

**Станбекова Г.Э.¹, Бейсенов Д.К.²,
Калиева А.А.³, Искаков Б.К.⁴**

¹ведущий научный сотрудник, e-mail: gulshanst@yahoo.com

²младший научный сотрудник, e-mail: beisenov.d@gmail.com

³лаборант, e-mail: aigul_altaevna@mail.ru

⁴д.б.н., профессор, заведующий, e-mail: bulat.iskakov@mail.ru

Лаборатория белка и нуклеиновых кислот РГП «Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина» КН МОН РК, Казахстан, г. Алматы

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *UIDA* В ТРАНСПЛАСТОМНЫХ РАСТЕНИЯХ ТАБАКА ПОД КОНТРОЛЕМ 5'-НЕТРАНСЛИРУЕМОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНОМНОЙ РНК Y-ВИРУСА КАРТОФЕЛЯ

Регуляция экспрессии хлоропластных генов в основном происходит на посттранскрипционном уровне, существенную роль в которой играют 5'-нетранслируемые последовательности (5'НТП) пластидных мРНК. В транспластомных растениях табака нами изучено влияние 5'НТП геномной РНК Y-вируса картофеля (5'PVY), а также 5'НТП пластидного гена *psbA* (5'psbA) на экспрессию бактериального репортерного гена *uidA*, кодирующего β-глюкуронидазу (GUS). Были созданы генетические конструкции, содержащие ген *uidA*, под контролем одинаковых транскрипционных регуляторных элементов: промотора и терминатора гена *psbA* и двух различных 5'НТП – 5'psbA и 5'PVY. Этими конструкциями трансформировали хлоропласты табака методом биобаллистики. Транспластомные линии показали примерно 24-кратные различия в активности GUS. Замена природной 5'psbA на чужеродную 5'PVY привела к значительному снижению синтеза GUS-белка.

Ключевые слова: хлоропласты, синтез белка, 5'НТП, транспластомные растения, репортерный белок.

Stanbekova G.E.¹, Beisenov D. K.²,

Kalieva A.A.³, Iskakov B. K.⁴

¹c. bi.sci., e-mail: gulshanst@yahoo.com

² junior researcher, e-mail: beisenov.d@gmail.com

³technician of the laboratory, e-mail: aigul_altaevna@mail.ru

⁴d.bi. sci., professor, head, e-mail: bulat.iskakov@mail.ru

leading researcher of the laboratory of protein and nucleic acids, RSE «М.А. Айтхожин Institute of Molecular Biology and Biochemistry», Committee of science, MES RK, Kazakhstan, Almaty

Expression of *uidA* gene in tobacco transplastomic plants under the control of 5'-untranslated region of genomic RNA of potato virus Y

Regulation of the expression of chloroplast genes mainly occurs at the post-transcriptional level, in which 5'-untranslated regions (5'UTR) of plastid mRNA play a significant role. In transplastomic tobacco plants, we studied the effect of the 5'UTRs of the genomic RNA of potato Y-virus (5'PVY), as well as the 5'UTR of the plastid *psbA* gene (5'psbA) on the expression of the bacterial reporter *uidA* gene encoding β-glucuronidase (GUS). Genetic constructs containing the *uidA* gene were created under the control of identical transcriptional regulatory elements: the promoter and terminator of the *psbA* gene and two different 5'UTRs – 5'psbA and 5'PVY. Tobacco chloroplasts were transformed with these constructs by biobalistic method. Transplastomic lines showed approximately 24-fold differences in GUS activity. Replacing the natural 5'psbA with the heterologous 5'PVY resulted in a significant decrease in the synthesis of GUS protein.

Key words: chloroplasts, protein synthesis, 5'UTR, transplastomic plants, reporter protein.

Станбекова Г.Э.¹, Бейсенов Д.К.²,
Калиева А.А.³, Искаков Б.К.⁴

¹б.ғ.к., жетекші ғылыми қызметкері, e-mail: gulshanst@yahoo.com

²кіші ғылыми қызметкері, e-mail: beisenov.d@gmail.com

³лаборант, e-mail: aigul_altaevna@mail.ru

⁴б.ғ.д., профессор, меңгеруші, e-mail: bulat.iskakov@mail.ru

ҚР БҒМ ҒМ «М.А. Айтхожин атындағы молекулалық биология және биохимия институты»

ШЖҚ РМК Ақуыз және нуклеин қышқылдары зертханасы, Қазақстан, Алматы қ.

Картоптың Y-вирусының геномдық РНҚ 5' – трансляцияланбайтын тізбегінің бақылауындағы транспластомды темекі өсімдігінің *uidA* генінің экспрессиясы

Хлоропласт гендерінің экспрессиясының реттелуі посттранскрипционды деңгейде орын алады, бұл ретте пластикалық мРНҚ 5'-трансляцияланбайтын тізбегі (5'ТЛТ) маңызды рөлін атқарады. Картоптың Y-вирусының (5'PVY) геномдық РНҚ-ның 5'ТЛТ-ін және пластид *psbA* генінің 5'ТЛТ-нің транспластомды темекі өсімдіктерінде β-глюкуронидаза (GUS) кодтайтын бактериялық репортер *uidA* генінің экспрессиясына әсері біздің жұмыстарда зерттелінді. Трансформация үшін *uidA* генін қамтитын бірдей басқарушы транскрипциялық реттегіштер элементтері: пластидті *psbA* генінің промоутерлері мен терминаторлары және екі түрлі 5'ТЛТ: 5'*psbA* және 5'PVY бар генетикалық конструкциялар құрылды. Биобаллистика әдісімен бұл конструкциялар арқылы темекі хлоропластары трансформацияланды. Транспластомды сызығы GUS белсенділігінде шамамен 24 есе айырмашылықты көрсетті. Табиғи 5'*psbA* бөтен 5'PVY-ға ауыстыру GUS-белок синтезінің айтарлықтай төмендеуіне әкелді.

Түйін сөздер: хлоропластар, белок синтезі, 5'-ТЛТ, транспластомды өсімдік, репортерлы белок.

