

Федеральное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный университет»
Кафедра генетики и биотехнологии

На правах рукописи

Бурлаковский Михаил Сергеевич

**АНАЛИЗ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ, ПРОДУЦИРУЮЩИХ ГАММА-
ИНТЕРФЕРОН ЖИВОТНЫХ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ВЕТЕРИНАРИИ**

Специальность: 03.02.07 Генетика

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор
Лутова Людмила Алексеевна

Санкт-Петербург
2020

Содержание

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. Обзор литературы	11
1.1. Возможности генной инженерии.....	11
1.2. Методы получения трансгенных растений.....	15
1.3. Встраивание Т-ДНК в геном растения при агробактериальной трансформации.....	21
1.4. Цитокины и их применение в медицине и ветеринарии.....	26
1.5. Цитокины I класса (гемопэтины), синтезированные в растениях.....	32
1.6. Цитокины II класса, синтезированные в растениях.....	39
1.7. Методы повышения производительности экспрессии чужеродных соединений в растениях.....	48
1.8. Заключение.....	54
ГЛАВА 2. Материалы и методы исследования	57
2.1. Растительный материал.....	57
2.2. Штаммы микроорганизмов.....	60
2.3. Трансформация моркови <i>Agrobacterum (Rhizobium) rhizogenes</i>	63
2.4. GUS-окрашивание.....	64
2.5. Методы работы с нуклеиновыми кислотами.....	64
2.5.1. Выделение ДНК.....	64
2.5.2. Выделение РНК.....	65
2.5.3. Обратная транскрипция.....	66
2.5.4. Полимеразная цепная реакция (ПЦР, ПЦР-РВ).....	66
2.5.5. «Прогулка по геному», FPNI-PCR.....	67
2.5.6. Gateway.....	69
2.5.7. Плазмиды.....	69
2.5.8. Праймеры.....	69
2.6. Методы работы с белками.....	73
2.6.1. Выделение цитоплазматических растительных белков.....	73

2.6.2. Вестерн-блот анализ.....	75
2.7. Оценка биологической активности рекомбинантного белка на культуре клеток быка.....	78
2.8. Испытание рекомбинантного белка на лабораторных животных.....	82
2.9. Статистические методы и компьютерные программы, используемые в работе.....	86
ГЛАВА 3. Результаты.....	88
3.1. Исследование трансгенных растений табака (<i>Nicotiana tabacum</i>) поколения T4-T5.....	88
3.1.1. Анализ наследования гетерологичного гена <i>sIFNG</i>	88
3.1.2. Анализ экспрессии гена гамма-интерферона у трансгенных растений табака поколения T5.....	89
3.2. Белок гамма-интерферон из трансгенных растений.....	90
3.2.1. Анализ трансгенных растений табака на наличие гетерологичного белка гамма-интерферона.....	90
3.2.2. Измерение активности рекомбинантного белка на культуре клеток быка.....	90
3.2.3. Изучение активности рекомбинантного белка при пероральном применении.....	93
3.3. Причины различия в продуктивности между линиями растений табака Inter311 и InterB6	
3.3.1. Последовательность Т-ДНК вставки у растений	99
3.3.2. Поиск сайтов встраивания Т-ДНК.....	102
3.4. Создание генетических конструкций для высокоэффективной тканеспецифичной экспрессии.....	107
3.4.1. Клонирование промотора pZmRCP-1 кукурузы.....	108
3.4.2. Клонирование промотора pIbSRD1 батата.....	108
3.4.3. Создание векторов для визуализации экспрессии методом Gateway.....	108

3.4.4. Создание векторов для синтеза бычьего гамма-интерферона.....	109
3.5. Создание трансгенных растений моркови в результате трансформации <i>A. rhizogenes</i>	111
3.5.1. Визуализация зон экспрессии промоторов pZmRCP-1 и pIbSRD1.....	111
3.5.2. Создание “бородатых корней” моркови, продуцирующих бычий гамма-интерферон	112
ГЛАВА 4. Обсуждение.....	116
4.1. Растения табака стабильно наследуют и экспрессируют бычий гамма-интерферон на протяжении пяти поколений.....	116
4.2. Рекомбинантный бычий гамма-интерферон растительного происхождения проявляет биологическую активность.....	117
4.3. Разница в продуктивности между линиями табака обусловлена разными сайтами встраивания и многокопийной встройкой.....	119
4.4. Промотор pIbSRD1 может быть использован для получения растений-продуцентов.....	121
4.5. Существуют две формы промотора pIbSRD1, различающиеся по активности.....	122
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	123
ВЫВОДЫ.....	124
Список сокращений.....	126
Список литературы.....	127
Благодарности.....	154

ВВЕДЕНИЕ

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 (например, антитела, вакцины, ферменты, цитокины и факторы роста) (Walsh, 2018). В отличие от малых молекул, белки возможно получить только с использованием систем экспрессии живых организмов, однако 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 (Assenberg et al., 2013, Lambertz et al., 2014), дрожжей (Падкина и др., 2010) и растений (Fahad et al., 2014). Развиваются и такие направления, как наработка гетерологичного белка в молоке трансгенных животных (Bosze et al., 2008) и в бесклеточных системах белкового синтеза (Li et al., 2014).

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). В настоящее время в трансгенных растениях уже получено множество белков млекопитающих и человека, включая ферменты, антигены, гормоны, антитела (Plant-made pharmaceuticals, PMPs) (Abiri et al., 2016). Производство рекомбинантных белков на основе трансгенных растений осваивают более 20 компаний, включая «Dow AgroSciences» (США), «Icon Genetics» (Германия), «Large Scale Biology» (США), «Medicago» (Канада), «Meristem Therapeutics France», «Novoplant» (Германия), «ORF Genetics»

(Исландия), «Planet Biotechnology» (США), «ProdiGene» (США), «Protalix Biotherapeutics» (Израиль) и другие.

