

Tuotekehityksessä ja tutkimuksessa tarvittavien proteiinien tuottaminen kasveissa perunan A-viruksen avulla

Jani Kelloniemi¹, Kristiina Mäkinen², Minna-Liisa Rajamäki¹ ja Jari P.T. Valkonen¹

¹*Soveltavan biologian laitos, PL 27, 00014 Helsingin yliopisto, jari.valkonen@helsinki.fi*

²*Soveltavan kemian ja mikrobiologian laitos, PL 27, 00014 Helsingin yliopisto*

Viruksien käyttö tuotekehityksen ja tutkimuksen vaatimien proteiinien tuottamiseen, syötävien rokotteiden kehittämiseen ja geeniterapiaan edustavat kasvavia biotekniikan sovellusalueita. Perunan A-virus (PVA) kuuluu potyvirusiin, joiden proteiinit tuotetaan aluksi yhtenä suurena molekyylinä. Se pilkotaan yksittäisiksi proteiineiksi viruksen itsensä tuottamalla entsyymeillä. Siten virusgenomiin lisätty vieras geeni käännetään proteiiniksi virusproteiinien mukana. Lopputuloksena sekä viruksen proteiineja että vierasta proteiinia tuotetaan kasvisoluissa samansuuruinen määrä. PVA:n proteiini-kuoren koontimekanismi sallii perintöaineksen merkittävän lisäyksen ilman, että viruksen tartutuskyky merkittävästi heikkenee. Koska virus monistuu ja leviää koko kasviin, jo melko pieni määrä kasveja riittää huomattavan proteiinimäärän tuottamiseen esimerkiksi säännösten mukaisessa kasvihuoneessa.

Tämän työn tarkoituksena oli hyödyntää PVA:n genomia yhden vieraan proteiinin tai useiden erilaisten proteiinien samanaikaiseen tuottamiseen kasveissa. Aluksi kokeiltiin vieraan geenin kloonauksella viruksen replikaasia ja kuoriproteiinia koodaavien genomialueiden väliin. Työhön valittiin kaksi ihmisestä peräisi olevaa geeniä. Toinen geneistä tuotti sorsiiniproteiinia, joka toimii sydänlihaksen supistuksen säätelijänä. Toinen puolestaan tuotti S-COMT-entsyymiä (katekoli-O-metyylitransferaasi), jonka aktiivisuuden rajoittaminen auttaa Parkinsonin taudin hoidossa. Kasvissa tuotettua S-COMT:ia voitaisiin käyttää lääkekehityksessä estolääkkeiden testaukseen. Kahden viikon kuluttua tartutuksesta tupakan lehdissä oli entsyymaattisesti aktiivista S-COMT:ia n. 1 % lehden liukoisista proteiineista. Sorsiini sen sijaan oli pysymätön kasvisoluissa, sillä sitä ei havaittu mitattavia määriä. Tulos osoitti, että kaikki ihmisen proteiinit eivät sellaisenaan sovellu kasvissa tuotettaviksi.

Transposonimutaatioon perustuneella tutkimuksella oli paikannettu PVA:n P1-proteiinia koodaavalta alueelta kohta, johon voitaisiin siirtää vieras geeni. Asia varmistettiin siirtämällä tähän kohtaan meduusan geeni, joka tuottaa UV-valossa vihreänä fluoresoivaa proteiinia (GFP). *GFP*-geeniä kantava PVA levisi kasvissa ja lisääntyi n. 30-50 %:iin viruksen normaalista pitoisuudesta. Koko kasvi fluoresoi vihreänä UV-valossa. Sama voitiin havaita myös tuottamalla GFP jo edellä mainitusta, ihmisen proteiinien tuottamiseen käytetystä PVA-genomin kohdasta.

Vieras geeni voidaan sijoittaa myös potyviruksen P1- ja HCpro-proteiineja koodaavien alueiden väliin. Tämä on mahdollista myös PVA:ssa, mikä osoitettiin tässä työssä. Siten samaan PVA-genomiin voitiin siirtää kolme geeniä, yksi kuhunkin kolmesta kloonaukskohdasta. Lopputuloksena oli PVA-genomi, jossa *GFP*-geeni sijaitsi P1:n sisällä, merivuokon lusiferaasigeeni P1/HCpro-kohdassa ja bakteerin beta-glukuronidaasigeeni (*GUS*) replikaasi/kuoriproteiini-kohdassa. Virusgenomin ja itse viruksen pituudet kasvoivat 38 %, mutta virus säilytti tartutuskykynsä. Se levisi kasveissa saavuttaen 10-15 % viruksen normaalista pitoisuudesta. Kaikki kolme vierasta proteiinia tuotettiin huomattavina pitoisuuksina ja aktiivisina kasvien lehdissä.

