

СПИВАК Н.Я.<sup>1</sup>, СИНДАРОВСКАЯ Я.Р.<sup>2</sup>, ЛОЗОВАЯ О.И.<sup>1</sup>, САХНО Л.А.<sup>2</sup>,  
ГЕРАСИМЕНКО И.М.<sup>2</sup>, ОЛЕВИНСКАЯ З.М.<sup>1</sup>, ДИДЕНКО Л.Ф.<sup>1</sup>,  
ШЕЛУДЬКО Ю.В.<sup>2</sup>, КУЧУК Н.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,  
ул. Заболотного 154, г. Киев, 03680, Украина; e-mail: Spivak@serv.imv.kiev.ua

<sup>2</sup>Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины,  
ул. Заболотного 148, г. Киев, 03680, Украина e-mail: ysheludko@ukr.net

## ИССЛЕДОВАНИЕ РЕПРОДУКЦИИ ВИРУСА ОЖОГА ГРЕЧИХИ В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ ТАБАКА, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕН ИНТЕРФЕРОНА АЛЬФА 2b ЧЕЛОВЕКА

Вирусные болезни растений являются важной проблемой сельского хозяйства. Вирусы способны резко снижать урожайность и ухудшать качество продукции ценных сельскохозяйственных культур. К настоящему времени разработаны новые подходы к стратегии защиты растений от вирусной инфекции, одним из которых является изучение развития вирусной инфекции в растительном организме, экспрессирующем ген интерферона человека. Интерфероны являются неспецифическими факторами защиты клеток от широкого спектра ДНК- и РНК-содержащих вирусов животных [1]. Существуют также данные, что интерферон после экзогенной обработки может повышать устойчивость растительных клеток к вирусным заболеваниям [2-4]. Антивирусный эффект был продемонстрирован и в результате экспрессии генов  $\alpha$ - и  $\beta$ -интерферона в трансгенных растениях [5, 6]. С другой стороны, в ряде работ отмечено отсутствие достоверного защитного эффекта интерферона в растительных клетках [7, 8].

Целью настоящей работы являлось изучение восприимчивости растений табака, экспрессирующих ген интерферона человека, к фиторабдовирусу — вирусу ожога гречихи (ВОГ). Интерес использования минус-генетического ВОГ мотивирован тем, что механизм его репродукции отличается от ранее изученных плюс-генетических фитовирусов. Кроме того, ВОГ поражает ценные сельскохозяйственные культуры, в том числе гречиху, картофель, томаты, табак [9]. Полученные данные могут указать возможный механизм приобретения вирусостойчивости растений к фиторабдовирусам. В работе также было исследовано влияние вирусной инфекции на продукцию рекомбинантного интерферона в трансгенных растениях табака. Исследование накопления целевого белка при развитии вирусной инфекции в трансгенных растениях имеет значение для промышленной биотехнологии.

### Материалы и методы

В работе использованы растения табака *Nicotiana tabacum* сорта Wisconsin, несущие рекомбинантный (с растительным сигналом выведения белка в апопласт) или нативный ген интерферона альфа 2b человека (*inf b2b*) [10] и растения табака, несущие, помимо гена *inf b2b* (с растительным транспортным сигналом), ген *cry3A* (устойчивость к насекомым). Исполь-

зовали две линии табаков, несущих нативный ген *inf62b* (073/3, 073/9); три линии табаков, несущих ген *inf62b* с растительным транспортным сигналом (125/1, 125/2, 125/4), и три линии двойных трансформантов (125/150/1, 125/150/3, 125/150/9). Наличие трансгенов подтверждали ПЦР анализом. В качестве контроля использовали нетрансгенный табак сорта Wisconsin.

Трансгенные и контрольные растения табака инокулировали очищенным вирусным препаратом в концентрации 100 мкг/мл. В качестве контроля использовали растения табака, инокулированные буфером. Все растения, вне зависимости от визуальной оценки проявившейся на них вирусной патологии, были использованы для выделения ВОГ [11].

Сбор растительного материала и экстракцию белков проводили каждую неделю в течение месяца как описано в [10]. Для титрования интерферона была использована методика [12].

### **Результаты и обсуждение**

В результате агробактериальной трансформации были получены трансгенные растения табака, несущие ген интерферона человека *inf62b* с разными транспортными сигналами [10], а также растения табака, несущие ген *inf62b* и ген *cru3A* устойчивости к насекомым. Наличие трансгенов в растениях было подтверждено ПЦР анализом, а активность интерферона в растительных экстрактах была подтверждена методом титрования интерферона. Для эксперимента были отобраны линии растений с высокой активностью интерферона. Экспрессия гена *inf62b* не сопровождалась видимыми изменениями фенотипа растений или задержкой их развития.

