

BULKO O.V., LIOSHINA L.G.

*Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry NAS of Ukraine
Ukraine, 02160, Kyiv, Kharkivske hwy, 50, e-mail: obulko@mail.ru*

SOMATIC EMBRYOGENESIS FROM ZYGOTIC EMBRYOS AND CALLUS *GINKGO BILOBA* L.

Aims. Development of biotechnology *Ginkgo biloba* L. somatic embryos from zygotic embryos on hormone-free media and from callus culture on different modifications of media. **Methods.** Immature zygotic embryos and callus were cultured on different media modifications (pH, glucose content makrosalt) in the light at 24±2°C for one month to induce embryogenesis. At various stages of development the cytological analysis was carried. **Results.** We have shown that by choosing the media (the glucose reduction to 1% and a decrease makrosalt twice) from immature embryos of somatic embryos can be obtained without the use of exogenous phytohormones. Adding to the callus culture 1 mg/l BA +0.05 mg/l NAA and 1 mg/l kinetin+0.05 mg/l NAA, incubated in the light can stimulate the formation of somatic embryos, and 1mg/l NAA and 0,1mg/l IBA initiates rhizogenesis. **Conclusions.** From immature embryos of *Ginkgo biloba* can be obtained somatic embryos without the exogenous phytohormones using different media compounds. Formation somatic embryos in callus ginkgo is possible only on the media with hormones.

Key words: *Ginkgo biloba* L., somatic embryogenesis, zygotic embryos, callus.

ГЕРАСИМЕНКО И.М., ШЕЛУДЬКО Ю.В.

*Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины
Украина, 03680, Киев, ул. Заболотного 148, e-mail: ysheludko@ukr.net*

ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКИЕ ТРАНЗИТНЫЕ ПЕПТИДЫ ОБЕСПЕЧИВАЮТ ИМПОРТ РЕПОРТЕРНОГО БЕЛКА В ХЛОРОПЛАСТЫ С РАЗНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ

Использование растений в качестве систем для синтеза гетерологических белков имеет ряд важных преимуществ. Прежде всего это возможность пост-трансляционных модификаций эукариотического типа, относительно низкая вероятность загрязнения готового продукта патогенами и токсинами, опасными для человека, а также сравнительно низкая себестоимость производства [1]. Основным недостатком генетически-модифицированных растений с точки зрения биотехнологии является обычно низкое содержание целевого белка в результате невысокого уровня экспрессии трансгена и/или действия растительных протеаз. Разработаны подходы, позволяющие увеличить количество накапливающегося белка за счет оптимизации разных процессов: трансформации растений и интеграции трансгена, его транскрипции, трансляции и обеспечения стабильности конечного продукта [2]. Подбирая компартмент растительной клетки, оптимальный для накопления гетерологического белка, часто удается значительно повысить стабильность и, следовательно, содержание целевого продукта [2, 3].

Белки, которые кодируются ядерными генами и функционируют в хлоропластах, синтезируются в виде предшественников, имеющих

на N-конце так называемый транзитный пептид, который удаляется в ходе транспорта. Транзитные пептиды после фосфорилирования цитоплазматическими протеинкиназами в комплексе с шаперонами взаимодействуют с системами транслокации через мембраны хлоропластов, которые обеспечивают энергозависимый транспорт внутрь органеллы [4]. Присоединение к N-концу белка гетерологического транзитного пептида приводит к накоплению целевого продукта внутри хлоропластов [5], однако есть данные о том, что использование аналогичных сигналов внутриклеточного транспорта из разных видов может значительно влиять на уровень накопления рекомбинантного белка [3, 6].

Для накопления рекомбинантных белков в хлоропластах нами были выбраны два транзитных пептида (предшественников малой субъединицы рибулозобисфосфаткарбоксилазы *Nicotiana tabacum* и активазы рубиско *Spinacia oleracea*). Была подтверждена их способность обеспечивать транспорт репортерного зеленого флуоресцентного белка в хлоропласты *N. excelsior* и показана различная эффективность этого процесса при помощи исследованных транзитных пептидов.

