

УДК 576.315.42

# Новый вирусный вектор для суперпродукции эпитопов вакцинных белков в растениях

Л. Г. Тюлькина<sup>1</sup>, Е. В. Скурат<sup>1</sup>, О. Ю. Фролова<sup>2</sup>, Т. В. Комарова<sup>2</sup>, Е. М. Каргер<sup>2</sup>,  
И. Г. Атабеков<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40

\*E-mail: atabekov@genebee.msu.su

Поступила в редакцию 20.06.2011 г.

**РЕФЕРАТ** На основе геномов потексвирусов – генома X-вируса картофеля (ХВК) и гена капсидного белка вируса мозаики альтернантеры (КБ ВМАльт), сконструированы гибридные вирусные векторы ХВК-КБ ВМАльт и ХВКdt-КБ ВМАльт, обеспечивающие высокий уровень накопления капсидного белка. Система экспрессии на основе векторов ХВК-КБ ВМАльт и ХВКdt-КБ ВМАльт генетически безопасна, так как у гибридных вирусов нарушен системный транспорт и образование инфекционных вирусных частиц. КБ ВМАльт, формирующий вирусоподобные частицы (ВПЧ) в отсутствие геномной РНК, может служить платформой для эффективной презентации чужеродных эпитопов (включая эпитопы патогенов человека). В качестве модельного гетерологичного пептида при создании химерного КБ ВМАльт мы использовали N-концевой домен белка М2 (М2е) вируса гриппа А человека и его укороченный ΔМ2е-вариант. Химерные капсидные белки ВМАльт с эпитопами белка М2 вируса гриппа А также способны формировать на основе самосборки протяженные ВПЧ. В процессе накопления, полимеризации и выделения химерных ВПЧ эпитопы белка М2 вируса гриппа А не элиминируются, что свидетельствует о стабильности химерного КБ ВМАльт при С-концевой локализации чужеродного эпитопа. Таким образом, гибридный вирусный вектор ХВК-КБ ВМАльт может использоваться в биотехнологии для продукции вирусоподобных наноразмерных частиц, представляющих на своей поверхности эпитопы вакцинных белков. Химерные ВПЧ, несущие на поверхности чужеродные эпитопы, можно рассматривать как потенциальные вакцины.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** потексвирусы, вирусный вектор, чужеродный эпитоп, химерные вирусоподобные частицы.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ХВК – X-вирус картофеля; ВМАльт – вирус мозаики альтернантеры; КБ – капсидный белок; dt – делеция генов транспорта; ХВК-КБ ВМАльт – гибридный вирусный вектор на основе генома ХВК с КБ ВМАльт; М2е – эктодомен белка М2 вируса гриппа А; ΔМ2е – укороченный вариант М2е; КБ-М2е ВМАльт, КБ-ΔМ2е ВМАльт – химерные КБ ВМАльт с эпитопом белка М2; ВПЧ – вирусоподобные частицы; ПЦР – полимеразная цепная реакция; НТО – нетранслируемая область.

## ВВЕДЕНИЕ

Использование растений с целью экспрессии и накопления чужеродных (целевых) белков (ЦБ), применяемых в медицине, ветеринарии, сельском хозяйстве и промышленности, – одно из перспективных направлений биотехнологии.

Преимущество растений перед клетками животных или микроорганизмов состоит в технологической простоте и возможности одновременного производства большого количества недорогого целевого продукта, а отсутствие патогенов, общих для человека и растений, делает произведенные в растениях бел-

ки полностью безопасными. Наличие в растениях систем посттрансляционных модификаций обычно обеспечивает формирование правильной конформации целевых белков при помощи дисульфидных связей и гликозилирования.

Один из наиболее эффективных методов быстрого получения в растениях значительных количеств целевого белка основан на использовании автономно реплицирующихся рекомбинантных вирусных векторов. Высокая скорость репликации вирусных геномов обеспечивает высокую копияность транскриптов чужеродных генов в цитоплазме инфицированных

клеток. Поэтому продуктивность вирусной системы экспрессии в среднем на два порядка выше, чем при стабильной трансформации растений или транзientной экспрессии с помощью невирусных векторов [1, 2]. Наиболее широко используются вирусные векторы, созданные на основе РНК-содержащих вирусов растений (тобамо-, потекс-, комо-, бромо- и потивирусов) [3].

Существуют две основные стратегии получения целевых белков при использовании вирусного вектора:

1) ген ЦБ под контролем вирусного промотора экспрессируется с образованием индивидуального белка. Это может быть выполнено на основе «стратегии добавления гена», когда ген ЦБ помещают под контроль дублированного субгеномного промотора, например, гена белка оболочки [2, 4–6], или «стратегии замены гена», когда вирусный ген (чаще всего ген белка оболочки или/и гены межклеточного транспорта) заменены геном ЦБ [7–11]. Такой подход позволяет за короткое время накапливать целевой белок в количествах, достигающих 10% и более от суммарного растворимого белка растений. Векторы на основе геномов фитовирусов успешно применяются для продукции в растениях белков медицинского назначения, в том числе вакцинных. Эту стратегию использовали для синтеза сердцевинного белка вируса гепатита В (НВсAg) и капсидного белка калицивируса, способных формировать стабильные вирусоподобные частицы, стимулирующие гуморальный и клеточный иммунные ответы [12, 13];

2) стратегия «слияния» нуклеотидной последовательности гена ЦБ или его фрагмента с вирусным геном или его фрагментом. Чаще всего вирусный ген капсидного белка и ген ЦБ экспрессируются как единая рамка трансляции. Но существуют ограничения на допустимый размер добавленной чужеродной последовательности. Протяженные полипептиды, как правило, соединяют с основным белком через гибкий мостик, сайты протеолиза, через последовательность пептида 2А вируса ящура или иным способом [14–17].

Изучение молекулярных механизмов активации адаптивного иммунного ответа свидетельствует о том, что скорее пептиды, нежели целые белки отвечают за активацию Т- и В-лимфоцитов [18]. Пептиды (как синтетические, так и рекомбинантные) нестабильны и обладают слабой антигенной активностью [19], однако усиление их иммуногенности и повышение стабильности происходят после связывания с высокомолекулярными и высокоиммуногенными носителями [18].

Примером таких носителей могут быть капсидные белки (КБ) вирусов растений, способные формировать вирусные и/или вирусоподобные наночастицы

и служить платформой для презентации эпитопов патогена. Подобные наночастицы имеют стабильную и регулярно повторяющуюся структуру, которая способствует индукции сильного как клеточного, так и гуморального иммунного ответа [20–23].

Используя данную стратегию экспрессии, созданы вирусные векторы, продуцирующие в растениях вирусы с химерным КБ. На поверхности этих вирионов были презентируемы эпитопы антигенов золотистого стафилококка, вирусов ящура, гепатита С, папилломы, полиомиелита, вируса иммунодефицита человека, вируса гриппа [24–33] и многих других (см. также обзоры [3, 34]).

Но вирусные векторы на основе полноразмерных геномов, способных к системному транспорту и образованию инфекционных вирусных частиц, небезопасны для использования в биотехнологии. В процессе производства целевых белков нельзя исключить возможность попадания рекомбинантных вирусов в окружающую среду с последующим неконтролируемым распространением генетического материала.

Капсидные белки некоторых вирусов животных и растений сохраняют способность формировать стабильные капсиды, вирусоподобные частицы (ВПЧ) в отсутствие вирусного генома. Использование ВПЧ в качестве платформы для эффективной презентации чужеродных для иммунной системы эпитопов [21, 35–37] может решить проблему биобезопасности производства вакцинных белков. В настоящее время особое внимание уделяется конструированию векторных систем, экспрессирующих капсидные белки, которые формируют ВПЧ, свободные от каких-либо примесей РНК. Считается, что только такие ВПЧ могут использоваться в биотехнологии и нанотехнологии [38, 39].

