

*На правах рукописи*

Зверева Анна Сергеевна

**Продукция в растениях биологически активных  
миелоцитокинов человека**

03.00.06 - Вирусология

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва

2009 г.

Работа выполнена на кафедре вирусологии биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

**Научные руководители:**

академик РАН, доктор биологических наук, профессор **Атабеков Иосиф Григорьевич**  
доктор биологических наук, профессор **Долгих Дмитрий Александрович**

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук, профессор **Добров Евгений Николаевич**  
кандидат биологических наук **Эльдаров Михаил Анатольевич**

**Ведущая организация:**

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН

Защита состоится «30» октября 2009 г. в 13.00 на заседании диссертационного совета Д 501.001.76 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, стр. 40, НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского, ауд. 536.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета МГУ.

Автореферат разослан \_\_\_\_\_ сентября 2009 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



Крашенинников И.А.

### **Актуальность проблемы.**

В течение последних 20 лет мировой спрос на рекомбинантные белки непрерывно возрастает. Такие белки применяют в клинической медицине, в качестве вакцин для людей и животных, промышленных ферментов, с их помощью создают новые материалы, они являются компонентами новейших наночастиц различного назначения. Большинство рекомбинантных белков синтезируют в клеточных культурах млекопитающих и бактерий, а также в клетках дрожжей и насекомых. Однако данные технологии обладают специфическими ограничениями и не могут в полной мере удовлетворить растущий спрос на рынке. Поэтому на протяжении последних десятилетий ученые разрабатывали альтернативную экономически выгодную систему безопасной, широкомасштабной продукции рекомбинантных белков – продукцию в растениях. Помимо создания стабильно трансформированных (трансгенных) растений, экспрессирующих целевые белки, в последнее время растущей популярностью пользуются системы временной экспрессии, в том числе на основе вирусов-векторов растений. Хотя первые опыты по генетической модификации вирусов растений с целью создания векторов для гетерологичной экспрессии проводились еще в середине 1980-х годов, современное понимание растительной вирусологии и прогресс в молекулярной биологии позволили значительно усовершенствовать систему векторной экспрессии. Новые достижения способствовали появлению разнообразных вирусных систем экспрессии и их дальнейшему использованию в научных и промышленных целях. Производство рекомбинантных белков в растениях может стать выгодной альтернативой существующим методам.

### **Цель и задачи исследования.**

Целью данной работы было создание вирусов-векторов для продукции в растениях биологически активных миелоцитокинов человека: гранулоцитарного и гранулоцитарно-макрофагального

колониестимулирующих факторов человека (hG-CSF и hGM-CSF соответственно).

Были решены следующие задачи:

1. Создание вирусных векторов для экспрессии целевых генов.
2. Разработка методики выделения целевых белков из растительного материала.
3. Определение биологической активности рекомбинантных hG-CSF и hGM-CSF, полученных путем экспрессии в растениях.

### **Научная новизна и практическая ценность работы.**

Впервые был создан вирус-вектор для временной экспрессии hG-CSF и hGM-CSF в растениях. Используемый вектор является первым вирусом-вектором на основе тобамовирусов, геномная РНК которого транскрибируется под контролем эукариотического промотора.

hG-CSF регулирует образование и созревание функционально активных нейтрофильных гранулоцитов. Рекомбинантный hG-CSF широко используется в онкологии, поскольку химиотерапия часто сопровождается снижением количества нейтрофилов, а также при лечении таких заболеваний, как инфаркт миокарда и церебральная ишемия. hG-CSF оказался эффективен для профилактики и лечения гнойно-септических инфекций в хирургии, в том числе в онкохирургии и при лечении больных с рефрактерными хроническими инфекциями, т.к. hG-CSF активизирует различные механизмы защиты организма от инфекции. hG-CSF также применяют для стимуляции «выброса» стволовых клеток из костного мозга.

hGM-CSF регулирует пролиферацию и созревание предшественников миелоидных клеток, а также функции зрелых нейтрофилов, эозинофилов и моноцитов. В клинической практике его применяют для лечения миелодиспластических синдромов, миелосупрессии в результате химиотерапии; апластической анемии, нейтропении, а также для снижения риска инфекций, связанных с пересадкой костного мозга. Кроме того, на

основе hGM-CSF создают противораковые вакцины для онкологических больных.

В настоящее время в России зарегистрированы и имеются в продаже рекомбинантные импортные препараты этих цитокинов, которые, наряду со стимуляцией гранулопоэза (hG-CSF, hGM-CSF) и моноцитопоэза (hGM-CSF), обладают иммуномодулирующими свойствами. Высокая стоимость препаратов колониестимулирующих факторов существенно ограничивает их широкое применение. Использование вирусных векторов для синтеза hG-CSF и hGM-CSF в растениях может способствовать значительному снижению стоимости их производства и, следовательно, удешевить лечение разных заболеваний, в том числе и онкологических.

По сравнению с другими системами экспрессии растения имеют ряд особенностей и преимуществ: дешевизна выращивания растений; сельскохозяйственные масштабы; отсутствие общих патогенов у растений и человека; простота переноса экзогенных ДНК в растительный геном; в растениях осуществляется гликозилирование и правильная укладка белков, сходные с таковыми в клетках млекопитающих. Использование вирусов-векторов для временной экспрессии позволяет увеличить выход целевого белка. Скорость мультипликации вирусной РНК в растениях чрезвычайно высока, за счёт чего достигается высокая копияность транскриптов чужеродных генов в цитоплазме заражённых клеток. Поэтому продуктивность вирусной системы экспрессии в среднем на 2 порядка выше по сравнению со стабильной трансформацией растений. Разработанная система экспрессии может быть использована для дешевой и безопасной продукции hG-CSF и hGM-CSF.

#### **Апробация работы.**

Результаты работы были представлены на 4-м международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития», Москва, 2007; на 33-м международном конгрессе FEBS «Biochemistry of Cell

Regulation», Греция, 2008; на 1-м международном форуме по нанотехнологиям «Rusnanotech», Москва, 2008; на 34-м международном конгрессе FEBS «Life's molecular interactions», Чехия, 2009.

### **Публикации.**

По материалам диссертации опубликовано 2 статьи и 4 тезисов.

### **Структура и объем диссертации.**

Диссертационная работа изложена на 88 страницах и включает: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, выводы и список цитируемой литературы. Работа иллюстрирована 11 рисунками. Список литературы содержит 235 источников.

### **Результаты и обсуждение.**

Целью данной работы была разработка метода экспрессии миелоцитокинов человека hG-CSF и hGM-CSF с помощью вируса-вектора на основе крВТМ (вируса табачной мозаики, заражающего растения сем. Крестоцветные) в растениях *Nicotiana benthamiana* и последующее определение их биологической активности.

