

На правах рукописи

Бурлаковский Михаил Сергеевич

**Анализ трансгенных растений, продуцирующих гамма-
интерферон животных для применения в ветеринарии**

Специальность: 03.02.07 Генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2020

Работа выполнена на кафедре генетики и биотехнологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет».

Научный руководитель: **Лутова Людмила Алексеевна**
доктор биологических наук,
профессор кафедры генетики и биотехнологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», г Санкт-Петербург

Официальные оппоненты: **Проворов Николай Александрович**
доктор биологических наук
директор ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», г Санкт-Петербург

Антонова Ольга Юрьевна
кандидат биологических наук,
ведущий научный сотрудник Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н. И. Вавилова (без ученого звания), г Санкт-Петербург

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова», г. Москва

Защита диссертации состоится «10» июня 2020 г. в 14.00 часов на заседании совета Д 006.041.02 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова» (ВИР) по адресу: 190031, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 44.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова и на сайте института: <https://www.vir.nw.ru/dissertatsionnyj-sovet/>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 006.041.02,
доктор биологических наук

Рогозина Елена Вячеславовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Одной из тенденций развития современной фармакологии является переход от использования малых молекул к белковым препаратам. Почти треть всех фармацевтических веществ, находящихся в разработке, имеет белковую природу (антитела, вакцины, ферменты, цитокины и факторы роста) (Walsh, 2018). В отличие от малых молекул, белки можно получать только с использованием систем экспрессии живых организмов. Зачастую выделение их из естественных носителей нерентабельно, сопряжено с риском переноса заболеваний либо с этическими проблемами. Решением является использование трансгенных организмов-продуцентов, нарабатывающих в больших количествах чужеродные (рекомбинантные) белки. В настоящее время для коммерческого синтеза белков используются системы экспрессии на основе бактерий, культур клеток насекомых и млекопитающих, дрожжей и растений. Развиваются и такие направления, как наработка гетерологичного белка в молоке трансгенных животных и в бесклеточных системах белкового синтеза (Бурлаковский и др., 2016).

Растения-продуценты в сравнении с иными организмами обладают рядом особенностей и преимуществ, такими как низкая стоимость производства и высокая степень безопасности для млекопитающих (так как растения не поражаются вирусами и прионами животных и могут быть выращены без применения материалов животного происхождения). В настоящее время в трансгенных растениях уже получено множество белков животных и человека, включая ферменты, антигены, гормоны, антитела (Plant-made pharmaceuticals, PMPs) (Abirig et al., 2016). Для некоторых белков медицинского назначения, способных оказывать эффект при пероральном употреблении, существует возможность полностью отказаться от процедур выделения, очистки и инъекционного введения, используя трансгенные растения как съедобные иммуномодуляторы и вакцины. Это устраняет наиболее сложные и дорогостоящие этапы производства и применения.

Недостатком большинства растений-продуцентов является низкий уровень синтеза чужеродного белка, зачастую составляющего сотые доли процента сырой массы (Ki-Beom Moon et al., 2020). Одним из вариантов решения данной проблемы является выбор действующего вещества, способного оказывать терапевтическое воздействие в крайне малых дозах на слизистые оболочки ротовой полости и пищеварительного тракта. Этим требованиям удовлетворяют рекомбинантные цитокины, например, интерфероны, которые являются мощными неспецифическими стимуляторами иммунной системы против патогенов вирусной и бактериальной природы и различных опухолей; действуют в малых дозах и способны оказывать эффект при пероральном применении. В отличие от антибиотиков, интерфероны не вызывают появления устойчивых форм микроорганизмов, а также не приводят к появлению лекарственного привыкания (Хрянин, Решетников, 2015). В случае ветеринарного использования рекомбинантные интерфероны не представляют

угрозы при попадании в мясо и молоко. Препараты рекомбинантных интерферонов разработки компании «БелАгроГен» (Республика Беларусь) успешно производятся и применяются в ветеринарии (Шахов и др., 2019).

В лаборатории генной и клеточной инженерии растений кафедры генетики и биотехнологии СПбГУ были получены трансгенные растения табака (*Nicotiana tabacum* L.), несущие ген бычьего гамма-интерферона *sIFNG* под контролем 35S промотора (Савельева и др., 2015). В течение пяти поколений проводился отбор по критериям наличия трансгенной вставки, ее активности и присутствия в тканях растения белка гамма-интерферона, в результате чего были получены гомозиготные линии InterB и Inter311. Наши исследования продолжают данную работу и направлены на получение трансгенных растений-продуцентов иммуномодуляторов для животноводства.

Целью работы стал анализ ранее полученных линий трансгенных растений табака и создание новых генно-инженерных конструкций с целью получения более эффективных растений-продуцентов, съедобных для животных.

В соответствии с целью, были поставлены следующие **Задачи**:

1. Анализ четвертого и пятого поколений трансгенных растений табака (*Nicotiana tabacum* L.), синтезирующих бычий гамма-интерферон, на наследование трансгенной вставки и экспрессию гетерологичного гена *sIFNG*.
2. Анализ рекомбинантного белка: проверка растений на наличие в тканях гамма-интерферона, тестирование его биологической активности на культуре клеток быка и на лабораторных мышах.
3. Сравнение трансгенных линий табака InterB и Inter311, отличающихся по уровню синтеза рекомбинантного белка: изучение последовательности трансгенной вставки, поиск места ее встраивания в геном растений.
4. Создание новых трансгенных конструкций на основе тканеспецифичных корневых промоторов pIbSRD1 батата (*Ipomoea batatas* L.) и pZmRCP-1 кукурузы (*Zea mays* L.) для дальнейшего получения более эффективных продуцентов интерферона на базе растений моркови (*Daucus carota* L.).

Научная новизна

Подтверждено присутствие в тканях растений белка гамма-интерферона, сохраняющего биологическую активность, в том числе при пероральном введении животным. Объяснены различия в уровне накопления целевого белка между линиями табака InterB и Inter311, которые обусловлены встраиванием T-ДНК в разные районы генома и кластерной структурой вставки у линии Inter311. Клонированы тканеспецифичные растительные промоторы pIbSRD1 батата и pZmRCP-1 кукурузы, созданы трансгенные конструкции как для визуализации их области экспрессии, так и для синтеза бычьего гамма-интерферона под их контролем. С использованием данных конструкций впервые получены «бородатые корни» моркови.

Теоретическая и практическая значимость работы

Подтверждено стабильное наследование и экспрессия рекомбинантного гена в растениях табака на протяжении пяти поколений и отсутствие случаев его потери, что свидетельствует о получении гомозиготных линий (патент РФ RU2564115). Продемонстрирована принципиальная возможность получения растений-продуцентов гамма-интерферона быка и их использования в качестве съедобных иммуномодуляторов. Продемонстрирована важность анализа сайта встраивания трансгенной вставки при получении промышленных форм трансгенных растений. Подтверждена возможность использования промотора pIbSRD1 в генетических конструкциях для массовой продукции рекомбинантного белка в корнях растений.

Основные положения, выносимые на защиту

Рекомбинантный бычий гамма-интерферон, наработанный в трансгенных растениях табака, проявляет противовирусную активность на культуре клеток быка и при пероральном применении вызывает изменения в формуле крови лабораторных мышей. Это подтверждает принципиальную возможность использования растений в качестве «съедобных иммуномодуляторов» для применения в животноводстве.

Полученные линии табака InterB и Inter311 различаются по уровню синтеза рекомбинантного белка. Это обусловлено встраиванием Т-ДНК в разные районы генома и формированием кластерной структуры вставки у линии Inter311.

Тканеспецифичный промотор батата pIbSRD1 может быть использован для получения трансгенных растений-продуцентов, накапливающих рекомбинантный белок в корнях.

