

На правах рукописи

Абдеева Инна Александровна

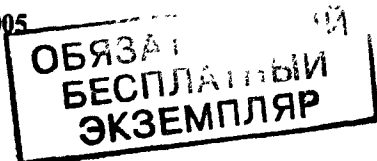
**Изучение экспрессии синтетических генов
спидроина и стабильности их продуктов в
растениях**

03.00.15 - Генетика

АВТОРЕФЕРАТ ДИССЕРТАЦИИ

**на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва - 2005



Работа выполнена в лаборатории функциональной геномики Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН.

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

доктор биологических наук, профессор Элеонора Суреновна Пирузян

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

член-корреспондент РАН,
доктор биологических наук, профессор
кандидат биологических наук

Ванюшин Борис Федорович
Хадеева Наталья Васильевна

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (ИФР РАН).

Защита состоится " _____ " _____ 2005г. в _____ часов на заседании
Диссертационного совета Д002.214.01. при Институте общей генетики им.
Н.И. Вавилова РАН по адресу: 119991, Москва, ул. Губкина, д. 3.
Факс: (095) 132-89-62.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института общей генетики им.
Н.И. Вавилова РАН, по адресу: 119991, Москва, ул. Губкина, д. 3.

Автореферат разослан " _____ " _____ 2005 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
кандидат биологических наук

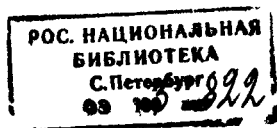
Г.Н. Полухина

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы диссертационной работы. К настоящему времени описано около 34000 видов пауков, каждый из которых способен производить несколько различных нитей паутины, которые образуют паутиный шелк. Лучшие всех изучены каркасные нити шелка паутины, которые образованы двумя белками – спидроном 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. Наличие большого количества повторов в составе генов белков паутины обуславливают структуры этих белков, состоящих из повторяющихся пептидных мотивов (модулей), в которых полиаланиновые блоки чередуются 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.

Благодаря своим структурным особенностям, белки каркасной нити являются удобными моделями для изучения взаимосвязи между структурой и функциями фибриллярных белков, а также представляют собой уникальный биоматериал, сочетающий удивительную прочность и эластичность. 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 и выявлена удивительная корреляция между качественным составом модулей каждого белка и его физическими свойствами - эластичностью и/или прочностью. Таким образом, зная последовательности исходных модулей и следя за изменениями механо-химических свойств соответствующих фибрилл, можно моделировать структурно-функциональные взаимоотношения белков этого типа, а также разрабатывать искусственные белки – аналоги белков паутины с заранее заданными свойствами и создавать на их основе материалы с различным сочетанием свойств прочности и эластичности



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 генов. 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 преждевременной терминации трансляции, клонированные гены были нестабильны, вследствие своей периодической природы. Несколько лучшие показатели были достигнуты в случае использования дрожжей *Pichia pastoris*. Однако в этом случае успех ограничивала проблема дорогостоящих ферментаций и сложной процедуры выделения искомым белков из клеток-продуцентов. В связи с вышеизложенным, 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 протяженные 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 трансформации, 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.

Цель исследования: изучить возможность использования растений в качестве систем экспрессии синтетических генов, кодирующих рекомбинантные аналоги белков паутины.

Исходя из цели работы, были поставлены следующие **задачи:**

1. Провести сравнительный анализ нуклеотидной последовательности синтетического гена, кодирующего аналоги белка спидроина 1, и его аминокислотной последовательности. Для этого:
 - определить GC-содержание в нуклеотидных последовательностях кДНК спидроина 1, синтетического гена 1/3, который был выбран нами для исследований, и генов некоторых видов растений;

- провести сравнительный анализ частоты использования кодонов синтетического гена спидроина 1 в растениях табака и растениях картофеля, используемых нами в работе;
- провести анализ транскрипта синтетического гена спидроина 1 на наличие областей, которые могут быть узнаны растительными клетками как интроны;
- провести сравнительный анализ первичной аминокислотной последовательности и состава белкового продукта синтетического гена спидроина 1 и кДНК природного гена спидроина 1.

2. Изучить экспрессию синтетических генов – аналогов генов белка шелка паутины (спидроинов) в модельных растениях табака. Для этого:

- сконструировать растительные экспрессионные вектора, в которых последовательности синтетических генов аналогов белка каркасной нити паутины спидроина 1, содержащих различное число мономеров и слитых в одной рамке считывания с последовательностью репортерного гена, находятся под контролем различных промоторов;
- получить и провести молекулярно-биологический анализ трансгенных растений табака, экспрессирующих гибридные гены спидроина 1.

3. Изучить экспрессию синтетических генов – аналогов генов белка шелка паутины (спидроинов) в растениях картофеля. Для этого:

- получить и провести молекулярно-биологический анализ первичных трансформантов растений картофеля, экспрессирующих гибридные гены спидроина1;
- провести сравнительное изучение экспрессии гибридных генов спидроина 1 в различных органах первичных трансформантов картофеля (листьях и клубнях);
- определить уровень накопления гибридных белков спидроина 1 в трансгенных растениях картофеля в период вегетации и стабильность этих белков при хранении клубней трансгенных растений картофеля.

Научная новизна работы. Показано, что геном растений способен поддерживать в своем составе синтетические гены белков паутины, состоящие из повторяющихся последовательностей и осуществлять эффективную экспрессию этих генов с образованием полноразмерных белковых продуктов. Впервые показано, что GC-богатая гетерологичная последовательность гибридного гена спидроина 1 в геноме трансгенных растений табака и картофеля поддерживается в активном состоянии. Продемонстрировано, что растения являются подходящими продуцентами белков шелка паутины. Присутствие лихеназы в составе гибридных белков облегчает проведение отбора и анализа экспрессии таких белков в трансгенных растениях, что является важным при проведении поисковых исследований

Апробация результатов работы Результаты работы были представлены на 11th International Congress on “Molecular Plant-Microbe Interactions” (С-Петербург, Россия, 2003); Международной научной конференции “Молекулярная генетика, геномика и биотехнология” (Минск, Беларусь, 2004); III съезде ВОГиС “Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития” (Москва, Россия, 2004); Международной конференции “Клеточные ядра и пластиды растений: биохимия и биотехнология” (Minsk, Belarus, 2004); Международной конференции «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии»

(Ялта-Гурзуф, 2005); 8th Iranian Congress of Biochemistry and First International Congress of Biochemistry & Molecular Biology (Tehran, Iran, 2005); на заседании научного семинара Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН и на семинарах лаборатории функциональной геномики Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, а также выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на _____ страницах машинописного текста, включая 15 таблиц и 30 рисунков. Список цитируемых литературных источников включает 118 наименований.

2. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ ПО ГЛАВАМ

ГЛАВА 1. Обзор литературы. В первом разделе приводятся литературные данные о составе, структуре и свойствах белков паутины. Описывается механизм прядения нити шелка насекомыми, в том числе пауками. Рассматриваются подходы, используемые для искусственного прядения нитей паутины, перспективы создания и применения биоматериалов на основе белков шелка паутины. Во втором разделе в сравнительном аспекте представлены литературные данные по экспрессии синтетических и природных генов спидроинов в различных системах экспрессии. В третьем разделе суммированы литературные данные о свойствах лихеназы *Clostridium thermocellum*, как нового транскрипционного и трансляционного репортера для прикладных и фундаментальных исследований.

ГЛАВА 2. Материалы и методы исследования.

В работе использованы штаммы: *E. coli*: XL1-Blue ("Stratagene", США): *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacM*⁺ZAM15 Tn10(Tet^R)]; BL21(DE3) ("Novagene", США) F⁻ *dcm ompT hsdS*(r_B- m_B-) *gal* λ (DE3); *Agrobacterium tumefaciens* AGLO (*recA::bla* pTiBo542 Δ T, Мор⁺, Cb^R). В работе использованы стандартные процедуры молекулярного клонирования, которые проводились согласно методическому руководству Sambrook et al. (1989). **Растения.** Использовали растения картофеля *Solanum tuberosum* сортов «Десница», «Жуковский ранний» и «Юбилей Жукова», а также растения табака *Nicotiana tabacum* cv. Samsun (n). **Агробактериальную трансформацию растений картофеля** проводили по разработанному нами методу на клубневых или стеблевых эксплантах. **Агробактериальную трансформацию растений табака** проводили методом листовых дисков. Отбор трансформантов и дальнейшее их поддержание проводили на среде МС с добавлением 50-100 мкг/мл канамицинсульфата. **Молекулярно-биологический анализ первичных трансформантов растений** проводили с использованием методов Саузерн-блот гибридизации, Вестерн-блот гибридизации, ПЦР, а также количественных и качественных методов определения активности лихеназы.

Методы определения активности лихеназы. Количественное определение лихеназной активности в бактериальных, дрожжевых и растительных белковых лизатах проводили по методу Miller et al. (1960), модифицированному нами. За

единицу активности принимали количество фермента, образующее 1 мкмоль восстанавливающих сахаров за 1 мин. Зимогаммы получали разделением белков в 10% или в 8-16% ДСН-ПААГ, содержащем субстрат лихенан, с последующим окрашиванием гелей 0,5% раствором Конго красного (Sigma) и отмыванием в 1М NaCl.

Белковые лизаты для определения активности лихеназы получали экстракцией растительных клеток в 50мМ трис-HCl, pH 8,0 в течение 30 минут при 4°C с последующим центрифугированием при 12000g в течение 20 минут для получения осветленных препаратов.

Статистическая обработка данных. Данные в таблицах и на рисунках представляют средние арифметические величины и стандартные ошибки, полученные при обработке результатов 5 независимых экспериментов, если не указано особо.

ГЛАВА 3. Результаты и обсуждение

3.1. Нуклеотидная последовательность синтетического гена спидроина 1 и ее анализ с целью экспрессии в растениях.

В качестве объектов исследования в нашей работе использовались синтетические гены, кодирующие белки – аналоги природного белка каркасной нити паутины - спидроина 1, сконструированные в лаборатории белковой инженерии ФГУП ГосНИИ «Генетика». Структура мономера синтетического гена была разработана на основе кДНК природного гена спидроина 1 паука *Nephila clavipes*, размер сконструированного мономера составляет 405 пар нуклеотидов. В результате процедур молекулярного клонирования были сконструированы синтетические гены, имеющие в своем составе пять, девять и семнадцать повторов мономера гена спидроина 1, которые были обозначены как *1f5*, *1f9* и *1f17*, соответственно.

Эффективность экспрессии гетерологичных генов в клетках–реципиентах зависит от многих факторов, и, прежде всего, от нуклеотидного состава экспрессируемого гена.

Последовательности всех известных генов шелка паутины характеризуются высоким содержанием GC-пар. Мы сравнили GC - состав, характерный для последовательностей кДНК спидроина 1, синтетического гена *1f5*, который был выбран нами для исследований, и генов некоторых видов растений (таблица 1). Как видно из представленных в таблице 1 данных, GC - состав в синтетическом гене *1f5*

значительно выше, чем у генов всех видов растений, включая однодольные. С одной стороны, это может оказать негативное влияние на эффективную экспрессию этого гена в растениях, поскольку известно, что динуклеотиды CG являются мишенями для метилирования. С другой стороны, имеются данные в литературе о том, что CpG-островки из генома человека проявляют устойчивость к метилированию и поддерживаются в геноме растений в активном состоянии. Для того чтобы выяснить, будет ли нуклеотидная последовательность синтетического гена, имеющая высокое содержание GC, поддерживаться либо в активном, либо и в инактивированном состоянии в геноме растений, необходимо получить и проанализировать трансгенные растения, содержащие эти последовательности под контролем различных регуляторных элементов.