Недостатком большинства растений-продуцентов является низкий уровень синтеза чужеродного белка, зачастую составляющего сотые доли процента сырой массы (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 селекции СПбГУ были получены трансгенные растения табака (*Nicotiana tabacum* L.), несущие ген бычьего гамма-интерферона 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*), 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 встраивания ее 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 стабильное наследование и экспрессия рекомбинантного гена в растениях табака на протяжении пяти поколений и отсутствие случаев его потери, что свидетельствует о получении гомозиготных линий. 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 Т-ДНК в разные районы генома и кластерной структурой вставки у линии Inter311. Клонированы тканеспецифичные растительные промоторы pIbSRD1 батата и pZmRCP 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.

Продemonстрирована принципиальная возможность получения растений-продуцентов гамма-интерферона быка и их использования в качестве съедобных иммуномодуляторов. Продemonстрирована 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 использовались молекулярные методы (выделение нуклеиновых кислот, 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 *Nicotiana tabacum*, кукуруза *Zea mays*, батат *Ipomoea batatas*, морковь *Daucus carota*), работа с лабораторными животными (мыши *Mus musculus* L.), культурами клеток быка (*Bos taurus taurus* L.). Реактивы использовались в соответствии с инструкциями производителя.

Личный вклад автора. Основная часть экспериментальной работы была выполнена автором самостоятельно. Измерение биологической активности белков на культуре клеток выполнялось совместно с сотрудниками лаборатории биохимической генетики кафедры генетики и биотехнологии СПбГУ, что отражено в совместной публикации. Клонирование тканеспецифичных промоторов pIbSRD1 и pZmRCP-1 проводилось 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 Московской 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 проводились 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).

ГЛАВА 1. Обзор литературы

1.1. Возможности генной инженерии растений.

Появление генетической инженерии стало логичным следствием развития клеточной и молекулярной биологии, микробиологии и генетики. Накопление знаний о структуре и механизмах действия генов сделало возможным непосредственные манипуляции с ДНК живых организмов: выявление регуляторных (промоторы, терминаторы) и значимых участков, кодирующих аминокислотные последовательности белков, их вырезание, соединение в нужных комбинациях и введение в геном клетки. Иными словами, биотехнологические методы позволяют преодолеть межвидовой барьер, проводя процесс рекомбинации вне организма с очень высокой точностью. Генная модификация в простейшем случае приводит к появлению в клетке несвойственного ей чужеродного белка либо к изменению уровня синтеза одного из её естественных белков.

Одним из первых вариантов практического применения генной инженерии стало создание организмов-продуцентов, нарабатывающих в больших количествах чужеродные белки, получение которых из естественных носителей нерентабельно, сопряжено с риском переноса заболеваний либо с этическими проблемами. Полученные препараты очищенного белка можно использовать для структурных и биофизических исследований, функционального анализа, а также для терапевтического применения в фармакологии. Получение гормона млекопитающих в клетках *Escherichia coli* было продемонстрировано в 1977 году (Itakura et al., 1977), а через пять лет рекомбинантный инсулин, наработанный в бактериях, получил одобрение FDA (US Food and Drug Administration), положив начало применению рекомбинантных белков в медицине.

Хотя генетический код универсален, различные организмы обладают несхожими механизмами процессинга РНК и посттрансляционной обработки белка. Так, в клетках прокариот не обеспечивается сплайсинг эукариотических

генов (вырезание интронов), что требует дополнительной модификации гетерологичного гена перед трансформацией. Различия в таких процессах, как гликозилирование, фосфорилирование, формирование дисульфидных связей, фолдинг, может снизить биологическую активность рекомбинантного белка вплоть до полной потери функциональности, либо вызвать аллергическую реакцию при его терапевтическом применении. Также чужеродные белки могут оказаться токсичными для продуцента (Brooks, 2004, Rosano, Ceccarelli, 2014). В целом признано что, чем ближе родство организма-продуцента и донора, тем лучшие результаты достигаются. Таким образом, для производства белка медицинского назначения наиболее удачными являются системы экспрессии млекопитающих. Однако они не подходят для синтеза белков с высокой сигнальной активностью, в частности, гормонов, и проигрывают альтернативным системам по стоимости производства и биобезопасности. Таким образом, на сегодняшний день не создано универсальной системы белкового синтеза, и зачастую невозможно предсказать, какая из существующих систем лучше подойдет для промышленного производства того или иного белка (Assenberg et al., 2013, Rosano, Ceccarelli, 2014).

Среди существующих в настоящее время трансгенных организмов растениям принадлежит наибольшая экономическая роль, в первую очередь за счет их сельскохозяйственного использования. Это направление биотехнологии — «молекулярная селекция», - занимается решением классических проблем сельского хозяйства путем генетической модификации традиционных сортов для их адаптации к методам интенсивного земледелия. Возможность генетической трансформации растений была подтверждена в 1980-х годах (Bevan et al., 1983). К настоящему времени созданы и введены в оборот трансгенные растения, отличающиеся устойчивостью к гербицидам, насекомым-вредителям и патогенам, растения со сбалансированным измененным составом аминокислот, жирных кислот и вторичных метаболитов. Эти достижения позволяют постоянно повышать продуктивность сельского хозяйства и поддерживать мировое

производство продовольствия в соответствии с потребностями растущего населения планеты (Ronald, 2011, Рукавцева, 2007, Дейнеко, 2012). Интенсивные исследования в этом направлении привели к появлению простых и хорошо охарактеризованных методов трансформации растений, что заложило основу для использования их в качестве продуцентов фармацевтических белков. Гормон роста человека (Barta et al., 1986) и фрагмент антител (Hiatt et al., 1989) были получены с использованием трансгенных табака и подсолнечника вскоре после появления технологии трансформации растений. В 1997 году из трансгенной кукурузы был выделен рекомбинантный авидин, пригодный для коммерческого использования, подтверждая возможности производства рекомбинантных белков в больших масштабах (Hood et al., 1997). С тех пор в растительных системах экспрессии были получены многочисленные антитела, вакцины, цитокины и другие белки с использованием как зрелых растений, так и клеточных культур (Obembe et al., 2011, Дейнеко, Загорская, 2017).