Методология и методы исследования

В работе использовали молекулярные методы (выделение нуклеиновых кислот, ПЦР, ОТ-ПЦР, ПЦР-РВ, «прогулка по хромосоме»), клонирование генов, создание трансгенных конструкций методом Gateway, выделение и очистка белков, вестерн-блот), трансформация бактерий и растений, визуализация области экспрессии (GUS-окрашивание), выращивание растений *in vitro* и *in vivo* (табак, кукуруза, батат, морковь), работа с лабораторными животными (мыши *Mus musculus* L.), культурами клеток быка (*Bos taurus taurus* L.). Реактивы использовали в соответствии с инструкциями производителя.

Личный вклад автора

Основная часть экспериментальной работы была выполнена автором самостоятельно. Измерение биологической активности белков на культуре клеток выполняли совместно с сотрудниками лаборатории биохимической генетики кафедры генетики и биотехнологии СПбГУ, что отражено в совместной публикации. Клонирование тканеспецифичных промоторов pIbSRD1 и pZmRCP-1 проводили совместно с Носовой Ксенией Игоревной.

Степень достоверности

Достоверность результатов обеспечена проведением исследований с использованием современных методик и высокотехнологичного оборудования и подтверждается воспроизводимостью экспериментов и статистической обработкой данных.

Апробация работы

Материалы были опубликованы в 4 статьях в рецензируемых научных изданиях и изложены на следующих конференциях и съездах: VI Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2011); VII International symposium «EU-Russia: cooperation in biotechnology, agriculture, forestry, fisheries and food in the 7th framework programme» (Москва, 2012); VII Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2013); Международная научно-практическая конференция "Биотехнология и качество жизни" (Москва, 2014); VI съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров (ВОГиС) и ассоциированных генетических симпозиумов (Ростов-на-Дону, 2014); Международная научно-практическая конференция «Биотехнологии в комплексном развитии регионов» (Biotech World 2016) (Москва, 2016); V международная научно-практическая конференция «Биотехнология: наука и практика», (Ялта, 2017); VII съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ (Санкт-Петербург, 2019); Международная научно-практическая конференция «Достижения в генетике, селекции и воспроизводстве сельскохозяйственных животных» (Санкт-Петербург, 2019).

Связь работы с плановыми исследованиями и научными программами

Исследования проводили в период с 2011 г. по 2020 гг. в рамках плановых тем НИР лаборатории генной и клеточной инженерии растений кафедры генетики и биотехнологии СПбГУ, проектов НШ-5115.2014.4 (1.10.359.2014), НИР СПбГУ 1.38.229.2014, НШ-9513.2016.4 (1.10.1169.2016).

Структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 154 страницах машинописного текста, содержит 23 таблицы, иллюстрирована 27 рисунками и состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследований, результатов, обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка использованной литературы, включающего 211 источников, в том числе 175 ссылок на зарубежных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы

К настоящему времени проведено множество экспериментов по наработке в трансгенных растениях рекомбинантных белков медицинского и ветеринарного назначения. Гетерологичный ген может интегрироваться в ядерный или хлоропластный геном либо находиться в составе вектора для временной (транзиентной) экспрессии. Содержать трансгенные растения можно как *in vitro*, в качестве суспензионной клеточной культуры или «бородатых корней», так и *in vivo*, в виде целых организмов, при этом сельскохозяйственные технологии выращивания позволяют добиться минимальной цены за единицу биомассы среди трансгенных систем экспрессии. Использование различных промоторов дает возможность накапливать целевой белок в определенных органах растения — листьях, корнях, семенах, что облегчает сбор сырого материала.

Де-факто стандартом для получения трансгенных растений является метод агробактериальной трансформации. Интеграция трансгена происходит в случайный участок геномной ДНК, около 50% событий приводит к формированию кластеров из двух или более копий вставки, и около 30–70% включают последовательности родительской бинарной плазмиды Т-ДНК либо геномной ДНК растения.

Перспективными для наработки в растениях являются белки семейства цитокинов - эндогенных медиаторов межклеточного взаимодействия. Большие надежды связывают с препаратами интерферонов, являющихся неспецифическими средствами защиты организма от вирусных инфекций. Для интерферонов характерными являются противовирусные, иммуностимулирующие, антибактериальные и противоопухолевые свойства. Препараты интерферонов успешно применяются в медицине и ветеринарии (Бурлаковский и др., 2016).

Материалы и методы

Растительный материал. В работе использовали трансгенные растения табака (*Nicotiana tabacum* L.) поколений T₄ и T₅, несущие ген бычьего гамма-интерферона *sIFNG*. Растения-основатели линий InterB и Inter311 (рис. 1) были получены ранее на кафедре генетики и биотехнологии (Савельева и др., 2009; Савельева и др., 2015) в результате агробактериальной трансформации с использованием генетической конструкции pART27INT6 (патент РФ RU2564115). Растения поддерживали микроочеркованием в 100-мл стаканчиках на среде MS20, при шестнадцатичасовом световом дне. Для получения значительной биомассы и семян растения пересаживали в грунт в оранжерею.

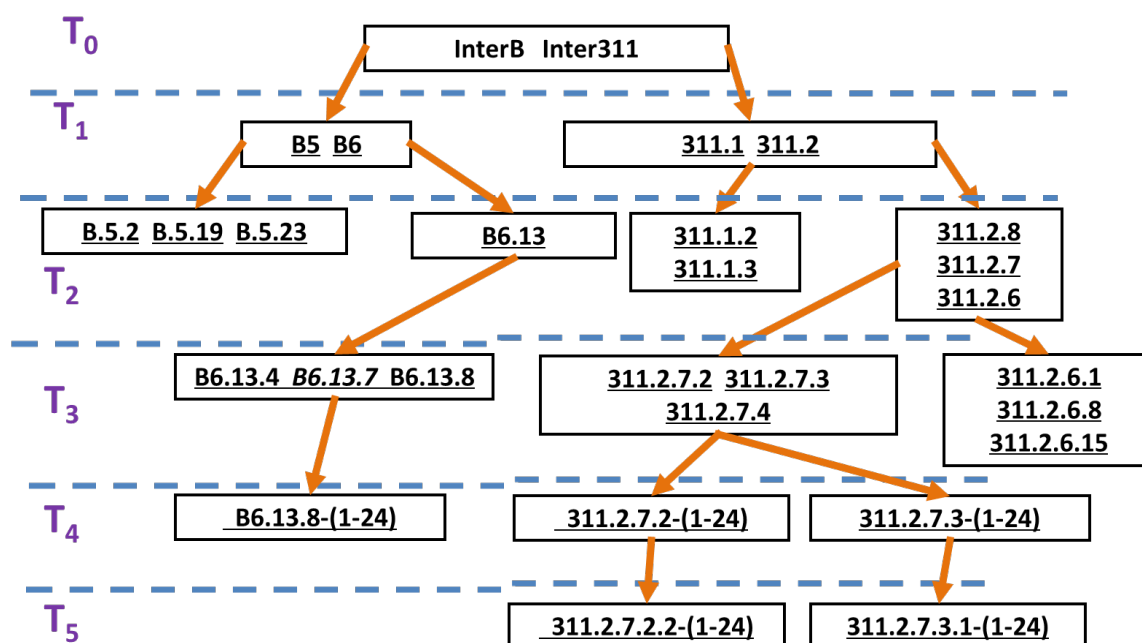


Рисунок 1. Родословная трансгенных растений табака.

Также объектами выступали морковь посевная (*Daucus carota* subsp. *sativus*) сорта Нантская-4 (выращенные в грунте корнеплоды и полученные в ходе трансформации «бородатые корни»); батат, или сладкий картофель (*Ipomoea batatas* L.) (клубни); кукуруза сахарная (*Zea mays* L.) (пророщенные в воде семена).