Материалы и методы

Для подбора транзитных пептидов использовали информацию о внутриклеточной локализации белков, полученную из базы данных UniProt (<http://www.uniprot.org/>). Избранные нуклеотидные последовательности (кодирующие аминокислоты 1-57 предшественника малой субъединицы рубиско *Nicotiana tabacum*, Асс.Но. Р69249, и аминокислоты 1-58 предшественника активазы рубиско *Spinacia oleracea*, Асс.Но. Р10871), фланкированные сайтами узнавания эндонуклеаз рестрикции *ClaI* и *NcoI*, были синтезированы (GenScript, США) и встроены в векторные конструкции, созданные на основе pBIN19, в одной рамке считывания с геном зеленого флуоресцентного белка (GFP) под контролем 35S промотора ВМЦК (Рис.1). В последовательность, кодирующую транзитный пептид предшественника малой субъединицы рубиско *N. tabacum*, была введена мутация G→C

в предпоследней позиции для создания сайта *NcoI*. В работе использовали ЭР и Т4 ДНК лигазу New England Biolabs (США) и наборы для выделения плазмидной ДНК (NucleoSpin Plasmid) и экстракции ДНК из агарозных гелей (NucleoSpin Extract) (Macherey-Nagel, ФРГ). Конструирование векторных молекул проводили с использованием стандартных методик [7] в штамме *E. coli* XL1Blue. Готовые генетические конструкции переносили в штамм *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. Транзientную экспрессию проводили в листьях тепличных растений *N. excelsior* с использованием супрессора замолкания генов p19 вируса кустистой карликовости томата (Tomato bushy stunt virus) по описанной ранее методике [8]. Интенсивность флуоресценции GFP на поверхности листьев измеряли с помощью спектрофлуориметра Флюорат-02 (Люмэкс, Россия).