По сравнению с другими системами экспрессии (бактерии, микроорганизмы, культуры клеток животных) растения имеют ряд особенностей и преимуществ. В первую очередь следует отметить высокую инфекционную безопасность растений для человека, поскольку они свободны от патогенных микроорганизмов и вирусов животных, и могут быть выращены без использования материалов животного происхождения. Для прироста биомассы им необходимы только свет, углекислый газ и минеральные вещества, что упрощает и удешевляет производство. Система гликозилирования растений, по сравнению с микроорганизмами, более сходна с таковой у млекопитающих (Brooks, 2004; Gomord et al., 2010; Xu et al., 2011). Это относится и к возможности выполнять иные посттрансляционные модификации белков, что позволяет производить сложные гликопротеины с сохранением их биологической активности и стабильности (Kim, 2008; Lienard, 2007). Для растений существуют разнообразные, относительно простые и к настоящему времени хорошо отработанные методики трансформации. Гетерологичный ген может

интегрироваться в ядерный или хлоропластный геном либо находиться в составе вектора для временной (транзистентной) экспрессии. Содержать трансгенные растения можно как *in vitro*, в качестве суспензионной клеточной культуры или в форме каллусных тканей, так и *in vivo*, в виде целых организмов, при этом сельскохозяйственные технологии выращивания позволяют добиться минимальной цены за единицу биомассы среди трансгенных систем экспрессии (Desai et al., 2010). Если выращивание растений в открытом грунте неприемлемо по требованиям стерильности либо необходимости избежать попадания генномодифицированных организмов в природные популяции, возможно использовать технологии гидропонного либо аэропонного выращивания, «вертикальных ферм» (Moon et al., 2020). Также для предотвращения перекрестного опыления с родственными видами возможно использовать исключительно организационные мероприятия: собирать урожай до цветения (если целевой белок накапливается в вегетативных тканях), поддерживать севооборот. Использование различных промоторов дает возможность накапливать целевой белок в определенных органах растения — листьях, корнях, семенах, что облегчает сбор сырого материала. Присоединение к целевому белку сигнала внутриклеточной локализации в вакуоли либо апопласте позволяет длительное время хранить и транспортировать продукт без консервации или заморозки. Эти меры, теоретически, позволяют резко снизить стоимость наработанного в растениях рекомбинантного белка и упростить его применение (Daniell et al., 2009; Desai et al., 2010; Obembe et al., 2011; Дейнеко, Загорская, 2017).

Наконец, для некоторых белков медицинского назначения, способных оказывать эффект при пероральном применении, существует возможность полностью отказаться от процедур выделения, очистки и инъекционного введения, используя растения как съедобные иммуномодуляторы и вакцины, что устраняет наиболее сложные и дорогостоящие этапы производства (80–90% затрат при производстве рекомбинантного белка), требующие привлечения квалифицированного персонала (Owczarek et al., 2019). Клеточная стенка растения

защищает действующее вещество от деградации пищеварительными ферментами желудка посредством биоинкапсулирования до тех пор, пока не переваривается кишечными микробами, высвобождая целевой белок (Shahid, Daniell, 2016).

1.2. Методы получения трансгенных растений

Большинство трансгенных растений-продуцентов на настоящий момент созданы с использованием почвенной бактерии - патогена растений *Agrobacterium tumefaciens* и родственных ей, обладающих естественным механизмом трансформации. Ti-плазида *A. tumefaciens* несет комплекс генов, отвечающих за транспорт фрагмента этой же плазмиды, называемого Т-ДНК, в растительную клетку и интеграцию его в геном. Методами молекулярной биологии в Т-ДНК может быть интегрирована любая генетическая конструкция, которая будет перенесена в геном растения (Лутова, 2010). Метод, использующий *A. tumefaciens* (агробактериальная трансформация) отличается удобством и простотой, очень высокой вероятностью интеграции гетерологичного гена, высокой точностью и возможностью работы с достаточно длинными (до 150 kb) фрагментами. Он применяется, с некоторыми ограничениями, для трансформации как двудольных, так и однодольных растений, и является де-факто стандартом для трансгенных растений (Broothaerts et al., 2005, Desai et al., 2010, Gao, Nielsen, 2013; Singer, 2018; Lacroix, Citovsky, 2019).

Альтернативой агробактериальной трансформации выступает биобаллистический метод, при котором клетки обстреливают микроскопическими фрагментами инертного металла (золота или вольфрама) с нанесенной на них векторной ДНК (Sujatha, Visarada, 2013). Это один из немногих универсальных методов генной инженерии, способный проникнуть сквозь клеточную стенку растений. Преимуществами биобаллистики являются независимость от видовой принадлежности растения, возможность трансформировать как ядерный геном, так и геном хлоропластов или митохондрий, а также отсутствие у вставки

фланкирующих последовательностей, характерных для агробактериальных векторов. Недостатком баллистического метода по сравнению с агробактериальным является пониженная частота трансформации и множественность вставки (Gao, Nielsen, 2013).

Преимуществом трансформации ядерного генома является стабильное наследование трансгенной вставки в ряду поколений, что позволяет получить от единственного трансформанта неограниченное количество потомков для массового использования. Основным на данный момент недостаток ядерной трансформации — низкий уровень экспрессии трансгена, в результате чего содержание рекомбинантного белка часто не превышает 1% от растворимых белков клетки, и может уменьшаться в зависимости от места встраивания гетерологичного гена и активации процесса сайленсинга. Возможность свободного размножения несет и опасность неконтролируемого распространения трансгена в природе, в том числе при скрещивании с другими сортами и дикорастущими родственниками культурных растений (Daniell et al., 2009, Fahad et al., 2015).