Таблица 1. GC - содержание в последовательностях природного и синтетического генов спидроина 1 и генов разных видов растений

Источник нуклеотидной последовательности	GC-содержание, %
кДНК спидроина 1	53,17
Синтетический ген <i>1f5</i>	62,00
<i>Nicotiana tabacum</i>	43,67
<i>Solanum tuberosum</i>	42,45
<i>Arabidopsis thaliana</i>	44,60
<i>Brassica napus</i> var. <i>Napus</i>	45,95
<i>Glycine max</i>	45,85
<i>Medicago sativa</i>	42,82
<i>Triticum aestivum</i>	55,44

Важным условием успешной реализации гетерологичной генетической информации является соответствие частот использования кодонов в последовательности экспрессируемого гена и в генах гетерологичного организма, а также отсутствие в нуклеотидной последовательности чужеродного гена областей, которые могут быть узнаны клеточными компонентами организма - реципиента как интроны. Нуклеотидная последовательность синтетического гена спидроина 1 была проанализирована на соответствие частот использования кодонов этого гена и генов модельных растений с использованием компьютерных программ и баз данных. Проведенный анализ показал, что синтетический ген спидроина не содержит редких

для растений картофеля и табака кодонов. Анализ транскрипта синтетического гена спидроина 1, проведенный нами, выявил отсутствие в его последовательности областей, которые могут быть узнаны растительными клетками как интроны. Для облегчения процедуры отбора растений, экспрессирующих синтетические гены белков шелка паутины, а также для обеспечения возможности быстрого тестирования молекулярных масс их продуктов в растительных белковых экстрактах на ранней стадии получения растений, использовали в качестве трансляционного репортера термостабильную лихеназу.

3.2. Получение трансгенных растений гаплоида табака, экспрессирующих синтетические гены спидроина 1.

Для того чтобы показать принципиальную возможность использовать растения для экспрессии синтетических генов спидроина, нами были выбраны растения табака сорта *Samsun* в качестве модельных. Первоначально были сконструированы гибридные гены, которые содержат последовательности синтетических генов – аналогов генов белка каркасной нити паутины спидроина 1 *N. clavipes*, содержащих различное число повторяющихся мотивов, слитых в рамке считывания с последовательностью репортерного гена лихеназы, под контролем сильного конститутивного промотора 35S РНК вируса мозаики цветной капусты (35S CaMV) и слабого конститутивного промотора из области Т-ДНК *A. tumefaciens* (Tr2'). В результате процедур молекулярного клонирования была получена серия бинарных экспрессионных векторов для трансформации растений, содержащих синтетические гены белков – аналогов спидроина 1 паутины *lf5* и *lf9*, слитые с геном репортерного белка лихеназы, и находящиеся под контролем промоторов, имеющих различную силу - pTr2'-*lf5-licBM2*, pTr2'-*lf9-licBM2*, p35S-*lf5-licBM2* и p35S-*lf9-licBM2* (рис. 1).

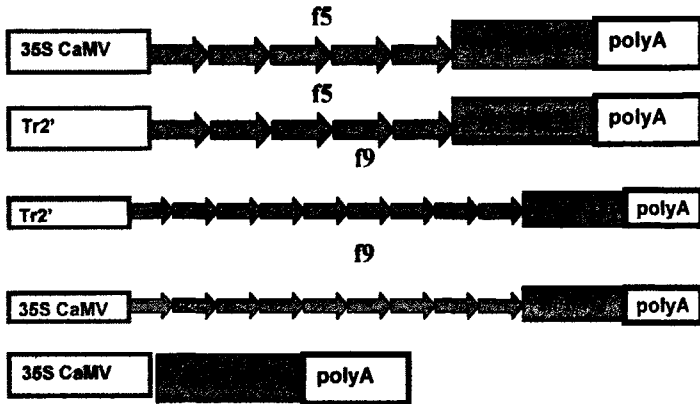


Рисунок 1. Схема кассет экспрессии для трансформации растений табака. 35S CaMV – сильный конститутивный промотор 35S РНК вируса мозаики цветной капусты, Tr2' – слабый конститутивный промотор из области Т – ДНК *Agrobacterium tumefaciens*, f5 и f9 – 5 и 9 повторов гена спидроина 1, *licBM2* – ген, кодирующий репортерный белок лихеназы, poly A – область полиаденилирования.

Растительные экспрессионные вектора были использованы для трансформации растений табака. В результате трансформации растений табака методом листовых дисков было отобрано по 15 независимых первичных трансформантов линий T9 и S5, укоренившихся на среде с канамицином. Отбор первичных трансформантов, экспрессирующих гибридные гены, в состав которых входит репортерный ген лихеназы, проводили с использованием метода определения активности лихеназы. Этот метод позволяет проводить отбор первичных трансформантов, в которых синтезируются гибридные белки, простыми и чувствительными методами, не требующими временных затрат и дорогостоящих реагентов. Для доказательства интеграции последовательностей гибридных генов спидроина в геном растений, проведена гибридизация по Саузерну (рис. 2). Результаты этих экспериментов свидетельствуют о том, что у всех линий трансгенных растений табака произошла встройка в геном одной копии гибридного гена и размер перенесенной последовательности соответствует теоретически рассчитанной: 3500 п.о для растений линии с пятью повторами, и около 4350 п.о. для растений линии с девятью повторами спидроина 1. Полученные результаты

позволяют заключить, что растительный геном способен поддерживать последовательности генов спидроина 1, характеризующихся большим числом повторяющихся элементов.

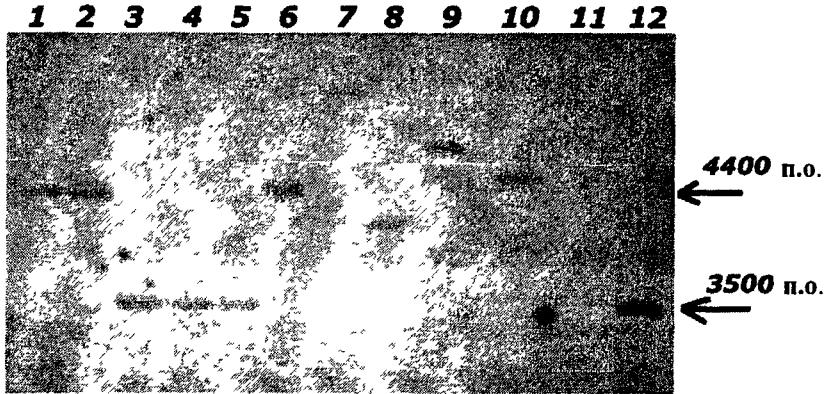


Рисунок 2. Саузерн – гибридизация геномной ДНК контрольного и трансгенных растений табака линий T9 и S5: 1-5 определение размера интегрированных генов; 6-10 определение количества копий генов.

