

О СПОСОБАХ ИНТЕНСИФИКАЦИИ СИНТЕЗА АНТИГЕННЫХ БЕЛКОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАСТИТЕЛЬНЫХ ВИРУСНЫХ РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ ПРИ РАЗРАБОТКЕ ИННОВАЦИОННЫХ ВАКЦИН НА БАЗЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСПРЕССИОННЫХ СИСТЕМ

Н.И. Рекославская^{1,2}, Р.К. Саляев¹, А.С. Столбиков¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, rekoslavskaya@sifibr.irk.ru

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Иркутский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук, Россия

Аннотация. Растительная экспрессионная система на основе плодов трансгенного томата была использована для усиления синтеза антигенного белка HPV16 L1 наиболее онкогенного типа 16 папилломавируса человека. Для создания стабильно трансформированных растений томата была использована генетическая конструкция рVINHPV16 L1 Ω 5' НТО ВТМ, которая обеспечивала продукцию HPV16 L1 до 2330 нг/мг общего растворимого белка (ОРБ). Для транзientной экспрессии была разработана генетическая конструкция с репликазой РНК2а CMV (RdRP), которая включала белок антисайленсер РНК2b CMV. В этом случае выход антигенного белка достигал 200000 нг/мг ОРБ.

Ключевые слова: высокоонкогенный папилломавирус тип 16, HPV16 L1, омега лидер ВТМ, RdRP CMV

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1348-1352

Растительные экспрессионные системы имеют значительные преимущества по сравнению с другими экспрессионными системами на основе бактерий, бакуловирусов, дрожжей, микроводорослей, так как осуществляют гликозилирование антигенных белков, сопоставимое с млекопитающими, не несут скрытых опасных генетических элементов, достаточно дешевы, довольно легко переводимы на крупномасштабное производство антигенных белков или других биофармацевтиков, а антигенные белки, синтезированные в растениях, способны достаточно долго (до года и более) храниться без потери иммуногенности. Но стабильно трансформированные с помощью агробактериального вектора растения обеспечивают недостаточно высокий выход синтеза антигенных белков в пределах нескольких десятков нг на мг ОРБ, что значительно препятствует их масштабированному производству при создании инновационных вакцин на базе растений. Поэтому для интенсификации синтеза применяют различные вирусные регуляторные элементы и гены, которые в природе позволяют вирусам довольно быстро синтезировать свои структурные белки, необходимые для организации генома, репликации, транспорта и ассамблирования. При этом необходимым условием является помещение генетической конструкции в пределы ТДНК агробактерии, обеспечивающей стабильную инсерцию в геном растительной клетки и наследование в поколениях.

Нами был использован лидерный (с 1 по 68 пн) генетический элемент ВТМ Ω (омега) 5' НТО ВТМ для создания растительной продукционной системы для синтеза антигенного белка папилломавируса высокоонкогенного типа HPV16 L1. Ген *hpv16 L1* помещали под контроль промотора р35S вируса мозаики цветной капусты и последовательности омега лидера (трансляционного энхансера) вируса мозаики табака (Ω 5'НТО ВТМ) (рис. 1). Последовательность Ω 5'НТО ВТМ состоит из 68 пн: GUAUUUUACAACAUAUACCAACAACAACAACAACAACAACAACAUAUACAUAUA CUAUUUACAUAUACA [Agalarov et al., 2011]. Омега лидер Ω 5'НТО ВТМ является