Введение

Полиплоидность хлоропластного генома позволяет синтезировать чужеродные белки на очень высоком уровне, что дает огромное преимущество пластидной системе экспрессии по сравнению с ядерной. За последние годы были получены транспластомные растения с улучшенными агрономическими признаками, такими как увеличение биомассы, устойчивость к гербицидам, насекомым, засухе, холоду и соли. Показана их возможность применения в фиторе-медиации, производстве вакцинных антигенов и биопрепаратов медицинского назначения, ферментов для промышленного производства, биоматериалов и биотоплива [1, 2, 3].

Уровень синтеза одного и того же гетерологичного белка в транспластомных растениях может сильно варьировать в зависимости от выбора регуляторных элементов. Как было показано в работах по мутагенезу одноклеточной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* [4], в транспластомных линиях табака [5] и в хлоропластной системе трансляции *in vitro* [6], значительную роль в экспрессии пластидных генов играет посттранскрипционная регуляция, определяемая во многом нуклеотидными последовательностями, расположенными до и после иницирующего кодона AUG в мРНҚ. К областям, примыка-

ющим к стартовому кодону, относятся 5'НТП и так называемый “downstream box”, обычно включающий первые 10-15 кодонов мРНҚ. Комбинация и модификации указанных элементов, как было показано рядом исследователей, часто приводит к значительному повышению уровня экспрессии целевого гена [7, 8, 9, 10].

В работах по трансформации хлоропластов наиболее часто используют 5'НТП пластидных генов *psbA*, *atpB*, *rbcL* [11, 12, 13, 14, 15]. Удивительно, но наиболее рекордного выхода целевого белка удалось достичь при применении чужеродной 5'НТП гена 10 бактериофага T7 (5'T7G10). Так при экспрессии в табаке гена *plyGBS*, кодирующего бактериофаговый антибиотик против стрептококков группы Б, выход рекомбинантного белка составил более 70% от общего растворимого белка [16]. Такой же высокий уровень синтеза рекомбинантного проинсулина в хлоропластах был продемонстрирован в работе Рулмана с соавт. [17]. Первые фертильные транспластомные растения арабидопсиса, наиболее хорошо изученного модельного генетического объекта, были получены с помощью 5'T7G10-содержащих векторов [18].

Успешное применение 5'T7G10 при синтезе рекомбинантных белков вызвал интерес к изучению других 5'НТП генов бактериофагов. Так была показана способность 5'T7g1.3 и 5'T4g23

направлять синтез в хлоропластах аминокликозид 3'-аденилилтрансферазы, кодируемой геном *aadA* и придающей устойчивость к спектиномицину, применяемого в качестве селективного антибиотика при отборе трансформантов. Несмотря на присутствие в них характерной для большинства 5'НТП *E. coli* и пластидных транскриптов последовательности Шайн-Дальгарно, содержание придающей устойчивость к спектиномицину белка в растениях была значительно ниже по сравнению с 5'T7G10, но достаточным для отбора трансформантов [19].

Кроме лидерных последовательностей генов бактериофагов было исследовано влияние 5'НТП растительных вирусов на синтез GUS-белка в хлоропластах, таких как 5'НТП белка оболочки вируса картофеля PVX, IRES-элементы (Internal Ribosome Entry Site) генов белка оболочки и транспортного белка тобамовируса крестоцветных: IRES_{Scp148} и IRES_{mp75} [8].

Поиск новых непластидных 5'НТП для регуляции экспрессии трансгенов в хлоропластах является актуальным, поскольку гетерологичные последовательности в силу отсутствия гомологии с пластомом хозяина сокращают риск нежелательной посттрансформационной рекомбинации между эндогенными и привнесенными в составе трансгена пластидными элементами (промоторами, терминаторами, 5'НТП), которая может приводить к утрате трансгенов и/или гетерогенности пластид в транспластомных растениях [20].

В настоящей работе мы впервые исследовали влияние 5'НТП геномной РНК вируса картофеля Y (5'PVY) на уровень экспрессии кодирующего репортерный белок β-глюкуронидазу гена *uidA* в транспластомных растениях табака. Выбор данной лидерной последовательности неслучаен, а обусловлен результатами исследований, показавших ее функциональную активность при экспрессии гена *uidA* в *E. coli*, сравнимую с последовательностью Шайн-Дальгарно [21].

Материалы и методы исследования

Сайт-направленный мутагенез. Мутагенез плазмиды pKG27 [22], любезно предоставленной проф. Х. Варцехой (Технический Университет г. Дармштадт, Германия) проводили посредством амплификации Pfu-полимеразой («Roche», Швейцария) с участием пары праймеров: BamHI-for (5' –TGTTATACTGTTGAATAAGGATCCTTCCATTTTC-

TATT– 3') и BamHI-rev (5' –AATAGAAAATGGAAGGATCCTTATTCAACAGTATAACA– 3'). Вносимые мутации подчеркнуты. ПЦР проводили на амплификаторе Mastercycler® («Eppendorf», Германия) в следующем температурном режиме: 1 мин при 94°C; 50 сек при 94°C, 50 сек при 48°C, 7 мин при 68°C – 25 циклов; 10 мин при 68°C. Продукты ПЦР анализировали в 1% агарозном геле.

Конструирование векторов. В полученную мутагенезом плазмиду pKG27В клонировали фрагмент ДНК, содержащий 5' PVY, из плазмиды pET23c/Y (из коллекции лаборатории). Полученную плазмиду обозначили как pKG27BY. Плазмиды pNT4/5'psbA-GUS и pNT4/5'PVY-GUS были получены путем встраивания *SacI/HindIII* ДНК-фрагментов из pKG27 и pKG27BY в плазмиду pNT4 (любезно предоставленной проф. Х. Варцехой). При клонировании использовали общепринятые методы [23].

Секвенирование ДНК осуществляли с использованием коммерческого набора Big Dye® Terminator v.3.1 («Applied Biosystems», США) по методике фирмы-производителя, используя праймер GUS-rev (5'-CACAGTTTTTCGCGATC CAGACTGAA-3'). Амплификацию проводили в амплификаторе 9700 («Applied Biosystems», США) при использовании температурного режима: 2 мин при 96°C; 15 сек при 96°C, 10 сек при 50°C, 4 мин при 60°C – 25 циклов. Образцы ДНК анализировали на генетическом анализаторе 310 («Applied Biosystems», США).

