

ОТРИМАННЯ ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН *NICOTIANA BENTHAMIANA*, В ЯКИХ ПРОХОДИТЬ ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ ПРОЛІЛ-4-ГІДРОКСИЛАЗИ ЛЮДИНИ

Колаген I типу є важливим сировинним матеріалом для цілого ряду напрямків фармацевтичного виробництва і використовується як хірургічний шовний матеріал, як допоміжна речовина в технології мазей, супозиторіїв, розчинів для ін'єкцій, очних лікарських плівок та ін. Традиційно колаген, що використовують в фармацевтичній та косметологічній промисловості екстрагують з тваринних тканин. Такий продукт містить колагени різних типів, та може містити алергени та збудники інфекційних захворювань. Технологія отримання рекомбінантного колагену дозволила отримувати більш однорідний та безпечний колаген. Рекомбінантний колаген було отримано в тваринних клітинах [1], культурі клітин комарів [2], дріжджах [3] та культурі рослинних клітин [4]. Ці технології мають певні обмеження та високу вартість.

Протягом останніх десятиліть активно проводиться розробка альтернативної економічно вигідної та безпечної системи продукції рекомбінантних білків в рослинних системах. Крім створення трансгенних рослин, в яких проходить експресія цільових білків після переносу чужорідного гена в геном рослини, розроблені системи транз'єнтної (тимчасової) експресії, при якій експресія клонованого гена відбувається без його обов'язкової інтеграції в геном рослини [5]. Рослини, як продуценти рекомбінантних білків, мають ряд переваг у порівнянні з бактеріями, дріжджами або клітинами ссавців. Рослини не містять патогенні для людини віруси та пріони, не потребують застосування коштовного обладнання та культуральних середовищ для їх вирощування, а також проведення робіт в асептичних умовах.

Вперше в рослинних системах колаген було отримано в трансгенних рослинах тютюну [6] і таким чином було показано, що в рослинах можливий синтез про- β -ланцюгів колагену, та формування потрібної спіральної структури. Однак отриманий колаген мав низький вміст гідроксипроліну, що значно знизило його стабільність при фізіологічних температурах. Гідрокси-

лювання проліну є необхідним для стабілізації потрібної спіралі колагену, оскільки ОН-групи гідроксипроліну беруть участь в утворенні внутрішньомолекулярних водневих зв'язків. Утворення 4-гідроксипроліну каталізує фермент проліл-4-гідроксилаза і це необхідний етап у формуванні про- β -ланцюгів колагену [7, 8]. Проліл-4-гідроксилаза, яка присутня в рослинах, не забезпечує коректне гідроксилювання проліну у повторюваних амінокислотних послідовностях колагену X-Pro-Gly, в яких X – це будь-яка амінокислота, крім гліцину [9]. При цьому було показано, що сумісна експресія генів ланцюгів колагену та субодиниць проліл-4-гідроксилази в трансгенних рослинах збільшує вміст 4-гідроксипроліну в синтезованих молекулах і, як наслідок, дає можливість отримувати молекули колагену з максимально близькою до нативної просторовою структурою [10].

За останні роки було показано, що транз'єнтна (тимчасова) система експресії дає можливість значно збільшити кількість рекомбінантного білка у порівнянні з стабільно трансформованими рослинами. При використанні системи транз'єнтної експресії MagnICON [11] кількість отриманого рекомбінантного білка у порівнянні з трансгенними рослинами збільшилась майже у 100 разів [12]. У цій же системі повідомлялось, що *Nicotiana benthamiana*, у порівнянні зі звичайним тютюном, при транз'єнтній експресії накопичує у 7 разів більше білка.

Метою нашої роботи було створення трансгенних рослин *N. benthamiana* – адаптованих продуцентів для транз'єнтної експресії колагену людини, в яких відбувається пост-трансляційна модифікація цього рекомбінантного білка. Завдяки перенесенню в геном цих рослин послідовностей, що кодують фермент проліл-4-гідроксилазу та експресії цього ферменту, стає можливим гідроксилювання залишків проліну в молекулі колагену, що в свою чергу забезпечує утворення коректної просторової структури полімерного колагену.