Asiasanat: perunan A-virus, biotekniikka, vektorivirus, proteiini, vierasproteiinituotto

Johdanto

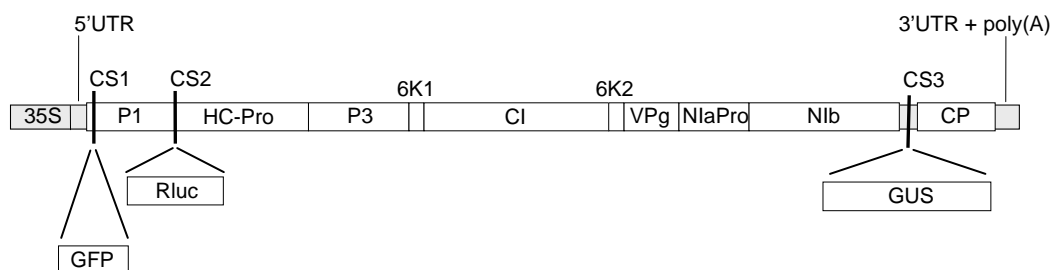
Viruksien käyttö tuotekehityksen ja tutkimuksen vaatimien proteiinien tuottamiseen, syötävien rokotteiden kehittämiseen ja geeniterapiaan edustavat kasvavia biotekniikan sovellusalueita (Gleba ym. 2007). Perunan A-virus (PVA) kuuluu potyvirusiin. Näiden virusten proteiinit tuotetaan aluksi yhtenä suurena molekyylinä transloimalla ne viruksen yksisäikeisestä RNA-genomista, kun virus on päässyt soluun haavan kautta tai kirvavektorinsa imukärsällään tekemässä koepistossa (Rajamäki ym. 2004). Virusgenomiin lisätyn vieraan geenin koodaama aminohapposekvenssi käännetään proteiiniksi virusproteiinien mukana. Saatua polyproteiini pilkotaan sen jälkeen yksittäisiksi proteiineiksi (Kuva 1) viruksen itsensä tuottamalla entsyymeillä. Lopputuloksena kaikkia proteiineja tuotetaan kasvisoluissa samansuuruinen määrä, vieras proteiini mukaan lukien. Lisäksi, potyviruksen proteiinikuoren koontimekanismi sallii perimäaineksen merkittävän lisäyksen ilman että viruksen tartutuskyky merkittävästi heikkenee. Koska virus monistuu ja leviää koko kasviin, jo melko pieni määrä kasveja riittää huomattavan proteiinimäärän tuottamiseen esimerkiksi säännösten mukaisessa kasvihuoneessa.

Tämän työn tarkoituksena oli hyödyntää PVA:n genomia siten, että virus soveltuisi yhden vieraan proteiinin tai useiden erilaisten proteiinien samanaikaiseen tuottamiseen kasveissa.

Aineisto ja menetelmät

PVA:n RNA-genomi on kloonattu DNA-muodossa, jotta sitä voidaan muokata, lisätä plasmidin osana bakteerisoluihin sekä säilyttää se muuttumattomana. Tähän kloonin voidaan lisätä vieraitakin DNA-jaksoja tai geenejä. Siihen soveltuvat kohdat on paikannettu aiemmissä tutkimuksissa (Kekarainen ym. 2002; Ivanov ym. 2003; Rajamäki ym. 2005; Kelloniemi ym. 2006). Ne on merkitty kuvaan 1. Näitä kloonauskohtia on muokattu geeniteknisesti siten, että niistä tuotetut vieraat proteiinit vapautuvat virusproteiineista samojen proteinaasien avulla kuin viruksen omatkin proteiinit.