Цель настоящей работы – создание системы генетически безопасных вирусных векторов на основе геномов потексвирусов для продукции в растениях ВПЧ, презентирующих на своей поверхности эпитопы патогена.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Среды, реактивы, ферменты и синтетические олигонуклеотиды

В работе использовали *Escherichia coli* XL-1 Blue («Stratagene», США) и *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 из коллекции кафедры вирусологии МГУ. Рекомбинантные ДНК клонировали в клетках *E. coli* XL-1 Blue стандартными методами [40] с использованием рестрикционных эндонуклеаз, ДНК-лигазы, Taq- и Pfu-полимераз («Fermentas», Литва и «СибЭнзим-М», Россия). Олигонуклеотиды были синтезированы фирмой «Синтол» (Россия).

Для клонирования использовали следующие синтетические олигонуклеотиды: ВМАльт-КБ-XhoI-p (CTAGCTCGAGATGTCCACTCCATTTCTCAAA), ВМАльт-КБ-XbaI-m (CGTCTAGATTACTSCGGTGGTGGGAGGTATTGA), PVX-R-Avr2-p (TGCACAGATTTTCTAGGCAC), PVX-R-XhoI-m (AGCTCTCGAGCTTATTCAAATCTCTAAGGTA), PVX-3ntr-XbaI-p (AGCTTCTAGACTACGTC-TACA TAACCGACGC), Oligo(dT)<sub>24</sub>-Kpn-m (AGCTGGTACSTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT T), PVX-Kpn-(dT)<sub>12</sub>-3ntr-m (AGCTGGTACSTTTTTTTTTTTTATATTATTCATACAATC), PVX-Xba-cpxho-3ntr-p (AGTCTCTAGTTCGAGGCGTTCAGGAACA), ВМАльт-КБ-evetpirn-XbaI-m (CGTCTAGATTAGTTTCTGATGGTGTTCACSCSTCCGGTGGTGGGAGGTA), ВМАльт-КБ-M2E-m (TTTCCACSTCTGTCAAGAGTGACTCCGGTGGTGGGAGGTA), M2E-XbaI-m (CGTCTAGATTAGTTCGATGAGTCGTTGCATCT), M2E-p (TCACTCTTGACAGAGGTGGAAACASCAATCAGAAACGAGTGGG), M2E-m (GTCGGATGAGTTCGTTGCATCTGCATCCCCACTCGTTTCTGATT). Правильность полученных конструкций подтверждали путем автоматического секвенирования препаратов плазмидных ДНК в фирме «ГеноТехнология» (Россия).

### Векторные конструкции ХВК-КБ ВМАльт и ХВКdt-КБ ВМАльт

Бинарные гибридные векторы получали в несколько стадий с использованием промежуточных конструкций (ПК).

**ПК 1** – Фрагмент плазмиды PVX-201, содержащий 35S промотор, репликон ХВК с дублированным субгеномным промотором, но без терминатора транскрипции гена нопаинсинтазы (Tnos-терминатор), по сайтам HindIII/EcoRI был перенесен в бинарный вектор pBIN 19.

**ПК 2** – Ген капсидного белка ВМАльт получен методом ПЦР на матрице кДНК-копии 3'-концевой области геномной РНК ВМАльт с использованием пары праймеров ВМАльт-КБ-XhoI-p и ВМАльт-КБ-XbaI-m и субклонирован в вектор Cambia 6963 по сайтам рестрикции XhoI/XbaI.

**ПК 3** – Для удобства клонирования сайт рестрикции XbaI, фланкирующий субгеномный промотор белка 25 кДа ХВК, был заменен сайтом рестрикции XhoI. С этой целью фрагмент кДНК ХВК, кодирующий С-концевую область вирусной полимеразы, получен методом ПЦР на матрице PVX-201 с использованием пары праймеров – PVX-R-Avr2-p и PVX-R-XhoI-m. Синтезированный фрагмент клонировали по сайтам Avr2/XhoI в вектор pGEM3-11369(polio)x2, содержащий субгеномный промотор

гена белка 25 кДа, последовательность, кодирующую С-концевую часть полимеразы ХВК и КБ U1 вируса табачной мозаики (ВТМ) с удвоенным полиовирусным эпитопом. Этой операцией из вектора pGEM3-11369(polio)x2 была удалена последовательность гена капсидного белка U1 ВТМ и создан сайт рестрикции XhoI на 3'-конце субгеномного промотора белка 25 кДа.

**ПК 4** – Три варианта 3'-НТО получены с помощью ПЦР на матрице PVX-201 с использованием трех пар праймеров: PVX-3ntr-XbaI-p и Oligo(dT)<sub>24</sub>-Kpn-m использовали для синтеза 3'-НТО ХВК (А)<sub>24</sub>; праймеры PVX-3ntr-XbaI-p и PVX-Kpn-(dT)<sub>12</sub>-3ntr-m – для синтеза 3'-НТО ХВК (А)<sub>12</sub>; праймеры PVX-Xba-cpxho-3ntr-p и PVX-Kpn-(dT)<sub>12</sub>-3ntr-m – для синтеза 3'-НТО ХВК p/cp (А)<sub>12</sub>.

Синтезированные фрагменты ДНК, соответствующие различным вариантам 3'-НТО, после расщепления рестриктазами XbaI/KpnI одновременно с геном КБ ВМАльт, предварительно выщепленным из ПК 2 по сайтам XhoI/XbaI клонировали в плазмиду pBlueScript II SK+ по сайтам XhoI-(XbaI)-KpnI.

**ПК 5** – Фрагмент ДНК, соответствующий КБ ВМАльт с прилегающей 3'-НТО, выщепляли из ПК 4 по сайтам рестрикции XhoI/KpnI и одновременно с фрагментом ДНК, соответствующим Tnos-терминатору, и предварительно выщепленным по сайтам KpnI/SacI из содержащего Tnos-терминатор субклона pGEM, клонировали в ПК 3 по сайтам XhoI-(KpnI)-SacI.

На последнем этапе клонирования фрагмент ДНК из ПК 5 по сайтам XhoI/SacI или AvrI/SacI переносили в ПК 1, предварительно обработанную рестриктазами SalI/SacI или AvrI/SacI.

### Получение векторных конструкций, экспрессирующих химерные капсидные белки ВМАльт

**ПК 6** – Ген КБ ВМАльт, содержащий последовательность, кодирующую ΔM2e-вариант, получен методом ПЦР на матрице кДНК-копии 3'-концевой области геномной РНК ВМАльт с использованием пары праймеров – ВМАльт-КБ-XhoI-p и ВМАльт-КБ-evetpirn-XbaI-m, и субклонирован в вектор Cambia 6963 по сайтам рестрикции XhoI/XbaI. Ген КБ ВМАльт, кодирующий полноразмерный домен M2e получен методом ПЦР в три стадии с использованием пары синтетических олигонуклеотидов M2E-p и M2E-m и двух пар праймеров – ВМАльт-КБ-XhoI-p и ВМАльт-КБ-M2E-m, и ВМАльт-КБ-XhoI-p и M2E-XbaI-m, и субклонирован в вектор Cambia 6963 по сайтам рестрикции XhoI/XbaI.

**ПК 7** – В ПК 5 по сайтам XhoI/XbaI последовательность вирусного капсидного белка заменяли

на последовательности химерных капсидных белков из ПК 6.