Трансформацию моркови для получения «бородатых корней» осуществляли методом инокуляции стерилизованных корневых дисков суспензией *Agrobacterium rhizogenes*. Диски и корни содержали на среде MS½ без гормонов (Baranski, 2008).

Штаммы микроорганизмов: в работе использовали бактерии *Escherichia coli* (штаммы DH5α, DB3.1, TOP 10, DH10β) для поддержания трансгенных конструкций и *Agrobacterium rhizogenes* (штамм MSU440) для трансформации растений.

Использовали следующие молекулярно-биологические методы:

Выделение плазмидной ДНК из бактериальных культур осуществляли с помощью набора Plasmid Miniprep (Евроген). ДНК из растений выделяли при помощи набора DNEasy Plant Mini Kit фирмы Quiagen, либо СТАБ-методом (Дрейпер и др., 1991; Рябушкина и др., 2012). ПЦР для амплификации фрагментов размером более 1000 п. н. осуществляли с помощью полимеразы Phusion (Thermo Scientific, США) в соответствии с инструкциями производителя. ПЦР для детектирования целевого фрагмента осуществляли с помощью Taq-полимеразы (Евроген, Россия). Растительную РНК выделяли с применением реагента Purezol (Bio-Rad, США). Обратную транскрипцию проводили с помощью обратной транскриптазы RevertAid (Thermo Scientific, США). Использовали набор реагентов для проведения ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) в присутствии красителя Eva Green (Синтол, Россия). ПЦР-РВ проводили на амплификаторе CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США). Расчеты пороговых циклов (Ct) проводили с помощью программы CFX-Manager (Bio-Rad, США). Количественную оценку экспрессии анализируемого гена проводили по методу $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Šubr et al., 2006; Ребриков и др., 2009). Секвенирование ДНК проводили в ресурсном центре СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий» (Chetverikov et al., 2019).

«Прогулка по геному»: для секвенирования фрагментов ДНК, фланкирующих известные последовательности, применяли метод «прогулки по геному» FPNI-PCR (Fusion primers and nested integrated PCR, вложенной ПЦР со слитыми праймерами) (Wang et al., 2011).

Для клонирования трансгенных конструкций использовали систему Gateway (Invitrogen, США).

Визуализацию области экспрессии репортерного гена GUS осуществляли с помощью субстрата X-Gluc (Thermo Scientific, США).

Выделение рекомбинантного белка из растительных тканей проводили по методике, описанной в статье (Burlakovskiy et al, 2015). Выделенные растительные белки фракционировали с помощью сульфата аммония (Долсон и др., 1991). Очистку фракции гамма-интерферона проводили путем диализа.

Для **вестерн-блот гибридизации** пробы разгоняли в полиакриламидном геле (Laemmli, 1970) и переносили на мембрану методом полусухого блота (Trans-Blot SD semi-dry transfer cell, Bio-Rad, США). Для проведения гибридизации использовали первичные поликлональные козы антитела к рекомбинантному бычьему гамма-интерферону (R&D systems, Великобритания, кат. № AF-2300) и вторичные поликлональные противокозьи кроличьи антитела, меченные пероксидазой хрена (МЕДГАМАЛ, Россия) (Burlakovskiy et al, 2015).

Оценку биологической активности рекомбинантного белка осуществляли на базе лаборатории биохимической генетики с использованием культуры клеток трахеи плодов коров и вируса везикулярного стоматита (ОФС.1.7.2.0002.15 Биологические методы испытания препаратов интерферона

с использованием культур клеток). Растительный материал дикого типа, а также трансгенных линий 311.2.7.2-(1-6), 311.2.7.3-(1-6) и В6.13.8-(1-6) отбирали, доводя суммарную массу зеленых тканей до 10 г. После экстракции белков, высаливания фракции гамма-интерферона и диализной очистки объем образца доводился до 1 мл.

Испытание рекомбинантного белка на лабораторных животных.

Использовали беспородных белых мышей, самцов, возрастом 3 месяца и весом 20-30 г. из питомника «Рапполово». Основной группе в течение шести дней перорально вводили очищенный экстракт, полученный из свежего листового материала трансгенных растений табака (311.2.7-(2, 3, 4)); первой контрольной группе - экстракт табака дикого типа; второй контрольной – чистый буфер белковой экстракции. Ежедневная доза гамма-интерферона для животного опытной группы составляла примерно 1 мкг. Численность каждой группы – 6 особей.

За день до начала терапии и еще дважды, через 16 и 30 дней, у животных отбирали образцы периферической крови из кончика хвоста. Для оценки соотношения форменных элементов получали мазки, окрашиваемые по Романовскому-Гимзе, для проведения иммуноферментного анализа центрифугированием отделяли плазму и хранили при -80°C . Измерения проводили на ИФА-анализаторе ФФМ-1 (Россия), использовали антитела против мышинных иммуноглобулинов (Медгамал, Россия), меченные пероксидазой хрена.

Статистические методы и компьютерные программы, используемые в работе. Для работы с последовательностями ДНК использовали программы Blast (NCBI), ApE (M. Wayne Davis, <https://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/ape/>) и GeneStudio™ Professional 2.2.0.0 (www.genestudio.com) (Chetverikov et al., 2019). Статистическую значимость различий между группами оценивали с помощью дисперсионного анализа и t-критерия Стьюдента с поправкой на множественные сравнения. Данные виды анализа использовали также в модификации для оценки повторных измерений. В случае несоответствия внутригруппового распределения нормальному, применяли непараметрический критерий Краскела-Уоллиса, критерий Фридмана и критерий знаков. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$ (Гланц, 1999).

Результаты и обсуждение

Анализ наследования и экспрессии гетерологичного гена *sIFNG*

Все исследованные растения поколений T₄ и T₅ в ходе ПЦР-анализа продемонстрировали присутствие гена *sIFNG*, что свидетельствует о стабильном наследовании гена гамма-интерферона до 5 поколения (рис. 2).

ОТ-ПЦР анализ продемонстрировал активность гена *sIFNG*, у всех исследованных растений.

Вестерн-блот гибридизация показала присутствие рекомбинантного интерферона во всех экстрактах трансгенных растений.

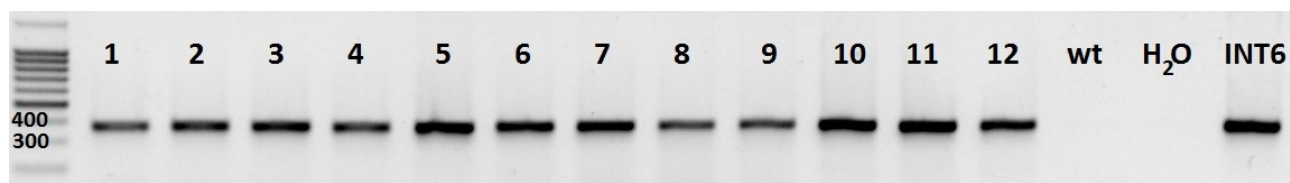


Рисунок 2. Электрофореграмма результатов ПЦР-анализа ДНК растений Inter311.2.7.2.2-(1-12). Образец wt – ДНК нетрансгенного растения табака, образец INT6 – плазида, использованная для трансформации растений T₀.

Оценка биологической активности рекомбинантного интерферона на культуре клеток быка

Интерферон, синтезируемый растениями линии 311, обладал противовирусной активностью, сопоставимой с таковой у белка, наработанного в трансгенных микроорганизмах (табл. 1). Продукт линии B6 гораздо менее эффективен.

Таблица 1. Противовирусная активность экстрактов растений.