Viruksen DNA-kloonilla voidaan tartuttaa kasveja siten, että DNA ammutaan kasvisolukkuon kultahiukkasten pinnalla. Tumassa DNA:sta transkriptoidaan viruksen RNA-genomi. Se kuljetetaan solulimaan, jossa siitä tuotetaan viruksen polyproteiini ja normaali infektiokierto alkaa. *Nicotiana benthamiana* on tupakan sukuinen, usein käytetty koekasvi virustutkimuksessa. Sitä käytettiin tässäkin tutkimuksessa tupakan (*N. tabacum*) ohella. Valkuaisaineet eristetään kasvisolukosta, jonka vektorivirus on tartuttanut. Tuotetut vieraat proteiinit voidaan tarvittaessa edelleen eristää ja puhdistaa niiden päähän lisätyn erityisen aminohapposekvenssin avulla pylväskromatografialla.



Kuva 1. Kaavakuva proteiinituottovektorina käytetystä perunan A-viruksen perimästä, joka mahdollistaa kolmen vieraan proteiinin samanaikaisen tuottamisen. Kolmeen kloonauskohtaan (CS1, CS2 ja CS3) koemielessä sijoitetut geenit koodaavat meduusan viherfluoresoivaa proteiinia (GFP; *Aequorea victoria* green fluorescent protein), merivuokon (*Renilla reniformis*) lusiferaasientyymiä (Rluc) ja *Escherichia coli*-bakteerin β -glukuronidaasientsyymiä (GUS). 35S, kukkakaalin mosaiikkiviruksen 35S-promoottori; 5'UTR ja 3'UTR, 5'- ja 3'-päähän ei-koodaavat alueet; P1, proteinaasi 1; HC-Pro, helper component-proteinaasi; P3, kolmas proteiini; 6K1 ja 6K2, 6 kDa proteiinit 1 and 2; CI, inklusioproteiini; VPg, virusgenomin 5'-päähän kiinnittyvä proteiini; NIaPro, tumainklusioproteiini b (viruksen pääproteinaasi); NIb, tumainklusioproteiini b (replikaasi); CP, kuoriproteiini; poly(A), polyadeniinisekvenssi.

Tulokset ja tulosten tarkastelu

Ihmisen proteiinin tuotto perunanviruksesta kasvissa

Aluksi kokeiltiin kloonauskohtaa C3 (Kuva 1) ihmisen proteiinien tuottamiseen. Toinen valituista geneistä koodaa sorsiiniproteiinia (22 kDa), joka toimii sydänlihaksen supistuksen säätelijänä (Frank ym. 2005). Toinen geneistä tuottaa puolestaan S-COMT-entsyymiä (katekoli-*O*-metyylitransferaasi, 25 kDa), jonka aktiivisuuden rajoittaminen auttaa Parkinsonintaudin hoidossa (Lundström ym. 1991). Kasvissa tuotettuja proteiineja voitaisiin käyttää lääkekehityksessä mm. estolääkkeiden testaukseen.

PVA, jonka C3-kohtaan oli lisätty kumpi tahansa em. geneistä, tartutti kasvit ja levisi tartuteuista lehdistä muihin kasvaviin kasvinosiin. Kasvit oirehtivat tyypillisellä tavalla, mutta hieman normaalia lievemmin, mikä on eduksi biomassan ja siten vieraiden proteiinienkin tuotannolle. Ihmisen geenit olivat pysyviä PVA:n genomissa viruksen lisääntymisen ja leviämisen aikana. Kahden viikon kuluttua tartutuksesta tupakan lehdistä oli entsyymaattisesti aktiivista S-COMT:ia n. 1 % lehden liukoisista proteiineista (Kelloniemi ym. 2006). Sorsiini sen sijaan oli pysymätön kasvisoluissa. Sitä ei erilaisien menetelmien käyttämisestä huolimatta havaittu mitattavia määriä.

Tulokset osoittivat, että S-COMT-proteiinia voidaan tuottaa kasvisolukossa korkeina pitoisuuksina, mutta sen sijaan kaikki ihmisen proteiinit kuten sorsiini eivät sellaisenaan sovellu kasvissa tuotettaviksi. Viruksesta tuotettu vieras proteiini voitaisiin kohdentaa tiettyihin solun osiin signaali-peptidien avulla ja siten parantaa proteiinin pysyvyyttä, mikä vaatii vielä jatkotutkimuksia.