До настоящего времени растительная экспрессия hG-CSF была получена только в клеточных культурах трансгенных растений с низким выходом продукта (105 мкг/л). hGM-CSF синтезировали в семенах трансгенного табака, где уровень целевого продукта достигал 0,03% от растворимого белка; в трансформированных клетках *Nicotiana tabacum* с выходом целевого белка 130 мкг/л; в трансформированных клетках табака (250 мкг/л). Более высокий уровень экспрессии hGM-CSF (980 мкг/л) был достигнут в суспензии клеток табака за счет повышения осмотического

давления при добавлении в клеточную среду маннитола, а также в других трансгенных клеточных культурах растений с незначительным выходом целевого белка. Высокий уровень экспрессии был достигнут благодаря использованию вектора на основе X вируса картофеля, при этом содержание hGM-CSF в листьях достигало 20 мг на 1 г зеленой массы, однако в этой работе не проводили выделение и характеристику очищенного препарата рекомбинантного цитокина.

### **Конструирование плазмид для экспрессии целевых цитокинов в растениях.**

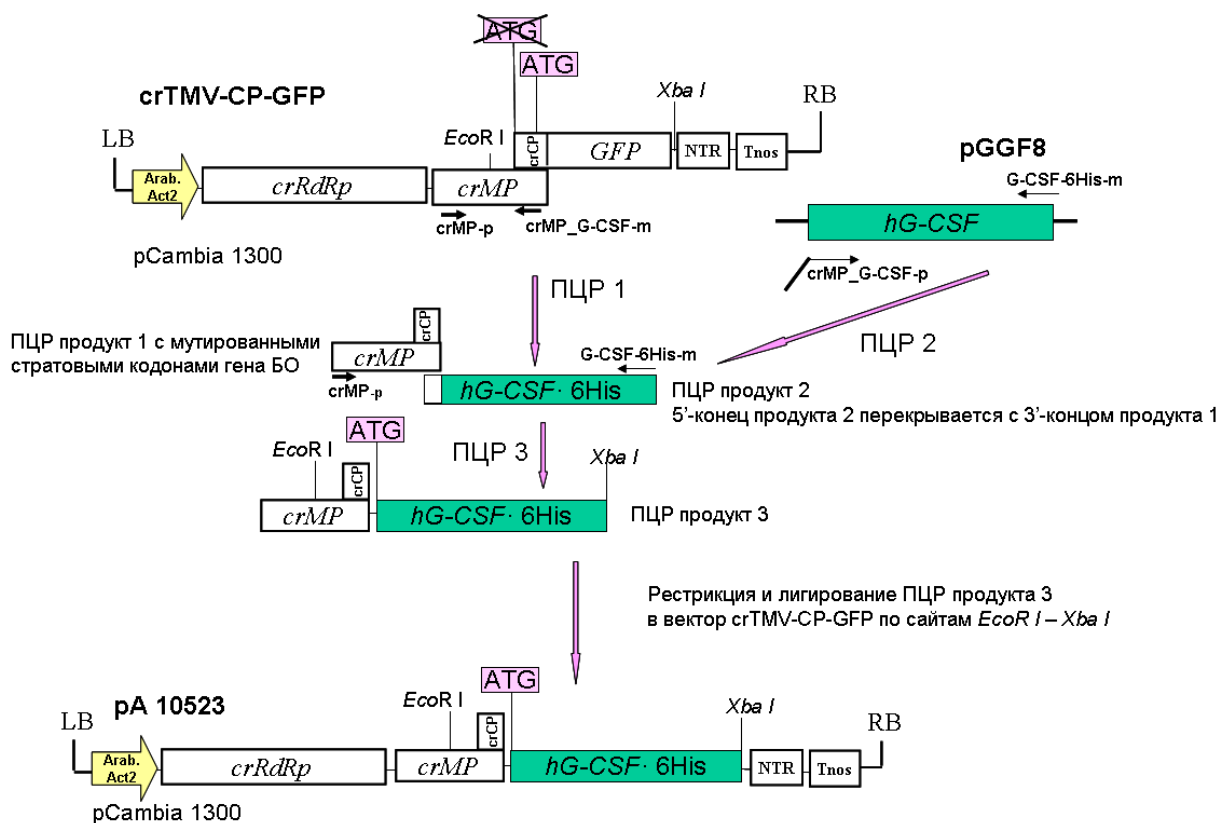
Для экспрессии колониестимулирующих факторов в клетках растений гены целевых белков *hG-CSF* и *hGM-CSF* были клонированы в вектор на основе крВТМ. Следует отметить, что это первый вектор на основе тобамовирусов, геном которого эффективно транскрибируется под контролем эукариотического промотора гена актина из *Arabidopsis thaliana*. Ранее было показано, что ВТМ – один из наиболее эффективных вирусов для продукции целевых белков. Например, количество белка GFP, синтезированного с использованием вектора ВТМ:30В, составляло 10 % от растворимого белка зараженного листа *N. benthamiana*. Известно, что листья растений являются не лучшей системой для продукции белков. В частности, содержание белка в незараженном зрелом листе *N. benthamiana* составляет 8 – 10 г на кг сырой биомассы, 50% которого приходится на Rubisco (ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase). Однако данные ограничения могут быть компенсированы исключительной способностью ВТМ переключать клеточный синтез на вирусные белки в зараженных клетках. Например, ранее была отмечена высокая продуктивность векторов на основе крВТМ – содержание целевого белка достигало 80% растворимого белка клетки. Использование крВТМ для создания систем экспрессии оказалось еще более эффективным, чем ВТМ, возможно, благодаря использованию сильного промотора. Кроме того, у крВТМ шире круг хозяев, что, при необходимости,

позволяет использовать различные виды растений семейства Крестоцветных для наработки целевых белков.

В качестве базового был использован вектор crTMV-CP-GFP (рис. 1). Его особенность состоит в том, что открытые рамки трансляции ТБ (транспортного белка) и БО (белка оболочки) перекрываются. Ген *ТБ* содержит субгеномный промотор гена *БО*, под контролем которого экспрессируется целевой белок. Кроме того, ТБ обеспечивает межклеточный транспорт вируса за пределы зоны агроинъекции. В данном векторе сохранена последовательность, кодирующая первые 26 аминокислот БО, следом за которой расположена последовательность гена *GFP* (green fluorescent protein, зеленого флуоресцирующего белка) в той же ОПТ. В результате, целевой белок содержит дополнительный фрагмент БО на N-конце. Предполагалось, что экспрессия GFP будет проходить эффективнее, благодаря имитации природного контекста гена *БО*, а также в связи с тем, что часть последовательности субгеномного промотора гена *БО* находится после стартового AUG-кодона.