Мы показали существование фоновой интерфероноподобной активности в экстрактах нетрансгенных растений, которая, по всей вероятности, имеет фазовый характер (чередование уменьшения и увеличения активности). Такие же фазовые изменения обнаружены и в интерфероноподобной активности экстрактов трансгенных растений табака. В последнем случае антивирусная активность экстракта состоит из фоновой интерфероноподобной активности самого растения и активности, полученной вследствие экспрессии гена интерферона.

В первую неделю эксперимента наблюдали резкое изменение уровней интерфероноподобной активности как в опытных (исключение — линии 073/9 и 125/2), так и в контрольных (инокулированных буфером) экстрактах растений. Во всех экстрактах контрольных растений уровень активности снижался, что особенно заметно для линий 073/9, 125/1 и 125/2, у которых активность снизилась с 800 МЕ/мл до 13, 50 и 25 МЕ/мл, соответственно. Данные результаты могли быть следствием включения защитных систем растения в ответ на ранение (втирание буфера в листья). Одним из механизмов защиты от стрессовых факторов является временное изменение белкового профиля растения. В этом случае происходит ограничение синтеза типичных растительных белков и накопление стрессовых белков [13].

Изменение интерфероноподобной активности в экстрактах экспериментальных (зараженных вирусом) растений через неделю после инфициро-

вания имело другой характер. В растительных экстрактах, имеющих изначально высокий уровень активности ( $\geq 400$  МЕ/мл), снижалась интерференоподобная активность в два и более раза (исключение — линии 073/9 и 125/2). Наоборот, в растительных экстрактах с изначально невысоким уровнем активности  $\leq 200$  МЕ/мл (на уровне неспецифической активности контроля), происходило увеличение интерференоподобной активности, в том числе и в экстракте нетрансгенного растения, до  $\geq 400$  МЕ/мл. Это особенно заметно для линии 125/150/1, интерференоподобная активность которой возросла до 800 МЕ/мл (рис. 1). Следует отметить, что через неделю после инокуляции интерференоподобная активность экстрактов опытных растений (в любом из вариантов) была выше, чем контрольных (исключение — линия 073/3).

Ко второй неделе после инфицирования интерференоподобная активность в экстрактах трансгенных растений начинает снижаться (кроме линии 125/150/9). Уровень интерференоподобной активности контроля в это время не изменяется и остается на уровне 400 МЕ/мл. Накопление вируса в это

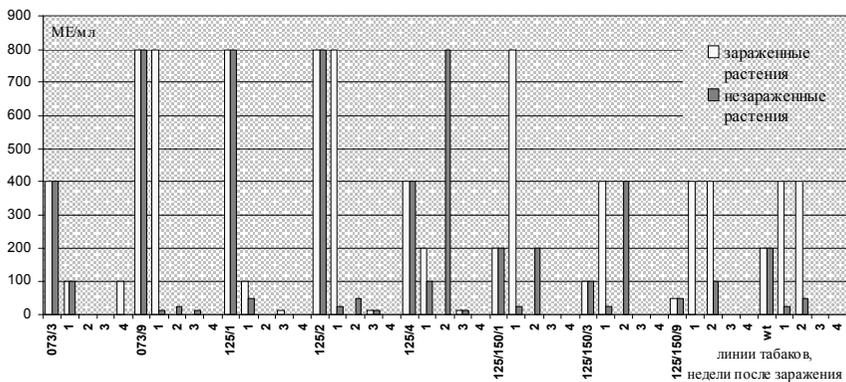


Рис. 1. Интерференоподобная активность у экстрактов растений

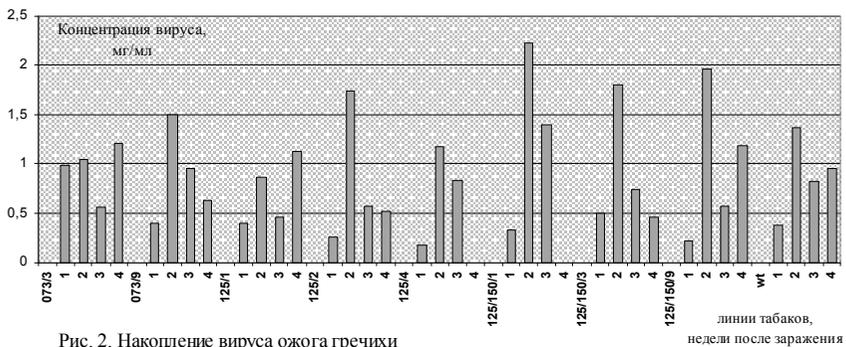


Рис. 2. Накопление вируса ожога гречихи

время достигает максимальных значений для большинства трансгенных линий (исключение — 073/3 и 125/1) и нетрансгенного контроля (рис. 2). В это время появляются симптомы вирусной инфекции на верхних листьях табаков.