1. – T9₁ (*Hind* III + *Xba*I); 2. – T9₂ (*Hind* III + *Xba*I); 3. – S5₂ (*Hind* III + *Xba*I); 4. – S5₃ (*Hind* III + *Xba*I); 5. – S5₁₀ (*Hind* III + *Xba*I); 6. – T9₁/*Bam*HI; 7. – T9₂/*Bam*HI; 8. – S5₂/*Bam*HI; 9. – S5₃/*Bam*HI; 10. – S5₁₀/*Bam*HI; 11. – контрольное растение; 12. – p35S-*lfs-lhcBM2* (*Hind* III + *Xba*I) (вектор).

Рядом авторов отмечались проблемы экспрессии природных и синтетических генов белков шелка паутины в микроорганизмах и дрожжах, которые связаны с тем, что для эффективной экспрессии белков шелка паутины, содержащих большое число остатков глицина и аланина, у микроорганизмов должен поддерживаться на высоком уровне пул тРНК данных аминокислот. Для оценки эффективности синтеза в растениях табака рекомбинантных белков, характеризующихся высокой молекулярной массой и обладающих необычной структурой и составом, белковые экстракты контрольного и трансгенных растений были проанализированы с помощью метода зимограмм и Вестерн-блот гибридизации (рис.3 и 4).

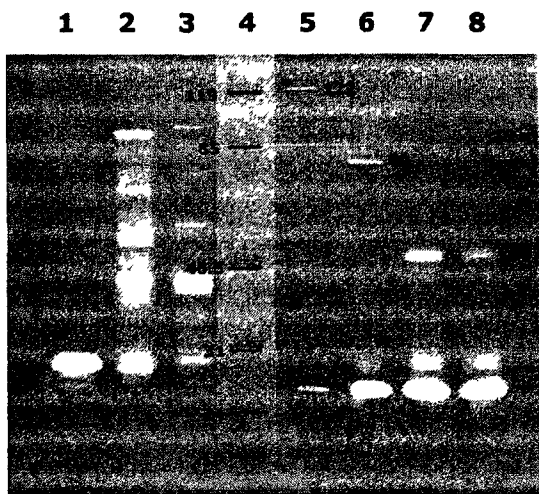


Рисунок 3. Зимограмма белковых экстрактов, полученных из трансгенных растений табака. 1 - GAL-LicBM2; 2 - GAL- GUS-LicBM2; 3 - GAL -LicBM2- GUS; 4 – маркер молекулярных масс (кДа); 5 - T9₂; 6 – S5₁₀; 7, 8 - S5₂ и S5₃.

Из анализа зимограммы (рис. 3) видно, что полосы активности лихеназы соответствуют теоретически рассчитанным молекулярным массам гибридных белков, в состав которых входит лихеназа. Для линии трансгенных растений T9 полоса активности лихеназы соответствует размеру 122 кДа, а для линии S5 – 80 кДа. В качестве контролей мы использовали белковые экстракты из клеток дрожжей, экспрессирующих гибридные белки GUS-LicBM2 и LicBM2-GUS, а также LicBM2.

Для подтверждения того, что гибридные белки содержат последовательности белков – аналогов белков шелка паутины, белковые экстракты трансгенных растений были проанализированы методом Вестерн-блот гибридизации (рис. 4.). На Вестерн - блоте в качестве контроля (рис. 4., дорожка 3) использовали очищенный белковый препарат спидронина 1 с восьмью мономерами, выделенный из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

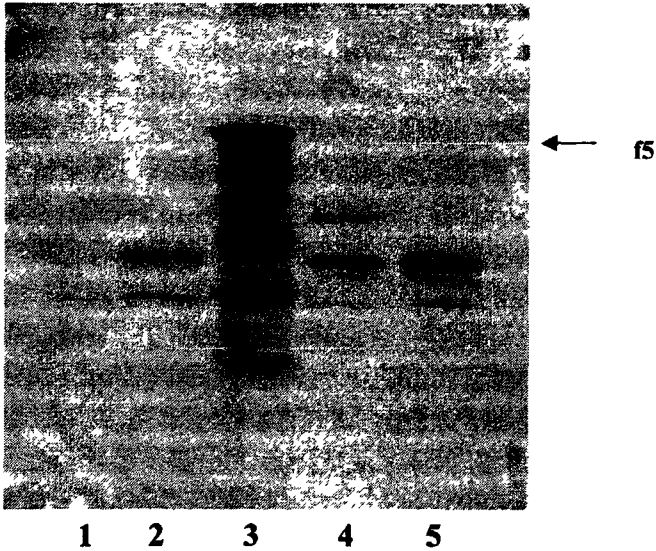


Рисунок 4. Вестерн-блот гибридизация гибридных белков, выделенных из трансгенных растений табака. 1, 2 – белковые экстракты из растений линии T9; 3 – контроль (белок спидроина, выделенный из дрожжей); 4, 5 – белковые экстракты из растений линии S5.

Как видно из результатов Вестерн-блоттинга, полоса, соответствующая полноразмерному гибриднему белку, выявляется лишь в случае линии S5; в случае линии T9 такая полоса не визуализируется, хотя на зимограмме соответствующая полоса хорошо видна (рис. 3.). Это свидетельствует о меньшей чувствительности метода Вестерн-гибридизации по сравнению с методом зимограмм для гибридных белков. Наличие высокомолекулярных полос, как на зимограмме, так и на Вестерн-блоте, свидетельствует в пользу того, что в растительных клетках происходит образование полноценного гибридного белка. Полученные результаты позволяют заключить, что в модельных трансгенных гаплоидных растениях табака происходит эффективный синтез рекомбинантных белков – аналогов белков шелка паутины, имеющих необычный качественный состав и структуру.