Матеріали і методи

Векторні конструкції та бактеріальні штами. Створення векторних конструкцій pCB210 та pCB226 проводили на основі вектора з колекції Інституту, Т-ДНК якого включає селективний (*bar*) та репортерний (*gfp*) гени. При конструюванні векторів ділянка із селективним геном фосфінотрицину-N-ацетилтрансферази, що надає трансгенним рослинам стійкість до гербіциду фосфінотрицину, не змінювалась. Проте структурна частина репортерного гена була делітована за допомогою гідролізу вихідного вектора рестриктазами *NcoI* та *KasI*, сайти впізнання яких саме фланкують структурну частину гена. Лінійний фрагмент вектора очищали із гелю після електрофоретичного розділення продуктів рестрикції. Очистку проводили за допомогою набору для виділення ДНК фрагментів (Gel extraction kit, ThermoScientific). Водночас тим самим способом проводили очистку структурних частин генів α -та β -субодиниць проліл-4-гідроксилази, синтезованих за допомогою ПЛР та оброблених після ПЛР рестриктазами *NcoI* та *XbaI*. З препаратами очищеного лінійного вектора та генів α -та β -субодиниць проліл-4-гідроксилази проводили реакції лігування за допомогою Т4-ДНК лігази за відповідних умов (ThermoScientific). Продуктами лігування трансформували *Escherichia coli* штаму XL1-Blue, відбирали стійкі до антибіотика колонії, плазмідну ДНК яких перевіряли рестриктним картуванням. Коректно зібрані бінарні векторні конструкції переносили в *Agrobacterium tumefaciens* штаму GV3101 методом електропорації з використанням MicroPulser Electroporator (BioRad). Для трансформації рослин використовували нічну культуру агробактерії, що вирощувалась на рідкому середовищі LB [13] при 28 °C.

Трансформація рослин *N. benthamiana* за допомогою *Agrobacterium tumefaciens*. Для агробактеріальної трансформації *N. benthamiana* використовували сегменти листків 5–6-тижневих рослин, що вирощувались в асептичних умовах. Експланти інкубували у бактеріальній суспензії (нічна культура агробактерії розведена у 4–5 разів) протягом 10–15 хвилин. Інокульовані бактеріальною суспензією експланти викладали на стерильний фільтрувальний папір і культивували протягом 12–16 годин. Після цього експланти переносили середовище MS [14], яке додатково містило 5 мг/л фосфінотрицину, 600 мг/л цефотаксиму, а також фітогормони 1 мг/л БАП та 0,1 мг/л НОК для ініціації регенерації рослин. Через 5–6 тижнів сформовані пагони пересажували на безгормональне середовище MS, доповнене 5 мг/л фосфінотрицину. Надалі вкорінені рослини переносили в ґрунт в умовах теплиці.

Аналіз трансформованих рослин *N. benthamiana*. Для доведення наявності трансгенів в отриманих рослинах аналізували сумарну рослинну ДНК за допомогою ПЛР з використанням праймерів до гена *bar* та генів α - та β -субодиниць ферменту проліл-4-гідроксилази. Реакційна суміш містила ~ 100 нг сумарної рослинної ДНК, сольовий буфер (10 mM Tris-HCl, pH 9,0, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0,01 % Трипон X-100), по 200 мкМ кожного з дезоксинуклеотидтрифосфатів, по 0,2 мкМ кожного з праймерів та 1 одиницю Taq-полімерази. Загальний об'єм суміші становив 20 мкл. В таблиці представлена інформація про нуклеотидні послідовності праймерів, які використовували в роботі, та їх специфічність. Сумарну рослинну ДНК, виділяли ЦТАБ-методом [15]. Як позитивний контроль для реакції ампліфікації використовували плазмідну ДНК векторів, яку виділяли з нічної

Таблиця

Праймери, які використані в роботі, для проведення молекулярного аналізу за допомогою ПЛР

Ген	Послідовність праймерів	Температура реакції	Продукт ампліфікації
<i>bar</i>	5'-CCGTACCGAGCCGCAGGAAC-3' 5'-CAGATCTCGGTGACGGGCAGGAC-3'	65°C	463 п.н.
P4H- α	5'-CACCATGGTCTGGTATATAATTAATTATAGGA-3' 5'-CACGGCGCCTTCCAATTCTGACAACGTACAAGG-3'	60°C	1758 п.н.
P4H- β	5'-TTCCATGGACGCCCGGAAGAAGAAGACCACG-3' 5'-AGAGGCGCCCAAGTTGATCTTTACAGCTTTCTG-3'	64°C	1477 п.н.
P4H- α	5'-GTTGCTGTGGATTACCTGCCAGAG-3' 5'-GGCTCATCTTTCCGTGCAAAGTC-3'	60°C	491 п.н.
P4H- β	5'-TCCTTGGTGGAGTCCAGCGAG-3' 5'-GACAGGCTGCTTGTCCAGTC-3'	61°C	666 п.н.
P4H- β	5'-TCCAGCGAGGTGGCTGTCATCG-3' 5'-CCAACAAGCACCTTGACAGGCTGC-3'	64°C	663 п.н.