Альтернативой ядерной трансформации является внедрение трансгена в геном хлоропластов. Каждая клетка мезофилла насчитывает около ста этих органелл, имеющих собственную систему экспрессии, сходную с прокариотической. Трансплантомные растения не подвержены эффекту сайленсинга, отличаются стабильно высоким уровнем экспрессии и содержанием рекомбинантного белка, которое может достигать 70% от белка клетки (Oey et al., 2009). Отсутствие хлоропластов в пыльце устраняет угрозу неконтролируемого распространения трансгена при выращивании растений в открытом грунте. Один промотор может контролировать синтез сразу нескольких белков благодаря оперонной организации генетического материала хлоропластов (Дейнеко, 2012). Синтез гетерологичного белка в пластидах может снижать его токсическое воздействие на клетки растения. Однако недостатком данной системы экспрессии является невозможность направления рекомбинантного белка в

эндоплазматический ретикулум и, соответственно, проведение ряда посттрансляционных модификаций (Desai et al., 2010). Получение транспластомных растений представляет собой более сложную и ненадежную процедуру, нежели агробактериальная трансформация (Obembe et al., 2011).

В клетках растений, помимо хлоропластов, присутствует еще один тип органелл с собственным генетическим материалом – митохондрии. К настоящему времени были проведены успешные попытки трансформации их генома. Гетерологичные конструкции вводили в митохондрии *Chlamydomonas reinhardtii* методом биобаллистики (Larosa, Remacle, 2013) и в митохондрии *Arabidopsis thaliana* с применением белковых трансмембранных комплексов (Kittur et al., 2015). Преимуществом данной технологии, как и в случае с хлоропластами, является большое количество митохондрий в клетках и высокая транскрипционная активность их генома, что теоретически может обеспечить значительный уровень экспрессии рекомбинантного гена. Однако в настоящее время эти методы остаются экспериментальными и не имеют коммерческого значения.

Перспективной является технология транзientной экспрессии, не предусматривающая появления гетерологичного гена в генеративных органах растения. В конце 1990-х годов системы транзientной экспрессии в интактных или инфицированных вирусом растениях рассматривались главным образом как средство проверки экспрессии вектора или целевого белка и как средство определения его функции. Метод агроинфильтрации включает обработку листовой ткани табака суспензией агробактерий в присутствии повреждающего клеточные мембраны фактора, например под давлением либо в вакууме, что приводит к массовому заражению клеток, появлению в них множества копий Т-ДНК и наработке в короткий срок большого количества рекомбинантного белка (Kanagarajan et al., 2012; Holtz et al, 2015; Merlin et al, 2016). Распространен и способ доставки трансгена с применением модифицированных вирусов растений, размножение которых в растительной клетке также приводит к появлению

множества копий гетерологичного гена и интенсивной наработке белка (Hefferon, 2012). Существует гибридная технология, при которой вирусный вектор лишается белков, отвечающих за проникновение через клеточную мембрану, и вводится в клетки растения в составе Т-ДНК *A. tumefaciens*, что позволяет увеличить выход целевого белка (Gleba et al., 2014). Векторы транзientной экспрессии не наследуются при половом размножении растений, что устраняет угрозу бесконтрольного распространения трансгена. Транзientная экспрессия позволяет выращивать растения в контролируемых условиях, чтобы быть уверенным в стерильности. Недостатком этого направления можно назвать ограничение массы рекомбинантного белка, полученного в результате одного акта трансформации, и необходимость постоянной наработки векторной системы в большом количестве. Транзientная экспрессия, не требующая регенерации целого растения, может быть использована для получения рекомбинантного белка в течение всего лишь нескольких дней, и эта система может представлять собой способ быстрого целевого производства терапевтических белков, в первую очередь вакцин, в условиях ограниченного времени (Gleba et al., 2005; Tremblay et al., 2010; Rech et al., 2012).

Для получения растительной биомассы необязательно использовать многоклеточные растительные организмы. Суспензионная культура клеток высших растений представляет собой широко распространенный метод получения коммерческих рекомбинантных белков. Также набирает популярность использование в качестве продуцентов одноклеточных водорослей, в частности, *Chlamydomonas reinhardtii* (Дейнеко, 2012). Перспективной является технология наработки растительной биомассы в виде культуры так называемых «бородатых корней» (результат трансформации с использованием *Agrobacterium rhizogenes*) (Stiles, Liu, 2013). Преимуществом биореакторов является отработанность технологии на культурах микроорганизмов и легкая масштабируемость. Изоляция от окружающей среды обеспечивает независимость от погодных условий, насекомых, безопасность от заражения патогенами млекопитающих и исключает

вероятность распространения трансгена, что идеально подходит для производства высокоочищенных фармацевтических белков, а также облегчает регистрацию продукта. В отличие от клеток млекопитающих, растительные клетки переносят относительно широкий спектр условий культивирования, в том числе могут быть выращены при комнатной температуре, что приводит к снижению капиталовложений в установку, а также в текущее обслуживание производства. Высокая скорость роста клеточной культуры и отсутствие необходимости регенерации полноценных растений позволяет получить достаточное количество рекомбинантного белка за короткое время. В условиях суспензионной культуры клетки микроводорослей, имеющие тонкую гликопротеиновую клеточную стенку, способны секретировать рекомбинантный белок в среду, что облегчает его выделение и очистку. При этом также достигается большая однородность свойств рекомбинантного белка по сравнению с получаемым в целых растениях, что связано как со строго контролируруемыми условиями в биореакторе, так и с меньшим сроком пребывания белка в контакте с различными внутриклеточными ферментами. (Xu et al., 2011; Huang et al., 2012). В связи с этим для получения рекомбинантных белков в растительных системах все чаще используют именно клеточные культуры (Moon et al., 2020).