Испытуемый препарат	Активность в МЕ/мл (5.06.13)	Активность в МЕ/мл (13.03.14)	Активность в МЕ/мл (21.04.16)	Активность в МЕ/мл (20.05.16)
К- (буфер белковой экстракции)	0 МЕ/мл	0 МЕ/мл	0 МЕ/мл	0 МЕ/мл
Экстракт нетрансгенных растений табака	40 МЕ/мл	0 МЕ/мл	0 МЕ/мл	0 МЕ/мл
Экстракт трансгенных растений табака 311.2.7.2 (1-6)	320 МЕ/мл	320 МЕ/мл	120 МЕ/мл	160 МЕ/мл
Экстракт трансгенных растений табака B6.13.8(1-12)	80 МЕ/мл	100 МЕ/мл	0 МЕ/мл	0 МЕ/мл
Экстракт трансгенных растений табака 311.2.7 после года хранения при -80°C	10 МЕ/мл	-	-	-
К+ (коммерческий рекомбинантный гамма-интерферон бактериального происхождения)	950 МЕ/мл	650 МЕ/мл	1 МЕ в 0,8 мкг	1 МЕ в 0,8 мкг
ОСО (ФГПУ «НПО «Микроген»») Серия 871211	10 МЕ/мл	10 МЕ/мл	10 МЕ/мл	10 МЕ/мл

Изучение действия рекомбинантного интерферона на лабораторных животных.

На первом этапе эксперимента (0-16 день) выявлено достоверное повышение общего уровня иммуноглобулинов плазмы крови у мышей, получавших экстракт из трансгенных и нетрансгенных растений (рис. 3). Также у этих групп показано статистически значимое увеличение совокупного уровня базофилов и эозинофилов (табл. 2). Это свидетельствует о развитии в течение 16 суток после терапии аллергических реакций на собственные растительные белки табака.

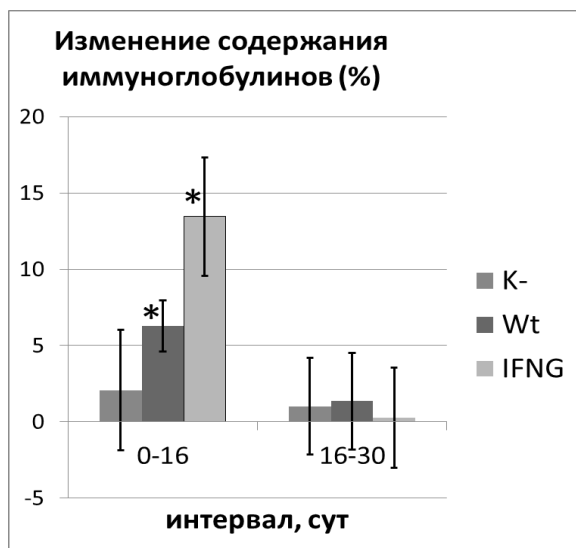


Рисунок 3. Действие недельной терапии белковыми экстрактами из трансгенных (IFNG) и нетрансгенных (Wt) растений табака, а также буфера белковой экстракции (K-), на общий уровень иммуноглобулинов плазмы крови мышей. На графике отложена стандартная ошибка среднего. Символом * обозначены достоверные ($p < 0,05$) различия между измерениями.

Таблица 2. Соотношение клеток крови различных типов (%) у мышей на разных этапах эксперимента. * - достоверное уменьшение, ** - достоверное увеличение ($p < 0,05$). Приведены значения стандартной ошибки среднего.

День	Буфер экстракции			Табак контроль			Трансгенный табак		
	0	16	30	0	16	30	0	16	30
базофилы	2,5 ±1,9	3,0 ±2,2	1,0 ±0,6	1,7 ±0,8	1,8 ±1,8	5,7 ±1,4**	2,0 ±1,4	7,5 ±3,0**	4,3 ±2,2
эозинофилы	3,5 ±1,5	3,2 ±1,7	2,5 ±1,2	2,0 ±1,7	7,7 ±4,5**	3,0 ±2,1	2,7 ±1,4	3,8 ±1,6	3,2 ±1,9
моноциты	5,8 ±2,3	12,0 ±5,2**	12,5 ±3,7	8,2 ±1,6	7,2 ±3,7	11,5 ±5,1	5,8 ±2,2	5,8 ±1,7**	10,0 ±4,1
палочкоядерные нейтрофилы	20,8 ±4,1	14,7 ±4,0*	8,8 ±1,8*	19,0 ±2,8	17,5 ±7,5	12,3 ±6,5	22,3 ±3,1*	11,0 ±4,5*	11,2 ±2,9*
сегментоядерные нейтрофилы	37,8 ±11,7	23,3 ±10,6*	23,0 ±8,6	41,5 ±4,8	25,5 ±18,1*	13,0 ±4,7*	40,3 ±10,1*	22,8 ±9,8*	27,5 ±8,3
лимфоциты	29,5 ±8,0	43,8 ±9,1**	52,2 ±5,0**	27,7 ±2,8	40,3 ±12,6**	54,5 ±7,5**	26,8 ±6,7**	49,0 ±8,9**	43,8 ±6,5

Во всех группах наблюдали спад уровня нейтрофилов (нейтропению) и увеличение содержания лимфоцитов (лимфоцитоз) (рис. 4). Это физиологический лимфоцитоз, следствие кровопотери при отборе проб крови.

У группы, получавшей экстракт трансгенного табака, изменения на 16 день более выражены, чем у контрольных групп, но к 30 дню наблюдается повышение уровня нейтрофилов и спад уровня лимфоцитов, тогда как в контрольных группах характер изменений остается неизменным. Это свидетельствует об усиленном иммунном ответе и ускоренной адаптации в опытной группе.

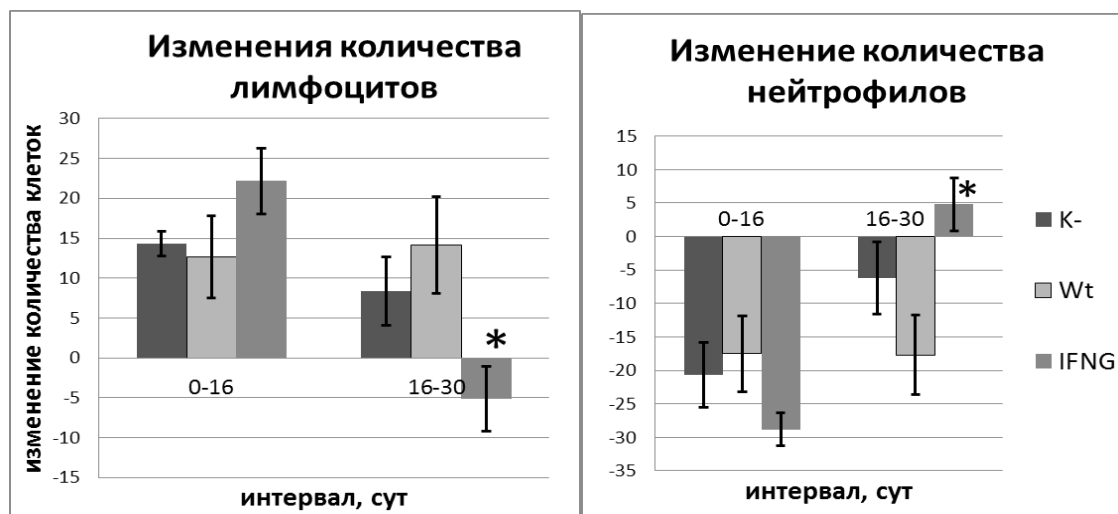


Рисунок 4. Изменение содержания лимфоцитов и нейтрофилов в крови животных под действием шестидневной терапии белковыми экстрактами трансгенных (IFNG) и нетрансгенных (Wt) растений табака, а также буфера белковой экстракции (K-) за время эксперимента. Символом * отмечен отличающийся характер изменений.