В дальнейшем, вплоть до конца эксперимента (4-я неделя после заражения), интерфероподобная активность экстрактов всех опытных растений оставалась низкой. При этом в экстракты двух линий контрольных растений (125/4 и 125/150/3) к третьей неделе демонстрируют увеличение интерфероподобной активности, незначительный всплеск активности показан также для линии 125/150/1. Подобные данные свидетельствуют в пользу предположения, что ВОГ ингибирует накопление рекомбинантного интерферона, что и сказывается на интерфероподобной активности экстрактов. К третьей неделе происходит развитие симптомов вирусного заболевания по всему растению, а нижние зараженные листья отмирают.

К окончанию эксперимента количество вируса в некоторых линиях (125/2 и 125/150/3) значительно падает. Причиной этого может быть как приобретение устойчивости к ВОГ, так и гибель инфицированных тканей. Последний факт, по-видимому, явился причиной некротизации растений линий 125/4 и 125/150/1.

Интересно наличие интерфероподобной активности в нетрансгенных растениях табака. Результаты проведенных исследований показали угнетение репродукции вируса везикулярного стоматита в культуре перевиваемых тестикул поросят на уровне 400 МЕ/мл. Эти данные можно объяснить тем, что в растениях табака присутствует ген, обладающий высокой степенью гомологии с геном  $\beta$ -интерферона человека. Экспрессия данного гена индуцируется в растениях при заражении вирусом табачной мозаики [14]. Возможно, экспрессия такого гена приводит к определению активности интерферона в системе *in vitro*. Этот вопрос требует дальнейшего изучения.

### **Выводы**

Исследована динамика репродукции вируса ожога гречихи растениях табака, экспрессирующих ген интерферона альфа 2b человека. Показано, что высокий уровень накопления вируса коррелирует с низким уровнем экспрессии гена интерферона. Устойчивость к ВОГ у трансгенных растений табака достоверно не отличается от таковой у контрольных растений. Полученные данные имеют значение для дальнейшего изучения ВОГ, а также для изучения поведения трансгенов и накопления целевого белка в растениях при развитии вирусной инфекции.

### **Литература**

1. Goodbourn S., Didcock L. Interferons: cell signaling, immune modulation, antiviral responses and virus countermeasures // J. of General Virool.— 2000.— V.81.— P. 2341–2364.
2. Orshansky P., Rubinstein M., Sela I. Human interferons protect plants from virus infection // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1982.— V.79.— P. 2278–2280.

3. *Огарков В.И., Каплан И.Б., Тальянский М.Э., Атабеков И.Г.* Подавление репродукции вирусов картофеля под влиянием интерферона человека // Докл. АН СССР.— 1984.— Т.276, №3.— С. 743–745.

4. *Rosenberg N., Reichman M., Sela I.* Antiviral activity of natural and recombinant human leukocyte interferons in tobacco protoplasts // *Viol.*— 1985.— V.140.— P. 173–178.

5. *Смирнов С.П., Крашенинникова Л.В., Пухальский В.А.* Устойчивость к вирусу табачной мозаики у трансгенных растений табака, продуцирующих  $\alpha$ -интерферон человека // Докл. АН СССР.— 1991.— Т.317, №3.— С. 732–734.

6. *Рывкин М.И., Дейнеко Е.В., Комарова М.Л., Кочетов А.В., Шумный В.К.* Оценка вирусоустойчивости трансгенных растений табака и люцерны, несущих ген  $\beta$ -интерферона человека // Докл. АН СССР.— 1993.— Т.331, №5.— С. 652–654.

7. *Huisman M.J., Broxterman H.J.* Human interferon does not protect cell protoplasts against infection with alfa-alfa mosaic virus // *Viol.*— 1985.— 143, №4.— P. 622–625.

8. *Edelbaum O., Stein D., Holland N. et al.* Expression of active human interferon- $\beta$  in transgenic plants // *J. of Interferon Res.*— 1992.— V.12, №4.— P. 449–453.

9. *Шевчук В.К., Довгань С.В., Діденко Л.Ф. та ін.* Вірусний опік гречки // Карантин і захист рослин.— 2008.— №11.— С. 13–15.

10. *Шелудько Ю. В., Герасименко И. М., Щербак и др.* (2009) Перспективы для применения в ветеринарной медицине трансгенных растений, синтезирующих физиологически активный интерферон  $\alpha 2b$  человека. Ветеринарна медицина. Збірник наукових праць / Ред. Стегній Б.Т.: Харків, ТОВ “НТМТ”.— 2009.— Т.92.— С. 528–531.