На сегодняшний день показана способность трансгенных растений синтезировать множество функциональных фармацевтических белков разных семейств, многие из них проходят клинические испытания и приближаются к коммерческому использованию. Так, было проведено рандомизированное двойное слепое исследование раствора для пероральной регидратации для детей на основе риса, содержащего рекомбинантные лактоферрин и лизоцим, и результаты продемонстрировали положительный эффект (Zavaleta et al., 2007). Израильская компания Protalix производит биофармацевтический препарат, зарегистрированный под названием ELEYSO и одобренный для терапии болезни Гоше 1 типа (глюкозилцерамидный липидоз, лизосомальная болезнь накопления, вызванная недостатком фермента глюкоцереброзидазы и накоплением

глюкоцереброзида во многих тканях организма). Действующим веществом является фермент глюкоцереброзидаза, нарабатанный в суспензионной культуре клеток моркови ProCellEx®. Благодаря использованию сигнала внутриклеточного транспорта от хитиназы табака рекомбинантный белок накапливается в вакуолях клеток (Paul et al., 2013). Платформа Protalix ProCellEx® использует гибкие полиэтиленовые одноразовые биореакторы, разработанные и оптимизированные для культур растительных клеток. В отличие от больших реакторов из нержавеющей стали, обычно используемых для производства рекомбинантных белков, биореакторы ProCellEx® просты в использовании, требуют низких начальных капиталовложений и могут быть масштабируемыми с точки зрения затрат. Кроме того, они требуют относительно небольшого практического обслуживания между циклами. Значительный интерес вызвала разработка канадской компанией Medicago рекомбинантной вакцины против вируса атипичной пневмонии H1N1 по заказу агентства передовых оборонных исследований (DARPA, США). Белок нарабатывается в растениях табака, подвергнутых агроинфильтрации, в течение суток, что позволяет быстро развернуть производство в случае эпидемии. Вакцина, клинические испытания которой в настоящее время завершаются, является одним из самых перспективных фармацевтических белков растительного происхождения (da Cunha et al., 2014). Не меньший интерес вызвала наработка в трансгенных растениях табака химерных антител к вирусу Эбола, продемонстрировавших клиническую эффективность (Rybicki, 2014). С помощью растительных систем в некоторых случаях возможно разрабатывать и коммерциализировать рекомбинантные белки без нарушения прав интеллектуальной собственности третьих сторон. Всего же производство рекомбинантных белков на основе трансгенных растений осваивают около 20 компаний (Obembe et al., 2011; Дейнеко, 2017).

1.3. Встраивание Т-ДНК в геном растения при агробактериальной трансформации

Почвенные бактерии *Agrobacterium tumefaciens* можно назвать природным генным инженером, способным к горизонтальной передаче бактериальных генов и генетической трансформации растительных клеток (Gelvin, 2003). Действительно, передача генетического материала от *A. tumefaciens* и родственных видов растениям-хозяевам представляет собой первый известный случай активного горизонтального переноса генов от прокариот к эукариотам. Основные факторы, придающие эту способность *A. tumefaciens*, расположены на большой плазмиде Ti (Tumor inducing, индуцирующей опухоль), которая содержит область с генами Vir (вирулентности), кодирующими большинство белков, необходимых для переноса фрагмента ДНК, Т-ДНК. Последовательности Т-ДНК естественным образом переносятся несколькими представителями *Agrobacterium spp.* и содержат два типа генов под контролем промоторов, обеспечивающих их экспрессию в эукариотических клетках. Первый набор генов (онкогены) кодирует белки, которые влияют на биосинтез регуляторов роста (ауксинов и цитокининов) или реакцию растительных клеток на них, и вызывают неконтролируемое клеточное деление, что приводит к пролиферации тканей и образованию опухолевых новообразований (корончатые галлы). Второй набор генов кодирует ферменты, участвующие в синтезе небольших молекул (опинов), состоящих из аминокислоты и органической кислоты или углевода, которые могут использоваться клетками *Agrobacterium* в качестве источника углерода и азота (Escobar, Dandekar, 2003). Способность *Agrobacterium* переносить ДНК либо для временной экспрессии, либо для стабильной генетической трансформации широко используется в качестве инструмента исследований и биотехнологии (Лутова, 2010; Матвеева, Сокорнова, 2017). Хотя механизм переноса и интеграции Т-ДНК активно исследовался с начала 1970-х годов, многие аспекты этого процесса до сих пор вызывают споры (Singer, 2018; Lacroix, Citovsky 2019).

Первым этапом интеграции Т-ДНК является ее перенос из агробактерии в клетки растения. Перенос Т-ДНК представляет собой процесс, сходный с бактериальной конъюгацией. Первый этап процесса происходит внутри бактериальной клетки, когда Т-ДНК отделяется от ее родительской плазмиды (Ti-плазмиды в природе или бинарной плазмиды в лабораторных штаммах). Разделение Т-ДНК начинается, когда белковый комплекс, состоящий из геликазы VirD1 и эндонуклеазы VirD2, присоединяется к левой (LB, left border) и правой (RB, right border) границам области Т-ДНК. LB и RB представляют собой несовершенные прямые повторы длиной 24-25 пар оснований. VirD2 разрезает цепь ДНК между третьим и четвертым нуклеотидами каждого из этих повторов. Таким образом, от родительской плазмиды отделяется одноцепочечная Т-ДНК, несущая значительную часть LB на 3'-конце и лишь три нуклеотида RB на 5'-конце. Один белок VirD2 остается ковалентно связанным с 5'-концом Т-ДНК (сторона RB) (Singer, 2018; Lacroix, Citovsky, 2019).

Белок VirD2 проводит одноцепочечную Т-ДНК через бактериальную систему секреции типа IV в растительную клетку. Данный процесс может прерываться в случайный момент; в силу этого рекомендуется размещать селективный маркерный ген рядом с LB, который проходит в растительную клетку последним. Это значительно повышает вероятность того, что устойчивое растение получит и целевой ген. Предполагается, что в цитоплазме растения перед проникновением в ядро транспортируемая s-Т-ДНК покрывается множественными мономерами ДНК-связывающего белка VirE2, которые проникают в растительную клетку через другую систему транспорта, независимо от Т-ДНК (Li, Pan, 2017). Кроме того, считается, что с ViE2 и VirD2 взаимодействуют и другие бактериальные и растительные белки, с образованием «Т-комплекса». Предполагаемая роль Т-комплекса заключается в защите одноцепочечной Т-ДНК от деградации и в облегчении ее транспорта в ядро. VirD2 облегчает ядерный транспорт с помощью своего домена NLS (сигнала ядерной локализации). Аналогично, VirE2 может облегчать транспорт Т-

комплекса посредством двух его доменов NLS. Тем не менее, ряд групп сообщили, что VirE2 остается в основном в цитоплазме (Singer, 2018).