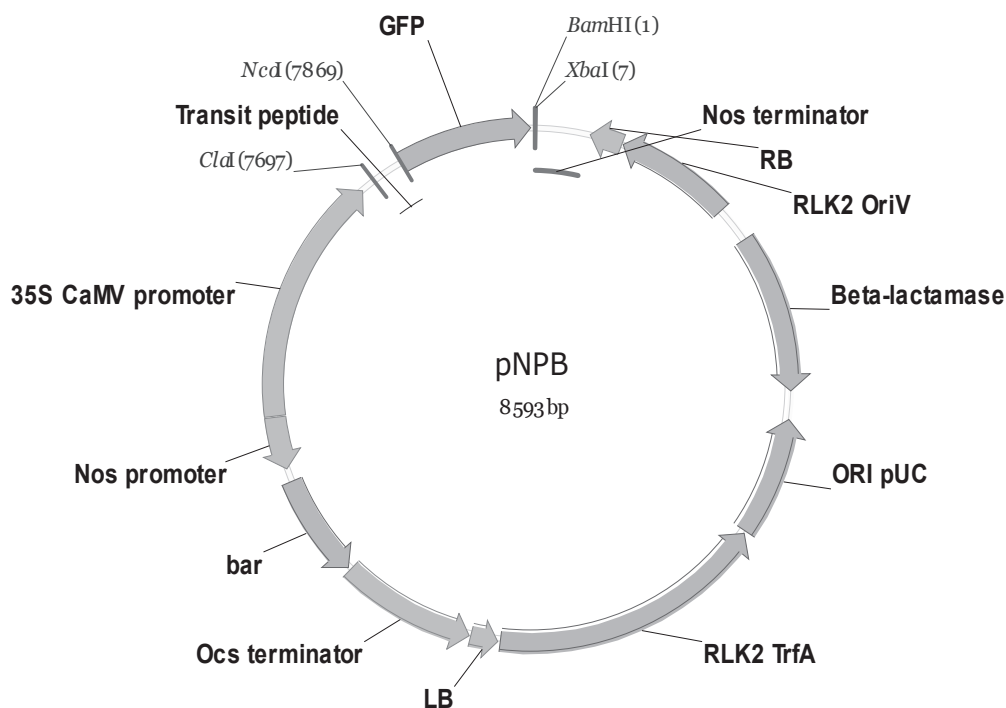


Рис. 1. Схема генетических конструкций для накопления целевых белков в хлоропластах. Transit peptide – последовательность, кодирующая транзитный пептид (tpRbs - предшественника малой субъединицы рубиско *Nicotiana tabacum* в конструкции pNPB0107 или tpRca - предшественника активазы рубиско *Spinacia oleracea* в конструкции pNPB0108)

Результаты и обсуждение

Последовательности, кодирующие транзитные пептиды предшественников малой субъединицы рубиско *Nicotiana tabacum* (tpRbs) и активазы рубиско *Spinacia oleracea* (tpRca), были слиты в одной рамке считывания с геном зеленого флуоресцентного белка (GFP). Полученные гены были транзientно экспрессированы в

листьях *N. excelsior* для подтверждения способности избранных транзитных пептидов обеспечивать транспорт рекомбинантных белков в хлоропласты. В качестве контроля использовали ген GFP без транспортных сигналов. В соответствии с литературными данными [8], интенсивность флуоресценции контрольного репортерно-

го белка достигла максимума на 4-5 день после инфильтрации и в дальнейшем постепенно снижалась. Сходную динамику накопления репортерного белка наблюдали и при использовании гена *tpRbs::GFP*, хотя интенсивность была выше по сравнению с контролем. Снижение интенсивности флуоресценции происходило медленнее, чем в контроле, и до конца периода измерений она была выше при экспрессии гена *tpRbs::GFP* (рис. 2).

Существенные отличия динамики изменения флуоресценции репортера наблюдали при экспрессии гена *tpRca::GFP*. Если в первые четыре дня после инфильтрации интенсивность флуоресценции быстро нарастала, как и при использовании других генов, то впоследствии снижение интенсивности флуоресценции происходило значительно медленнее (рис. 2). До четвертого дня интенсивность флуоресценции продукта гена *tpRca::GFP* была ниже, чем *tpRbs::GFP*, а на пятый день соотношение стало обратным. В дальнейшем интенсивность флуоресценции листьев, экспрессирующих *tpRca::GFP*, была выше, чем при использовании как контрольного гена, так и *tpRbs::GFP*. Заметный уровень флуоресценции при экспрессии *tpRca::GFP* сохранялся даже на 50-й день после

инфильтрации, несмотря на старение листьев.

Микроскопическое исследование клеток, транзитно экспрессирующих изучаемые гены на 5-ый день после инфильтрации, показало, что оба транзитных пептида обеспечивают транспорт репортерного белка в хлоропласты. Однако при экспрессии гена *tpRbs::GFP* зеленая флуоресценция наблюдалась не только в хлоропластах, но и в цитоплазме, в отличие от продукта гена *tpRca::GFP*, который обнаруживается только в пластидах.

В проведенных опытах репортерный белок синтезировался в результате транзитной экспрессии генов, которая происходит в течение нескольких дней (наиболее активно как правило до 4-го дня [9]), о чем свидетельствует быстрое увеличение интенсивности флуоресценции в первые 4-5 дней после инфильтрации. В дальнейшем уровень транзитной экспрессии снижается и накопленный белок постепенно разрушается под действием протеаз. Замедленное снижение интенсивности флуоресценции листьев при экспрессии *tpRca::GFP* объясняется, по нашему мнению, более эффективным импортом репортера в хлоропласты, где его стабильность выше, чем в цитоплазме.