Трансформация и регенерация транспластомных растений.

Растения табака *Nicotiana tabacum* (Nt) культивара Petit Havana были выращены из семян *in vitro* при 22±3°C при световом режиме 16ч/8ч (день/ночь), освещенности 3000 люкс на агаризованной, содержащей сахарозу (30 г/л) среде МС [24]. Листья растений были трансформированы методом биобаллистики (бомбардировки) микрочастицами золота (0,6 мкм), на поверхности которых были иммобилизованы молекулы ДНК, с помощью баллистической пушки PDS-1000/He Biolistic Particle Delivery System («Bio-Rad», США) по методу Сваба с соавт. [25]. Селективная среда МС для отбора трансформантов содержала 1 мг/л БАП (6-бензиламинопурин) и 0,1 мг/л НУК (нафтилуксусная кислота) и 500 мг/л спектиномицина. Образувавшиеся побеги срезали и пересаживали на безгормональную среду с добавлением антибиотика.

ПЦР анализ растений. Препараты тотальных ДНК выделяли из 50 мг листьев табака с помощью набора DNeasy Plant Mini Kit («Qiagen», Германия) по методике фирмы-изготовителя. 100 нг ДНК брали для ПЦР анализа, который проводили с помощью **Taq-полимеразы** («Fermentas», Литва) и пары праймеров Ppsba-for (5'-CACCCACTAGCATATCGAAATTCT-3') и GUS-rev, подобранных к 3'-концу промотора гена *psbA* и 5'-концу гена *uidA*.

Гибридизационный анализ по Саузерну. По 2 мкг препаратов тотальных ДНК, выделенных из транспластомных линий и дикого типа табака, были обработаны рестриктазой *EcoO109I* («Fermentas», Литва). Далее фрагменты ДНК были разделены электрофоретически в 1% агарозном геле, после чего были перенесены капиллярным способом на нейлоновую мембрану Porablot NY plus («Macherey-Nagel», Германия) и гибридизованы с меченым дигоксигенином зондом, полученным амплификацией ДНК дикого типа с помощью набора PCR DIG Probe Synthesis Kit («Roche», Швейцария) и пары праймеров Chl-for/Chl-rev (5'-TCTCGGTTGTGAGACACATTAААТ-3'; 5'-GAAGCCCSTTTACCATTCTGTAT-3'). Детекцию связавшихся с зондом фрагментов проводили с помощью набора DIG Nucleic Acid Detection kit («Roche», Швейцария).

Измерение активности β-глюкуронидазы проводили флюорометрическим методом согласно Джеферсону с соавт. [26] на приборе Hoefer ТКО-100 («Hoefer», США). В качестве субстрата использовали MUG (4-метилумбеллиферил-β-D-глюкуронид) («Sigma aldrich», США). 50 мг листьев растирали в ступке в 100 мкл экстракционного буфера (50 мМ Na-фосфатный буфер, pH 7.8; 10 мМ β-меркаптоэтанол; 10 мМ Na₂-ЭДТА; 0.1% Тритон X-100), центрифугировали 5 мин при 13400 тыс. об/мин. К 16 мкл супернатанта добавляли 4 мкл раствора 5мМ MUG в экстракционном буфере, инкубировали 30 мин при 37°C, реакцию останавливали добавлением 2 мл 0,2 М Na₂CO₃.

Результаты исследований и их обсуждение

Сайт-направленный мутагенез

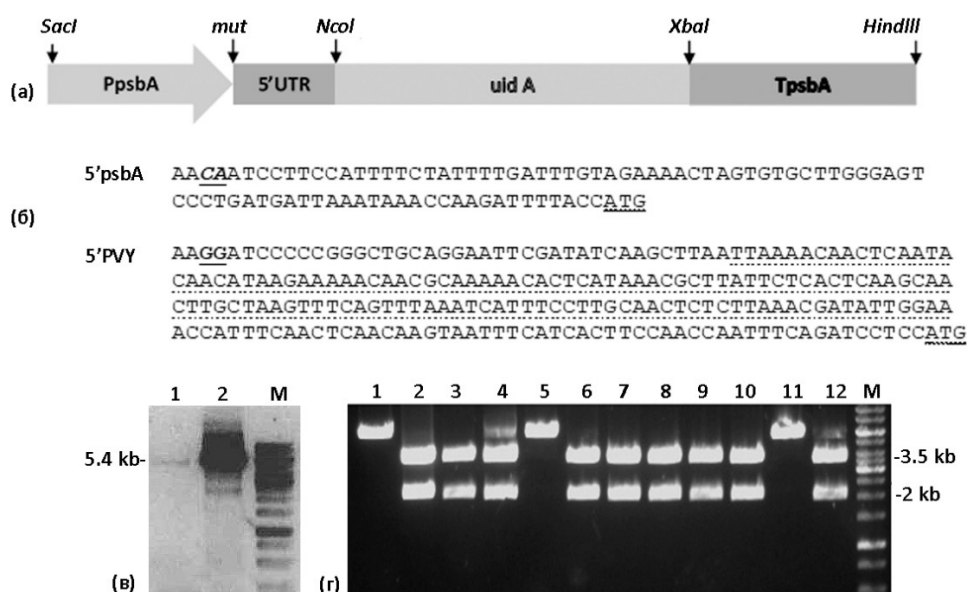
Для сравнительного изучения влияния 5'PVY и 5'psbA на трансляцию репортерного GUS-белка в хлоропластах нами были получены соответствующие конструкции. Их основой послужил

вектор pKG27 (рис. 1а), который содержит *uidA* ген под контролем промотора с 5'НТП и терминатора пластидного гена *psbA*, кодирующего D1 полипептид фотосистемы II. По причине отсутствия в pKG27 сайта клонирования между промотором и 5'НТП нами в указанную область был введен *VamHI* сайт посредством сайт-направленного мутагенеза. Мутагенез осуществляли путем амплификации плазмиды целиком посредством высокоточной ДНК-полимеразы с вовлечением двух взаимно комплементарных праймеров, подобранных к желаемой области и содержащих в центре две нуклеотидные замены. Замена третьего и четвертого нуклеотида от начала старта транскрипции CA на GG приводит к образованию сайта GGATCC, узнаваемого эндонуклеазой рестрикции *VamHI* (рис. 1а, 1б). Электрофоретический анализ продуктов ПЦР показал, что синтезированный ампликон по размеру соответствовал исходной плазмиде pKG27 (рис. 1в).