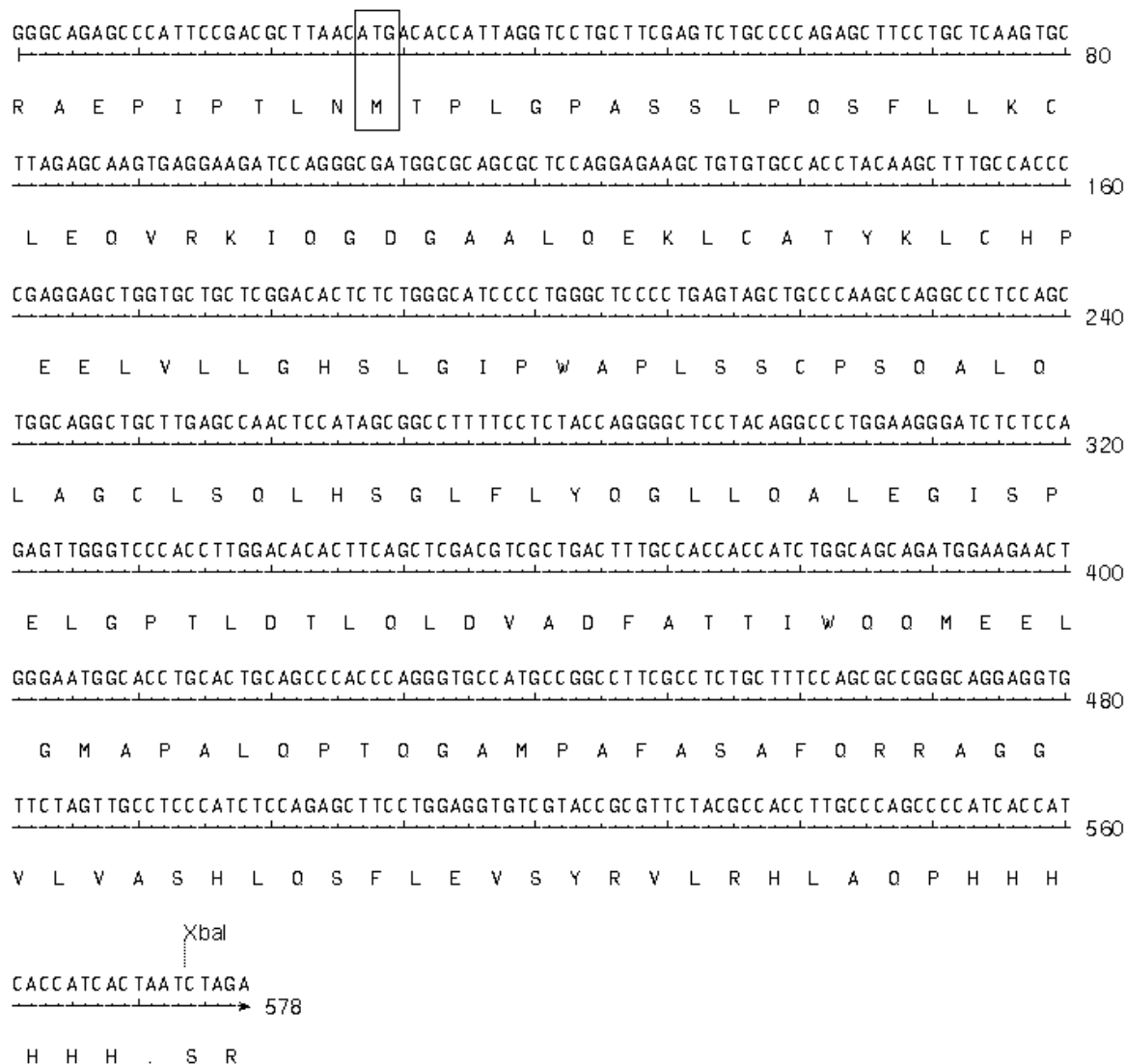
Однако при экспрессии белков медицинского назначения в первую очередь важна их биологическая активность и низкая иммуногенность. Предположительно, дополнительный N-концевой фрагмент может нарушать функции цитокинов и вызывать нежелательный иммунный ответ. Поэтому для клонирования выбрали версию этого вектора, в которой стартовый кодон гена *БО* был мутирован (триплет АТГ заменен на АСГ), в результате чего целевой белок должен был синтезироваться с природной N-концевой последовательностью. Однако, в последовательности гена *ТБ* есть еще один стартовый кодон в рамке считывания БО, с которого может начаться трансляция. Для того, чтобы мутировать и этот кодон, была проведена полимеразная цепная реакция ПЦР-1 (на матрице crTMV-CP-GFP с праймерами crMP-p и crMP\_G-CSF-m).





**Рис. 1. Схема конструирования плазмиды pA10523 для экспрессии hG-CSF.** LB (left border) и RB (right border) – левая и правая границы Т-ДНК соответственно. Arab.act2 – актиновый промотор, *crRdRp* (crTMV RNA dependent RNA polymerase) – ген репликазы крВТМ, *crMP* (crTMV movement protein) – ген транспортного белка крВТМ, *crCP* (crTMV coat protein) – первые 78 нуклеотидов гена белка оболочки крВТМ, *GFP* – ген зеленого флуоресцирующего белка, *hG-CSF* – ген цитокина, NTR (non-translatable region) – 3'НТО (нетранслируемая область), Tnos (terminator of polaline synthase) – терминатор гена нопалинсинтазы.

