Reporter system for prokaryotic and eukaryotic cells based on the thermostable lichenase from *Clostridium thermocellum* // *Mol. Genet. Genom.* — 2002. — 266. — P. 778—786.
 13. *Голденкова И.В.* Репортерные системы: возможности для изучения различных аспектов регуляции экспрессии генов // *Усп. соврем. биологии.* — 2002. — 122, № 6. — С. 515—526.
 14. *Мусийчук К.А., Голденкова И.В., Абдеев Р.М., Кобец Н.С., Пирузян Э.С.* Получение и свойства делеционных вариантов лихеназы *Clostridium thermocellum* и создание на их основе бифункциональных гибридных белков // *Биохимия.* — 2000. — 65. — P. 1659—1665.

Поступила 14.07.06