Далее реакционную смесь обрабатывали рестриктазой *DpnI*, расщепляющей метилированную ДНК по последовательностям 5'-Gm⁶ATC-3'. Поскольку исходная плаزمида была метилирована (штамм *E. coli* DH5 является *dam+* штаммом), рестриктаза *DpnI* расщепляла исходную, служившей матрицей немутированную плазмиду, но не амплифицированную в ходе ПЦР мутированную ДНК. После рестрикции реакционной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* штамма XL1-Blue. Плазмиды из выросших клонов анализировали совместной обработкой эндонуклеазами рестрикции *VamHI* и *XbaI*. Выщепление фрагмента с размером ~2 kb в большинстве проанализированных клонов свидетельствовало о внедрении *VamHI* сайта (рис. 1г). Данный факт был подтвержден посредством секвенирования ДНК. Полученная плазмида pKG27 с *VamHI* сайтом между промотором и 5'НТП *psbA* гена была обозначена как pKG27В.

Клонирование *uidA* гена в хлоропластный вектор

Для встраивания последовательности 5'PVY перед кодирующей областью гена *uidA* фрагмент ДНК размером 222 bp из плазмиды pET23c/Y, содержащий полную последовательность вирусного лидера (рис. 1б), клонировали в плазмиду pKG27В по сайтам рестрикции *VamHI/NcoI*. Полученная плазмиды была обозначена как pKG27ВУ и отличалась от исходной pKG27 только областью 5'НТП перед *uidA* геном.



(a) PpsbA, TpsbA, 5'UTR – промотор, терминатор, 5'НТП пластидного гена *psbA*, *uidA* – ген, кодирующий GUS-белок; (б) 5'psbA, 5'PVY – нуклеотидные последовательности 5'НТП, подчеркнуты две нуклеотидные замены, пунктиром выделена 5'PVY, волнистой линией отмечен стартовый кодон; (в) М – ДНК-маркер, 1 – отрицательный контроль, 2 – при добавлении Pfu; (г) 1-12- анализируемые плазмиды, обработанные BamHI и XbaI рестриктазами.

Рисунок 1 – Сайт-направленный мутагенез плазмиды pKG27 и нуклеотидные последовательности 5'НТП.

(а) Карта плазмиды pKG27, (б) нуклеотидные последовательности 5'psbA и 5'PVY, (в) электрофорез продуктов ПЦР (г) скрининг клонов

На следующем этапе полученная ДНК-кассета была перенесена в хлоропластный вектор pNT4. pNT4 обеспечивает интеграцию трансгенов в межгенную область *trnG/trnFM* хлоропластного генома путем гомологичной рекомбинации и содержит ген *aadA*, придающий устойчивость к антибиотику спектиномицину. ДНК-фрагменты размером 2332 bp и 2469 bp, полученные путем рестрикции плазмид pKG27 и pKG27BY совместной обработкой ферментами *HindIII* и *SacI*, были клонированы по тем же сайтам в pNT4. Полученные плазмиды были обозначены как pNT4/5'psbA-GUS и pNT4/5'PVY-GUS (рис. 2). Так как в последовательности 5'PVY плазмиды pKG27BY имеется дополнительный *HindIII*-сайт (рис. 2) фрагмент ДНК, содержащий кассету [PpsbA-5'PVY-GUS-TpsbA], был получен в результате неполного гидролиза рестриктазой *HindIII*, предварительно обработанной *SacI*.

Получение и характеристика транспластомных растений

Генетическая трансформация хлоропластов табака была проведена методом биобаллистики листьев полученными векторами pNT4/5'psbA-

GUS и pNT4/5'PVY-GUS, иммобилизованными на поверхности золотых микрочастиц. Экспланты листьев после обстрела культивировали на среде с гормонами и спектиномицином для селекции и регенерации трансформантов. Нетрансформированные сегменты листьев постепенно обесцвечивались и отмирали. Образование первых зеленых побегов-регенерантов наблюдали через 6-8 недель от начала эксперимента (рис. 3а). Для корнеобразования побеги, достигшие 2-3 см в длину, переносили на безгормональную, спектиномицин-содержащую среду. Для подтверждения интеграции трансгена и отсева устойчивых к антибиотику спонтанных мутантов подросшие растения были протестированы методом ПЦР с участием пары праймеров Ppsba-for/GUS-rev, подобранных к 3'- и 5'-концам промотора гена *psbA* и кодирующей части гена *uidA*. Проведенный анализ показал, что все пять отобранных растений содержат целевую вставку (рис. 3б). По две линии каждого варианта были подвергнуты вторичному отбору для элиминации пластид дикого типа и отбора пластид, несущих ген устойчивости к спектиномицину. Листовые сегменты четырех

линий культивировали на среде с гормонами и антибиотиком до появления вторичных регенерантов. Такой отбор проводили четырежды. Линии, прошедшие вторичный отбор, были вы-

сажены в грунт и анализировались далее. Полученные транспластомные растения по внешнему виду ничем не отличались от растений дикого типа (рис. 3в).