высокоэффективным усилителем (энхансером) трансляции вследствие уникальности своей структуры, отличающейся следующими особенностями: 1 – центральная (коровая) часть состоит из 11 повторов цитидиловых и адениловых остатков САА, составляющих примерно половину всей последовательности лидера; 2 – повторяющиеся САА остатки формируют стабильную тройную спираль, отличающуюся от канонического спаривания по Уотсону и Крику, так как в ней почти отсутствуют гуаниловые остатки, а вместо этого С:А и А:А связаны одной водородной связью; 3 – лидерная последовательность с помощью тройной спирали и АУ-обогащенной 3'концевой части может связываться с 80S и 40S рибосомами и усиливать трансляцию. Омега лидер ВТМ способен усиливать трансляцию с гомологичных или гетерологичных РНК в клетках различного типа (в том числе, как животных, так и растительных), а также в бесклеточных системах [Agalarov et al., 2011]. Исходя из структуры неканонической спирали с САА повторами можно предполагать, что таким образом создается эффект подавления замолкания вирусной РНК ВТМ, так как РНКазы Dicer (или AGO и др.) не способна разрезать омега последовательность ввиду отсутствия соответствующих сайтов рестрикции, а сам омега лидер представляет собой антисайленсерный элемент. К тому же, других подобных регуляторных элементов у РНК ВТМ нет, хотя, как известно [Hao et al., 2011], многие РНК+вирусы снабжены последовательностями белков антисайленсеров, функцией которых является сохранение популяции РНК. Омега лидер, как реликтовый генетический элемент [Agalarov et al., 2011], по-видимому, в природе еще представляет собой праймер для синтеза ДНК по копии РНК, подобно РНК I и РНК II в плаزمиде Col E2 *E.coli* при регуляции репликации и инициации синтеза ДНК, хорошо известным в литературе [Sugiyama, Itoh, 1993]. В ранних работах [Goelet et al., 1982] САА обогащенные последовательности омега лидера были успешно использованы как праймеры в синтезе амплификатов ДНК на первоначальных этапах секвенирования ВТМ.

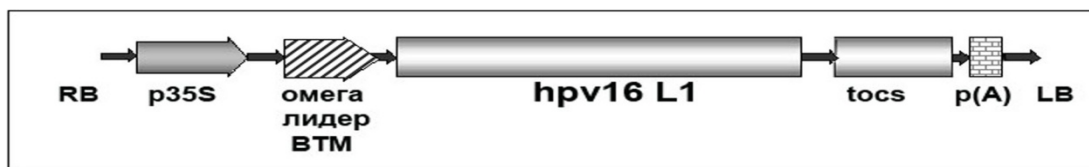


Рис. 1. Схема генетической конструкции рVINHPV16 L1 Ω 5'НТО ВТМ. RB и LB - правая и левая пограничные последовательности гДНК *A. tumefaciens* EHA105, p35S - промотор 35S РНК вируса CaMV, Ω 5'НТО ВТМ - Ω лидер в 5' нетранслируемой области ВТМ, *hpv16 L1* - ген, кодирующий основной белок L1 оболочки папилломавируса человека высокоонкогенного типа 16, *tocs* - терминатор гена октопиринсинтазы *A. tumefaciens*, поли(А) сигнал - сигнал полиаденилирования мРНК.

Генетическую конструкцию рVINHPV16 L1 помещали в *A. tumefaciens* EHA105 и трансформировали плоды томата уколом суспензии *A. tumefaciens* в растворе 1 мг/мл ацетосирингона в 5% глюкозе. Для трансформации плоды выдерживали при 6-8 °С в течение 15-20 суток в темноте. Препараты общей РНК из трансформированных плодов томата получали с помощью набора Triagent (MolBiol. Scientific Research, США). При изготовлении зонда для нозерн-дот-блот-гибридизации использовали плазмиду рUC57 HPV16 L1 Ω 5' НТО ВТМ, клонируемую в *E.coli* DH5α, и набор DIG DNA Labeling and Detection Kit (Roche Diagnostics, США).

На рис. 2 представлена нозерн-дот-блот-гибридизация РНК из экстрактов плодов трансгенного томата, нанесенная по 5 мкл в пятно на мембрану Nucleobond N+, с зондом DIG-11-dUTP рUC57 HPV16 L1 Ω 5' НТО ВТМ. Можно видеть, что в плодах трансгенного по гену *hpv16 L1* томата присутствует РНК в достаточных количествах

для гибридизации с зондом DIG-11-dUTP pUC57 HPV16 L1 Ω 5' НТО ВТМ. В образцах контрольных томатов такой гибридизации не обнаружили.



Рис. 2. Присутствие РНК HPV16 L1 Ω 5' НТО ВТМ в экстрактах общей РНК из трансгенных плодов томата. Первичные антитела - моноклональные антитела к HPV16 L1 (Santa Cruz Biotechnology, США), вторичные антитела - анти-DIG-POL (Roche Diagnostics, США), субстрат - 3',3',5',5'-тетраметилбензидин (ТМБ). Контроль – нетрансформированные плоды.

Электрофоретический анализ буферных экстрактов лиофильно высушенных плодов трансгенного томата выявил наличие 1 полосы, совпадающей по подвижности с маркером белка с молекулярной массой 55 кДа (рис. 3). При этом, судя по плотности окрашивания пятен, количество стандарта HPV16 L1 в 2,5 мкг в пятно (рис. 3, 1), нанесенное на пластинки PhastGel Native Buffer 4-15 % (Amersham, UK), значительно уступало по содержанию антигенного белка HPV16 L1 в экстрактах плодов томата (рис. 3, 2-5).