На последнем этапе клонирования фрагменты ДНК из ПК 7 по сайтам XhoI/SacI или AvrI/SacI переносили в ПК 1, предварительно обработанную рестриктазами SalI/SacI или AvrI/SacI.

### Агроинъекция

Агробактерии *A. tumefaciens* (штамм GV3101) трансформировали рекомбинантными плазмидами, используя метод «замораживания-оттаивания» [41]. Агробактерии, содержащие рекомбинантные бинарные векторы, выращивали в течение ночи на качалке при 28°C в среде LB, содержащей 50 мг/л рифампицина, 50 мг/л канамицина и 25 мг/л гентамицина. Клетки осаждали центрифугированием при 4000 *g* в течение 5 мин и ресуспендировали в буфере для агроинъекции, содержащем 10 мМ Mes (рН 5.5) и 10 мМ MgSO<sub>4</sub>. Листья растений *Nicotiana benthamiana* инъецировали суспензией агробактерий (*OD*<sub>600</sub> = 0.2) с помощью шприца без иглы. После агроинъекции растения выращивали под лампой дневного света при 16-часовом световом дне и 22°C. Для подавления посттранскрипционного у молчания генов агроинъекцию растений проводили в присутствии гена-супрессора p19 вируса кустистой карликовости томатов.

### Анализ экспрессии капсидного белка ВМАльт при агроинъекции

Высечки из агроинъецированных листьев *N. benthamiana* гомогенизировали в трех-пяти объемах экстракционного буфера (10 мМ Трис, рН 8.0, содержащего 5 мМ EDTA). Полученную суспензию осветляли центрифугированием при 12000 *g* в течение 15 мин. К супернатанту добавляли равный объем денатурирующего буфера для нанесения на полиакриламидный гель (ПААГ). Буфер для нанесения проб на ПААГ содержит 60% глицерина, 20% β-меркаптоэтанола, 10% додецилсульфата натрия, 250 мМ Трис-НСI-буфера, рН 6.8 и 1% бромфенолового синего. Анализируемые пробы прогревали при 95°C в течение 15 мин и фракционировали с помощью электрофореза в 12% ПААГ по методу Лэммли [42] с последующим окрашиванием Кумасси R-250. Синтезированные в листьях *N. benthamiana* химерные капсидные вирусные белки идентифицировали методом Вестерн-блоттинга, как описано ранее [43], с использованием поликлональных антител к КБ ВМАльт и/или М2е-эпитопу и вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена («Sigma»). Продукты реакции визуализировали методом хемилюминесценции с использованием системы ECL («Amersham Biosciences»).

### Выделение капсидных белков ВМАльт из растительной ткани

На шестые-восьмые сутки после заражения листовой материал растирали до образования однородной суспензии в экстракционном буфере (10 мМ Трис, рН 8.0, 5 мМ EDTA). Полученную смесь центрифугировали при 12000 *g* в течение 15 мин и отбирали супернатант, в котором содержались капсидные белки. Для полимеризации КБ ВМАльт и образования ВПЧ к супернатанту добавляли 0.5 М цитратный буфер, рН 4.0, до концентрации 25 мМ и инкубировали в течение 40 мин при комнатной температуре. Псевдовирioны из растительного экстракта осаждали ультрацентрифугированием при 100 000 *g* в течение 120 мин или полиэтиленгликолем (8% ПЭГ 6000, 2% NaCl, 25 мМ цитратный буфер, рН 4.0). Осадки суспендировали в 25 мМ цитратном буфере, рН 4.0, инкубировали в течение 40 мин для корректирующей полимеризации и осветляли центрифугированием при 12000 *g* в течение 15 мин. Полученные препараты химерных ВПЧ подвергали иммуоферментному и электронно-микроскопическому анализу.

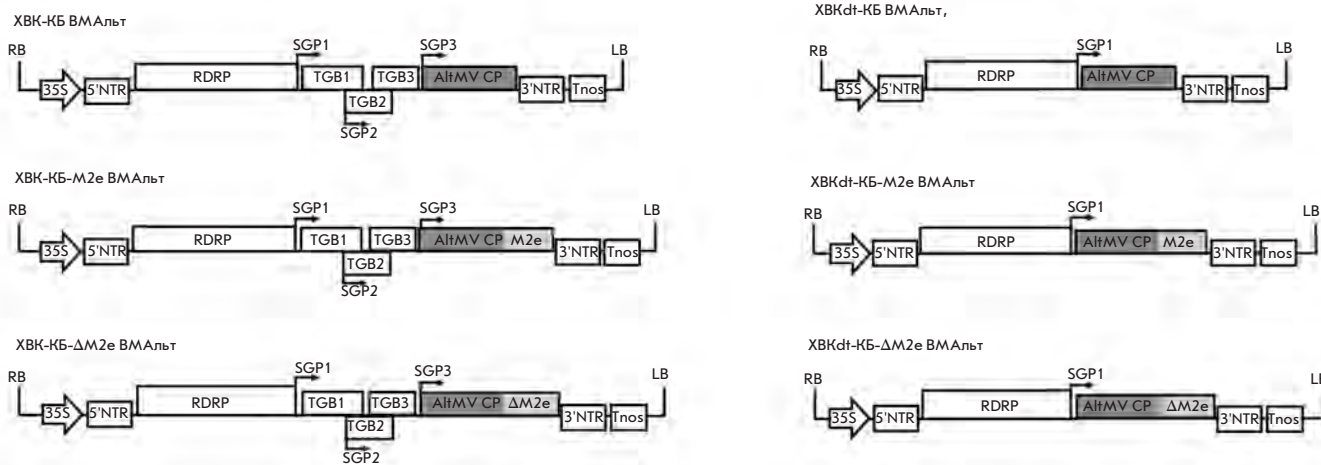
### Электронная микроскопия

Образцы, приготовленные по стандартной методике негативного контрастирования с использованием 1% раствора уранилацетата, просматривали на просвечивающем электронном микроскопе JEM-1011 («JEOL», Япония). Фотографировали при помощи цифровой камеры Gatan Erlangshen ES500W, используя программу Gatan Digital Micrograph. × 250000.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Гибридные вирусные векторы

X-вирус картофеля и вирус мозаики альтернатеры относятся к роду *Potexvirus* (потексвирусы) семейства Flexiviridae. Частицы типового ХВК представляют собой гибкие нитевидные вирионы со спиральной структурой длиной 515 и диаметром 13.5 нм. Около 1300 идентичных субъединиц капсидного белка формируют полярную спираль ХВК с шагом 3.6 нм. Вирусная РНК заключена между витками этой спирали, каждый виток спирали включает 8–9 субъединиц КБ. Частицы имеют полый центральный осевой канал диаметром 3 нм [44, 45]. Систему экспрессии на основе геномов потексвирусов создавали с использованием популярного вектора PVX-201, содержащего полную кДНК-копию генома ХВК UK3, клонированную между 35S промото-ром вируса мозаики цветной капусты (CaMV) и Tnos-терминатором [4]. В качестве донора капсидного белка мы использовали ВМАльт, который серологически близок, но не идентичен вирусу мозаики папайи (ВМП) [46]. Отличие КБ ВМП от КБ типового представителя