Таким образом, на первом этапе работы была подтверждена биологическая активность рекомбинантного гамма-интерферона, наработанного в трансгенных растениях, в том числе при пероральном применении. При этом экстракты, выделенные из равных по массе навесок растений линий 311 и В6, демонстрировали различный уровень противовирусной активности. Следующей задачей работы стал поиск причины данных различий.

Анализ последовательности трансгенной вставки

Т-ДНК плазмиды pART27INT6 включает ген бычьего гамма-интерферона под контролем промотора p35S и селективный ген устойчивости к канамицину *nptII* (патент РФ RU2564115) (рис. 5).

Показано, что трансгенные вставки растений 311.2.7.2-2 и В6.13.8-17 в исследованных районах полностью идентичны друг другу и соответствующей области Т-ДНК плазмиды pART27INT6, за исключением области LB линии 311. Не обнаружено мутаций в последовательности гена *sIFNG*.

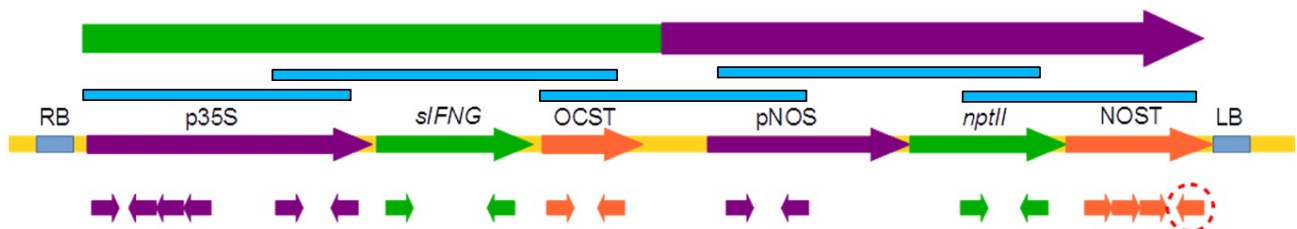


Рисунок 5. Структура Т-ДНК плазмиды pART27-INT6, расположение секвенированных фрагментов и праймеров, один из которых (NOST_antiSP, обведен) показал различие между линиями 311 и В6.

Поиск сайтов встраивания Т-ДНК

С использованием метода FPNI-PCR были получены последовательности геномной ДНК табака, фланкирующие трансгенные вставки. Установлено, что в случае линии В6 Т-ДНК встроилась в район центромерных повторов неопределенной хромосомы. Для линии 311 встраивание произошло также в неопределенный, но более активный участок генома: в непосредственной близости расположены открытые рамки считывания.

Также в результате секвенирования граничных последовательностей было обнаружено, что линия 311 несет кластер как минимум из трех полноразмерных Т-ДНК в ориентации «хвост-к-хвосту—голова-к-хвосту» (рис. 6), что подтверждено ПЦР со специфичными праймерами.

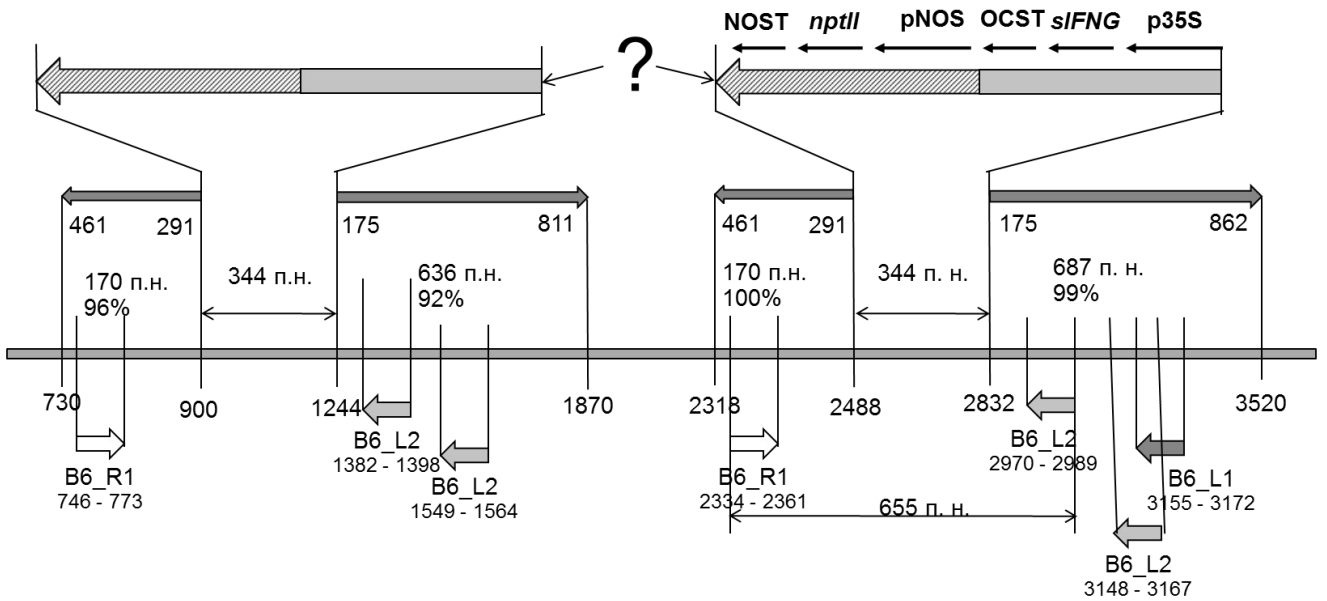
Неизвестна структура соединения вставок «хвост-к-хвосту» - данный участок не удалось амплифицировать. Это свидетельствует о включении значительного участка неизвестной последовательности растительной или бактериальной ДНК.

ПЦР с праймерами к геномной ДНК показала, что в геноме растений линии 311 не осталось немодифицированных копий участка инсерции, то есть линия гомозиготна по рекомбинантному гену (рис. 7).

В концевой части терминатора нопалинсинтазы линии 311 произошли перестройки (рис. 8). Однако они не повлияли на функциональность терминатора NOST, судя по тому, что растения 311 успешно прошли этап канамициновой селекции.

Таким образом, большая эффективность продукции рекомбинантного интерферона растениями линии 311 объясняется наличием у них трех копий Т-ДНК и их встраиванием в транскрипционно активную область генома.