Kolmen vieraan proteiinin samanaikainen tuottaminen PVA-vektorista

Transposonimutaatioon perustuneella tutkimuksella oli paikannettu PVA:n P1-proteiinia koodaavalta alueelta kohta (CS1) (Kuva 1), johon voitaisiin siirtää vieras geeni (Kekarainen ym. 2002). Asia varmistettiin siirtämällä tähän kohtaan meduusan geeni, joka tuottaa UV-valossa vihreänä fluoresoivaa proteiinia (GFP). *GFP*-geeniä kantava PVA levisi kasvissa ja lisääntyi n. 30-50 %:iin viruksen normaalista pitoisuudesta (Rajamäki ym. 2005). Koko kasvi fluoresoi vihreänä UV-valossa. Sama voitiin havaita myös tuottamalla GFP jo edellä mainitusta, ihmisen proteiinien tuottamiseen käytetystä PVA-genomin kohdasta. Vieras geeni voidaan sijoittaa myös potyvirusen P1- ja HCpro-proteiineja koodaavien alueiden väliin (CS2; Kuva 1). Näin PVA:ssa oli käytettävissä kolme vieraiden proteiinien kloonauskohtaa. Kolmea vierasta proteiinia ei ole aikaisemmin tuotettu vektoriviruksista samanaikaisesti, joten mahdollisuus tähän päätettiin testata kolmen eläin- ja bakteeriperäisen proteiinin avulla.

Samaan PVA-genomiin siirrettiin kolme geeniä, yksi kuhunkin kolmesta kloonauskohdasta: meduusan GFP-proteiinia (238 aminohappoa; 27 kDa) tuottava geeni P1:n sisälle (kohta C1), merivuokon lusiferaasia (Rluc; 311 aminohappoa, 35 kDa) koodaava geeni P1/HCpro-kohtaan (C2) ja *E. coli*-bakteerin β -glukuronidaasia (GUS; 603 aminohappoa, 68 kDa) koodaava geeni (*Uida*) replikaasi/kuoriproteiini-kohtaan (C3) (Kuva 1). Virusgenomin pituus kasvoi 38 %, mutta virus säilytti silti tartutuskykynsä. Se levisi kasveissa saavuttaen 10-15 % viruksen normaalista pitoisuudesta. Kaikki kolme vierasta proteiinia esiintyivät lehdistä aktiivisina. Lisäksi tehtiin vektorivirukset, joissa kyseiset geenit olivat joko yksinään tai pareittain. Näin saatujen 7 vektoriviruksen tuottama kuoriproteiini- ja vierasproteiinipitoisuus on esitetty Taulukossa 1.

Kun tuotettiin yksistään GUS-entsyymiä, entsyymaattisesti aktiivisen GUS:n määrä oli 0,6-0,7 % lehden liukoisista proteiineista. Viruksen kuoriproteiinin määrä oli 1,4-3,3 %. Jos viruksessa ei ollut lainkaan vieraita genejä, kuoriproteiinin määrä oli 1,8-3,6 % lehden liukoisista proteiineista. Siten yksi suurikaan geeni (*GUS*) ei merkittävästi vaikuttanut viruksen lisääntymiseen ja leviämiseen. Kuitenkaan GUS:n saanto ei ollut sama kuin viruskuoriproteiinin, vaikka kumpaakin tulisi syntyä yhtä paljon. Saanto lienee ollut optimaalista alempi siksi, että *GUS*-geeni on jossain määrin epästabiili. Sen vuoksi osassa monistuvista virusgenomeista *GUS*-geeni muuntuu, mikä puolestaan johtaa lyhentyneisiin tai lukehekykseltään virheellisiin proteiineihin, jotka eivät ole aktiivisia.