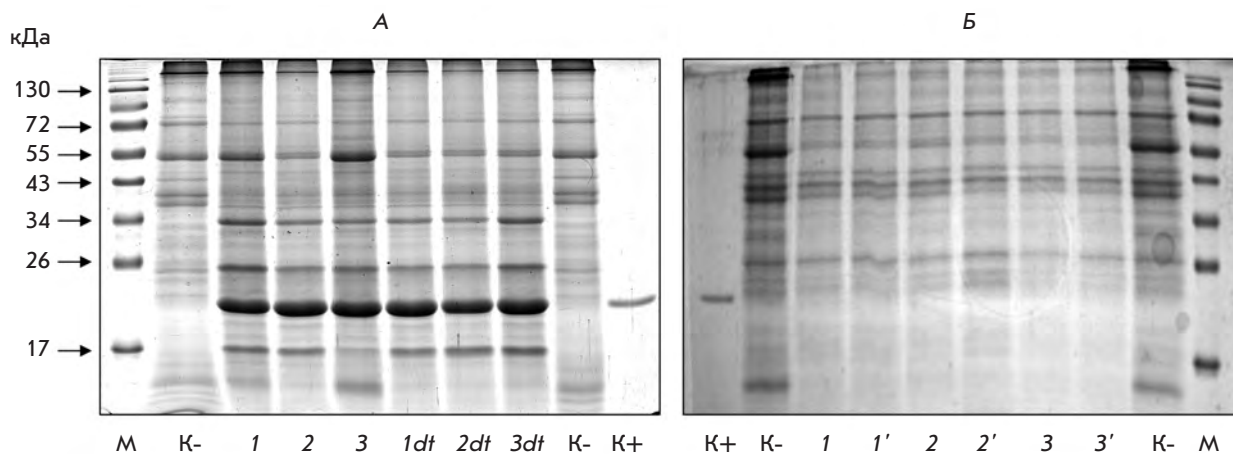
**Рис. 1.** Схемы гибридных векторов, сконструированных на основе геномов потексвирусов – ХВК и ВМАльт. RDRP (RNA dependent RNA polymerase) – ген вирусной РНК-зависимой-РНК-полимеразы; TGB1, TGB2, TGB3 (triple genes block) – тройной блок генов (25, 12 и 8 кДа); SGP (subgenomic promoter) – промоторы субгеномных РНК, обозначены стрелками; AltMV CP (*Alternanthera mosaic virus capsid protein*) – ген капсидного белка ВМАльт; M2e, N-концевой эктодомен белка М2 вируса гриппа А; ΔM2e, укороченный вариант М2е; 35S (promoter for the 35S RNA of CaMV) – промотор 35S РНК вируса мозаики цветной капусты; Tnos (terminator of nopaline synthase) – терминатор транскрипции гена нопалинсинтазы; NTR (non-translatable region) – нетранслируемая область; LB (left border) и RB (right border) – левая и правая границы Т-ДНК. Исходный полногеномный вектор ХВК-КБ ВМАльт и укороченный вектор-репликон ХВКdt-КБ ВМАльт содержали фрагменты ДНК, кодирующие полноразмерный нативный КБ ВМАльт. Полногеномные химерные векторы (ХВК-КБ-М2е ВМАльт, ХВК-КБ-ΔМ2е ВМАльт) и химерные векторы-репликоны (ХВКdt-КБ-М2е ВМАльт, ХВКdt-КБ-ΔМ2е ВМАльт) кодировали химерные белки оболочки: КБ-М2е ВМАльт и КБ-ΔМ2е ВМАльт. Перечисленные конструкции клонировали в бинарный вектор для доставки в листья растений методом агробактериальной инъекции.

потексвирусов – ХВК, состоит в его способности образовывать *in vitro* вирусоподобные частицы со спиральным типом симметрии без участия РНК [47]. Данные электронно-микроскопического анализа препаратов КБ ВМАльт свидетельствуют, что капсидный белок ВМАльт также способен образовывать *in vitro* ВПЧ.

На основе геномов ХВК и ВМАльт мы сконструировали два типа гибридных вирусных векторов: ХВК-КБ ВМАльт (полногеномный вариант) и ХВКdt-КБ ВМАльт (репликон-мини-вариант). Геном ХВК-КБ ВМАльт находится под контролем 35S промотора и Tnos-терминатора, содержит 5'- и 3'-нетранслируемые области РНК ХВК, ген РНК-зависимой-РНК-полимеразы ХВК, тройной блок генов транспорта ХВК. Ген КБ ВМАльт экспрессируется под контролем субгеномного промотора КБ ХВК. Геном ХВКdt-КБ ВМАльт также находится под контролем 35S промотора и Tnos-терминатора, содержит 5'- и 3'-нетранслируемые области РНК ХВК, ген РНК-зависимой-РНК-полимеразы ХВК, но в нем отсутствуют гены транспорта, как и в конструкции, описанной в работе [10]. В вирусных векторах ХВКdt-КБ ВМАльт ген капсидного белка ВМАльт находится под контролем субгеномного промотора белка 25 кДа ХВК.

Известно, что для эффективного синтеза целевого белка вирусный вектор должен содержать определенный набор *cis*-действующих элементов в 3'-нетранслируемой области, которые определяют сродство к репликазе, облегчают транскрипцию и трансляцию, обеспечивая максимальный уровень экспрессии чужеродных генов. Так как в гибридных вирусных векторах 3'-концевой ген КБ ХВК заменен геном КБ ВМАльт, при конструировании векторов мы использовали три модельных варианта 3'-НТО: 3'-НТО ХВК (A)<sub>24</sub>, 3'-НТО ХВК (A)<sub>12</sub> и 3'-НТО ХВК р/ср (A)<sub>12</sub>. 3'-НТО ХВК (A)<sub>12</sub> соответствует 3'-концевой области полноразмерной инфекционной кДНК-копии генома ХВК (PVX-201). В 3'-НТО ХВК (A)<sub>24</sub> отсутствует последовательность АТАААТ, но поли-(А)-тракт увеличен с 12 до 24 А. 3'-НТО ХВК р/ср (A)<sub>12</sub> имеет соответствующий PVX-201 поли-(А)-тракт, но с 5'-конца 3'-НТО увеличена на 60 нуклеотидов за счет прилегающего к НТО 3'-концевого фрагмента гена КБ ХВК.

Таким образом, на первом этапе на основе генома ХВК мы сконструировали два типа гибридных вирусных векторов (рис. 1), ХВК-КБ ВМАльт и мини-вектор-репликон ХВКdt-КБ ВМАльт с тремя



**Рис. 2.** Накопление капсидного белка ВМАльт в листьях *N. benthamiana* после агроинъекции векторами ХВК-КБ ВМАльт и ХВКdt-КБ ВМАльт с различными 3'-НТО (1 и 1dt, 3'-НТО ХВК (A)<sub>24</sub>; 2 и 2dt, 3'-НТО ХВК р/ср (A)<sub>12</sub>; 3 и 3dt, 3'-НТО ХВК (A)<sub>12</sub>). 12% гель (ДСН-ПААГ), окрашенный Кумасси. На гель нанесены экстракты растворимого белка, соответствующие 2.5 мг растительного материала; К+, КБ ВМАльт – 0.5 мкг; К- – неинкулированный лист (отрицательный контроль); маркеры подвижности белков обозначены М. А – Агроинфицированные листья, 8-й день после агроинъекции; Б – верхние системные листья, 16-й (1, 2, 3) и 20-й (1', 2', 3') дни соответственно после агроинъекции нижних листьев.

вариантами 3'-НТО каждый. Все конструкции клонировали в бинарный вектор pBIN19 для последующего инфицирования растений *N. benthamiana* с помощью агробактерий.