культури *E. coli*, використовуючи лужний метод [16]. Електрофорез ПЛР фрагментів ДНК проводили у 1 % агарозному гелі.

Результати та обговорення

Рослини *N. benthamiana* є модельним об'єктом для синтезу рекомбінантних білків, тому для проведення досліджень, щодо експресії генів колагену людини I-го типу, був вибраний саме цей вид. Гідроксилування залишків проліну в молекулі колагену є необхідною складовою процесу дозрівання молекули колагену в людському організмі, отже наявність ферменту проліл-4-гідроксилази людини в клітинах *N. benthamiana* є вкрай важливим фактором для коректного формування молекули колагену. Створення трансгенних рослин *N. benthamiana*, які мають у своїх клітинах проліл-4-гідроксилазну активність, дає можливість отримати адаптовані продуценти для синтезу колагену в рослинній системі.

Для створення рослин *N. benthamiana* із гідроксилазною активністю за людським типом було проведено клонування генів α - та β -субодиниць ферменту (*P4H- α* та *P4H- β*) за допомогою ПЛР та створення генетичних конструкцій для трансформації рослин. Далі, на основі створених векторів рСВ210 та рСВ226, що представлені на рис.1, було отримано відповідні лінії агробакте-

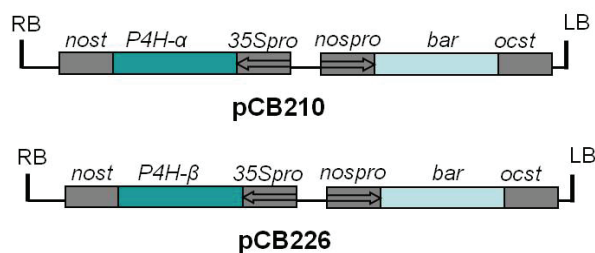


Рис. 1. Схематичне зображення Т-ДНК бінарних векторів рСВ210 та рСВ226: 35Spro – промотор вірусу мозаїки цвітної капусти; nospro – промотор нопалін синтази; nost – термінатор нопалін синтази; ocst – термінатор октопін синтази; bar – ген фосфінотрицину – N – ацетилтрансферази, P4H- α та P4H- β гени α - та β -субодиниць ферменту проліл-4-гідроксилази

рії *A. tumefaciens* штаму GV3101 та проведено генетичну трансформацію *N. benthamiana*.

Для проведення генетичної трансформації ми використовували суміш суспензій двох агробактеріальних культур, кожна з якої містила відповідний вектор. Регенерація рослин *N. benthamiana* на селективному середовищі, що містило 5 мг/л фосфінотрицину, відбувалась 6–10 тижнів, протягом яких на експлантах формувались численні пагони (рис. 2-а). Вкорінення регенерантів проводили на безгормональному