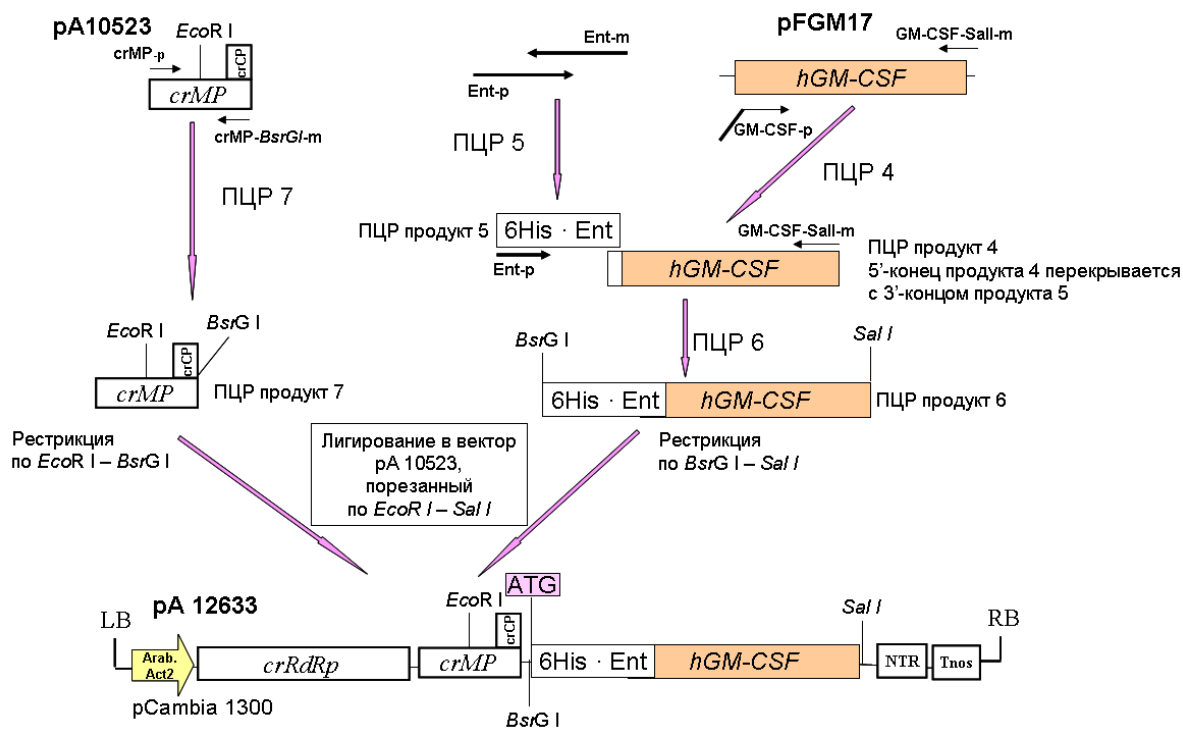
Для амплификации гена *hG-CSF* при помощи ПЦР-2 использовали ДНК плазмиды pGGF8 в качестве матрицы и праймеры: crMP\_G-CSF-p и G-CSF·6His-m. Полученный ПЦР-продукт 2, содержал ген *hG-CSF* с шестью гистидиновыми кодонами на 3'-конце (рис. 2). Праймеры crMP\_G-CSF-p и crMP\_G-CSF-m содержат перекрывающиеся участки, благодаря которым ПЦР-продукты 1 и 2 были объединены с помощью дополнительного раунда ПЦР-3 с праймерами crMP-p и G-CSF·6His-m. Итоговый ПЦР-продукт 3 был клонирован в вектор crTMV-CP-GFP по сайтам *EcoRI* – *XbaI*.



**Рис. 2. Нуклеотидная последовательность ПЦР продукта 2.** Прямоугольником отмечен стартовый кодон ОПТ (открытой рамки трансляции) hG-CSF. В 3'-концевой области гена расположена последовательность, кодирующая 6 гистидинов.

Аmplification гена *hGM-CSF* проводили в аналогичных условиях на матрице ДНК плазмиды rFGM17 с использованием праймеров GM-CSF-p и GM-CSF-Sall-m (ПЦР-продукт 4) (рис. 3). Последовательность из шести гистидиновых кодонов вместе с сайтом расщепления энтеропептидазой (ПЦР-продукт 5) была получена с помощью ПЦР-5 и олигонуклеотидов Ent-p и Ent-m. Праймеры Ent-m и GM-CSF-p содержат перекрывающиеся участки, благодаря которым ПЦР-продукты 4 и 5 были объединены при помощи дополнительного раунда ПЦР-6 с праймерами Ent-p и GM-CSF-Sall-m. Была проведена рестрикция ПЦР-продукта 6 (рис. 4) по сайтам *BsrGI* – *Sall*. С помощью ПЦР-7 (на матрице pA10523 с праймерами crMP-p и crMP-BsrGI-

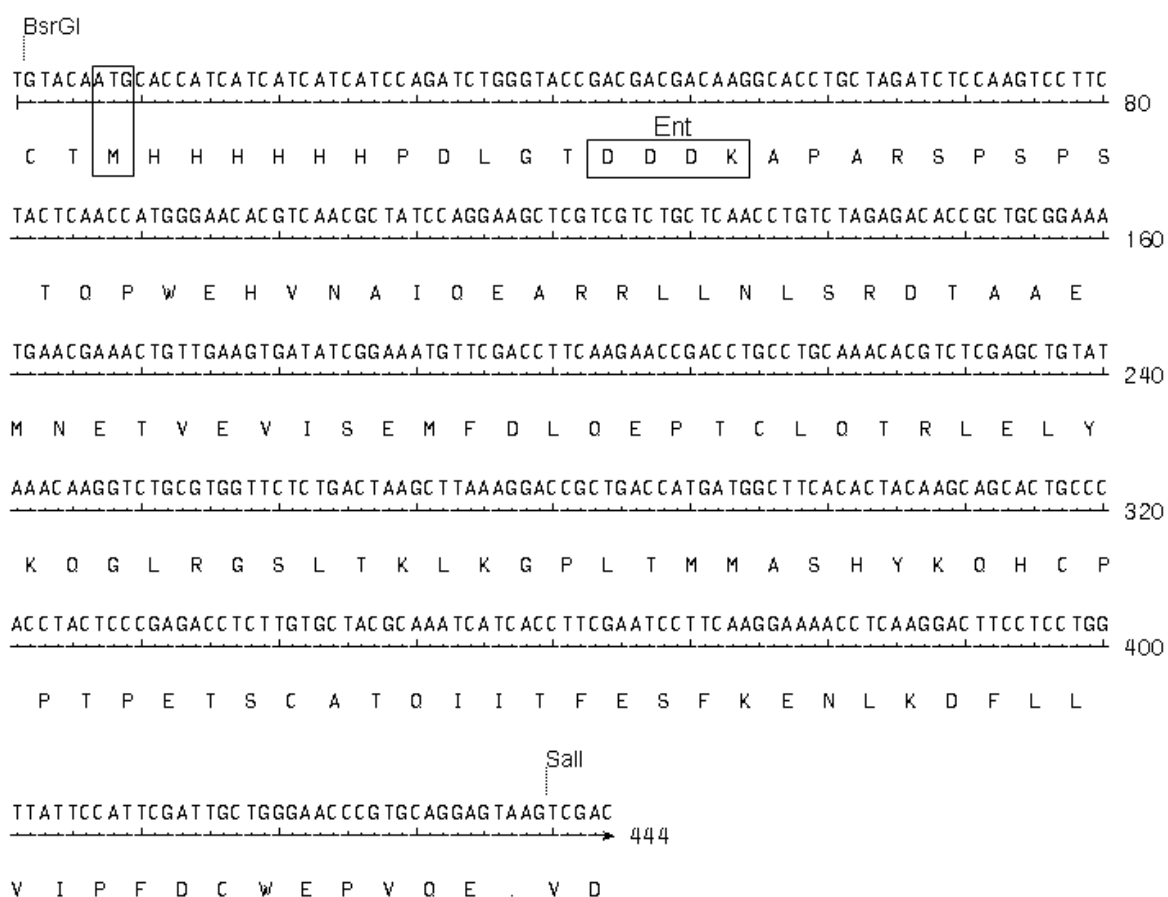
m) был введен сайт *BsrGI* в 3'-концевую последовательность гена *ТБ*. Затем была проведена рестрикция ПЦР-продукта 7 ферментами по сайтам *EcoRI* – *BsrGI*. После чего, ПЦР-продукты 6 и 7 были одновременно лигированы в вектор pA10523 предварительно обработанный рестриктазами *EcoRI* – *SalI*.