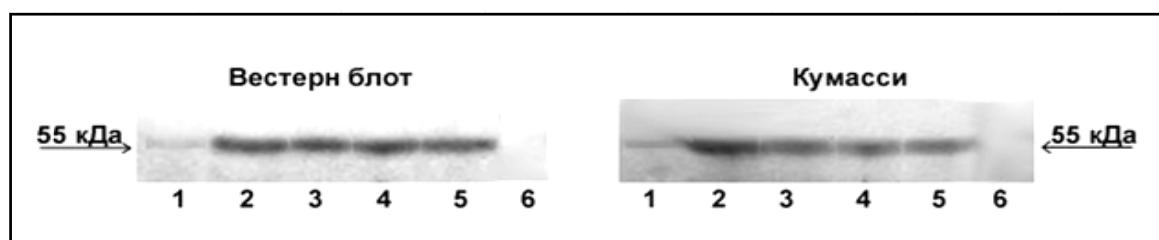


Рис. 3. Хроматографическое разделение экстрактов плодов томата после генетической трансформации суспензией *A. tumefaciens* ЕНА105 с рVINHPV16 L1 Ω 5' НТО ВТМ в течение 15 суток (справа) и вестерн-блот-гибридизация по данной электрофореграмме (слева). 1 - 2,5 мкг стандартного белка HPV16 L1 (Genway Bio, США), 2, 3, 4 и 5 - 0,5 мкл экстрактов лиофильно высушенных плодов томата с HPV16 L1 Ω 5'НТО ВТМ, 6 - экстракт из нетрансформированных плодов. Указана молекулярная масса HPV16 L1 в 55 кДа. Для электрофореза использовали прибор Phastsystem и пластинки PhastGel (Amersham, UK) с градиентом ПААГ 4-15% в нативном буфере, которые проявляли по Кумасси. Для вестерн-блоттинга пластинки инкубировали с первичными антителами к HPV16 L1 (Santa Cruz Biotechnology, США), обрабатывали вторичными антителами с привитой пероксидазой, в качестве субстратов использовали ортофенилендиамин (ОФД) и ТМБ в последовательной обработке.

Количественное определение содержания HPV16 L1 проводили с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) в буферных экстрактах лиофильно высушенных трансгенных плодов томата (рис. 4), содержание общего растворимого белка (ОРБ) рассчитывали по Брэдфорд. Как можно видеть на рис. 4, содержание антигенного белка HPV16 L1 было достаточно велико во всех образцах высушенных плодов томата и значительно превосходило уровень 400 нг стандартного раствора HPV16 L1 (GenWayBio, США). Количество HPV16 L1 составило 2330 нг /мг ОРБ.

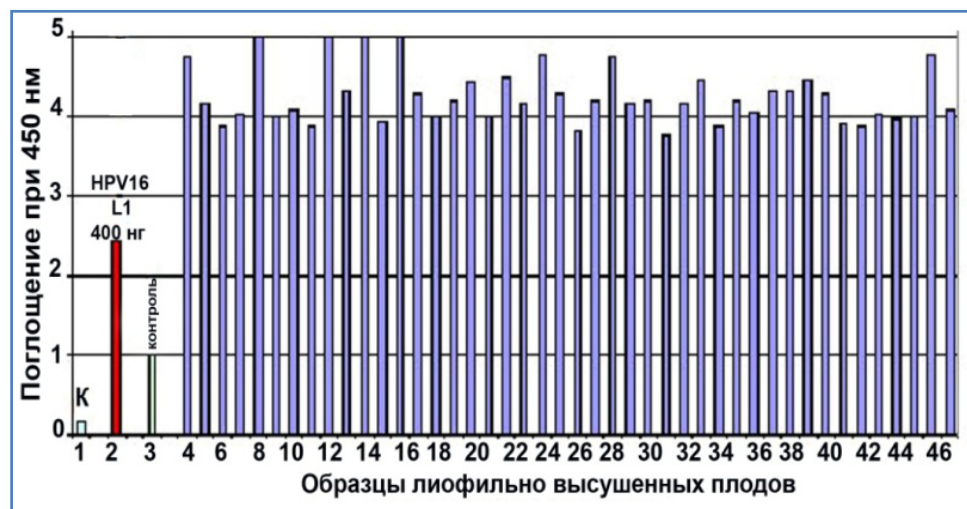


Рис. 4. ИФА содержания антигенного белка HPV16 L1 в экстрактах плодов трансгенного по гену *hvp16* L1 томата после трансформации суспензией *A. tumefaciens* ЕНА105 с рVINHPV16 L1 Ω 5'НТО ВТМ в течение 15 суток. К - отрицательный контроль, 2 - 400 нг стандарта HPV16 L1, 3 - контроль, нетрансформированные плоды, 4-47 - экстракты лиофильно высушенных плодов трансгенного томата.