#### Репликация гибридных вирусных векторов в листьях растений *N. benthamiana*

Эффективность экспрессии гена КБ ВМАльт различными векторами определяли по накоплению капсидного белка в листьях растений *N. benthamiana* на 6–8 день после агроинъекции. Необходимо отметить, что во всех рассмотренных конструкциях репликация гибридного вирусного вектора ХВК-КБ ВМАльт в растениях *N. benthamiana* приводила к накоплению КБ ВМАльт примерно в тех же количествах, как и КБ ХВК при механической инокуляции растений вирусом (более 1 мг на 1 г зеленой массы). ВМАльт обычно накапливается в растениях в более низких концентрациях (около 340 мкг на 1 г зеленой массы).

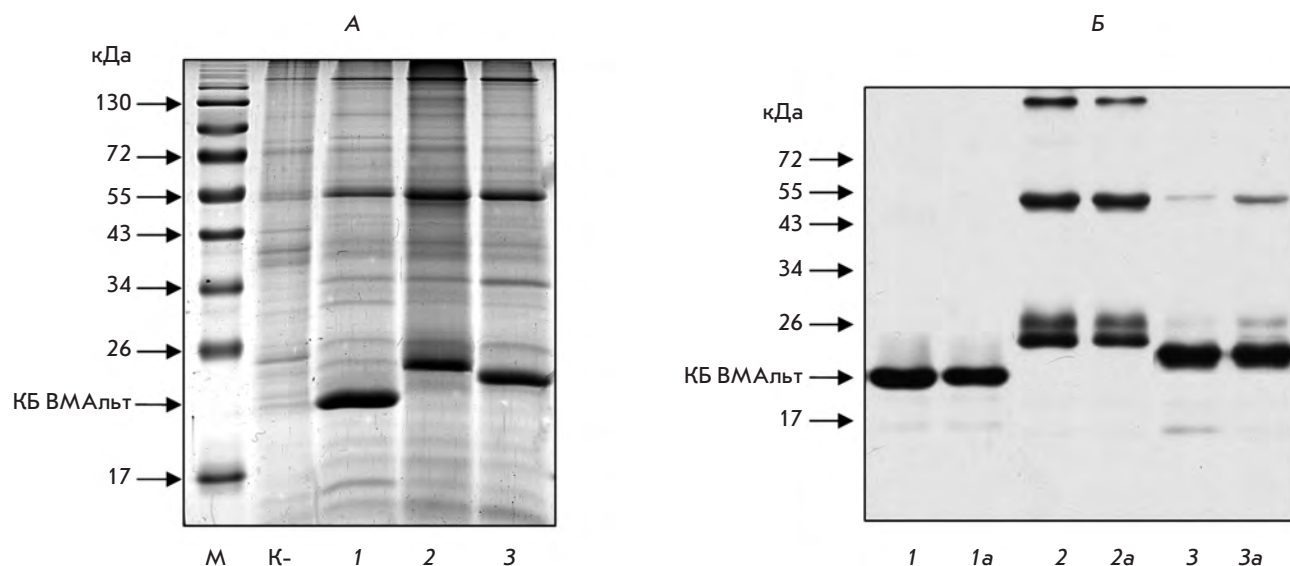
Мы не обнаружили различий в эффективности продукции КБ при использовании различных вариантов 3'-НТО. Удаление 3'-концевого 60-нуклеотидного фрагмента гена КБ ХВК не снижало уровня КБ ВМАльт, в отличие от данных, приведенных в работе [10]. Можно предположить, что имеющейся гомологии между 3'-концевыми областями генов КБ ХВК и КБ ВМАльт достаточно для эффективной работы полимеразы ХВК. Аналогичные результаты, а именно от-

сутствие преимуществ у какого-либо из вариантов 3'-НТО и сходный уровень накопления рекомбинантного КБ ВМАльт, получены и при репликации вирусных векторов ХВКdt-КБ ВМАльт (рис. 2А). В дальнейшем мы использовали векторные конструкции только с одним вариантом 3'-НТО – с 3'-НТО ХВК (A)<sub>12</sub> (рис. 1).

По накоплению рекомбинантного капсидного белка ВМАльт в листьях растений *N. benthamiana* на 6–8 день после агроинокуляции в присутствии гена-супрессора умолкания генов (гена белка р19 вируса кустистой карликовости томатов) мини-векторы ХВКdt-КБ ВМАльт не превосходили векторы ХВК-КБ ВМАльт (рис. 2А).

Известно, что функция межклеточного и системного транспорта ХВК в растениях контролируется четырьмя генами, включая тройной блок генов (ТГВ) и КБ [4]. В «системных», не агроинфицированных листьях растений *N. benthamiana*, агроинокулированных гибридными вирусными векторами ХВК-КБ ВМАльт на 16–20 день мы не обнаружили рекомбинантного КБ ВМАльт (рис. 2Б). Таким образом, замена гена КБ ХВК в рекомбинантных гибридных вирусных векторах на ген КБ ВМАльт приводит к нарушению системного транспорта гибридного вируса.

Электронно-микроскопический анализ экстрактов листьев растений *N. benthamiana*, агроинокулированных гибридными вирусными векторами ХВК-КБ ВМАльт и ХВКdt-КБ ВМАльт, показал, что реком-



**Рис. 3.** Накопление КБ ВМАльт и химерных капсидных белков ВМАльт в листьях *N. benthamiana* на шестой день после агроинъекции векторами ХВК-КБ ВМАльт (1) и ХВКΔt-КБ ВМАльт (1a), ХВК-КБ-М2е ВМАльт (2) и ХВКΔt-КБ-М2е ВМАльт (2a), ХВК-КБ-ΔМ2е ВМАльт (3) и ХВКΔt-КБ-ΔМ2е ВМАльт (3a); А – 12% гель (ДСН-ПААГ), окрашенный Кумасси. На гель нанесены экстракты растворимого белка, соответствующие 1.5 мг растительного материала; К- – отрицательный контроль; Б – Вестерн-блот-анализ экстрактов растворимых белков из листьев, агроинкулированных вирусными векторами, с использованием мышиных поликлональных антител к КБ ВМАльт. Маркеры подвижности белков – М. Стрелкой отмечено положение КБ ВМАльт.

бинантный капсидный белок ВМАльт способен формировать протяженные вирусоподобные частицы (см. далее), которые можно использовать в качестве платформы для презентации чужеродных эпитопов. Спектр УФ-поглощения в диапазоне 225–339 нм препарата ВПЧ КБ ВМАльт, выделенного из растительного экстракта, свидетельствует об отсутствии в нем РНК (данные не приведены).