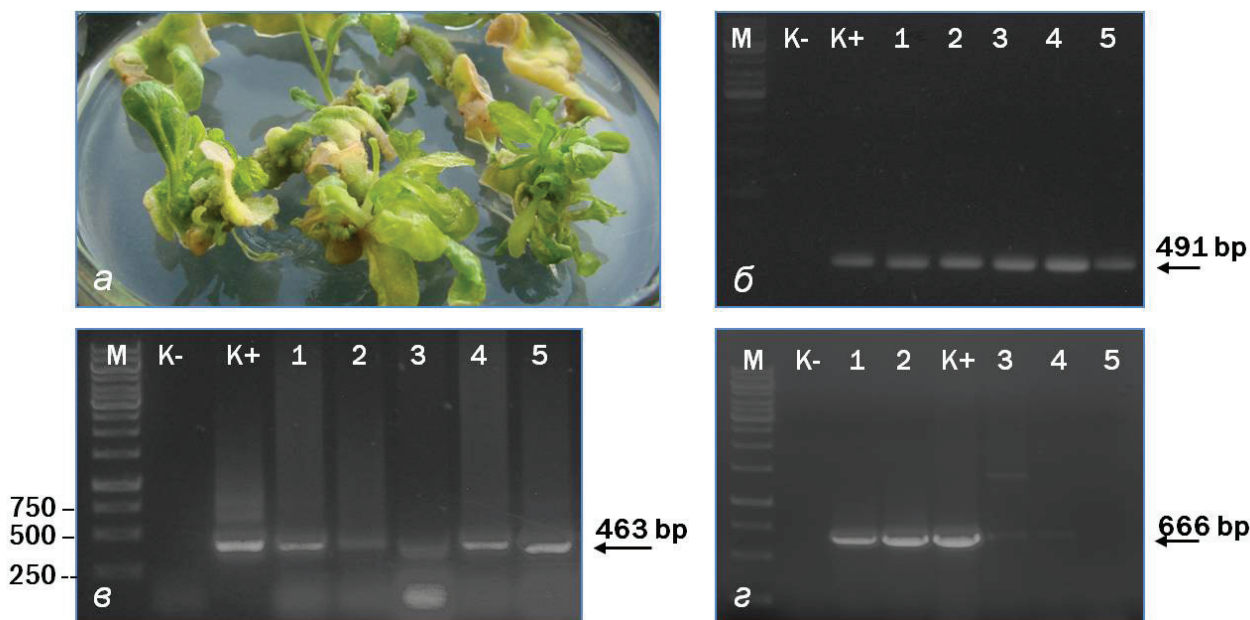


Рис. 2. Результати генетичної трансформації *N. benthamiana* векторами рСВ210 та рСВ226: а – регенерація рослин *N. benthamiana* на селективному середовищі; б–в – електрофореграма результатів ПЛР аналізу тотальної ДНК рослин *N. benthamiana*, відібраних на селективному середовищі з використанням праймерів до *bar* (в), *P4H- α* (б) та *P4H- β* (г) генів: М – маркер 1 kb Plus DNA Ladder (Gibco BRL); К – негативний контроль, ДНК нетрансформованої рослини; К+ – позитивний контроль ДНК плазмиди рСВ210 або рСВ226; 1–5 – ДНК рослин-регенерантів, стійких до фосфінотрицину

середовищі MS, що також містило 5 мг/л фосфінотрицину. Для підтвердження наявності перенесених генів субодиноць проліл-4-гідроксилази в геномі рослин, відібраних у результаті селекції на фосфінотрицині, проводили молекулярно-біологічний аналіз за допомогою ПЛР (рис. 2 б-г).

В обох векторах, pCB210 та pCB226, для селекції рослин був використаний ген *bar*, що надає трансгенним рослинам стійкість до гербіциду фосфінотрицину. В умовах такої селекції, приблизно 30 % трансгенних рослин мали в своєму геномі послідовності обох субодиноць проліл-4-гідроксилази. На рисунку 2-г видно відсутність відповідного сигналу після проведення ПЛР (доріжки 4, 5), що свідчить про відсутність гена *P4H-β* в геномі цих рослин, тоді як наявність гена *P4H-α* в них підтверджується (рис. 2-б). Вкорінені рослини, в геномі яких за допомогою ПЛР було підтверджено наявність обох субодиноць проліл-4-гідроксилази, перенесли в ґрунт в умовах теплиці. Перенесені в ґрунт

з умов *in vitro* рослини швидко адаптувались та росли, формуючи великі листові пластини, що, на наш погляд, можна вважати ще однією перевагою для використання цих рослин для транз'єнтної експресії.

Висновки

Були створені генетичні конструкції для агробактеріальної трансформації, які містять генетичні послідовності α - та β -субодиноць ферменту проліл-4-гідроксилази, проведено генетичну трансформацію рослин *N.benthamiana*. В результаті були отримані трансгенні рослини *N. benthamiana*, що містять гени α - та β -субодиноць ферменту проліл-4-гідроксилази, наявність яких в геномі підтверджена за допомогою ПЛР. Ми вважаємо, що такі рослини можуть бути використані, як адаптовані продуценти, в яких забезпечується пост-трансляційна модифікація ланцюгів колагену, а саме гідроксилювання залишків проліну, що синтезуються транз'єнтно.