**Рис. 3. Схема конструирования плазмиды pA 12633 для экспрессии hGM-CSF.** LB (left border) и RB (right border) – левая и правая границы Т-ДНК соответственно. Arab.act2 – актиновый промотор, *crRdRp* – ген репликазы крВТМ, *crMP* – ген транспортного белка крВТМ, *crCP* – первые 78 нуклеотидов гена белка оболочки крВТМ, *hGM-CSF* – ген цитокина, NTR (non-translatable region) – 3'НТО, Tnos (terminator of nopaline synthase) – терминатор гена нопалинсинтазы, Ent – сайт расщепления энтеропептидазы.

В результате, на основе бинарного вектора pCambia 1300 были сконструированы плазмиды pA10523 и pA12633, содержащие гены репликазы крВТМ, ген ТБ, целевой ген и 3'НТО, необходимую для репликации вируса-вектора. Вся кассета экспрессировалась под контролем актинового промотора из *A. thaliana* и терминатора гена нопалинсинтазы из *Agrobacterium tumefaciens*. 3'- и 5'-концевые части генов *hG-CSF* и *hGM-CSF*, соответственно, содержали последовательности, кодирующие по 6 остатков гистидина для облегчения последующей очистки целевых белков методом

металлоаффинной хроматографии. Известно, что в некоторых случаях гексагистидиновый участок оказывает негативное влияние на структуру и биологическую активность рекомбинантных белков. Кроме того, наличие дополнительных аминокислот является нежелательным при использовании лекарственной формы белка, поскольку может способствовать развитию патологического иммунного ответа организма. Поэтому в случае hGM-CSF между кодонами гистидинов и последовательностью гена был введен сайт расщепления энтеропептидазы для изучения возможности последующего отщепления гексагистидинового участка.



**Рис. 4. Нуклеотидная последовательность ПЦР продукта 6.** Прямоугольниками отмечены стартовый кодон OPT hGM-CSF и сайт расщепления энтеропептидазы.

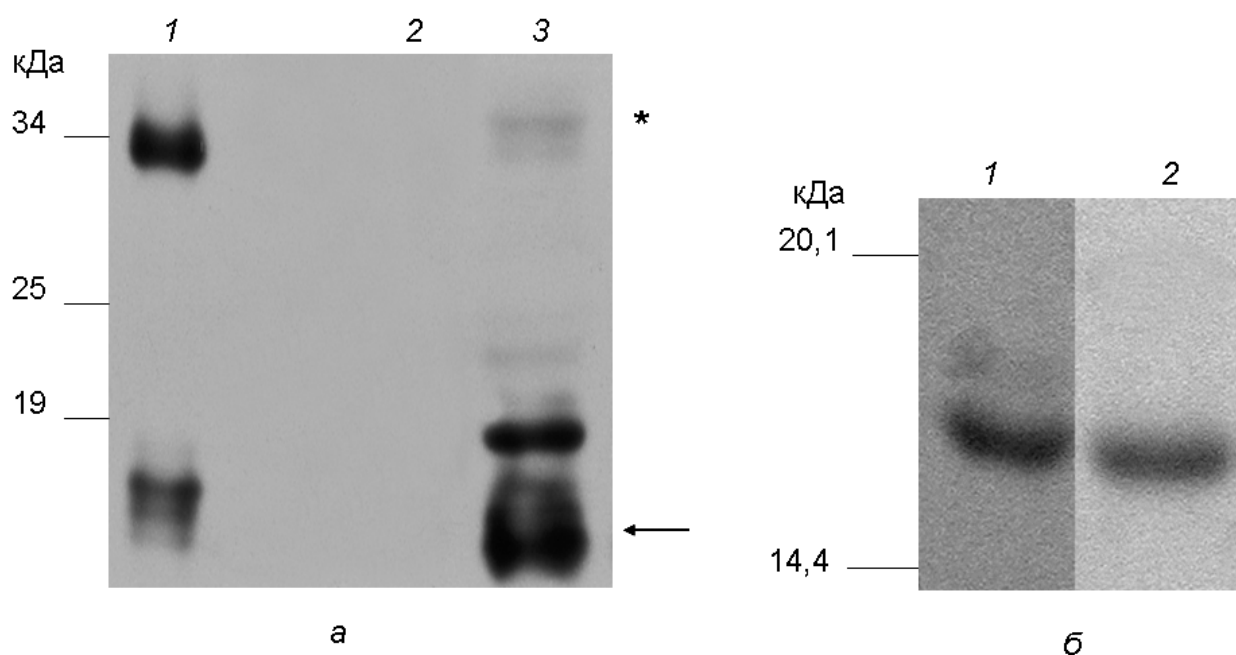
Для доставки вирусных векторов в листья растений был использован метод агроинъекции с помощью культур клеток *A. tumefaciens*, предварительно трансформированных конструкциями pA10523 и pA12633.

Для стимуляции продуктивности и повышения уровня экспрессии вируса-вектора опыты проводились в условиях совместной агроинъекции смесью агробактерий, несущих геном вируса-вектора и агробактерий, содержащих ген белка p19 из вируса кустистой карликовости томатов. Белок p19 является супрессором противовирусной реакции клеток растения-хозяина - «умолкания генов» вирусной РНК. Эффект ингибирования посттранскрипционного умолкания генов (ПТУГ) достигается за счет способности белка p19 образовывать комплекс с короткими интерферирующими РНК, что блокирует систему передачи сигнала ПТУГ. Поэтому агроинъекция гена p19 позволяет повысить стабильность РНК вируса-вектора.

#### **Экспрессия hG-CSF в листьях *N. benthamiana*.**

Для оценки эффективности экспрессии гена *hG-CSF* в растениях проводили экстракцию белков из листьев и измеряли содержание рекомбинантного цитокина при помощи белкового электрофореза и Вестерн-блот анализа. Интенсивность полос на иммуноблоте, соответствующих растительному phG-CSF (plant-made hG-CSF) сравнивали с известным количеством rhG-CSF, выделенным из *E. coli*. Для определения времени максимального накопления белка в листьях проводили сравнительный анализ содержания белка в зараженных листьях каждые 24 ч после агроинъекции. Установлено, что на пятые сутки после заражения содержание phG-CSF в листьях достигало максимума – 500 мг/кг сырой зеленой массы (рис. 5, а). Дополнительные полосы с молекулярной массой около 34 кДа, окрашиваемые антителами к hG-CSF, представляют собой, по-видимому, димеризованный белок. Это может быть связано с тем, что повышенный уровень экспрессии в гетерологичной системе сопровождается нарушением фолдинга части рекомбинантного белка, при этом экспонированные гидрофобные участки обладают склонностью к образованию агрегатов.

Возможно в связи с этим, большая часть целевого белка находится в нерастворимой фракции.