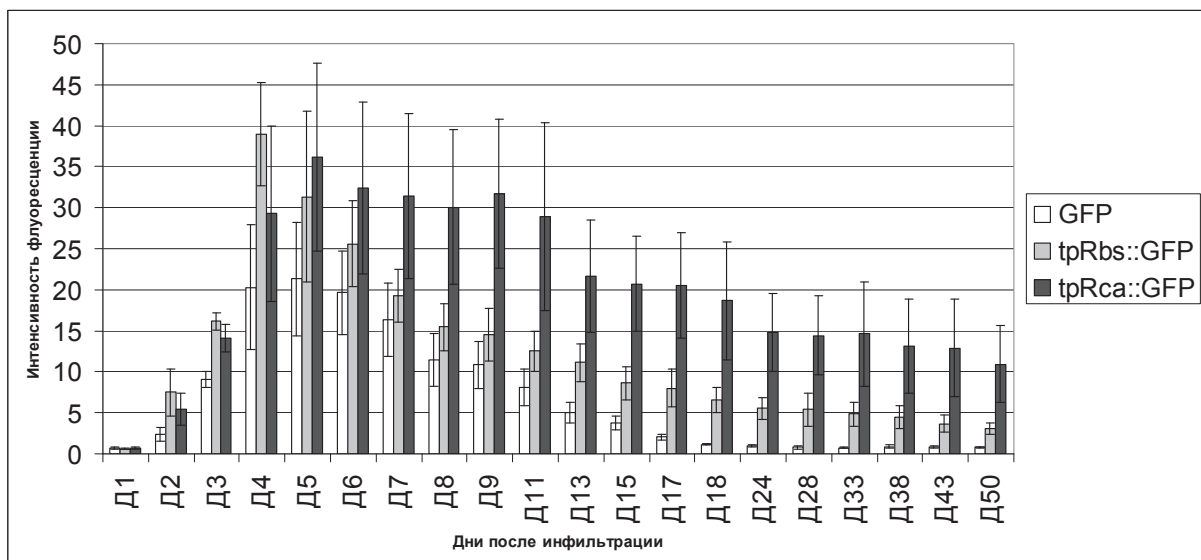


Рис. 2. Интенсивность флуоресценции листьев *N. excelsior*, транзитно экспрессирующих гены зеленого флуоресцентного белка без сигналов внутриклеточного транспорта (GFP) и с транзитными пептидами предшественников малой субъединицы рубиско *Nicotiana tabacum* (*tpRbs::GFP*) и активазы рубиско *Spinacia oleracea* (*tpRca::GFP*). На диаграмме представлены доверительные интервалы ($P=0,95$)

По литературным данным, транзитные пептиды можно разделить на группы в зависимости от их способности обеспечивать импорт белков в хлоропласты в листьях разного возраста

[10]. Возможно, неполный транспорт репортера в хлоропласты при помощи *tpRbs* в наших опытах можно объяснить неоптимальным для этого транзитного пептида возрастом листьев,

однако это предположение требует дальнейшей экспериментальной проверки.

Аминокислотные последовательности транзитных пептидов не обнаруживают заметной гомологии, однако имеют сходные физико-химические свойства и, предположительно, пространственные структуры [11]. N-концевой участок транзитных пептидов незаряжен, остальная часть включает несколько положительно заряженных аминокислотных остатков. Вся последовательность обогащена гидроксильными аминокислотами. В водной среде транзитные пептиды не структурированы, при взаимодействии с мембранами пластид частично приобретают α -спиральную конформацию. Предполагается, взаимодействию транзитных пептидов с

фосфо- и гликолипидами пластидных мембран способствуют положительно заряженные и гидроксильные аминокислотные остатки [11]. Возможно, *trRca* обеспечивает более эффективный импорт репортера в пластиды благодаря высокому даже по сравнению с другими транзитными пептидами содержанию таких аминокислот (рис. 3).