После проникновения Т-ДНК в ядро происходит внехромосомная достройка ее второй цепи, и лишь затем – встраивание в геном. Механизм данного процесса однозначно не установлен, и вероятнее всего включает связывание олигонуклеотидов с участком LB Т-ДНК с дальнейшим синтезом комплементарной цепи. Быстрое превращение одноцепочечной Т-ДНК в двуцепочечную после ее проникновения в ядро подтверждается многочисленными экспериментами. Первым доказательством является быстрая и активная временная экспрессия генов Т-ДНК в инфицированных листьях, независимо от того, является ли перенесенная одноцепочечная Т-ДНК кодирующей или не кодирующей цепью. Кроме того, эксперименты, включающие гомологичную рекомбинацию между внехромосомными конструкциями Т-ДНК, доставленными в виде некомплементарных цепей, показали, что по крайней мере одна из них должна быть преобразована в двуцепочечную Т-ДНК до рекомбинации (Singer, 2018). Кроме того, из зараженных *Agrobacterium* растений были выделены внехромосомные двухцепочечные кольцевые структуры Т-ДНК (Т-кольца) (Singer et al., 2012). Таким образом, нет никаких сомнений в том, что внехромосомные двуцепочечные Т-ДНК появляются в растениях вскоре после заражения *Agrobacterium*, однако остается вопрос, опосредовано ли их появление независимым механизмом или является промежуточным звеном в процессе интеграции.

Предполагается, что в нацеливании комплекса Т-ДНК на хроматин хозяина участвуют нуклеосомные гистоны, обеспечивая взаимодействие между Т-комплексом и геномной ДНК до интеграции.

Ранние исследования показали, что интегрированные Т-ДНК преимущественно локализованы в транскрипционно активном хроматине. Это объяснялось тем, что денатурированная во время транскрипции ДНК более доступна для встраивания. Однако эти исследования основывались на анализе

трансгенных растений, регенерированных в ходе отбора на устойчивость к антибиотикам. Это делает практически невозможным обнаружение интеграций в гетерохроматин, который не поддерживает экспрессию маркерного гена резистентности. В исследованиях, проведенных без отбора, был получен совершенно другой результат, который показал, что Т-ДНК интегрируется случайным образом во все области хроматина, в том числе в центромерные и теломерные регионы (Kim, Veena, Gelvin, 2007).

В отличие от многих интегрирующихся вирусов, *Agrobacterium* не кодирует белок с интегразной активностью среди своих эффекторных белков. Хотя ранние исследования показали, что VirD2 может выступать в качестве интегразы, позже было показано, что интеграция опосредована факторами хозяина, связанными с репарацией двуцепочечных разрывов (Lacroix, Citovsky, 2019). Считается, что в процесс вовлечены системы NHEJ (негомологичное соединение концов) и MMEJ (соединение концов на основе микрогомологии). RB-сторона Т-ДНК представляет собой тупой конец, который предпочтительно использует путь репарации ДНК NHEJ, тогда как сторона LB представляет собой 3' липкий конец, который предпочтительно использует путь репарации ДНК MMEJ. В ходе анализа последовательности внехромосомных кольцевых структур Т-ДНК было обнаружено, что соединения ДНК внутри них демонстрируют характерные паттерны восстановленных двуцепочечных разрывов.

Встраивание Т-ДНК в растительный геном является достаточно неточным процессом и может сопровождаться значительными изменениями как в последовательности Т-ДНК, так и в геноме хозяина. На концах Т-ДНК возможны потери, которые чаще затрагивают район LB, что подтверждает его роль как точки связывания случайных праймерных последовательностей при достройке комплементарной нити Т-ДНК. Встраивание Т-ДНК может происходить одновременно и независимо в несколько регионов генома; кроме того, возможно формирование кластеров из близко расположенных Т-ДНК. Промежутки между ними включают участки как бактериальной, так и растительной ДНК длиной до

десятков тысяч пар оснований. Интеграция Т-ДНК в открытую рамку считывания способна вызвать событие инсерционного мутагенеза (Дейнеко и др., 2007). Наличие в геноме нескольких Т-ДНК зачастую провоцирует хромосомные перестройки. Интеграция Т-ДНК в виде кластеров из двух или более копий может составлять около 50% событий интеграции, и около 30–70% событий включают последовательности родительской бинарной плазмиды Т-ДНК (Nicolia et al., 2017; Singer 2018).

В целом, отмечается, что механизм встраивания Т-ДНК в геном в значительной мере обусловлен системами растения-хозяина, как и в случае методов, не включающих использование *Agrobacterium* (электропорация, биобаллистика). Его более высокая эффективность объясняется присутствием белков VirE2 и VirD2, обеспечивающих транспорт Т-ДНК в ядро и ее защиту от деградации нуклеазами.

Стабильная генетическая трансформация с помощью бактерий рода *Agrobacterium* является предпочтительным методом, используемым для получения трансгенных растений. Целевая последовательность ДНК клонируется между границами Т-ДНК. Следовательно, после интеграции Т-ДНК в геном растения образуется трансгенное растение. Штаммы *Agrobacterium*, используемые для биотехнологических применений, сами являются генетически модифицированными. Эта модификация включает удаление естественных генов, индуцирующих опухоль, из Т-ДНК, так что штаммы становятся «разоруженными». Однако на способность разоруженных штаммов переносить модифицированную Т-ДНК это не влияет, поскольку для переноса Т-ДНК необходимы лишь левая и правая граничные последовательности (LB и RB). Более того, чтобы упростить операции генной инженерии, Т-ДНК часто помещают на меньшую бинарную плазмиду вместо природной плазмиды Ti, поскольку с ней легче работать и она может эффективно реплицироваться как в *E.coli*, так и в *Agrobacterium*. Гены Vir располагаются на другой плазмиде.