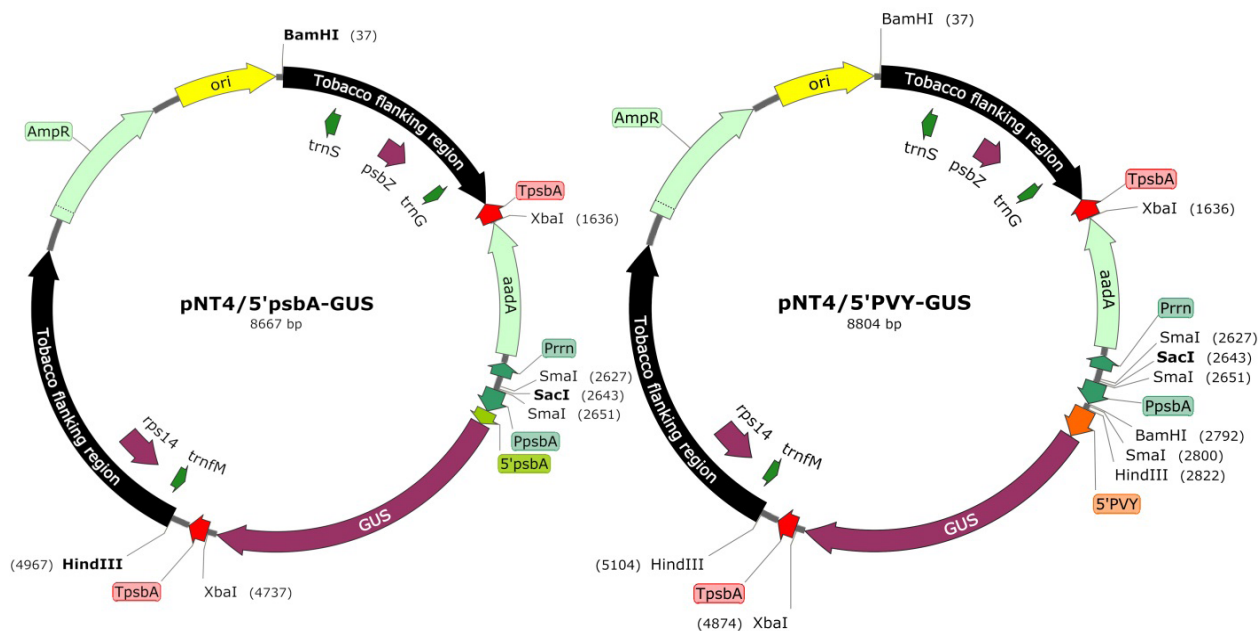
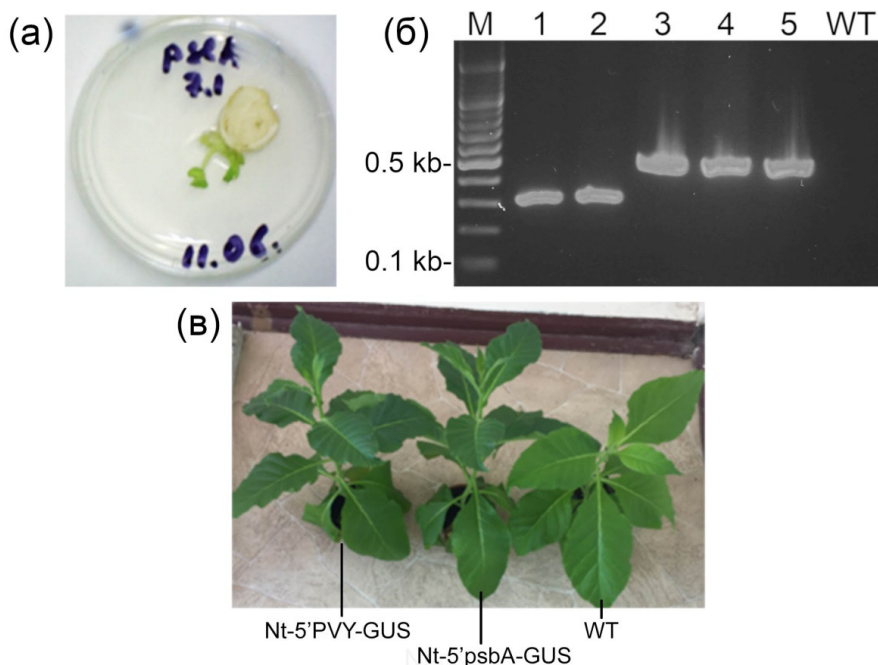


Рисунок 2 – Карты плазмид pNT4/5'psbA-GUS и pNT4/5'PVY-GUS

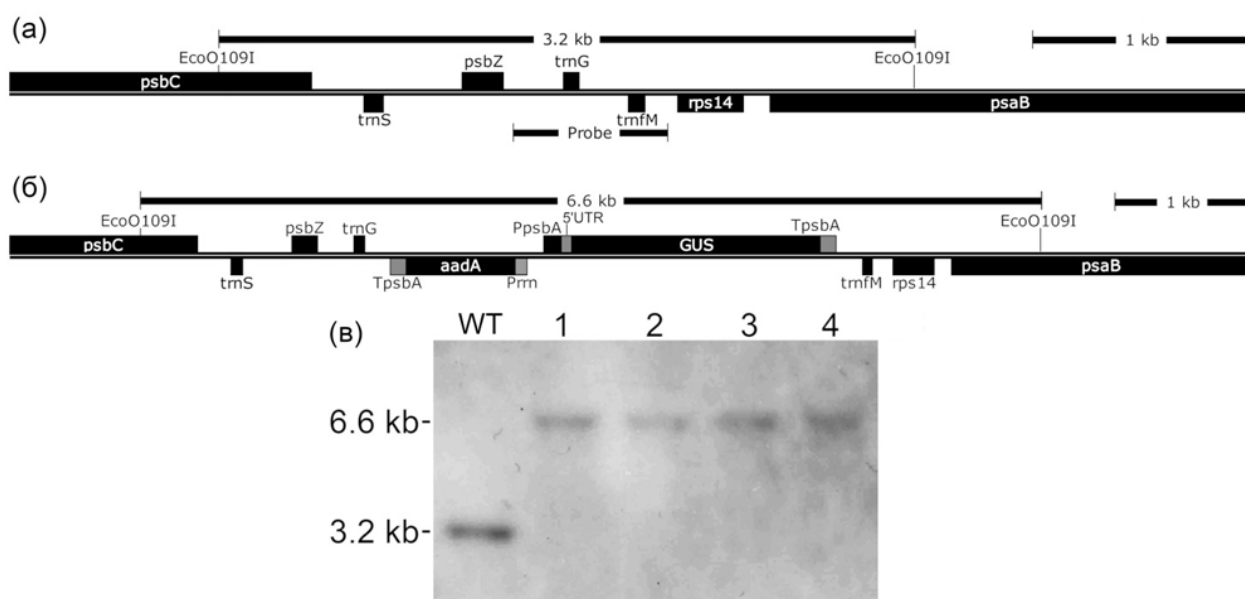


М – ДНК-маркер; 1,2–линии Nt-5'psbA-GUS; 3,4,5– линии Nt-5'PVY-GUS; WT–дикий тип.