**Рис. 5.** Экспрессия hG-CSF в листьях *N. benthamiana*. Экспрессия hG-CSF в листьях *N. benthamiana*. а – Положительный контроль – rhG-CSF, полученный из *E. coli* (дорожка 1). Неинокулированный лист (отрицательный контроль – дорожка 2). Вестерн-блот анализ экстракта листа, агроинокулированного конструкцией pA10523 (дорожка 3), Слева показаны положения маркеров молекулярной массы белков («Fermentas»). Стрелкой отмечены белковые полосы, соответствующие rhG-CSF; звездочкой – предполагаемые димеры hG-CSF. б – электрофорез методом Лэмли hG-CSF, полученного экспрессией в *E. coli* (дорожка 1) и очищенного rhG-CSF (дорожка 2)

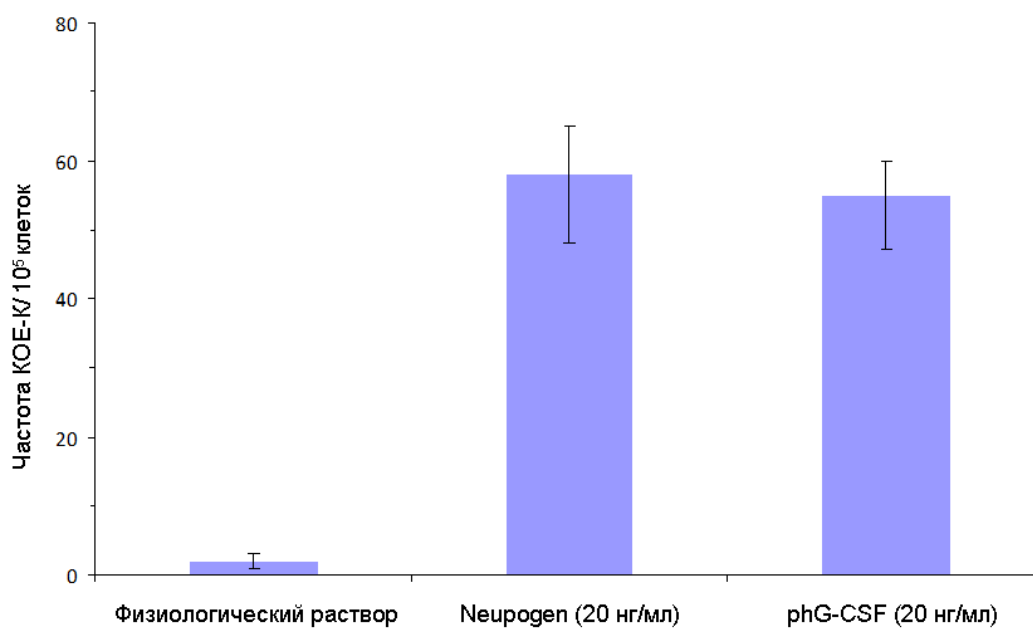
Для выделения белка из экстракта растительных клеток был использован метод металло-аффинной хроматографии на  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-агарозе. Гексагистиридиновые участки в составе гидрофобных молекул белка должны быть доступны для связывания с аффинной смолой, поэтому стадию нанесения проводили в денатурирующих условиях. Затем постепенно снижали концентрацию денатурирующих агентов, чтобы белок смог принять нативную пространственную конформацию. Для элюции использовали имидазол-содержащий буфер без денатурантов.

После выделения и очистки с помощью белкового электрофореза в препарате rhG-CSF была выявлена одна полоса с молекулярной массой 17

кДа, соответствовавшая целевому белку с гексагистиридиновым участком (рис. 5, б). Чистота полученного белка превосходит 95%. Выход очищенного белка составил 100 мг/кг зеленой массы, что значительно превышает выход, полученный в предыдущих исследованиях.

### Определение биологической активности rhG-CSF.

Для определения колониестимулирующей активности клетки костного мозга мыши культивировали в присутствии очищенного препарата rhG-CSF из листьев растений, а затем проводили подсчет образовавшихся колоний нейтрофилов. Исследование пролиферации мышинных миелобластов является стандартным тестом для hG-CSF, поскольку мышинный и человеческий белки обладают межвидовой кросс-реактивностью.



**Рис. 6. Биологическая активность rhG-CSF.** КОЕ-К - колониеобразующие единицы в культуре.

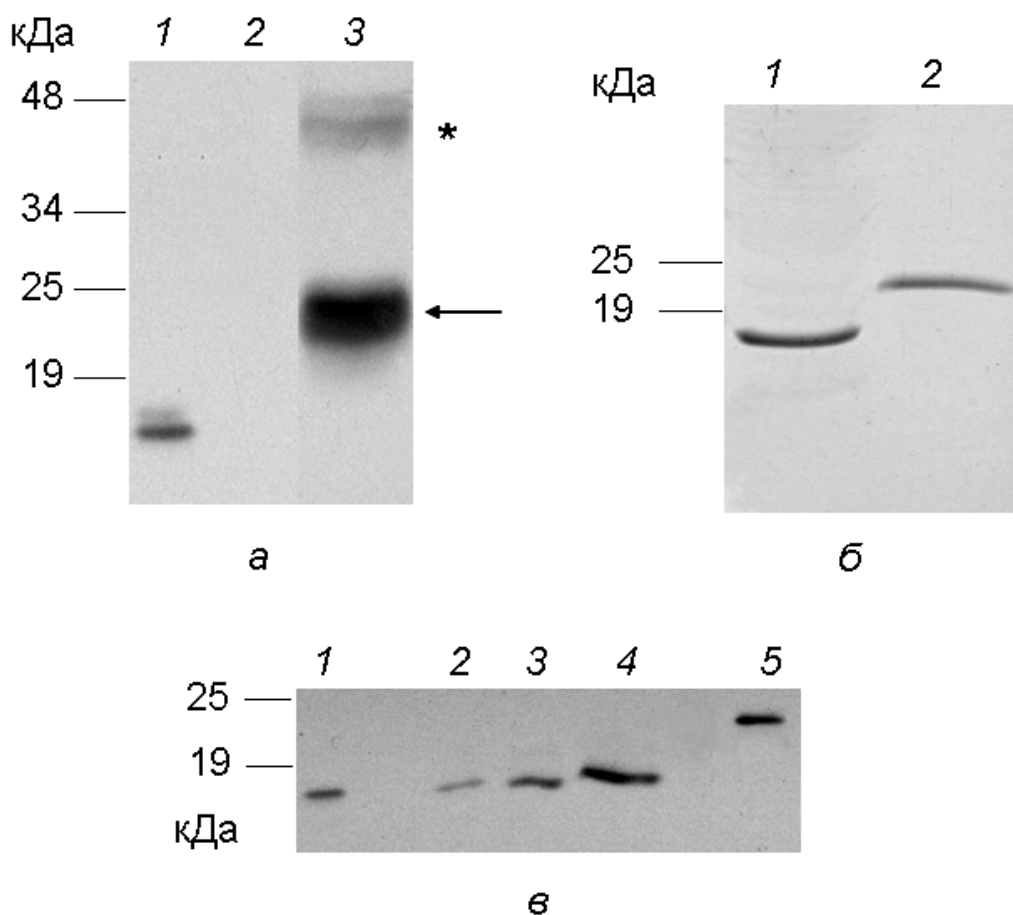
В качестве положительного контроля использовали препарат hG-CSF Neurogen фирмы «F.Hoffmann-La Roche» (Швейцария). Установлено, что rhG-CSF обладает такой же активностью, как и контрольный препарат (рис.