Созданные генетические конструкции позволяют заменять репортерный ген GFP на другие последовательности (с помощью ЭР *NcoI* - *BamHI*, *XbaI*, рис. 1), что позволяет проводить подбор способа экспрессии, более эффективного для требуемых видов растений и целевых белков.

ats1A MASSMLSSATMVASP--AQATMVAPFNGLKSSAAFPATRKANNDITSITSN-GGRVNC--- 14/4
 ats1B MASSMLSSAAVVTSP--AQATMVAPFTGLKSSAFPVTRKANNDITSITSN-GGRVSC--- 17/4
 rbsNt MASSVLSSAAVATRSNVAQANMVAPFTGLKSAASFPVSRKQNLDTISIASN-GGRVQS--- 14/5
 rcaSo MATAV-STVGAATR⁺APLN⁺NGSSAGASVPTSGFLGSSL⁺KKHTNV-RFPSSSR⁺TTSM⁺TVKA- 19/7
 rcaAt MAAAV-STVGAIN⁺RAPL⁺SLNGSGSGAV-SAPASTFLG-KKVVTVSRFAQSN⁺KKNSG⁺SFK⁺VL 13/7
 rcaOs MAAAFSSTVGAPASTPTNFLG⁺KKL⁺KKQ-VTSAVNYHG-KS-SNINRFK⁺VMA----- 10/8

Рис. 3. Аминокислотные последовательности транзитных пептидов предшественников малой субъединицы рубиско *Arabidopsis thaliana* (гены *ats1A* и *ats1B*) и *Nicotiana tabacum* (*rbsNt*); активазы рубиско *Spinacia oleracea* (*rcaSo*), *A. thaliana* (*rcaAt*) и *Oryza sativa* (*rcaOs*). Указано количество гидроксильных (подчеркнуты) и положительно заряженных (выделены черным) аминокислот

Выводы

Созданы генетические конструкции, позволяющие осуществлять накопление целевого белка в хлоропластах при помощи двух разных транзитных пептидов - предшественников малой субъединицы рубиско *Nicotiana tabacum* и активазы рубиско *Spinacia oleracea*. Продемонстри-

рована различная эффективность импорта в органеллы при использовании двух исследованных транзитных пептидов. Созданные векторные конструкции позволят проводить подбор способа экспрессии, более эффективного для требуемых видов растений и целевых белков.

Работа выполнялась при поддержке гранта НАНУ УкрИНТЭИ № 0110U006061.

Литература

1. Yusibov V., Streatfield S.J., Kushnir N. Clinical development of plant-produced recombinant pharmaceuticals // Human Vaccines – 2011. – Vol. 7. – P. 313-321.
2. Streatfield S.J. Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants // Plant Biotechnol. J. – 2007. – Vol. 5. – P. 2–15.
3. Gils M., Kandzia R., Marillonnet S., Klimyuk V., Gleba Y. High-yield production of authentic human growth hormone using a plant virus-based expression system // Plant Biotechnol. J. – 2005. – Vol. 3. – P. 613-620.
4. Jarvis P, Soll J. Toc, Tic, and chloroplast protein import // Biochim. Biophys. Acta – 2001. – Vol. 1541. – P. 64–79.
5. Gnanasambandam A., Polkinghorne I.G., Birch R.G. Heterologous signals allow efficient targeting of a nuclear-encoded fusion protein to plastids and endoplasmic reticulum in diverse plant species // Plant Biotechnol. J. – 2007. – Vol. 5. – P. 290–296.
6. Sindarovska Y.R., Gerasymenko I.M., Sheludko Y.V., Olevinskaya Z.M., Spivak N.Y., Kuchuk N.V. Production of human interferon alfa 2b in plants of *Nicotiana excelsior* by *Agrobacterium*-mediated transient expression // Tsitol. Genet. – 2010. – Vol. 44. – P. 60-64.
7. Маниатис Т., Фрич Е.Ф., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984. – 521с.
8. Sheludko Y.V., Sindarovska Y.R., Gerasymenko I.M., Bannikova M.A., Kuchuk N.V. Comparison of several

- Nicotiana* species as hosts for high-scale *Agrobacterium*-mediated transient expression // *Biotechnol. Bioeng.* – 2007. – Vol. 96. – P. 608-614.
9. Sheludko Y.V. *Agrobacterium*-mediated transient expression as an approach to production of recombinant proteins in plants // *Recent Patents on Biotechnology.* – 2008. – Vol. 2. – P. 198-208.
 10. Teng Y.-S., Chan P.-T., Li H.-M. Differential Age-Dependent Import Regulation by Signal Peptides // *PLOS Biol.* – 2012. – Vol. 10. – P. 1-14.
 11. Bruce B.D. Chloroplast transit peptides: structure, function and evolution // *Trends Cell Biol.* – 2000. – Vol. 10. – P. 440-447.