PVA:n perimä on suhteellisen pieni (9565 emästä) eikä sisältäne viruksen kannalta tarpeettomia osia. Tämä johtaa siihen, että myös virusperimään lisätyt vieraat, viruksen kannalta tarpeettomat tai jopa tartuttaa osin haittaavat geenit ennemmin tai myöhemmin poistetaan viruksen monistuessa. *GFP*-geenin havaittiin alkavan lyhentyä CS1-kohdassa kahden viikon kuluessa tartutuksesta (Rajamäki ym. 2005), kun taas CS3-kohtaan kloonattu *GFP* alkoi lyhentyä noin kuukauden kuluttua

infektion alkamisesta (Kelloniemi ym. 2006). Geenin pituudella tai emäsjärjestyksellä voi niilläkin olla vaikutusta pysyvyyteen vektoriviruksessa. C3-kohtaan kloonatusta *Uida*-geenistä oli havaittavissa lyhentyneitä muotoja jo 10 päivää virustartutuksesta. Useimmissa tapauksissa tällainen geenien epastabiilisuus ei kuitenkaan koidu suureksi ongelmaksi, sillä tupakassa ja *N. benthamianassa* kaksi viikkoa riitti viruksen leviämiseen kauttaaltaan koko kasviin. Tällöin ylälehdissä oli runsaasti virusta ja vierasta proteiinia ja ne voitiin eristää.

Taulukko 1. Viruksen kuoriproteiinin (CP) ja vieraiden proteiinien, viherfluoresoivan proteiinin (GFP - G), lusiferaasin (Rluc - L) ja β -glukuronidaasin (GUS - U) määrät tuotettuna PVA-vektoriviruksista *Nicotiana benthamiana*-kasvissa. Koe toistettiin ja tulokset olivat samanlaiset.

Proteiinit	Vektorivirukset ¹							
	pG00	p0L0	p00U	pGL0	pG0U	p0LU	pGLU	p000
CP ²	10,1 (1,6)	13,9 (1,3)	14,2 (2,1)	5,8 (0,4)	7,7 (0,3)	8,4 (1,7)	2,7	18,5 (3,3)
GFP ³	+++	-	-	++	++	-	+	-
Rluc ⁴	0	3790 (725)	0	1070 (255)	0	1460 (588)	142	0
GUS ⁵	0	0	6,1 (1,9)	0	2,3 (0,8)	2,7 (1,2)	0,4	0

¹Vektoriviruksista tuotetut vireaat proteiinit: pG00, GFP; p0L0, Rluc; p00U, GUS; pGL0, GFP ja Rluc; pG0U, GFP ja GUS; p0LU, Rluc ja GUS; pGLU GFP, Rluc ja GUS; p000, tuottovektori ilman viraita geenejä. Numerot ovat kolmen kasvin pitoisuuksien keskiarvoja mitattuina systeemisesti infektoituneista lehdistä 14 päivää tartutuksen jälkeen (keskihajonta suluissa).

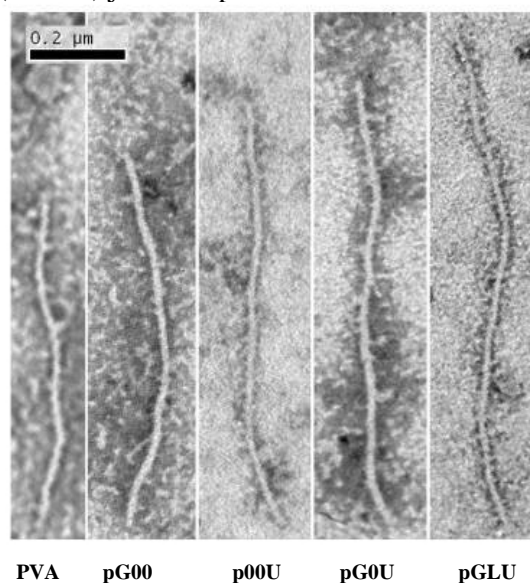
²Kuoriproteiinin (CP) määrät (ng/ μ g liukoista lehtiproteiinia) mitattiin DAS-ELISA:lla käyttäen tunnettuja määriä puhdistettuja PVA viruspartikkeleita verranteena.

³Viherfluoresenssin suhteellinen voimakkuus UV-valossa: +++, korkea voimakkuus; ++, kohtalainen voimakkuus; +, heikko fluoresenssi; -, ei havaittavaa fluoresenssia.

⁴Suhteellinen lusiferaasiaktiivisuus kasvimehussa (valoyksikkö/ μ g liukoista lehtiproteiinia).

⁵Entsymaattisesti aktiivisen GUS:n määrä kasvimehussa (ng/ μ g liukoista lehtiproteiinia) käyttäen tiettyjä määriä puhdistettua GUS:a verranteena.