ЛІТЕРАТУРА

- Geddis A., Prockop D. Expression of human COL1A1 gene in stably transfected HT1080 cells: the production of a thermostable homotrimer of type I collagen in a recombinant system // Matrix. 1993. 13, N 5. P. 399405.
- Myllyharju J., Lamberg A., Notbohm H., Fietzek P., Pihlajaniemi T., Kivirikko K.I. Expression of wild-type and modified pro alpha chains of human type I procollagen in insect cells leads to the formation of stable [alpha 1(I)](2)alpha 2(I) collagen heterotrimers and [alpha 1(I)](3) homotrimers but not [alpha 2(I)](3) homotrimers // J. Biol. Chem. – 1997. 272, N 35. P. 2182421830.
- Vuorela A., Myllyharju J., Nissi R., Pihlajaniemi T., Kivirikko K.I. Assembly of human prolyl 4-hydroxylase and type III collagen in the yeast *Pichia pastoris*: formation of a stable enzyme tetramer requires coexpression with collagen and assembly of a stable collagen requires coexpression with prolyl 4-hydroxylase // EMBO J. – 1997. 16, N 22. – P. 67026712.
- Ritala A., Wahlstrom E.H., Holkeri H., Hafren A., Makelainen K., Baez J., Makinen K., Nuutila A.M. Production of a recombinant industrial protein using barley cell cultures // Protein Expr. Purif. – 2008. 59, N 2. P. 274281.
- Komarova T., Baschieri S., Donini M., Marusic C., Benvenuto E. Transient expression systems for plant-derived biopharmaceuticals // Expert. Rev. Vaccines. – 2010. – 9, N 8. – P. 859–876.
- Ruggiero F., Exposito J.Y., Bournat P., Gruber V., Perret S., Comte J., Olganier B., Garrone R., Theisen M. Triple helix assembly and processing of human collagen produced in transgenic tobacco plants // FEBS Lett. – 2000. 469, N 1. P. 132–136.
- Gorres K., Raines R. Prolyl 4-hydroxylase // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 2010. 45, N 2. P. 106–124.
- Myllyharju J. Prolyl 4-hydroxylases, the key enzymes of collagen biosynthesis // Matrix Biol. 2003. – 22, N 1. P. 15–24.
- Tanaka M., Sato K., Uchida T. Plant prolyl hydroxylase recognizes poly(L-proline) II helix // J. Biol. Chem. – 1981. 256, M 22. P. 11397–11400.
- Xu X., Gan Q., Clough R.C., Pappu K.M., Howard J.A., Baez J.A., Wang K. Hydroxylation of recombinant human collagen type I alpha 1 in transgenic maize co-expressed with a recombinant human prolyl 4-hydroxylase // BMC Biotechnol. – 2011. – 11, N 69.
- 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. 23, N 6. P. 718–723.
- Nausch H., Mikschofsky H., Koslowski R., Meyer U., Broer I., Huckauf J. High-level transient expression of ER-targeted human interleukin 6 in *Nicotiana benthamiana* // PLoS One. – 2012. – 7, N 11. e48938.
- Bertani G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli* // J. Bacteriol. 1951. – 62, N 3. P. 293–300.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plantarum. – 1962. 15, N 3. P. 473–497.
- Армитидж Ф., Уолден Р., Дрейпер Дж. Выделение тотальных препаратов нуклеиновых кислот из *A. tumefaciens* // Генная инженерия растений. Лабораторное руководство: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Дрейпера, Р. Скота, Ф. Армитидж, Р. Уолден. – М.: Мир, 1991. С. 76–78.
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. – М.: Мир, 1984. – 545 с.

SHCHERBAK N.L., VASYLENKO M.YU., KUCHUK M.V.

*Institute of Cell Biology and Genetic Engineering NAS of Ukraine,
Ukraine, 03680, Kyiv, Zabolotnogo str., 148, e-mail: natasha@icbge.org.ua*

OBTEINING OF TRANSGENIC NICOTIANA BENTHAMIANA PLANTS CARRYING GENES OF PROLYL-4-HYDROXYLASE SUBUNITS

Aims. The use of plants as a recombinant peptides expression system is a valuable alternative for the production of collagen for various medical and scientific purposes. The aim of this work was to obtain transgenic plants of *Nicotiana benthamiana* with two human genes encoding subunits of prolyl-4-hydroxylase (P4H), responsible for key posttranslational modifications of collagen. **Methods.** Transgenic plants were obtained via *Agrobacterium* mediated transformation method. Presence of the target and selective genes was confirmed by PCR-analysis. **Results.** We report here the development of transgenic plants of *Nicotiana benthamiana* carrying genes of prolyl-4-hydroxylase (P4H) subunits. **Conclusions.** Obtained plants have potential to produce adequately modified exogenous collagen with mammalian-like post-translation modifications via transient expression experiments.

Keywords: *Nicotiana benthamiana*, transgenic plants, prolyl-4-hydroxylase, collagen, transient expression.