Рисунок 3 – Получение транспластомных растений. (а) регенерация; (б) ПЦР анализ; (в) взрослые растения

Гомопластидность линий после двух этапов селекции была подтверждена при изучении полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) посредством Саузерн-блоттинга. Препараты тотальных ДНК различных линий были обработаны рестриктазой *EcoO109I* и гибридизованы с DIG-меченным зондом. Зонд представлял собой ДНК-фрагмент размером 710 bp, полученный в ходе амплификации ДНК дикого типа с участием

пары праймеров *Chl-dir/Chl-rev* и охватывающей смежные с сайтом встраивания трансгена области пластидной ДНК (рис. 4а, 4б). Зонд гибридизовался с 3,2 kb ДНК-фрагментом дикого типа, тогда как ДНК из транспластомных растений давала сигнал около 6,6 kb (рис. 4в). Отсутствие 3,2 kb фрагмента в полученных растениях свидетельствовало о генетической однородности хлоропластной ДНК, несущей целевые вставки.



WT – дикий тип; 1, 2 – линии Nt-5'PVY-GUS; 3, 4 – линии Nt-5'psbA-GUS.

Рисунок 4 – Саузерн-блот гибридизация ДНК. (а) карта места интеграции гена *uidA* в хлоропластную ДНК дикого типа; (б) карта хлоропластной ДНК транспластомных линий; (в) результаты Саузерн-блоттинга

Изучение GUS-активности

Данные по измерению GUS-активности в листьях отобранных линий приведены в таблице 1. Результаты показали, что в линиях табака, трансформированных конструкцией pNT4/5'PVY-GUS, активность фермента β-глюкуронидазы снижена по сравнению с линиями, полученными с помощью конструкции pNT4/5'psbA-GUS, приблизительно в 24 раза.

Незначительная активность GUS-белка в растениях дикого типа объясняется примесью 4- метилумбеллиферона (гидролизованного MUG) в препарате субстрата. Причиной столь значительного понижения синтеза целевого белка не является более низкое содержание

мРНК, так как линии Nt-5'PVY-GUS по уровню транскриптов гена *uidA* лишь незначительно уступали линиям Nt-5'psbA-GUS (данные не приводятся).

Полученные нами данные еще раз подтверждают тот факт, что не всегда чужеродные энхансеры, показавшие активность в *E. coli*, функциональны в пластидах. До сегодняшнего дня лишь для 5'T7G10 показана усиливающая активность в обеих системах. Несмотря на значительное сходство в силу эндосимбиотического происхождения хлоропластов от фотосинтезирующих прокариот, механизм трансляции в хлоропластах отличается от такового в бактериях [3, 27].

Таблица 1 – Уровень активности β -глюкуронидазы в транс-пластомных линиях

линия	активность в усл. ед.
дикий тип	44±2
Nt-5'psbA-GUS1	8417±175
Nt-5'psbA-GUS2	8757±188
Nt-5'PVY-GUS3	382±9
Nt-5'PVY-GUS4	342±9

Заключение

Проведенный нами сравнительный анализ влияния двух различных 5'НТП на уровень синтеза репортерного белка в хлоропластах показал, что замена пластидной 5'psbA перед целевым геном на чужеродную 5'PVY приводит к значительному снижению синтеза белка. Применение 5'PVY в качестве лидера может быть актуально в тех случаях, когда высокий уровень синтеза гетерологичных белков в пластидах приводит к

негативным последствиям для растения-продукта (задержке роста, изменению окраски листьев, снижению уровня фотосинтеза, мужской стерильности), которые являются причиной снижения биомассы, а значит и низкого выхода целевого белка [21, 28, 29].

Полученные в ходе настоящей работы плазмиды pKG27B и pKG27BY, содержащие сайты клонирования после промотора гена *psbA*, могут быть использованы в конструировании векторов с другими лидерными последовательностями для изучения их влияния на трансляцию в хлоропластах не только репортерных, а также белков прикладного назначения.

Работа выполнена при финансовой поддержке МОН РК в рамках научных проектов AP05132066 «Разработка технологии экспрессии рекомбинантных антигенов вируса оспы овец в транспластомных растениях» и AP05132532 «Новые молекулярно-биологические подходы к улучшению продуктивности растений».