1.4. Цитокины и их применение в медицине и ветеринарии

Белки крови представляют особый интерес для фармакологии, так как они играют ключевую роль в метаболизме и связаны с социально значимыми заболеваниями. Различные типы белков крови могут быть разделены на две основные категории: (I) полипептиды, связанные с циркулирующими клетками; и (II) белки, полученные из плазмы (PDS), такие как гормоны, цитокины, ферменты, ингибиторы протеаз, факторы свертывания крови, а также переносчики липидов, витаминов и ионов. Фракционированные белки плазмы используются при лечении приобретенных или врожденных заболеваний, в том числе различных форм гемофилии, других гематологических заболеваний, а также иммунологических нарушений (Burnouf, 2011).

Цитокины - группа эндогенных белковых медиаторов межклеточного взаимодействия, участвующих в регулировании процессов пролиферации, дифференцировки и клеточной подвижности. Цитокины являются важными компонентами иммунной системы, однако они также задействованы в эмбриогенезе, влияют на кроветворную систему и на нервные клетки. В настоящее время к системе цитокинов относят более 250 индивидуальных веществ, которые обладают общими свойствами. Цитокины являются полипептидами с молекулярной массой от 5 до 50 кДа, часто гликозилированными, и могут состоять из одной, двух, трех и более одинаковых или разных субъединиц.

Роль цитокинов в регуляции функций организма может быть разделена на шесть основных составляющих (Симбирцев, 2013):

- 1) регуляция процессов развития, в том числе оплодотворения, эмбриогенеза, закладки и развития органов, в особенности иммунной системы;
- 2) поддержание и регуляция некоторых нормальных физиологических функций организма, в первую очередь гемопоэза;

- 3) участие во всех типах защитных реакций организма, поддержание гомеостаза при воздействии внешних и внутренних повреждающих факторов;
- 4) контроль развития иммунопатологических процессов (аллергических, аутоиммунных, воспалительных реакций);
- 5) участие в регуляции опухолевой трансформации клеток, в развитии и метастазировании опухолей;
- 6) регуляция процессов регенерации.

По совокупности характеристик их часто называют гормонами иммунной системы. Цитокины синтезируются и воспринимаются клетками различного происхождения, действуют в крайне низких концентрациях через высокоспецифичные клеточные рецепторы, и могут воздействовать на весь организм после попадания в кровяное русло (эндокринно), лишь на близлежащие клетки, например в очаге воспаления (паракринно), и на саму клетку, синтезирующую данный цитокин (автокринно). Некоторые исследователи выделяют цитокины в новую самостоятельную систему регуляции, существующую наряду с нервной и эндокринной системами поддержания гомеостаза (Симбирцев, 2013). Для цитокиновой сети характерны взаимосвязанность, избыточность сигналинга и зачастую противоположная роль одного и того же цитокина на разных этапах развития процесса (Хаитов и др., 2000).

Классификация цитокинов может проводиться как по их биохимическим, так и по физиологическим свойствам, а также по типам связывающих их рецепторов (Sirko et al., 2011; Симбирцев, 2013; da Cunha et al., 2014). Наиболее распространенная на данный момент классификация учитывает все эти параметры. Следует отметить, что ввиду разнообразия цитокинов и длительного времени их изучения, некоторые молекулы были независимо охарактеризованы разными группами исследователей, так, интерлейкины 19, 20 и 24 представляют собой одно и то же вещество. Многие устоявшиеся названия также относятся к раннему периоду изучения цитокинов, когда не был известен масштаб этой

группы белков. Термин «интерлейкины» первоначально использовался исследователями для обозначения цитокинов, чьими предполагаемыми целями являются, главным образом, лейкоциты. В настоящее время он используется в основном для обозначения новооткрытых молекул цитокинов, безотносительно к их предполагаемой функции. Подавляющее большинство из них производятся Т-хелперами. Лимфокины — цитокины, синтезируемые лимфоцитами, монокины — исключительно моноцитами. Интерфероны — цитокины, участвующие в противовирусном ответе. Колонистимулирующие факторы поддерживают рост клеток различных путей кроветворения. Хемокины опосредуют хемоаттракцию (хемотаксис) между клетками. Факторы некроза опухолей вызывают апоптоз клеток.

Цитокины регулируют некоторые важные функции организма и играют ключевую роль в организации иммунного ответа на патогены любой природы, что предопределило их использование в фармацевтике. В настоящее время в качестве лекарственных препаратов в мире широко используются несколько белков из этого семейства (табл. 2). Наибольших успехов цитокиновая терапия достигла в области стимуляции костномозгового кроветворения, борьбе с различными инфекционными заболеваниями и опухолями, в том числе в сочетании с иными препаратами (Леднева и др., 2011; Шахов, 2019).

Таблица 1. Семейства цитокинов.

Класс	Семейство	Цитокин
Цитокины I класса (гемопоэтины)	Семейство рецепторов IL-2	Интерлейкины IL-2, 4, 7, 9, 13, 15, 21
	Семейство рецепторов IL-3	Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF, ГМ-КСФ), интерлейкины IL-3, 5
	Семейство рецепторов IL-6	Онкостатин М (OSM), фактор ингибирования лейкемии (LIF), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF, Г-КСФ), кардиотрофин 1, лептин
	Односубъединичные гемопоэтины	Эритропоэтин (ЭПО, ЕРО), пролактин
Цитокины II класса	Интерфероны I типа	Интерфероны альфа, бета, омега 1, каппа, тау 1
	Интерфероны II типа	Интерферон гамма
	Интерфероны III типа	Интерферон лямбда, он же интерлейкин 28/29
	Семейство IL-10	Интерлейкины IL-10, 19/20/24, 22, 26
Семейство тромбоцитарных факторов роста (PDGF)		IGF1, IGF2
Семейство факторов некроза опухолей (TNF)		TNFA, TNFB, TNFC, TNFSF4...
Семейство IL-1		IL-1A, 1B, 1RN, 18, F5, F6, F7, F8, F9, F10
Семейство IL-17		IL-17, 17B, 17C, 17D, 17E, 17F
Семейство факторов роста опухолей (TGF-бета)	9 семейств	TGF-beta 1, 2, 3 Костные морфогенетические белки (BMP, bone morphogenetic proteins)
Хемокины	Семейство CC	CCL2, CCL3, CCL4...
	Семейство CXC	CXCL1, CXCL4, IL-8...
	Семейство CX3C	CX3CL1
	Семейство C	XCL

Таблица 2. Цитокины, одобренные для клинического применения (Бурлаковский и др., 2016).