Тот факт, что в результате экспрессии гибридных генов происходит образование полноразмерных гибридных белков, состоящих из соответствующего

числа мономеров белка спидроина 1 и репортерного белка лихеназы, позволяет нам по активности лихеназы, пересчитанной на гибридный белок, оценить уровень накопления белков спидроина в трансгенных растениях табака (рис.5). Для сравнения уровня накопления рекомбинантных белков в растениях были взяты трансгенные растения, экспрессирующие лихеназу.

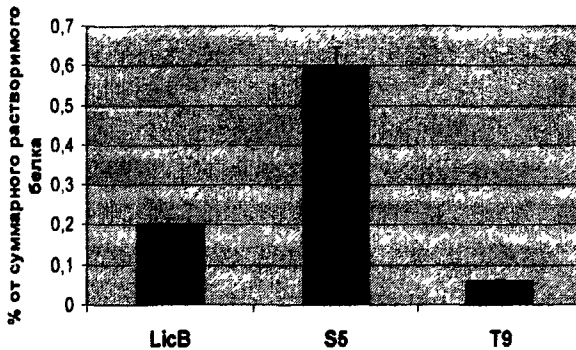


Рисунок 5. Содержание рекомбинантных белков в трансгенных растениях табака. LicB – контрольные трансгенные растения, экспрессирующие ген лихеназы под контролем 35S CaMV промотора; S5 – трансгенные растения табака линии S5; T9 – трансгенные растения табака линии T9.

Как видно из представленных данных, в модельных трансгенных растениях табака происходит эффективный синтез рекомбинантных белков – аналогов белков шелка паутины, имеющих необычный качественный состав и структуру, при этом эффективность экспрессии зависит от регуляторного элемента контролирующего экспрессию гибридных генов. Следует отметить, что трансгенные растения, экспрессирующие гибридные гены *1f5-licBM2* под контролем промотора 35S CaMV, имели более высокий уровень накопления белковых продуктов, по сравнению с трансгенными растениями, экспрессирующими только репортерный ген *licBM2* под контролем того же промотора (рис. 5).

Полученные результаты позволяют заключить, что нуклеотидная последовательность синтетического гена, имеющая высокое содержание GC,

поддерживается в геноме растений в активном состоянии и растения табака способны осуществлять эффективную экспрессию генов, имеющих повторяющиеся мотивы, и синтезировать полноразмерные белковые продукты. Полученные данные также свидетельствуют о том, что растения являются подходящими продуцентами белков шелка паутины.

3.3. Получение и анализ растений картофеля, экспрессирующих синтетические гены спидроина 1.

После того, как нами было показано, что геном модельного гаплоидного растения табака способен поддерживать в своем составе синтетические гены паутины и осуществлять их экспрессию, дальнейшие наши исследования были направлены на выяснение следующих вопросов:

- Изменится ли уровень экспрессии синтетических генов и стабильность их белковых продуктов при переходе от модельных пробирочных растений к сельскохозяйственным культурам?

- Изменятся ли содержания спидроинов в растениях в период вегетации 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 следующим: 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).

В работе по трансформации растений картофеля использовали 3 сорта растений отечественной селекции: «Юбилей Жукова», «Жуковский ранний», «Десница». При получении трансформантов картофеля использовались стеблевые и клубневые экспланты растений и экспрессионные вектора, несущие гибридные гены, которые содержат различное число повторяющихся мотивов синтетического гена,

слитых в рамке считывания с последовательностью репортерного гена лихеназы, под контролем различных регуляторных элементов (рис. 1).

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 лихеназной активности, получен при использовании клубневых эксплантов для всех использованных конструкций (рис. 6). При этом эффективность трансформации при использовании конструкции S9 была на порядок выше, чем таковая при использовании конструкции 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» (данные в автореферате не приводятся)

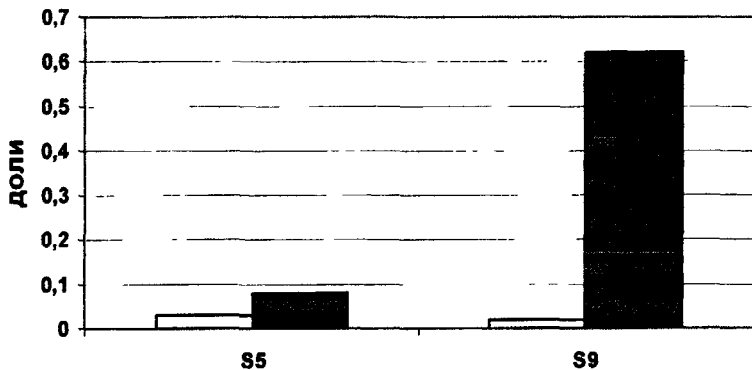


Рисунок 6. Доля первичных трансформантов растений картофеля сорта «Юбилей Жукова», отобранных по лихеназной активности (количество первичных регенерантов, обладающих лихеназной активностью, в пересчете на общее число эксплантов), полученных из клубневых (темные столбцы) и стеблевых эксплантов (светлые столбцы), для линий растений S5 и S9.

На основании полученных результатов можно заключить, что эффективность трансформации зависит как от сорта растений, так и от векторных конструкций, используемых в работе. Следует подчеркнуть, что все трансформанты растений имели морфологию, которая не отличалась от морфологии контрольных растений

Полученные регенеранты растений картофеля всех линий, устойчивые к канамицину, были проанализированы с помощью метода определения активности лихеназы 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 1 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 (данные в автореферате не приводятся). 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. 7) и Вестерн-блот гибридизации (данные в автореферате не приводятся).