A



B

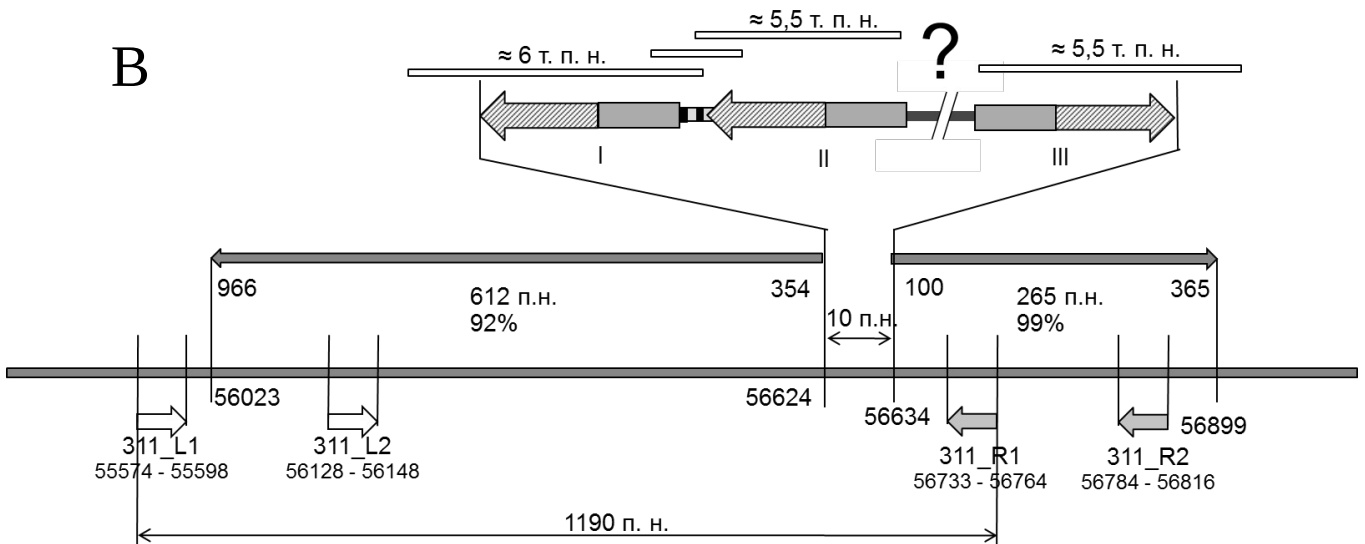


Рисунок 6. А: Структура вставки линии В6 в участок геномной ДНК табака NW_015800096.1. Указаны два возможных сайта встраивания. **В:** Структура вставки линии Inter311 в участок геномной ДНК табака NW_015801991.1 и подтверждающие ее ПЦР-фрагменты. Цифрами обозначены номера нуклеотидов в последовательностях, длина совпадающих участков и % совпадений.

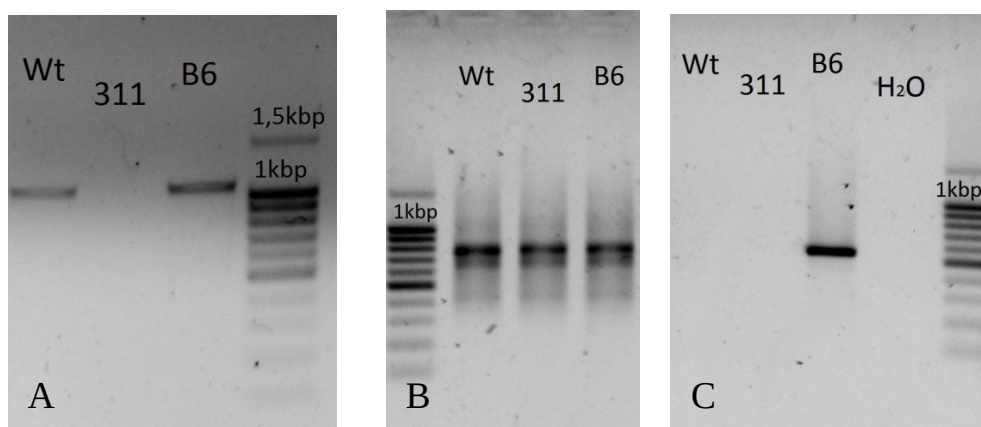


Рисунок 7. Результаты ПЦР с праймерами к участкам геномной ДНК табака, фланкирующим трансгенные вставки. Образец Wt – ДНК нетрансгенного растения табака, 311 и B6 — ДНК трансгенных растений линий Inter311 и InterB6. **А:** праймеры 311_L1 — 311_R1. Соответствующий фрагмент (1092 п.н.) отсутствует в пробе 311, в которой между сайтами связывания этих праймеров встроилась трансгенная вставка. **В:** праймеры B6_L2 – B6_R1. Показан значительный уровень неспецифического связывания для всех образцов, что подтверждает встраивание вставки в район повторов. **С:** праймеры B6_R1 (геномная ДНК) – Nost_SP2* (участок T-ДНК). Амплифицированный фрагмент появился только в образце B6.

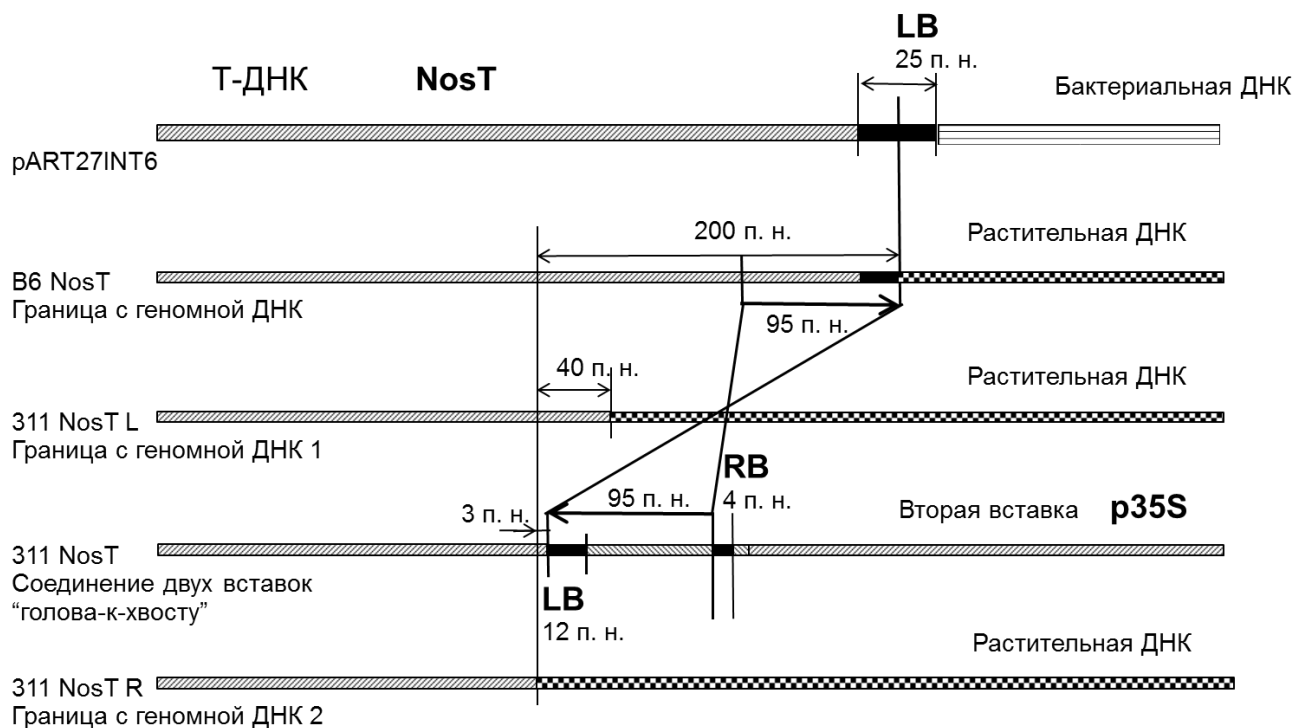


Рисунок 8. Схема левой границы T-ДНК. В обеих точках соединения с геномной ДНК у растений линии 311 отсутствует LB, а терминатор NOST укорочен на 160-200 пар нуклеотидов. В сайте соединения двух вставок в ориентации «голова-к-хвосту» участок размером 95 п. н., включающий фрагмент NOST и LB, развернут на 180 градусов.

Клонирование высокоэффективных промоторов для тканеспецифичной экспрессии

В литературе описаны промотор регуляторного гена *SRD1* батата, обеспечивающий экспрессию генов в подземных частях растения на уровне в 10 раз большем, нежели 35S промотор (Noh et al., 2012), и промотор гена кукурузы *RCP-1*, использованный для экспрессии синтетических пептидов в корнях (Onyango et al., 2016).