Литература

- 1 Adem M., Beyene D., Feyissa T. Recent achievements obtained by chloroplast transformation // *Plant methods*. – 2017. – Vol. 13. – P. 30–41.
- 2 Jin S., Kanagaraj A., Verma D., Lange T., Daniell H. Release of hormones from conjugates: chloroplast expression of β -glucosidase results in elevated phytohormone levels associated with significant increase in biomass and protection from aphids or whiteflies conferred by sucrose esters // *Plant physiol.* – 2011. – Vol. 155. – P. 222–235.
- 3 Zoschke R., Bock R. Chloroplast translation: structural and functional organization, operational control and regulation // *Plant Cell*. – 2018. – Vol. 30. – P. 745–770.
- 4 Nickelsen J., Fleischmann M., Boudreau E., Rahire M., Rochaix J.D. Identification of cis-acting RNA leader elements required for chloroplast *psbD* gene expression in *Chlamydomonas* // *Plant Cell*. – 1999. – Vol. 11. – P. 957–970.
- 5 Kuroda H., Maliga P. Complementarity of the 16S rRNA penultimate stem with sequences downstream of the AUG destabilizes the plastid mRNAs // *Nucleic Acids Res.* – 2001. – Vol. 29. – P. 970–975.
- 6 Yukawa M., Kuroda H., Sugiura M. A new in vitro translation system for non-radioactive assay from tobacco chloroplasts: effect of pre-mRNA processing on translation in vitro // *Plant J.* – 2007. – Vol. 49. – P. 367–376.
- 7 Bock R. Plastid biotechnology: prospects for herbicide and insect resistance, metabolic engineering and molecular farming // *Curr Opin Biotechnol.* – 2007. – Vol. 18. – P. 100–106.
- 8 Herz S., Füll M., Steiger S., Koop H.U. Development of novel types of plastid transformation vectors and evaluation of factors controlling expression // *Transgenic Res.* – 2005. – Vol. 14. – P. 969–982.
- 9 Ye G. N., Hajdukiewicz P.T., Broyles D., Rodriguez D., Xu C.W., Nehra N., Staub J.M. Plastid-expressed 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase genes provide high level glyphosate tolerance in tobacco // *Plant J.* – 2001. – Vol. 25. – P.261–270.
- 10 Leelavathi S., Reddy V.S. Chloroplast expression of His-tagged GUS-fusions: a general strategy to overproduce and purify foreign proteins using transplastomic plants as bioreactors // *Mol Breed.* – 2003. – Vol. 11. – P. 49–58.
- 11 Fernández-San Millán A., Ortigosa S. M., Hervás-Stubbs S., Corral-Martínez P., Seguí-Simarro J. M., Gaétan J., Veramendi J. Human papillomavirus L1 protein expressed in tobacco chloroplasts self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic // *Plant Biotechnol J.* – 2008. – Vol. 6. – P. 427–441.
- 12 Morgenfeld M., Lentz E., Segretin M. E., Alfano E. F., Bravo-Almonacid F. Translational Fusion and Redirection to Thylakoid Lumen as Strategies to Enhance Accumulation of Human Papillomavirus E7 Antigen in Tobacco Chloroplasts // *Mol Biotechnol.* – 2014. – Vol. 56. – P. 1021–1031.
- 13 Kuroda H., Maliga P. Overexpression of the *clpP* 5'-untranslated region in a chimeric context causes a mutant phenotype, suggesting competition for a *clpP*-specific RNA maturation factor in tobacco chloroplasts // *Plant physiol.* – 2002. – Vol. 129. – P. 1600–1606.

- 14 Jin S., Daniell H. The Engineered Chloroplast Genome Just Got Smarter // Trends Plant Sci. – 2015. – Vol. 20. – P. 622–640.
- 15 Gerasymenko I. M., Sheludko Y. V., Klebanovych A. A., Rudas V. A., Shakhovskiy A. M., Klein T. M., Kuchuk N. V. Comparison of effectiveness of 5'-regulatory sequences in transplastomic tobacco chloroplasts // Transgenic Res. -2016. – Vol. 26. – P. 65–75.
- 16 Oey M., Lohse M., Kreikemeyer B., Bock R. Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic // Plant J. – 2009. – Vol. 57. – P. 436–445.
- 17 Ruhlman T., Ahangari R., Devine A., Samsam M., Daniell H. Expression of cholera toxin B-proinsulin fusion protein in lettuce and tobacco chloroplasts: oral administration protects against development of insulinitis in non-obese diabetic mice // Plant Biotechnol J. – 2007. – Vol. 5. – P. 495–510.
- 18 Ruf S., Forner J., Hasse C., Kroop X., Seeger S., Schollbach L., Bock R. High-efficiency generation of fertile transplastomic Arabidopsis plants // Nat Plants. – 2019. – Vol. 5. – P. 282–289.
- 19 Yang H., Gray B. N., Ahner B. A., Maureen R., Hanson M.R. Bacteriophage 5' untranslated regions for control of plastid transgene expression // Planta. -2013. – Vol. 237. – P. 517–527.
- 20 Gray B.N., Ahner B.A, Hanson M.R. Extensive homologous recombination between introduced and native regulatory plastid DNA elements in transplastomic plants // Transgenic Res. – 2009. – Vol. 18. – P. 559–572.
- 21 Nizkorodova A., Beisenov D., Iskakov B. 5'-untranslated region of potato virus Y genomic RNA provides efficient mRNA translation in bacterial cells // EMBO Conference: protein synthesis and translational control – EMBL advanced training centre, Heidelberg, 09-13 Sep. 2015. – P. 243.
- 22 Michoux F., Ahmad N., Hennig A., Nixon P.J., Warzecha H. Production of leafy biomass using temporary immersion bioreactors: an alternative platform to express proteins in transplastomic plants with drastic phenotypes // Planta. – 2013. – Vol. 237. – P. 903–908.
- 23 Sambrook J., Russel D.W. Molecular cloning: A laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: CSHL Press; 2001.
- 24 Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol Plant. – 1962. – Vol. 15. – P.473–497.
- 25 Svab Z., Hajdukiewicz P., Maliga P. Stable transformation of plastids in higher plants // Proc Natl Acad Sci USA. – 1990. – Vol. 87. – P. 8526–8530.
- 26 Jefferson R.A., Kavanagh T.A., Bevan M.W. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants // EMBO J.–1987. -Vol. 6. – P.3901–3907.
- 27 Tiller N., Bock R. The Translational Apparatus of Plastids and Its Role in Plant // Development. Mol Plant. – 2014 – Vol. 7. – P. 1105–1120.
- 28 Hennig A., Bonfig K., Roitsch T., Warzecha H. Expression of the recombinant bacterial outer surface protein A in tobacco chloroplasts leads to thylakoid localization and loss of photosynthesis // FEBS J. – 2007. – Vol. 274. – P. 5749-5758.
- 29 Scotti N., Cardi T. Transgene-induced pleiotropic effects in transplastomic plants // Biotechnol Lett. – 2014. – Vol. 36. – P. 229–239.