11. *Мандріка Т.Ю., Серденко О.Б., Діденко Л.Ф., и др.* Характеристика бациллоподобного вирусу плямистості айру // Мікробіологічний журнал.— 2007.— Т.69, №5.— С. 49–58.

12. *Белоцкий С.М., Спивак Н.Я.* Интерфероны: биологические и клинические эффекты.— К.: Фитосоцицентр, 2006.— 288 с.

13. *Sembdner G.* The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates // *Ann. Rev. of Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.*— 1993.— V.44.— P. 569–589.

14. *Sela I., Grafi G., Sher N., Edelbaum O., Yagev H., Gerassi E.* Resistance Systems Related to the *N* Gene and their Comparison with Interferon. In: *Plant Resistance to Virus.* Ciba Foundation Symposium, 1987.— P. 109–112.

### Резюме

Было проведено исследование динамики репродукции минус РНК-геномного фиторабдовируса — вируса ожога гречихи в растениях табака, экспрессирующих ген интерферона альфа 2b человека. Показано, что по сравнению с нетрансгенным контролем трансгенные растения табака не проявляют устойчивости к ВОГ.

Було проведено дослідження динаміки репродукції мінус РНК-геномного фіторабдовирусу — вірусу опіку гречки (ВОГ) у рослинах тютюну, які експресують ген інтерферону альфа 2b людини. Показано, що в порівнянні із нетрансгенним контролем, трансгенні рослини тютюну не проявляють стійкості до ВОГ.

Dynamics of RNA-minus genome phytorhabdovirus (burn of buckwheat virus (BBV) reproduction in tobacco plants expressing human alpha 2b interferon was studied. It was shown that transgenic as well as non-transgenic plants do not demonstrate BBV resistance.

**СУПРУН С.М., ДОНЧЕНКО Г.В., ПАРХОМЕНКО Ю.М., \*КУРЧЕНКО И.Н., \*ХАРКЕВИЧ Е.С., \*НОГИНА Т.М., КУЧМЕРОВСКАЯ Т.М.**

*Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Украина, 01601, Киев, ул. Леонтовича, 9, e-mail: sst @biochem.kiev.ua*

*\*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАНУ, Украина, Киев, ул. Заболотного, 154.*

## **БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ КОФЕРМЕНТА А (СОА)**

Кофермент А (СоА) является одним из важнейших коферментов осуществляющих перенос ацильных групп чрезвычайно необходимых в процессах клеточного метаболизме, особенно в биосинтезе жирных кислот. Учитывая его важную роль в обмене веществ, внимание исследователей привлекает СоА, в качестве потенциального препарата, который может обладать корректирующими при нарушениях клеточного метаболизма, вызванных различными заболеваниями (ишемическая болезнь сердца, острые нарушения мозгового кровообращения, атеросклероз, сахарный диабет и т.п.). Экспериментальными исследованиями было показано, что дисульфид СоА и его предшественники могут использоваться в лечебных целях [1]. Однако, получение кофермента А с применением химического синтеза в промышленном масштабе достаточно сложный и не эффективный процес. Не исключено, что хорошей альтернативой ему может быть биотехнологический способ получения препарата, который является более рентабельным и широко используется у высоко развитых странах. При этом наиболее эффективными с точки зрения биотехнологии получения СоА оказались штаммы *Brevibacterium* обладающие высокой биосинтетической активностью, которые начали широко использовать [2, 3]. В качестве потенциального источника СоА в последние годы большое внимание уделяется грибам, которые богаты на разнообразные биологически активные вещества, многие из которых нашли применения для получения лекарственных средств. [4–6]. В связи с эти поиск новых продуцентов сверхпродуцентов СоА, пантотеновой кислоты (ПАК) и других биологически-активных соединений остается актуальным. Преимущество грибов состоит в том, что они нетребовательны к субстрату для культивирования, устойчивы к изменениям природных условий и достаточно технологичны. Цель данного исследования — разработка биотехнологии получения СоА на основе селекционированных штаммов-продуцентов.

### **Материалы и методы**

Нами был проведен скрининг штаммов-продуцентов СоА и его предшественников среди различных таксономических групп микромицетов и бактерий коллекции культур микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии. Для определения СоА микромицеты выращивали глубинным способом на синтетической среде Чапека на качалках при 240 об/мин в течение 3-х суток, в то время как бактерии выращивали в течении двух суток на среде Хоттингера с 1,5% пептона и 1% дрожжевого экстракта. Селекцию штамма продуцента *Corynebacterium ammoniagenes B-6* — прово-