Данные промоторы были клонированы из ДНК растений батата и кукурузы. Полученные последовательности проверены секвенированием, обнаружившим 96-99% сходство с результатами из баз данных. Созданы плазмиды на основе вектора pBGWFS7, в котором исследуемый промотор регулирует экспрессию репортерных генов глюкононидазы (GUS) и зеленого флуоресцентного белка (GFP). Также созданы векторы для синтеза гамма-интерферона под контролем промоторов pIbSRD1 и pZmRCP (pK43GW::pSRD1::sIFNG::35St и pK43GW::ZmRCP::sIFNG::35St соответственно). На основе данных плазмид были получены штаммы *A. rhizogenes*, использованные для трансформации моркови.

В результате GUS-окрашивания установлено, что ген под контролем промотора pIbSRD1 активно экспрессируется во всех тканях «бородатых корней», а под контролем pZmRCP-1 – только в кончиках корней (рис. 9). Таким образом, только промотор гена *SRD1* подходит для применения в растениях-продуцентах. Промотор гена *RCP-1* исключен из дальнейших экспериментов.

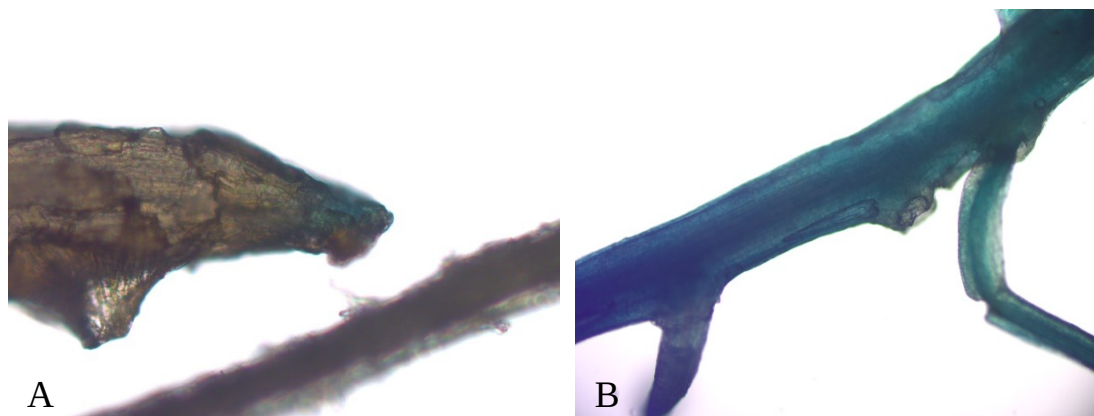


Рисунок 9. Результаты GUS-окрашивания трансгенных корней. **А:** под контролем промотора pZmRCP-1 глюкононидаза экспрессируется только в кончике корня; **В:** промотор pSRD1 обеспечивает экспрессию во всех тканях корня.

Для наработки рекомбинантного гамма-интерферона быка были использованы штаммы *A. rhizogenes*, несущие плазмиды pK43GW::pSRD1::sIFNG::35St (полученную впервые) и pKGW-MGW::p35S::sIFNG::35St (из коллекции лаборатории). ПЦР-РВ показала, что уровень экспрессии интерферона в «бородатых корнях» под контролем промотора pIbSRD1 более чем в тысячу раз ниже, чем под контролем p35S.

Это объясняется различиями в последовательности промотора pIbSRD1 (рис. 10). В геноме батата обнаружены две формы, являющиеся либо паралогичными, либо аллельными (рис. 11). Таким образом, анализ методом GUS-окрашивания и изучение экспрессии гена *sIFNG* проходили фактически для разных промоторов. В дальнейшем будут получены новые плазмиды для продукции гамма-интерферона под контролем активной формы промотора pIbSRD1.



Рисунок 10. Несовпадения в последовательности промотора pIbSRD1 из плазмид для визуализации области экспрессии (вверху) и плазмид для производства гамма-интерферона (внизу). Неактивная форма промотора отличается наличием вставки размером 40 п. н.

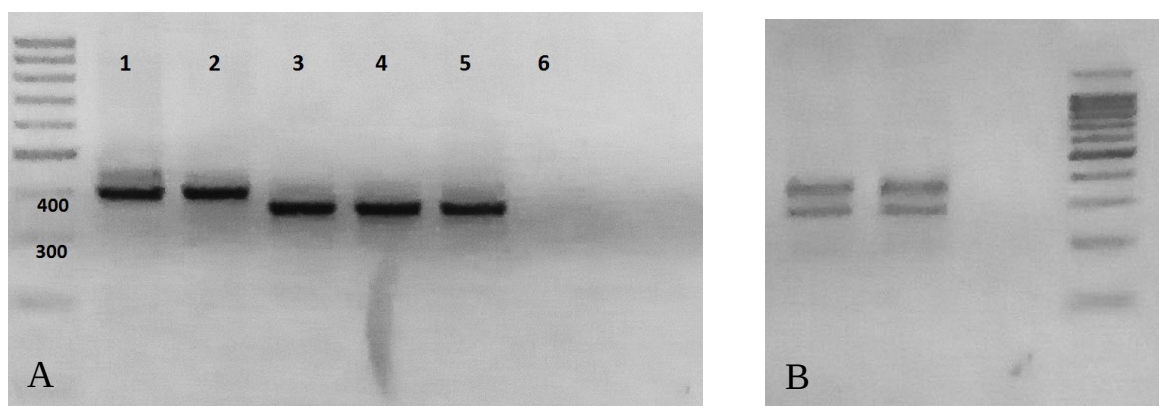


Рисунок 11. Детекция присутствия вставки 40 п. н. в промоторе pIbSRD1 методом ПЦР с праймерами SRD1_R_SP4 и SRD1_R_3014. Размер фрагмента 407 п. н. в случае присутствия вставки, 367 п. н. при ее отсутствии. **А:** образцы 1, 2 – плазмиды для синтеза гамма-интерферона; 3, 4, 5 – плазмиды для визуализации области экспрессии; 6 – отрицательный контроль. **В:** результаты ПЦР с геномной ДНК батата.

Заключение

Результатом работы стало подтверждение сохранения трансгенной вставки в геноме растений табака на протяжении пяти поколений и отсутствие случаев ее потери, что свидетельствует о получении гомозиготной линии. Также подтверждено присутствие в тканях растений белка гамма-интерферона и выявлена его биологическая активность, в том числе при пероральном применении.

Помимо этого, проведено секвенирование трансгенной вставки, подтвердившее отсутствие мутаций в рекомбинантном гене. Обнаружено, что причиной различий в биологической активности экстрактов двух линий табака стало встраивание трансгенной вставки в разные районы генома и в разных количествах.

Для дальнейших экспериментов с высокоэффективными растениями-продуцентами из батата выделен промотор гена *SRDI*, способный обеспечить высокий уровень экспрессии трансгена в подземных частях растений.

Выводы

1. Анализ четвертого и пятого поколений трансгенных растений табака, синтезирующих бычий гамма-интерферон, выявил следующее:

1.1. Трансгенная вставка присутствует во всех растениях до пятого поколения включительно. Подтверждена гомозиготизация линии Inter311.

1.2. Во всех исследованных растениях наблюдается экспрессия рекомбинантного гена.

2. Анализ рекомбинантного гамма-интерферона, наработанного в трансгенных растениях табака, выявил, что:

2.1. Рекомбинантный белок присутствует в тканях трансгенных растений.

2.2. Гамма-интерферон, синтезированный в трансгенных растениях табака, обладает биологической активностью в отношении культуры клеток быка: защищает клетки от поражения вирусом.

2.3. Гамма-интерферон, синтезированный в трансгенных растениях табака линии Inter311.2.7, обладает биологической активностью в отношении подопытных животных при пероральном применении: стимулирует изменения лейкоцитарной формулы крови (ускоренный переход от неспецифического нейтрофильного ответа к специфическому лимфоцитарному).