Tutkimme myös, kasvoiko viruspartikkelien pituus samassa suhteessa kuin virusgenomin pituus. Normaalinäköisiä, oletetun mittaisia partikkeleita muodostui kaikilla tarkastelluilla vektoriviruksilla (Kuva 2) ja niiden pituudet korreloivat lineaarisesti virusgenomin pituuden kanssa.



PVA:	perimä:	9565 emästä
	partikkeli:	743 nanometriä (nm)
GFP-geenin sisältävä PVA (pG00):	perimä:	10470 emästä
	partikkeli:	811 nm
Uida-geenin sisältävä vektorivirus (p00U):	perimä:	11565 emästä
	partikkeli:	899 nm
GFP- ja Uida-geenit sisältävä vektorivirus (pG0U):	perimä:	12279 emästä
	partikkeli:	965 nm
GFP-, lusiferaasi- ja Uida-geenit sisältävä vektorivirus (pGLU):	perimä:	13212 emästä
	partikkeli:	997 nm

Kuva 4. Viruspartikkeleiden pituuksia elektronimikroskooppikuvista mitattuina. Pituudet ovat 20-50 mittauksen keskiarvoja. Kolmen vieraan geenin lisäys vektorivirukseen kasvatti sen perimän pituutta 38 % ja johti myös viruspartikkelien pituuden kasvuun samassa suhteessa.

Johtopäätökset

Perunan A-virusvektorista voitiin tuottaa eri lajeista peräisin olevia proteiineja kasvilla. Kasvisolukoon saatiin korkeina pitoisuuksina ihmisen (S-COMT), meduusan (GFP), merivuokon (lusiferaasi) ja bakteerin (GUS) proteiineja. Menetelmä soveltuu siten tutkimuksessa ja teollisuudessa tarvittavien proteiinien tuottoon. Proteiinit ovat kuitenkin yksilöllisiä. Toisesta eliöstä peräisin olevan proteiinin saanto kasvilla on vaikeasti ennustettavissa. Vektoriviruksen käytön etuna on, että geenin/proteiinin soveltuvuus kasvituottoon voidaan todentaa hyvin nopeasti, jopa alle kuukaudessa.

Kirjallisuus

- Gleba, Y., Klimyuk, V. & Marillonnet, S.** 2007. Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Curr. Opin. Biotech.* 18: 134-141.
- Frank, K.F., Bölck, B., Ding, Z., Krause, D., Hattebuhr, N., Malik, A., Brixius, K., Hajjar, K.J., Schrader, J. & Schwinger, R.H.G.** 2005. Overexpression of sorcin enhances cardiac contractility in vivo and in vitro. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 38: 607-615.
- Ivanov, K.I., Puustinen, P., Gabrenaite, R., Vihinen, H., Ronnstrand, L., Valmu, L., Kalkkinen, N. & Mäkinen, K.**, 2003. Phosphorylation of the potyvirus capsid protein by protein kinase CK2 and its relevance for virus infection. *Plant Cell* 15, 2124-2139.
- Lundström, K., Salminen, M., Jalanko, A., Savolainen, R. & Ulmanen, I.** 1991. Cloning and characterization of human placental catechol-O-methyltransferase cDNA. *DNA Cell Biol.* 10: 181-189.
- Kelloniemi, J., Mäkinen, K. & Valkonen, J.P.T.** 2006. A potyvirus-based gene vector allows producing active human S-COMT and animal GFP, but not human sorcin, in vector-infected plants. *Biochimie* 88: 505-513.
- Kekarainen, T., Savilahti, H. & Valkonen, J.P.T.** 2002. Functional genomics on *Potato virus A*: virus genome-wide map of sites essential for virus propagation. *Genome Res.* 12: 584-594.
- Rajamäki, M.-L., Kelloniemi, J., Alminaitė, A., Kekarainen, T., Rabenstein, F. & Valkonen, J.P.T.** 2005. A novel insertion site inside the potyvirus P1 cistron allows expression of heterologous proteins and suggests some P1 functions. *Virology* 342: 88-101.
- Rajamäki, M.L., Mäki-Valkama, T., Mäkinen, K. & Valkonen, J.P.T.** 2004. Infection with potyviruses. Pages 68-91 in *Plant-Pathogen Interactions*. N.J. Talbot (ed.), Blackwell Publishing, Sheffield, UK. ISBN 1-4051-1433-9.