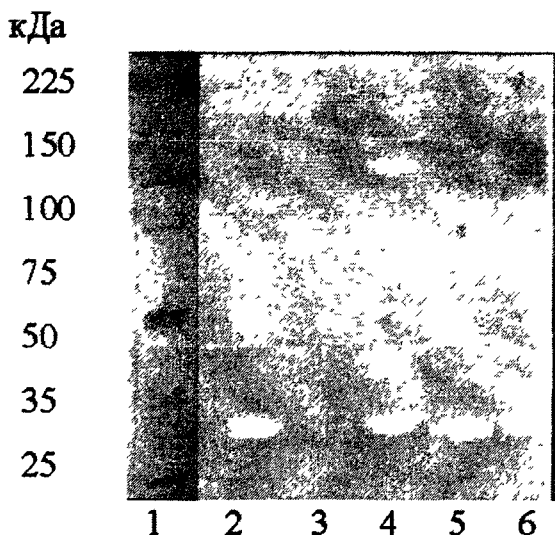


Рисунок 7. Зимограмма белковых экстрактов, полученных из листьев растений картофеля. 1 – маркер молекулярных масс (кДа), 2 – линия контрольных растений LicB ; 3 – растения линии S17; 4 – растения линии S9; 5 – растения линии S5; 6 – растения линии T5.

Методом зимограмм были выявлены полосы активности фермента у первичных трансформантов картофеля (рис. 7), которые соответствовали теоретически рассчитанным молекулярным массам гибридных белков (80 кДа - для гибридного белка, содержащего пять повторов спидроина 1, слитого с лихеназой, и 122 кДа – для гибридного белка, содержащего девять повторов спидроина 1, слитого с лихеназой). Соответствие молекулярных масс выявляемых гибридных белков теоретически ожидаемым свидетельствует о том, что геном растений картофеля способен стабильно поддерживать в своем составе гены спидроина 1 и в растениях картофеля происходит синтез рекомбинантных белков – спидроина 1.

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

красного. В микроклубнях всех линий трансгенных растений была выявлена активность лихеназы (данные в автореферате 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 (данные в автореферате не приводятся).

В растительном материале, полученном из клубней и листьев контрольного и трансгенных растений, было определено содержание гибридных белков спидроина 1 (рис. 8). Из представленных результатов видно, что содержание гибридных белков спидроина 1 в клубнях трансгенных растений ниже, чем в листьях этих же растений

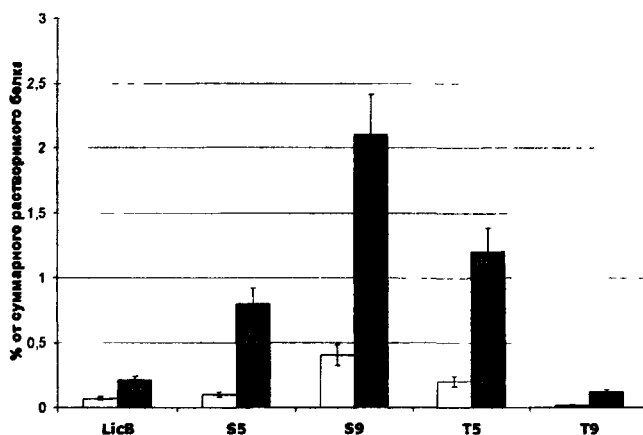
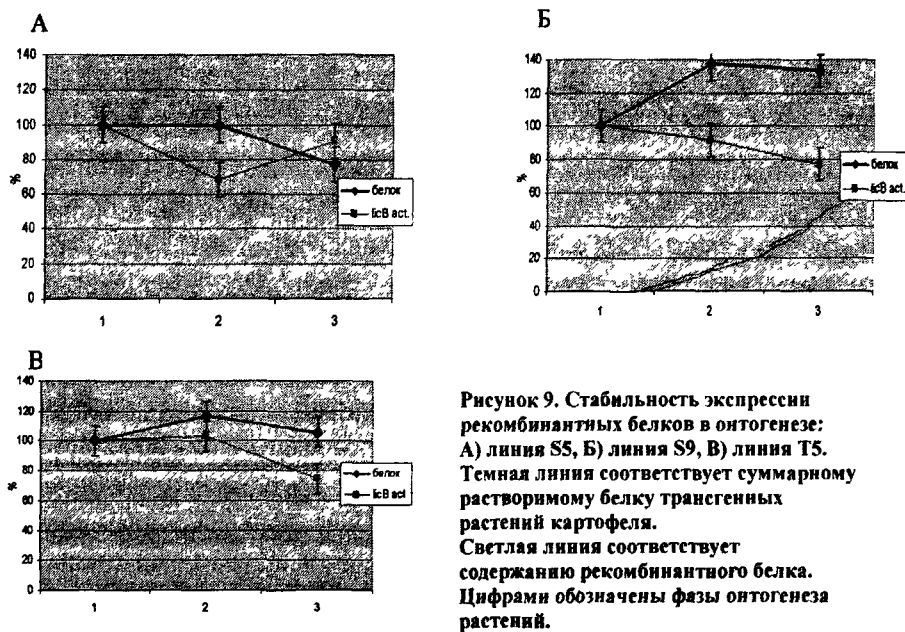


Рисунок 8. Содержание рекомбинантных белков в клубнях и листьях трансгенных растений картофеля, выращенных в грунте. Светлые столбики отражают содержание белка в клубнях, а темные столбики – в листьях.

Для получения ответа на вопрос относительно содержания спидроинов в растениях картофеля в период вегетации были определены количество суммарного растворимого белка и активность лихеназы на трех фазах развития растений. На рисунке 9 представлены сравнительные данные по количеству суммарного растворимого белка растений и активности лихеназы в листовой ткани, в



зависимости от фазы развития растений картофеля.

Как видно из представленных данных (рис. 9), содержание гибридных белков в листовой ткани трансгенных растений картофеля изменяется незначительно на всем протяжении вегетации растений картофеля. С использованием метода зимограмм были определены молекулярные массы гибридных белков, синтезирующихся на различных стадиях развития трансгенных растений картофеля. Следует отметить, что были выявлены полосы активности лихеназы, соответствующие полноразмерным гибридным белкам для всех линий растений (данные в автореферате не приводятся).