References

- 1 Adem M., Beyene D., Feyissa T. (2017) Recent achievements obtained by chloroplast transformation. Plant methods, vol. 13, pp. 30-41.
- 2 Bock R. (2007) Plastid biotechnology: prospects for herbicide and insect resistance, metabolic engineering and molecular farming. Curr Opin Biotechnol, vol. 18, pp. 100–106.
- 3 Fernández-San Millán A., Ortigosa S. M., Hervás-Stubbs S., Corral-Martínez P., Seguí-Simarro J. M., Gaétan J., Veramendi J. (2008) Human papillomavirus L1 protein expressed in tobacco chloroplasts self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. Plant Biotechnol J, vol. 6, pp. 427–441.
- 4 Gerasymenko I. M., Sheludko Y. V., Klebanovych A. A., Rudas V. A., Shakhovskiy A. M., Klein T. M., Kuchuk N. V. (2016) Comparison of effectiveness of 5'-regulatory sequences in transplastomic tobacco chloroplasts. Transgenic Res, vol. 26, pp. 65–75.
- 5 Gray B.N., Ahner B.A, Hanson M.R. (2009) Extensive homologous recombination between introduced and native regulatory plastid DNA elements in transplastomic plants. Transgenic Res, vol. 18, pp. 559–572.
- 6 Hennig A., Bonfig K., Roitsch T., Warzecha H.(2007) Expression of the recombinant bacterial outer surface protein A in tobacco chloroplasts leads to thylakoid localization and loss of photosynthesis. FEBS J, vol. 274, pp. 5749-5758.
- 7 Herz S., Füll M., Steiger S., Koop H.U. (2005) Development of novel types of plastid transformation vectors and evaluation of factors controlling expression. Transgenic Res, vol. 14, pp. 969–982.
- 8 Jefferson R.A., Kavanagh T.A., Bevan M.W. (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J, vol. 6, pp.3901–3907.
- 9 Jin S., Daniell H. (2015) The Engineered Chloroplast Genome Just Got Smarter. Trends Plant Sci, vol. 20, pp. 622–640.
- 10 Jin S., Kanagaraj A., Verma D., Lange T., Daniell H. (2011) Release of hormones from conjugates: chloroplast expression of β -glucosidase results in elevated phytohormone levels associated with significant increase in biomass and protection from aphids or whiteflies conferred by sucrose esters. Plant physiol, vol. 155, pp. 222–235.
- 11 Kuroda H., Maliga P. (2001) Complementarity of the 16S rRNA penultimate stem with sequences downstream of the AUG destabilizes the plastid mRNAs. Nucleic Acids Res, vol. 29, pp. 970–975.

- 12 Kuroda H., Maliga P. (2002) Overexpression of the clpP 5'-untranslated region in a chimeric context causes a mutant phenotype, suggesting competition for a clpP-specific RNA maturation factor in tobacco chloroplasts. *Plant physiol*, vol. 129, pp. 1600-1606.
- 13 Leelavathi S., Reddy V.S. (2003) Chloroplast expression of His-tagged GUS-fusions: a general strategy to overproduce and purify foreign proteins using transplastomic plants as bioreactors. *Mol Breed*, vol. 11, pp. 49-58.
- 14 Michoux F., Ahmad N., Hennig A., Nixon P.J., Warzecha H. (2003) Production of leafy biomass using temporary immersion bioreactors: an alternative platform to express proteins in transplastomic plants with drastic phenotypes. *Planta*, vol. 237, pp. 903-908.
- 15 Morgenfeld M., Lentz E., Segretin M. E., Alfano E. F., Bravo-Almonacid F. (2014) Translational Fusion and Redirection to Thylakoid Lumen as Strategies to Enhance Accumulation of Human Papillomavirus E7 Antigen in Tobacco Chloroplasts. *Mol Biotechnol*, vol. 56, pp. 1021-1031.
- 16 Murashige T., Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, vol. 15, pp. 473-497.
- 17 Nickelsen J., Fleischmann M., Boudreau E., Rahire M., Rochaix J.D. (1999) Identification of cis-acting RNA leader elements required for chloroplast psbD gene expression in *Chlamydomonas*. *Plant Cell*, vol. 11, pp. 957-970.
- 18 Nizkorodova A., Beisenov D., Iskakov B. (2015) 5'-untranslated region of potato virus Y genomic RNA provides efficient mRNA translation in bacterial cells. *EMBO Conference: protein synthesis and translational control*, Heidelberg, 09-13 Sep. 2015, p. 243.
- 19 Oey M., Lohse M., Kreikemeyer B., Bock R. (2009) Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic. *Plant J*, vol. 57, pp. 436-445.
- 20 Ruf S., Forner J., Hasse C., Kroop X., Seeger S., Schollbach L., Bock R. (2019) High-efficiency generation of fertile transplastomic *Arabidopsis* plants. *Nat Plants*, vol. 5, pp. 282-289.
- 21 Ruhlman T., Ahangari R., Devine A., Samsam M., Daniell H. (2007) Expression of cholera toxin B-proinsulin fusion protein in lettuce and tobacco chloroplasts: oral administration protects against development of insulinitis in non-obese diabetic mice. *Plant Biotechnol J*, vol. 5, pp. 495-510.
- 22 Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001) *Molecular cloning a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- 23 Scotti N., Cardi T. (2014) Transgene-induced pleiotropic effects in transplastomic plants. *Biotechnol Lett*, vol. 36, pp. 229-239.
- 24 Svab Z., Hajdukiewicz P., Maliga P. (1990) Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 87, pp. 8526-8530.
- 25 Tiller N., Bock R. (2014) *The Translational Apparatus of Plastids and Its Role in Plant Development*. *Mol Plant*, vol. 7, pp. 1105-1120.
- 26 Yang H., Gray B. N., Ahner B. A., Maureen R., Hanson M.R. (2013) Bacteriophage 5' untranslated regions for control of plastid transgene expression. *Planta*, vol. 237, pp. 517-527.
- 27 Ye G. N., Hajdukiewicz P.T., Broyles D., Rodriguez D., Xu C.W., Nehra N., Staub J.M. (2001) Plastid-expressed 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase genes provide high level glyphosate tolerance in tobacco. *Plant J*, vol. 25, pp. 261-270.
- 28 Yukawa M., Kuroda H., Sugiura M. (2007) A new in vitro translation system for non-radioactive assay from tobacco chloroplasts: effect of pre-mRNA processing on translation in vitro. *Plant J*, vol. 49, pp. 367-376.
- 29 Zoschke R., Bock R. (2018) Chloroplast translation: structural and functional organization, operational control and regulation. *Plant Cell*, vol. 30, pp. 745-770.