3. Линии табака InterB и Inter311, полученные с применением одинаковой трансгенной конструкции, отличаются по уровню синтеза рекомбинантного белка, что объясняется следующим:

3.1. Линии различаются по сайту встраивания Т-ДНК в геном табака: в случае более продуктивной линии Inter311 оно произошло в транскрипционно-активный регион генома, в случае же линии InterB трансген встроился в район центромерных повторов.

3.2. Трансгенная вставка в случае линии Inter311 имеет сложную кластерную структуру и состоит из трех Т-ДНК, соединенных в последовательности «хвост-к-хвосту – голова-к-хвосту». Наличие трех копий могло повысить уровень синтеза привнесенного гена.

4. Созданы новые трансгенные конструкции для дальнейшего получения эффективных растений-продуцентов интерферона.

4.1. Созданы трансгенные конструкции для визуализации области экспрессии промоторов генов *SRD1* батата (*Ipomoea batatas*) и *ZmRCP-1* кукурузы (*Zea mays*).

4.2. С их помощью методом агробактериальной трансформации получены «бородатые корни» моркови (*Daucus carota*). В результате GUS-окрашивания определены области экспрессии промоторов pIbSRD1 и pZmRCP-1 в корнях. Промотор pIbSRD1 признан перспективным для получения растений-продуцентов.

4.3. Созданы трансгенные конструкции на базе промоторов pIbSRD1 и pZmRCP-1 для получения трансгенных растений с геном бычьего гамма-интерферона.

4.4. Обнаружено, что в геноме батата существуют две формы промотора гена pSRD1, различающиеся наличием вставки длиной 40 п. н. Форма, несущая данную вставку, обладает значительно меньшей активностью и непригодна для применения в генетических конструкциях для массовой наработки белка.

Список публикаций по теме диссертации

Статьи:

1. Burlakovskiy M. S. Production of bovine interferon-gamma in transgenic tobacco plants / M. S. Burlakovskiy, N. V. Saveleva, V. V. Yemelyanov, M. V. Padkina, L. A. Lutova // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). - 2015. - Vol. 22. - № 3. - P. 685-697. DOI: 10.1007/s11240-015-0802-7
2. Савельева Н. В. Трансгенные растения-продуценты веществ медицинского и ветеринарного назначения / Н. В. Савельева, М. С. Бурлаковский, В. В. Емельянов, Л. А. Лутова // Экологическая генетика. - 2015. - Т. XIII. - № 2. - С. 77-99. DOI: <http://dx.doi.org/10.17816/ecogen13277-99>
[Saveleva N. V. Transgenic plants as bioreactors to produce substances for medical and veterinary uses / N. V. Saveleva, M. S. Burlakovskiy, V. V. Yemelyanov, L. A. Lutova // Russian Journal of Genetics: Applied Research. - 2016. - Vol. 6. - No. 6. - P. 712-724. DOI: 10.1134/S2079059716060071]
3. Бурлаковский М. С. Растения – продуценты рекомбинантных цитокинов (обзор) / М. С. Бурлаковский, В. В. Емельянов, Л. А. Лутова // Прикладная биохимия и микробиология. - 2016. - Т. 52. - № 2. - С. 149-167. DOI: 10.7868/S0555109916020033
[Burlakovskiy M. S. Plant based bioreactors of recombinant cytokines (Review) / M. S. Burlakovskiy, V. V. Yemelyanov, L. A. Lutova // Applied Biochemistry and Microbiology. - 2016. - Vol. 52. - No. 2. - P. 121-137. DOI: 10.1134/S0003683816020034]
4. Chetverikov P. E. // Supplementary descriptions and DNA barcodes of two rarely encountered *Trisetacus* species (Eriophyoidea, Phytoptidae) associated with Tertiary relict conifers from the Mediterranean region / P. E. Chetverikov, S. J. Bolton, M. S. Burlakovskiy, C. Craemer, P. G. Efimov, P. Klimov, S. Naser, S. S. Paponova, A. Romanovich, S. I. Sukhareva, J. Amrin // Systematic & Applied acarology. - 2019.- Vol. 24. - No. 9. - P. 1631-1652. DOI:10.11158/saa.24.9.5

Тезисы конференций:

1. Бурлаковский М.С., Савельева Н.В., Емельянов В.В., Лутова Л.А. Изучение трансгенных растений *Nicotiana tabacum* L., синтезирующих бычий гамма-интерферон // Материалы VI Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». Москва, 21-25 марта 2011. Часть I. С. 315-316.
2. Savelyeva N., Yemelyanov V., Burlakovskiy M., Tkachenko A., Guseva O., Lutova L. Creation of plants synthesizing proteins of pharmacological importance for medicine and veterinary // Abstracts of VII International symposium «EU-Russia: cooperation in biotechnology, agriculture, forestry, fisheries and food in the 7th framework programme», Moscow, 31 May – 1 June 2012. P. 33-34.
3. Емельянов В.В., Савельева Н.В., Бурлаковский М.С., Гусева О.В., Ткаченко А.А., Лутова Л.А. Растения – продуценты фармакологических белков // Материалы VII Московского международного конгресса

- «Биотехнология: состояние и перспективы развития». Москва, 19-22 марта 2013. Часть I. С. 366-367.
4. Емельянов В.В., Бурлаковский М.С., Гусева О.В., Ткаченко А.А., Лутова Л.А. Растения – продуценты для производства белков фармакологического назначения // Тезисы докладов международной конференции «Биоиндустрия», Санкт-Петербург, 16-18 октября 2013. С. 17.
 5. Бурлаковский М.С., Савельева Н.В., Емельянов В.В., Лутова Л.А. Создание трансгенных растений *Nicotiana tabacum* L., синтезирующих бычий гамма-интерферон // Тезисы докладов VI съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров (ВОГиС) и ассоциированных генетических симпозиумов, Ростов-на-Дону, 15-20 июня 2014. С. 183.
 6. Емельянов В.В., Бурлаковский М.С., Гусева О.В., Ткаченко А.А., Лутова Л.А. Растения – продуценты рекомбинантных белков для ветеринарии // Там же, С. 184-185.
 7. Емельянов В.В., Бурлаковский М.С., Савельева Н.В., Лутова Л.А. Создание растений-продуцентов интерферонов млекопитающих и птиц // Материалы Международной научно-практической конференции «Биотехнологии в комплексном развитии регионов» (Biotech World 2016). Москва, 15-17 марта 2016. С. 58.
 8. Емельянов В.В., Бурлаковский М.С., Лутова Л.А. Создание растений-биореакторов для продукции белков-иммуномодуляторов птиц и млекопитающих // Актуальная биотехнология. 2017. № 2 (21) (Материалы V международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика», Ялта, 25-29 сентября 2017). С. 98.
 9. Бурлаковский М.С., Емельянов В.В., Савельева Н.В., Лутова Л.А. Использование трансгенных растений как продуцентов белковых лекарственных веществ для применения в животноводстве // Материалы Международной научно-практической конференции «Достижения в генетике, селекции и воспроизводстве сельскохозяйственных животных», Санкт-Петербург, 29-30 мая 2019. С. 11-12.
 10. Бурлаковский М.С., Емельянов В.В., Савельева Н.В., Носова К.И., Лутова Л.А. Новые подходы к получению трансгенных растений – продуцентов гамма-интерферона быка // Сборник тезисов VII съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, Санкт-Петербург, 18-22 июня 2019. С. 841.

Патенты:

1. Лутова Л.А., Падкина М.В., Савельева Н.В., Емельянов В.В., Бурлаковский М.С., Зобнина А.Е., Ткаченко А.А. Рекомбинантная плазмидная ДНК рART27INT6 и способ получения на её основе инбредной линии растений табака, синтезирующего внутриклеточный гамма-интерферон быка // Патент РФ RU2564115 2014