GERASYMENKO I.M., SHELUDKO Y.V.

*Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, NAS of Ukraine
Ukraine, 03680, Kiev, Zabolotnogo str 148, e-mail: ysheludko@ukr.net*

HETEROLOGOUS TRANSIT PEPTIDES ALLOW FOR REPORTER PROTEIN IMPORT INTO CHLOROPLASTS WITH VARYING EFFICIENCY

Aim. The stability of recombinant proteins in plants can be improved by targeting into optimal cell compartment. Two transit peptides (TPs), of RuBisCO small subunit from *Nicotiana tabacum* (tpRbs), and RuBisCO activase from *Spinacia oleracea* (tpRca), were tested for their ability to insure chloroplast import and increase stability of a reporter GFP. **Methods.** The sequences encoding TPs were fused with the reporter GFP gene under control of 35S CaMV promoter. The obtained recombinant genes were transiently expressed in *Nicotiana excelsior* leaves. The level of reporter protein was estimated by surface fluorescence, and GFP subcellular localization was investigated microscopically. **Results.** Using of both TPs allowed for reporter protein accumulation at higher levels than with control GFP gene without targeting signals. Chloroplast import efficiency was better with tpRca than tpRbs, that resulted in improved reporter stability after *tpRca::GFP* gene expression. **Conclusions.** Genetic vectors containing TPs with different efficiency were constructed. They can be used to select the best way for production of valuable proteins in plants.

Key words: plant genetic transformation, subcellular localization, transit peptide.

ГОНЧАРУК О.М.¹, БАВОЛ А.В.¹, МОРГУН Б.В.², ДУБРОВНА О.В.¹

¹*Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України
03022, Київ, вул. Васильківська, 31/17; E-mail: dubrovny@ukr.net*

²*Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України
03680, Київ, вул. Академіка Заболотного, 148*

AGROBACTERIUM-ОПОСЕРЕДКОВАНА ТРАНСФОРМАЦІЯ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ ШЛЯХОМ ІНОКУЛЯЦІЇ БАЗАЛЬНОЇ ЧАСТИНИ ПАГОНА

На сьогодні, біотехнологічні рослини пшениці, стійкі до стресових чинників, отримують, в основному, методами генетичної інженерії та клітинної селекції. Генетична модифікація рослин може здійснюватись за допомогою *Agrobacterium*- опосередкованого методу або шляхом прямого перенесення генів. Найбільш поширеним методом для рослин є генетична трансформація з використанням агробактерій *Agrobacterium* для перенесення екзогенних Т-ДНК в рослинну клітину. Незважаючи на те, що такий підхід широко застосовується для більшості сільськогосподарських культур, у зернових спочатку не було отримано успіхів, оскільки ці культури були, природно, не сприйнятливі до *Agrobacterium* [1, 2]. Тим не менш, вдосконалення технологій *Agrobacterium*-

опосередкованої трансформації до середини 1990-х років, призвело до бажаної генетичної модифікації пшениці [3-5].

Цей метод має декілька переваг у порівнянні з іншими підходами: в геном реципієнта включається обмежене число копій генів, можливість передачі відносно великих генетичних конструкцій з мінімальною її перебудовою, простота методик та загалом менша вартість. Очікується, що *Agrobacterium* буде використовуватися в якості надійного і недорогого вектора для доставки екзогенних генів у геном пшениці. Проте, використання такого підходу ускладнене тим, що для його успішного застосування існуючі методики потребують вдосконалення та адаптації для роботи з конкретним рослинним об'єктом. Розробка відповідного способу