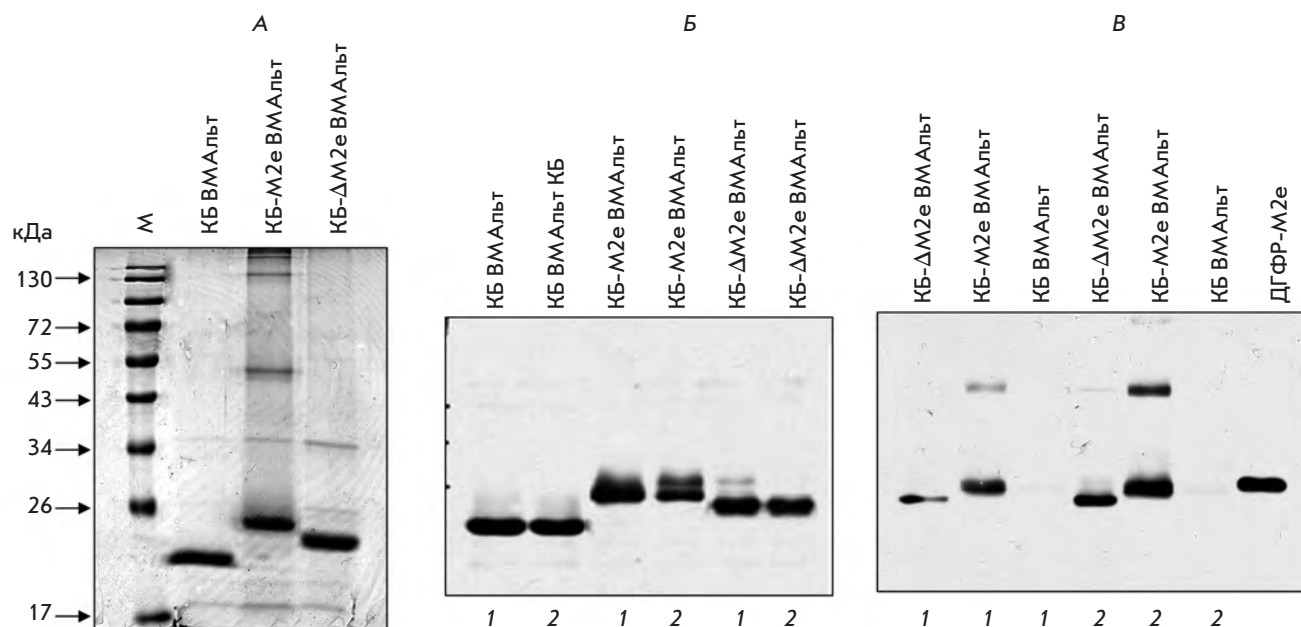
Необходимо отметить, что ВПЧ со спиральным типом симметрии при использовании в качестве платформы для презентации эпитопов патогена имеют некоторое преимущество перед ВПЧ с икосаэдрическим типом симметрии: большее число субъединиц в ВПЧ и соответственно возможность презентации химерными КБ в ВПЧ значительно большего числа эпитопов патогена.

#### **Конструирование гибридных вирусных векторов, экспрессирующих химерные капсидные белки ВМАльт**

В качестве модельного чужеродного пептида при создании химерного КБ ВМАльт мы использовали N-концевой домен белка М2 (М2е) вируса гриппа А и его укороченный вариант (ΔМ2е), ответственные за индукцию протективного иммунного ответа [48]. Матриксный (М2) белок вируса гриппа А считается

перспективным кандидатом для создания противовирусной вакцины, так как аминокислотная последовательность эктодомена этого белка (М2е) высококонсервативна и практически не изменилась с момента первого выделения в 1933 г. вируса гриппа А человека [49]. На основании компьютерного анализа 55 изолятов вируса гриппа А человека предложена консенсусная синтетическая аминокислотная последовательность эктодомена белка М2 [50].

Так как конформационная структура КБ ВМАльт в настоящее время не известна, поиск оптимального сайта инсерции, который, с одной стороны, обеспечивает презентацию гетерологичного эпитопа на поверхности капсидного белка, а с другой, минимально влияет на конформацию КБ и не препятствует формированию полимерных структур, проводили с использованием пакета программ DNASTar. В результате выбрали С-концевую локализацию М2е-эпитопа и ΔМ2е-варианта в составе химерного КБ ВМАльт. Нуклеотидная последовательность М2е-эпитопа и ΔМ2е-варианта была сконструирована на основе соответствующей консенсусной аминокислотной последовательности N-концевого домена белка М2 вируса гриппа А с использованием синонимических кодонов, наиболее часто встречающихся в геноме ХВК и капсидного белка ВМАльт.



**Рис. 4.** Анализ препаратов ВПЧ, образованных КБ ВМАльт и химерным капсидным белком ВМАльт с эпитопами белка М2 вируса гриппа А. Препараты ВПЧ выделены из растительного экстракта листьев растений *N. benthamiana* преципитацией полиэтиленгликолем (1) или дифференциальным центрифугированием (2). А – Электрофоретический анализ препаратов ВПЧ, выделенных дифференциальным центрифугированием. 12% гель (ДСН-ПААГ), окрашенный Кумасси. Б – Вестерн-блот-анализ препаратов ВПЧ с использованием поликлональных антител к КБ ВМАльт. В – Вестерн-блот-анализ препаратов ВПЧ с использованием поликлональных антител к М2е-эпиту. ДГФР-М2е – рекомбинантный белок (ген дигидрофолатредуктазы слит с нуклеотидной последовательностью М2е-эпитопа), который использовали в качестве иммуногена для получения антител к М2е-эпиту вируса гриппа А; положительный контроль на М2е-эпитоп.

Методом ПЦР получены гены химерных КБ ВМАльт, кодирующие полноразмерный эктодомен белка М2 (23 аминокислотных остатка, М2е-эпитоп), SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD, и укороченный вариант, ΔМ2е (8 аминокислотных остатков, EVETPIRN), слитые с С-концом КБ (КБ-М2е ВМАльт и КБ-ΔМ2е ВМАльт). При помощи клонирования в гибридных вирусных векторах ХВК-КБ ВМАльт и ХВКdt-КБ ВМАльт последовательности вирусного капсидного белка заменяли последовательностями химерных капсидных белков.

Таким образом, на основе генома ХВК нами сконструированы четыре гибридных вирусных вектора, содержащие гены химерных капсидных белков ВМАльт (рис. 1): ХВК-КБ-М2е ВМАльт и его мини-вариант ХВКdt-КБ-М2е ВМАльт; ХВК-КБ-ΔМ2е ВМАльт и его мини-вариант ХВКdt-КБ-ΔМ2е ВМАльт. Этими конструкциями трансформировали компетентные клетки агробактерий для инфицирования растений *N. benthamiana*.

#### Экспрессия химерных капсидных белков ВМАльт в листьях растений *N. benthamiana*

Гибридные вирусные векторы на основе генома ХВК, кодирующие гены химерных капсидных белков ВМАльт (КБ-М2е и КБ-ΔМ2е), агроинъецировали в листья растений *N. benthamiana*. На шестые-восьмые сутки после агроинъекции синтез химерных белков оценивали количественно фракционированием растворимых белков в ПААГ и окраской Кумасси (рис. 3А). Химерные капсидные вирусные белки идентифицировали методом Вестерн-блотинга с поликлональными антителами к КБ ВМАльт или к М2е-эпиту (рис. 3Б). Как и в случае КБ ВМАльт, мы не обнаружили различий в накоплении химерных капсидных белков при репликации полноразмерного гибридного вирусного вектора или его мини-варианта. Продукция КБ-М2е и КБ-ΔМ2е зависела от индивидуальных особенностей растения, ярусности листа, условий сезонности. Тем не менее, из электрофореграмм, представленных на рис. 3, следует, что уровень накопления химерных капсидных белков ВМАльт (КБ-М2е и КБ-ΔМ2е) в листьях



растений сравним с уровнем рекомбинантного КБ ВМАльт и составляет более 1 мг (в некоторых опытах до 3 мг) на 1 г зеленой массы.

Химерные капсидные белки ВМАльт с М2е-эпитопом и ΔМ2е-вариантом, так же как и исходный капсидный белок ВМАльт, формируют протяженные вирусоподобные частицы при снижении рН до 4.0–4.9 в условиях низкой ионной силы раствора. Препарат химерных ВПЧ можно выделить из растительного экстракта дифференциальным центрифугированием или преципитацией полиэтиленгликолем. На рис. 4 и рис. 5 представлены результаты электрофоретического, иммуноферментного и электронно-микроскопического анализов препаратов химерных ВПЧ. Как следует из приведенных данных, в процессе накопления, полимеризации и выделения эпитопы белка М2 вируса гриппа А не элиминируются, что свидетельствует о стабильности химерного КБ ВМАльт при С-концевой локализации чужеродного эпитопа. Тот факт, что чужеродный эпитоп при С-концевой локализации не препятствует полимеризации химерного КБ ВМАльт, указывает на различия в конформации С-концевых областей КБ ВМАльт и ХВК [51].