В конце периода вегетации у контрольных и трансгенных растений, выращенных в грунте, были собраны и проанализированы клубни.

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 месяцев хранения клубней при +4°C (рис. 10). Как видно из представленных данных, содержание гибридных белков в клубнях трансгенных растений картофеля в период хранения достоверно не изменяется (рис. 10). Эти данные свидетельствуют о преимуществах использования растений в качестве биофабрик для наработки гетерологичных белков, а именно, способности их длительного хранения.

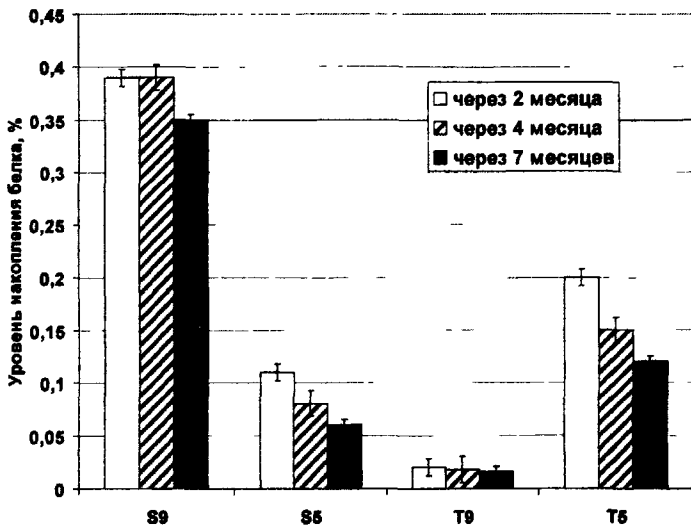


Рисунок 10. Содержание гибридных белков в клубнях трансгенных растений картофеля в процессе хранения.

Таким образом, нами показано, что при переходе от модельных пробирочных растений к реальным сельскохозяйственным культурам сохраняется экспрессия гибридных генов спидроина 1, имеющих повторяющиеся мотивы и высокое содержание GC-пар.

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 фазы онтогенеза и длительности хранения растительного материала.

Заключение

Проведенный анализ нуклеотидной последовательности синтетического гена спидроина 1 показал, что синтетический ген не содержит редких для растений табака и картофеля кодонов, однако, имеет высокое содержание GC-пар (62%). Транскрипт синтетического гена спидроина 1 не содержит последовательностей, которые могут быть узнаны растительными клетками как интроны, при этом первичная аминокислотная последовательность и состав белкового продукта синтетического гена схожи с таковыми для природного белка спидроина 1. Таким образом, из анализа нуклеотидной последовательности синтетического гена можно заключить, что исследуемый нами ген не требует модификаций для экспрессии в растениях.

Изучение экспрессии гибридного гена, содержащего различное число мономеров и последовательность репортерного гена термостабильной лихеназы, показало, что растения табака способны осуществлять экспрессию генов спидроина 1, имеющих повторяющиеся мотивы и высокое содержание GC пар, и синтезировать соответствующие белковые продукты. Соответствие размеров выявляемых гибридных генов теоретически ожидаемым свидетельствует о том, что геном растений способен поддерживать в своем составе синтетические гены белков паутины, состоящие из повторяющихся последовательностей.

Наилучший выход регенерантов картофеля наблюдается при использовании сорта «Юбилей Жукова». Более высокий процент первичных трансформантов растений картофеля, отобранных по лихеназной активности, получен при использовании клубневых эксплантов, по сравнению с таковым для стеблевых эксплантов. При этом эффективность трансформации зависит от векторной конструкции, которой проводят трансформацию. При использовании конструкции с

девятью повторами спидроина выход регенерантов был на порядок выше, чем при использовании конструкции с пятью повторами спидроина.

Изучение экспрессии гибридного гена, содержащего различное число мономеров и последовательность репортерного гена термостабильной лихеназы, показало, что растения картофеля способны осуществлять эффективный синтез гибридных белков спидроина 1, при этом содержание гибридных белков спидроина 1 в растениях в период вегетации и стабильность этих белков при хранении сельскохозяйственных культур отмечена на высоком уровне, что важно при использовании растений в качестве биофабрик для наработки гетерологичных белков, имеющих важное хозяйственное значение.

Термостабильная лихеназа использована в качестве удобного репортера для отбора трансгенных организмов, определения молекулярной массы гибридных белков и уровня их экспрессии.

Выводы

1. Анализ нуклеотидной последовательности синтетического гена спидроина 1 показал, что синтетический ген не требует модификаций для экспрессии в растениях, поскольку его последовательность не содержит редких кодонов для растений табака и картофеля и транскрипт синтетического гена спидроина 1 не содержит последовательностей, которые могут быть узнаны растительными клетками как интроны, при этом первичная аминокислотная последовательность и состав белкового продукта синтетического гена спидроина 1 схожи с таковыми для природного белка спидроина 1.
2. Геном растений способен поддерживать в своем составе синтетические гены белков паутины, состоящие из повторяющихся последовательностей и имеющие высокое содержание GC пар, и осуществлять синтез соответствующих белковых продуктов.
3. GC-богатая гетерологичная последовательность гибридного гена спидроина 1 поддерживается в геноме трансгенных растений табака и картофеля в активном состоянии.
4. Стратегия, основанная на конструировании и экспрессии гибридных белков, в состав которых входит репортерный белок лихеназа, облегчает отбор и анализ экспрессии гибридных белков в трансгенных растениях, и является обоснованной и адекватной при проведении поисковых исследований.
5. 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 фазы онтогенеза и длительности хранения растительного материала

ПУБЛИКАЦИИ ПО МАТЕРИАЛАМ РАБОТЫ:

- 1 Piruzian E S , Goldenkova I V . Musiychuk K A , Abdeev R M and Sazonova I.A Analysis of physiological processes in plants by means of expression of introduced bacterial genes - Biology of Plant Microbe Interactions/ Edited by Igor Tikhonovich, Ben Lugtenberg and Nikolai Provorov. St.-Petersburg, 2003, vol 4, 533-536 p.
- 2 Абдеева И.А., Мусийчук К.А., Абдеев Р.М., Голденкова И.В., Пирузян Э.С. Конструирование трансгенных растений табака, экспрессирующих синтетические гены, кодирующие белки-аналоги белков каркасной нити паутины *Nephila clavipes* // Сборник материалов Международной конференции «Клеточные ядра и пластиды растений биохимия и биотехнология», Минск, 26-28 мая, 2004, С.135-140
- 3 Э.С. Пирузян, Р.М. Абдеев, И.В. Голденкова, К.А. Мусийчук, Р.А. Комахин, И.А. Абдеева Конструирование трансгенных растений как методология функциональной геномики Материалы Международной научной конференции «Молекулярная генетика, геномика и биотехнология» Минск. 2004. с. 103-104.
- 4 И.В. Голденкова, Р.М. Абдеев, Р.А. Комахин, К.А. Мусийчук, И.А. Абдеева Экспериментальные модели для создания трансгенных растений, устойчивых к стрессовым воздействиям и перспективных для биотехнологии В сборнике материалов Международной конференции «Клеточные ядра и пластиды: биохимия и биотехнология». Минск. 2004 с. 94-98.
5. И.А. Абдеева, Р.А. Комахин, Н.Ю. Ковальская, Р.М. Абдеев, И.В. Голденкова, Э.С. Пирузян. Дизайн систем экспрессии для биотехнологии растений. В сборнике материалов Международной конференции «Клеточные ядра и пластиды: биохимия и биотехнология» Минск. 2004 с. 128-134.
- 6 Р.А. Комахин, И.А. Абдеева, Н.Ю. Ковальская, И.В. Голденкова Термостабильная лихеназа – удобная репортерная система для разработки методов трансформации различных видов растений В сборнике материалов Международной конференции «Клеточные ядра и пластиды: биохимия и биотехнология» Минск 2004 с 145-150
- 7 Комахин Р.А., Абдеева И.А., Салехи Джузани Г.Р., Голденкова И.В., Жученко А.А. Термостабильная лихеназа как трансляционный репортер // Генетика, 2005, т 41, № 1, С 1-10.
8. Волохина И.В., Сазонова И.А., Великов В.А., Чумаков М.И. Выделение, очистка и идентификация белка вирулентности VirE2 из *Agrobacterium tumefaciens* // Микробиология, 2005, т. 74, № 1, С. 92-98.
- 9 Абдеева И.А., Комахин Р.А., Мусийчук К.А., Голденкова И.В. Разработка дрожжевой векторной системы для изучения регуляторных функций не кодирующих элементов генома эукариот // Молекулярная биология, 2005, т 39, № 2, С. 1-7.
10. Abdeeva I.A., Goldenkova I V , Abdeev R.M , Salehi Jozani G.R., Bogush V.G Expression of synthetic genes encoding analogues spider silk proteins in plants // Iranian Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2005, v. 1., № 1, P. 99.
11. Абдеева И.А., Сидорук К.В., Богущ В.Г., Голденкова И.В., Дебабов В.Г., Пирузян Э.С. Эукариотические системы экспрессии синтетических генов, кодирующих аналоги белков шелка паутины, и их применение в медицине // Сборник материалов XIII Международной конференции и дискуссионного научного клуба «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии», Украина, Крым, Ялта, Гурзуф, 31 мая -9 июня, 2005, С.162-165.
- 12 Eleonora S Pyrouzian, I.V Goldenkova, K A Musiychuk, R M Abdeev, R A Komakhin, I.A. Abdeeva, S A Bruskin Transgenic plants for phytoremediation and novel technologies - Problems of Genetic Safety: Scientific Innovations and Public Understanding 2 nd International Workshop 18-20 February 2004, Moscow Editors: M Sokolova, S Evans, V - M, DDEC Studio, 2005, P 26-28

Автор выражает искреннюю и глубокую признательность своему научному руководителю, профессору, доктору биологических наук **Пирузян Элеоноре Суреновне** за поддержку, внимание и неоценимую помощь в ходе выполнения научной работы. Автор искренне благодарен д.б.н. **Голденковой Ирине Васильевне**, к.б.н. **Комахину Роману Александровичу** за неоценимую помощь в работе и дискуссии, в ходе которых рождались интересные идеи, и за участие в обсуждении полученных результатов; аспиранту **Брускину Сергею Александровичу** за отзывчивость, дружескую поддержку и помощь в работе; к.б.н. **Богушу Владимиру Григорьевичу** и к.б.н. **Сидоруку Константину** за предоставленные для работы синтетические гены и участие в обсуждении результатов; к.б.н. **Юрьевой Наталье Олеговне** за помощь в получении трансгенных растений картофеля; всем сотрудникам, аспирантам, стажерам и студентам лаборатории функциональной геномики Института общей генетики им. Н.И.Вавилова РАН: к.б.н. **Волковой Ларисе Васильевне**, к.б.н. **Ковальской Наталье Юрьевне**, **Денису Сотченкову**, **Андрею Марахонову**, **Христине Шимшилашвили**, **Марии Мокряковой**, а также всем моим добрым друзьям и коллегам. Моя огромная благодарность моему мужу к.б.н. **Абдееву Рустаму Муратовичу** за помощь, любовь, понимание

Напечатано с готового оригинал-макета

Издательство ООО "МАКС Пресс"

Лицензия ИД N 00510 от 01.12.99 г.

Подписано к печати 19.10.2005 г.

Формат 60х90 1/16. Усл.печ.л. 1,5. Тираж 100 экз. Заказ 673.

Тел. 939-3890. Тел./Факс 939-3891.

**119992, ГСП-2, Москва, Ленинские горы, МГУ им. М.В. Ломоносова,
2-й учебный корпус, 627 к.**

№20533

РНБ Русский фонд

2006-4

20603