Использование омега лидера ВТМ позволило нам увеличить выход антигенного белка примерно на 1,5-2 порядка по сравнению с нашими работами, в которых омега лидер не был включен в генетическую конструкцию [Salyaev et al., 2009]. С другой стороны, было получено поколение T₁, что может дать возможность получения стабильно экспрессирующих антигенный белок L1 в трансгенных по гену *hvp16* L1 растениях томата.

Второй путь интенсификации синтеза антигенного белка HPV16 L1 включал создание генетической конструкции с RdRP CMV (РНК2а репликазой вируса мозаики огурца), в состав которой входила последовательность белка РНК2b, который известен как: эффективный антисайленсер [Hao et al., 2011]. В этом случае продукция антигенного белка HPV16 L1 достигала 200000 нг/мг ОРБ. Но это была транзистная трансформация, и семена этих трансформированных плодов не давали всходов. Поэтому наследование в поколениях при участии RdRP элементов невозможно.

Таким образом, использование вирусных регуляторных элементов может быть перспективным для интенсификации синтеза гетерологичных белков в растительных экспрессионных системах.

Литература

Agalarov S.A., Sogorin E.A., Shirokikh N.E., Spirin A.S. In sight into structural organization of the omega leader of TMV RNA: the role of various regions of the sequence in the formation of a compact structure of the omega RNA // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2011. – V. 404, No. 1. – P. 250–264.

Goelet P., Lomonosoff G.P., Butler P.J.C., Akam M.E., Gait M.J., Karn J. Nucleotide sequence of tobacco mosaic virus RNA // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1982. – V. 79. – P. 5818–5822.

Hao X., Lu A., Sokal N., Bhagwat B., Leung E., Mao R., Reade R., Wu Y., Rochon D'A., Xiang Y. *Cucumber necrosis virus* p20 is a viral suppressor of RNA silencing // Virus Research. – 2011. – V. 155. – P. 423–432.

Salyaev R.K., Rekoslavskaya N.I., Stolbikov A.S., Hammond R.W., Shchelkunov S.N. Retention of the ability to synthesize HIV-1 and HBV antigens in generations of tomato plants transgenic for the TBI-HBS gene // Doklady Biochemistry Biophysics. – 2009. – V. 425, No. 1. – P. 120–123.

Sugiyama T., Itoh T. Control of ColE2 DNA replication: *in vitro* binding of the antisense RNA to the Rep mRNA // Nucleic Acid Res. – 1993. – V. 21, No. 25. – P. 5972–5977.

ABOUT THE METHODS OF THE INTENSIFICATION OF THE SYNTHESIS OF ANTIGENIC PROTEINS WITH USING PLANT VIRUS REGULATORY ELEMENTS AT THE DEVELOPMENT OF INNOVATIVE VACCINES ON THE BASE OF PLANT EXPRESSION SYSTEMS

N.I. Rekoslavskaya^{1,2}, R.K. Salyaev¹, A.S. Stolbikov¹

¹Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, rekoslavskaya@sifibr.irk.ru

²Irkutsk Scientific Center of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia

Abstract. To enhance the synthesis of antigenic protein HPV16 L1 of high-risk oncogenic type papillomavirus 16, the plant expression synthesis was used on the base of transgenic tomato fruit. To create stable transformation, the genetic construct pBINHPV16 L1 Ω 5'UTR TMV was used that provided the yield of HPV16 L1 up to 2330 ng per 1 mg of total soluble protein (TSP). For transient expression, the genetic construct pBIN p35S RdRP CMV (RNA 2 a,b) HPV16 L1 was developed that included the antisilencing protein 2b. In this case the yield of antigenic protein HPV16 L1 was risen to 200000 ng per mg TSP.

Keywords: *high-risk oncogenic type 16 of papillomavirus, HPV16 L1, omega leader TMV, RdRP CMV*