б). Следовательно, используемые методы очистки не приводят к потере биологической активности hG-CSF.

### **Экспрессия hGM-CSF в листьях *N. benthamiana*.**

Экспрессия гена *hGM-CSF* в составе плазмиды pA12633, оценка уровня накопления целевого белка и очистка rhGM-CSF проводились по аналогии с pA10523 и rhG-CSF. Согласно результатам Вестерн-блот анализа, на пятый день после заражения содержание rhGM-CSF (plant-made rhGM-CSF) в листьях достигало 300 мг/кг сырой зеленой массы (рис. 7, а). Дополнительные полосы с молекулярной массой около 45 кДа, окрашиваемые антителами к hGM-CSF, также представляют собой, по-видимому, димеры белка. Большая часть белка также находится в нерастворимой фракции. При помощи электрофореза в ПААГ (полиакриламидном геле) по методу Лэммли в препарате очищенного целевого белка обнаруживается единственная полоса, подвижность которой соответствует рассчитанной молекулярной массе hGM-CSF с гексагистидиновым участком и сайтом расщепления энтеропептидазы (24 кДа, рис. 7, б). Выход белка после очистки составил около 50 мг/кг зеленой массы. Чистота полученного белка превосходит 95%.





**Рис. 7. Экспрессия hGM-CSF в листьях *N. benthamiana*.** *а* – Вестерн-блот анализ. В качестве положительного контроля использован rhGM-CSF, полученный путем экспрессии в *E. coli* (дорожка 1), в качестве отрицательного контроля – неинкулированный лист (дорожка 2). Лист, агроинкулированный конструкцией pA12633 (дорожка 3). Слева показаны положения маркерных белков и их молекулярные массы; стрелкой – белковые полосы, соответствующие rhGM-CSF; звездочкой – предполагаемые димеры rhGM-CSF. *б* – электрофорез по Лэммли hGM-CSF, полученного из *E. coli* (дорожка 1) и очищенного rhGM-CSF (дорожка 2). *в* – Вестерн-блот анализ препаратов rhGM-CSF после обработки энтеропептидазой (дорожка 4), 20 и 50 нг очищенного rhGM-CSF после обработки энтеропептидазой (дорожки 2, 3 соответственно), очищенного rhGM-CSF до обработки ферментом (дорожка 5), hGM-CSF, полученного из *E. coli* (дорожка 1)

Для получения рекомбинантного hGM-CSF с природной аминокислотной последовательностью был проведен подбор условий обработки полученного белка препаратом энтеропептидазы. Установлено, что полный гидролиз одного мг белка осуществляется тремя единицами фермента в течение 16 ч при комнатной температуре. Эти условия были выбраны для препаративного гидролиза целевого белка. В результате

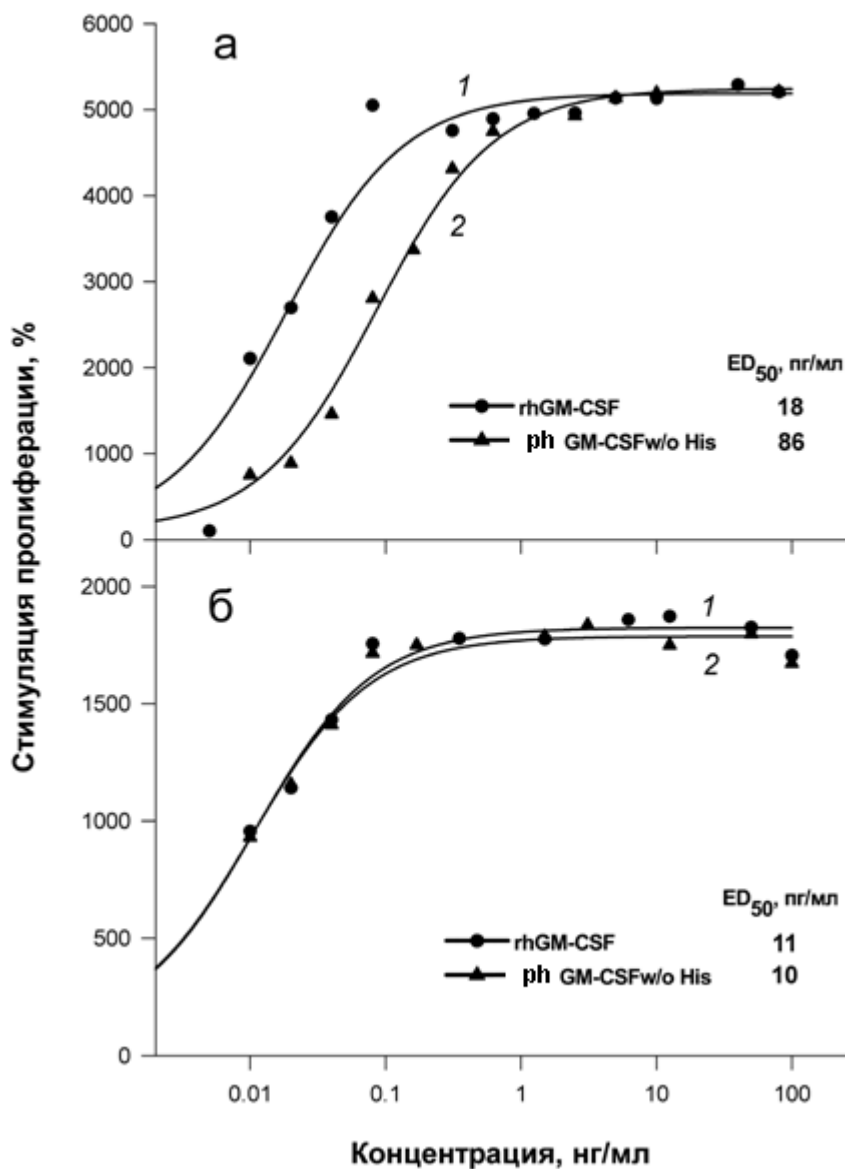
гидролиза был получен рекомбинантный rhGM-CSF с молекулярной массой, совпадающей с массой белка, выделенного из бактериального продуцента. При этом полоса нерасщепленного белка в препарате Вестерн-блотом не детектируется (рис. 7, в, дорожка 4). Таким образом, данные электрофореза и Вестерн-блота дают основания предполагать, что отщепление гексагистидинового участка в нашем случае произошло полностью, и N-концевая последовательность полученного нами белка соответствует природной.