### ВЫВОДЫ

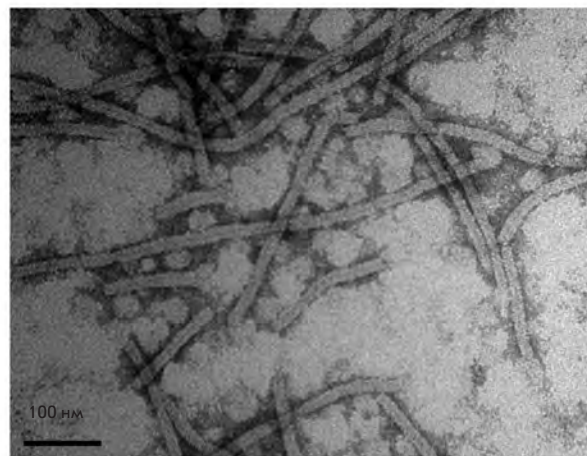
Цель нашей работы состояла в создании системы презентации гетерологичных эпитопов (эпитопов патогена) на поверхности вирусоподобных частиц, образованных капсидным белком фитовируса. На основе генома ХВК и гена КБ ВМАльт сконструированы гибридные вирусные векторы ХВК-КБ ВМАльт и ХВКdt-КБ ВМАльт, обладающие рядом преимуществ по сравнению с исходными вирусами, ХВК и ВМАльт:

1) уровень накопления рекомбинантного капсидного белка ВМАльт при агроинъекции листьев растений *N. benthamiana* гибридными вирусными векторами достигает 1 мг/г растительного материала, что значительно превышает накопление при механической инокуляции природного хозяина;

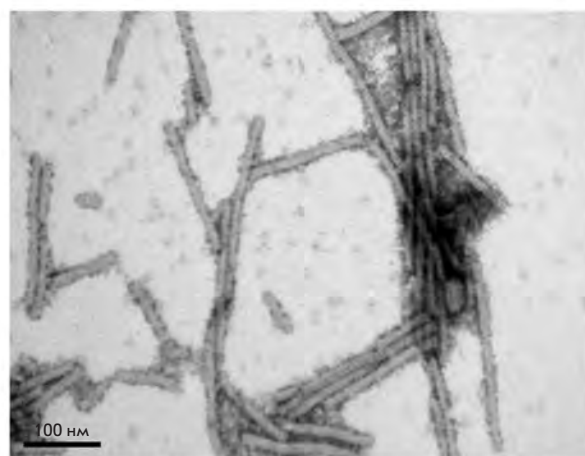
2) замена гена КБ ХВК в гибридных вирусных векторах на ген КБ ВМАльт приводит к подавлению системного транспорта гибридного вируса и нарушению формирования вирусных частиц;

3) способность формировать ВПЧ обеспечивается особенностью капсидного белка ВМАльт, КБ ХВК не обладает способностью образовывать ВПЧ.

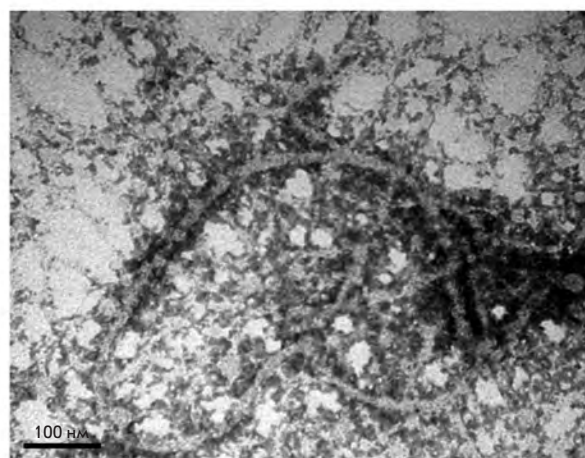
Представленные результаты указывают на возможность применения вирусных векторов ХВК-КБ ВМАльт и ХВКdt-КБ ВМАльт в биотехнологии для продукции вакцинных белков в растениях. Капсидный белок ВМАльт, накапливающийся в высоких концентрациях и формирующий в отсутствие



КБ ВМАльт



КБ-ΔМ2е ВМАльт



КБ-М2е ВМАльт

Рис. 5. Электронно-микроскопический анализ препаратов ВПЧ, выделенных из растительного экстракта листьев растений *N. benthamiana*, образованных КБ ВМАльт, КБ-ΔМ2е ВМАльт и КБ-М2е ВМАльт. Негативное контрастирование 1% раствором уранил-ацетата; × 250000.

геномной РНК вирусоподобные наночастицы, может служить платформой для эффективной презентации на поверхности ВПЧ эпитопов инфекционных агентов человека и животных. Химерные капсидные белки ВМАльт с модельными гетерологичными пептидами, эпитопами белка М2 вируса гриппа А, также способны формировать стабильные ВПЧ. Система экспрессии на основе гибридных вирусных векторов ХВК-КБ ВМАльт и ХВКdt-КБ ВМАльт является генетически безопасной; использование этой векторной системы позволяет избежать самопроизвольного вертикального и горизонтального заражения растений, неконтролируемого распространения генетического материала в окружающей среде. ●

*Авторы выражают благодарность П.А. Иванову за предоставление кДНК копии 3'-концевой области геномной РНК ВМАльт, А. Мухамеджановой за препарат мышинных антител к КБ ВМАльт и Т.В. Гасановой за препарат мышинных антител к эпитопу М2е вируса гриппа А.*

*Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (государственный контракт 02.527.11.0002) и 7-й рамочной программы Европейского союза (проект PLAPROVA).*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Giddings G., Allison G., Brooks D., Carter A. // *Nat. Biotechnol.* 2000. V. 18. № 11. P. 1151–1155.
- Lindbo J.A. // *Biotechnology.* 2007. V. 7. P. 1–11.
- Yusibov V., Rabindran S., Commandeur U., Twyman R.M., Fischer R. // *Drugs.* 2006. V. 7. № 4. P. 203–217.
- Baulcombe D.C., Chapman S., Santa Cruz S. // *Plant J.* 1995. V. 7. № 6. P. 1045–1053.
- Shivprasad Sh., Pogue G.P., Lewandowski D.J., Hidalgo J., Donson J., Grill L.K., Dawson W.O. // *Virology.* 1999. V. 255. № 2. P. 312–323.
- Wagner B., Fuchs H., Adhami F., Ma Y., Scheiner O., Breiteneder H. // *Methods.* 2004. V. 32. № 3. P. 227–234.
- Takamatsu N., Ishikawa M., Meshi T., Okada Y. // *EMBO J.* 1987. V. 6. № 2. P. 307–311.
- Ravin N.V., Kuprianov V.V., Zamchuk L.A., Kochetov A.V., Dorokhov Yu.L., Atabekov J.G., Skryabin K.G. // *Biochemistry (Moscow).* 2008. V. 73. № 10. P. 1108–1113.
- Ravin N.V., Mardanov E.S., Kotyarov R.Y., Novikov V.K., Atabekov J.G., Skryabin K.G. // *Biochemistry (Moscow).* 2008. V. 73. № 1. P. 44–49.
- Komarova T.V., Skulachev M.V., Zvereva A.S., Schwartz A.M., Dorokhov Yu.L., Atabekov J.G. // *Biochemistry (Moscow).* 2006. V. 71. № 8. P. 846–850.
- Natilla A., Hammond R.W., Nemchinov L.G. // *Arch. Virol.* 2006. V. 151. № 7. P. 1373–1386.
- Huang Z., Santi L., LePore K., Kilbourne J., Arntzen Ch.J., Mason H.S. // *Vaccine.* 2006. V. 24. № 14. P. 2506–2513.
- Santi L., Barchelora L., Huang Z., Hjelm B., Kilbourne J., Arntzen Ch.J., Chen Q., Hugh S., Mason H.S. // *Vaccine.* 2008. V. 26. № 15. P. 1826–1824.
- Santa Cruz S., Chapman S., Roberts A.G., Roberts I.M., Prior D.A., Oparka K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. № 13. P. 6286–6290.
- Unde K., Fischer R., Commandeur U. // *Arch. Virol.* 2005. V. 150. № 2. P. 327–340.
- Werner S., Marillonner S., Hause G., Klimyuk V., Gleba Y. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. № 47. P. 17678–17683.
- Zelada A.M., Calamante G., Santangelo M., Bigi F., Verna F., Mentaberry A., Cataldi A. // *Tuberculosis.* 2006. V. 86. № 3–4. P. 263–267.
- Molnar E., Dopfer E.P., Deswal S., Schamel W.W. // *Curr. Pharm. Des.* 2009. V. 15. № 28. P. 3237–3248.
- Lico C., Chen Q., Santi L. // *J. Cell Physiol.* 2008. V. 216. № 2. P. 366–377.
- Noad R., Roy P. // *Trends Microbiol.* 2003. V. 11. № 9. P. 438–444.
- Denis J., Majeau N., Acosta-Ramirez E., Savard Ch., Bedard M.C., Simard S., Lecours K., Bolduc M., Pare Ch., Willems B., et al. // *Virology.* 2007. V. 363. № 1. P. 59–68.
- Denis J., Acosta-Ramirez E., Zhao Y., Hamelin M.-E., Koukavica I., Baz M., Abed Y., Savard Ch., Pare Ch., Macias C.L., et al. // *Vaccine.* 2008. V. 26. № 27–28. P. 3395–3403.
- McCormick A.A., Palmer K.E. // *Expert. Rev. Vaccines.* 2008. V. 7. № 1. P. 33–41.
- Brennan F.R., Jones T.D., Longstaff M., Chapman S., Bellaby T., Smith H., Xu F., Hamilton W.D.O., Flock J.I. // *Vaccine.* 1999. V. 17. № 15–16. P. 1846–1857.
- Porta C., Spall V.E., Loveleand J., Johnson J.E., Barker P.J., Lomonosoff G.P. // *Virology.* 1994. V. 202. № 2. P. 949–955.
- Joelson T., Akerblom I., Oxelfelt P., Strandberg B., Tomenius K., Morris T.J. // *J. Gen. Virol.* 1997. V. 78. № 6. P. 1213–1217.
- Natilla A., Piazzolla G., Nuzzaci M., Saldarelli P., Tortorella C., Antonaci S., Piazzolla P. // *Arch. Virol.* 2004. V. 149. № 1. P. 137–154.
- Мещерякова Ю.А., Эльдаров М.А., Мигунов А.И., Степанова Л.А., Репко И.А., Киселев О.И., Ломоносов Д.П., Скрябин К.Г. // *Молекуляр. биология. (Москва).* 2009. V. 43. № 4. P. 741–750.
- Wu L., Jiang L., Zhou Z., Fan J., Zhang Q., Zhu H., Han Q., Xu Z. // *Vaccine.* 2003. V. 21. № 27–30. P. 4390–4398.
- Jiang L., Li Q., Li M., Zhou Z., Wu L., Fan J., Zhang Q., Zhu H., Xu Z. // *Vaccine.* 2006. V. 24. № 2. P. 109–115.
- Lico Ch., Mancini C., Italiani P., Betti C., Boraschi D., Benvenuto E., Baschieri S. // *Vaccine.* 2009. V. 27. № 31. P. 5069–5076.
- Palmer K.E., Benko A., Doucette S.A., Cameron T.I., Foster T., Hanley K.M., McCormick A.A., McCulloch M., Pogue G.P., Smith M.L., Christensen N.D. // *Vaccine.* 2006. V. 24. № 26. P. 5516–5525.
- Fujiyama K., Sarjung W., Yanagihara I., Nakado J., Misaki R., Honda T., Watanabe Y., Seki T. // *J. Biosci. Bioengin.* 2006. V. 101. № 5. P. 398–402.
- Komarova T.V., Baschieri S., Donini M., Marusic C., Benvenuto E., Dorokhov Yu.L. // *Expert. Rev. Vaccines.* 2010. V. 9. № 8. P. 859–876.
- Nemchinov L.G., Natilla A. // *Protein Expr. Purif.* 2007. V. 56. № 2. P. 153–159.
- Leclerc D., Beauseigle D., Denis J., Morin H., Pare Ch., Lama-

- re A., Lapointe R. // *J. Virol.* 2007. V. 81. № 3. P. 1319–1326.
37. Morin H., Tremblay M.-H., Plante E., Pare Ch., Majeau N., Hogue R., Leclerc D. // *J. Biotechnol.* 2007. V. 128. № 2. P. 423–434.
38. Saunders K., Sainsbury F., Lomonosoff G.P. // *Virology.* 2009. V. 393. № 2. P. 329–327.
39. Kothyarov R.Y., Kuprianov V.V., Migunov A.I., Stepanova L.A., Tsybalova L.M., Kiselev O.L., Ravin N.V., Skryabin K.G. // *Acta Naturae.* 2010. V. 2. № 2(5). P. 71–76.
40. Sambrook J., Russel D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* N.Y.: CSHL Press, 2001.
41. Chen H., Nelson R.S., Sherwood J.L. // *Biotechniques.* 1994. V. 16. № 4. P. 664–668.
42. Laemmli U. // *Nature.* 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
43. Tyulkina L.G., Karger E.M., Sheveleva A.A., Atabekov J.G. // *J. Gen. Virol.* 2010. V. 91. № 6. P. 1621–1628.
44. Tollin P., Wilson H.R. // *The Plant Viruses* / Ed. Milne R.C. N.Y.: Plenum Press, 1988. V. 4. P. 51.
45. Atabekov J.G., Dobrov E.N., Karpova O.V., Rodionova N.P. // *Molec. Plant Pathol.* 2007. V. 8. № 5. P. 667.
46. Geering A.D.W., Thomas J.E. // *Arch. Virol.* 1999. V. 144. № 3. P. 577–592.
47. Erickson J.W., Bancroft J.B. // *Virology.* 1976. V. 72. № 2. P. 514–517.
48. Liu W., Zou P., Chen Y.-H. // *Immunol. Lett.* 2004. V. 93. № 2–3. P. 131–136.
49. Liu W., Zou P., Jian D., Chen Y.-H. // *Microb. Infect.* 2005. V. 7. № 2. P. 171–177.
50. Fiers W., De Filette M., Birkett A., Neiryneck S., Min Jou W. // *Virus Res.* 2004. V. 103. № 1–2. P. 173–176.
51. Lukashina E., Badun G., Fedorova N., Ksenofontov A., Nemykh M., Serebryakova M., Mukhamedzhanova A., Rodionova N., Baratova L., Dobrov E. // *FEBS J.* 2009. V. 276. № 23. P. 7006–7015.