Для разделения продуктов гидролиза проводили повторную хроматографию на  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-агарозе. При этом продукты гидролиза, имевшие в своем составе последовательность из шести гистидинов (недорасщепленный гибридный белок, который не детектируется с помощью иммуноблота, и гексагистидиновый фрагмент), а также примесные белки, обладавшие неспецифическим сродством к  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA, задерживались смолой. Молекулярная масса очищенного рекомбинантного rhGM-CSF совпадала с массой белка, выделенного из бактериального продуцента (рис. 7, в, дорожки 2, 3).

#### **Определение биологической активности rhGM-CSF.**

Колониестимулирующую активность рекомбинантного GM-CSF определяли по уровню стимуляции пролиферации линии клеток эритролейкоза человека TF-1. В качестве контроля был взят рекомбинантный rhGM-CSF, выделенный из *E. coli*, активность которого совпадала с активностью рекомбинантного hGM-CSF Sargramostim Leukine фирмы «Immunex» (США), полученного путем экспрессии в клетках дрожжей. Степень стимуляции пролиферации определяли по включению [ $^3\text{H}$ ]тимидина. Установлено, что диапазоны активности белков несколько различаются (рис. 8, а). Максимальная стимуляция пролиферации достигается при добавлении 1 нг/мл rhGM-CSF, а доза, необходимая для 50%-ной стимуляции ( $\text{ED}_{50}$ ) составляет 86 пг/мл, что в 4.7 раз больше, чем у контрольного препарата (18

пг/мл). Однако, после удаления гексагистидинового участка с помощью энтеропептидазы (рис. 7, в) значения  $ED_{50}$  для phGM-CSF и rhGM-CSF практически совпадали (11 и 10 пг/мл соответственно) (рис. 8, б).



**Рис. 8. Биологическая активность phGM-CSF.** а – активность phGM-CSF (кривая 2) по сравнению с rhGM-CSF (кривая 1); б – активность phGM-CSF после обработки энтеропептидазой и последующей очистки (кривая 2) по сравнению с rhGM-CSF (кривая 1). За 100% принимали включение [ $^3$ H]тимидина в контрольные (не стимулированные) клетки. Кривые соответствуют уравнению  $IS = 100 + (IS_{lim} - 100)/(1 + ED_{50}/[M])$ , где IS – индекс стимуляции,  $IS_{lim}$  – предельная величина IS, [M] – концентрация миелоцитокина. Используемые значения  $ED_{50}$  (равные 18, 86 (а) и 11, 10 (б) для кривых 1 и 2 соответственно) и  $IS_{lim}$  определены методом нелинейной регрессии.

Полученный результат можно объяснить тем, что наличие достаточно протяженного заряженного пептида (гексагистидинового тага и участка расщепления энтеропептидазы) на N-конце молекулы hGM-CSF каким-то образом мешает формированию правильной пространственной структуры белка, необходимой для взаимодействия с клеточным рецептором. После обработки энтеропептидазой природная аминокислотная и, предположительно, пространственная структуры цитокина восстанавливаются, в результате чего колониестимулирующая активность препарата возрастает до уровня контрольной.

Существует несколько направлений усовершенствования полученной системы экспрессии. Модификации генома вируса-вектора, такие как введение интронов в последовательность генов вектора и оптимизация кодонов генов целевых белков могут привести к стимуляции их экспрессии. Возможно увеличить эффективность экспрессии целевых белков с помощью системной экспрессии. Для этого нужно восстановить последовательность гена белка оболочки, который необходим для транспорта вирусной инфекции. Интересно было бы изменить клеточную локализацию продуктов экспрессии генов цитокинов, присоединив к ним сигнальные последовательности, направляющие их в эндоплазматический ретикулум или апопласт. Другое направление - изменение техники агроинъекции. В некоторых исследованиях показано, что вакуумная инфильтрация целого растения суспензией агробактерий или техника заражения корней растений, выращенных методом аэропоники, оказываются наиболее эффективными.

Таким образом, в результате проделанной работы сконструирована система экспрессии цитокинов в листьях растений, обеспечивающая достаточно высокий уровень синтеза – 300-500 мг/кг листьев. Разработанные методы выделения белков из листьев растений позволяют получать биологически активные препараты высокой чистоты, что подтверждает

наличие широких перспектив использования вирусной системы для экспрессии генов различных цитокинов и других фармацевтических белков в растениях.

## ВЫВОДЫ

1. Впервые получены вирусные векторы на основе тобамовирусов для продукции рекомбинантных цитокинов hG-CSF и hGM-CSF в растениях.
2. Разработана методика заражения и культивирования зараженных растений *Nicotiana benthamiana*. Установлено, что максимальный уровень синтеза рекомбинантных цитокинов наблюдается на пятые сутки после заражения.
3. Разработана методика выделения рекомбинантных цитокинов из растений, позволяющая получать биологически активные препараты hG-CSF и hGM-CSF с высоким выходом.
4. Показано, что синтезированные в растениях hG-CSF и hGM-CSF обладают такой же колониестимулирующей активностью, как и аналогичные препараты, уже применяемые в медицине.

### Список работ, опубликованных по теме диссертации.

1. Зверева А.С., Петровская Л.Е., Родина А.В., Иванов П.И., Фролова О.Ю., Шингарова Л.Н., Комарова Т.В., Дорохов Ю.Л., Долгих Д.А., Кирпичников М.П., Атабеков И.Г. (2009). Продукция в растениях биологически активных миелоцитокинов человека. *Биохимия (Москва)*, 74, 1459 – 1468.
2. Комарова Т.В., Скулачев М.В., Зверева А.С., Шварц А.М., Дорохов Ю.Л., Атабеков И.Г. (2006). Новый вирусный вектор для эффективной продукции целевых белков в растениях. *Биохимия (Москва)*, 71, 846 – 850.
3. A. Zvereva (2009). Production of biologically active human granulocyte and granulocyte macrophage colony-stimulating factors in *Nicotiana benthamiana*. *Abstracts of 34<sup>th</sup> FEBS Congress, FEBS Journal* 276, 397.
4. A. Zvereva (2008). New approach to expression of cytokine in plants. *Abstracts of 33<sup>d</sup> FEBS Congress FEBS Journal* 275, 365.
5. A.S. Zvereva (2008). Expression of human cytokines (G-CSF and GM-CSF) in *Nicotiana benthamiana* plants. *Abstracts of Nanotechnology international forum “Rusnanotech” , Russia, Moscow, December 3 – 5*, 183.
6. Зверева А.С. (2007). Экспрессия Г-КСФ в растениях *Nicotiana benthamiana*. *Сборник тезисов Четвертого московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития» март 12-16*, 126.