Цитокин	Заболевание	Препарат (Производитель)
Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF)	Нейтропения	Neupogen/Filgrastim (Hoffmann-La Roche) Lenograstim/Granocyte (Chugai Pharmaceuticals) Граноген (ООО Фармапарк)
Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF)	Лейкемия	Leukine/Sargramostin (Immunex) Molgramostim/Leucomax (Schering Plough/Sandoz)
Интерферон- α (INF- α)	Вирусные инфекции, рак	Intron A (Schering Plough) Roferon A (Hoffman La Roche) Infergen (Three Rivers Pharmaceuticals) Alferon N (HEMISPHERx Biopharma) Pegasys (Genentech USA/Hoffman La Roche) Pegintron/Sylatron (Merck) Multiferon Альтевир (ООО Фармапарк) Альфарона (ООО Фармаклон) Виферон (ООО Ферон) Лайфферон (Вектор-медика) Генферон (Биокад)
Интерферон- β (INF- β)	Рассеянный склероз	Betaseron (Bayer) Avonex (Biogen Idec) Rebif (Merck Serono) CinnoVex (CinnaGen) Интерферон-бета-1b (Биокад) Интерферон-бета-1b (Генериум)
Интерферон- γ (INF- γ)	Остеопороз Хронический гранулематоз	Ингарон (ООО НПП Фармаклон) Actimmune (Horizon Pharma) Imukine (Boehringer ingelheim).

Таблица 2. Цитокины, одобренные для клинического применения (продолжение).

Цитокин	Заболевание	Препарат (Производитель)
Эритропоэтин (ЭПО)	Анемии различной природы	Eprex (Janssen-Cilag) Epogen (Amgen) Procrit (Ortho Biotech) Эпокрин (ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ») Эпостим (Фармапарк)
Интерлейкин-2 (IL-2)	Рак	Aldesleukin (Novartis) Proleukin (Prometheus Laboratories) Interking (Shenzhen Neptunus InterIng-H) Ронколейкин (Биотех)
Интерлейкин-11 (IL-11)	Тромбоцитопения	Oprelvekin/Neumega (Genetics Institute, Inc./ Wyeth/Pfizer)
Костные морфогенетические белки (BMP)	Переломы, операции ротовой полости	Infuse BMP-2 (Medtronic) OP-1 BMP-7 (Stryker Biotech)
Фактор роста стволовых клеток (SCF)	Рак, пересадка костного мозга	Ancestim (Amgen)

В настоящее время в России и за рубежом разработаны и зарегистрированы несколько препаратов рекомбинантных цитокинов, включая эритропоэтин, интерфероны альфа и гамма, колониестимулирующие факторы, интерлейкины и их антагонисты, а также некоторые другие. Производство рекомбинантных цитокинов традиционно основывается на микробных системах (суспензии кишечной палочки либо дрожжей), продуктивность которых составляет более 5 г интерферона на литр в культуре клеток (Xie et al., 2007; Падкина и др, 2010). В настоящее время на рынке присутствуют различные рекомбинантные цитокины микроорганизменного происхождения, одобренные для клинического применения в лечении нейтропении, лейкоза, хронического гепатита В и С (Sirko et al., 2011). Перспективным является использование цитокинов в качестве адъювантов для усиления иммунного ответа при вакцинации (Авдеева и др., 2009; Симбирцев и

др., 2011). Ограниченная применимость цитокиновых препаратов связана с побочными эффектами их применения, включающими, в частности, повышенную вероятность аутоиммунных заболеваний и гриппоподобный синдром (Baldo, 2014; Шахов и др., 2019).

Значительно большая активность наблюдается на рынке ветеринарных препаратов. В 2014 году белорусской компанией «Пробиотех» был разработан разбавитель-адъювант для живых вакцин крупного рогатого скота на основе рекомбинантного гамма-интерферона. В лаборатории биохимической генетики СПбГУ созданы штаммы дрожжей *Pichia pastoris*, синтезирующие внутриклеточные и секреторные цитокины: ИФН- γ быка и курицы (Градобоева, Падкина, 2008, Цыганков и др., 2014), химерные белки, состоящие из сывороточного альбумина, сшитого с ИЛ-2 или ИФН- α 16 человека (Карабельский и др., 2009, Карабельский, Падкина, 2012) и др. Применение препаратов цитокинов в животноводстве, и интерферонов в частности, имеет существенные преимущества по сравнению с традиционными антибиотиками и химиотерапевтическими препаратами. Областью применения ИФН- γ является лечение вирусных, онкологических, а также ряда бактериальных заболеваний. Показано, что ИФН- γ играет важную роль в иммунном ответе на *Mycobacteria tuberculosis bovis* (Flynn et al., 1993, Vesosky et al., 2006). Кроме того, ИФН- γ является противоопухолевым агентом, который активирует антинеопластическую функцию макрофагов (Ершов, 1996). Учитывая, что вирусный лейкоз является широко распространенным заболеванием крупного рогатого скота, необходимость подобных лекарственных средств для ветеринарии не вызывает сомнения.

1.5. Цитокины I класса (гемопэтины), синтезированные в растениях

Гемопэтины — одни из первых рекомбинантных цитокиновых препаратов, вошедших в повседневную клиническую практику. Причиной этого является

однозначность их действия (стимуляция пролиферации и дифференцировки клеток-предшественников различных ростков кроветворения в красном костном мозге) и хорошо исследованные последствия терапии, а также широкая сфера применения. Немаловажным фактором является простота структуры таких белков, как ЭПО и ГМ-КСФ, включающих единственную полипептидную цепь, что облегчает их синтез в трансгенных организмах-продуцентах.

Эритропоэтин (ЭПО) – сильно гликозилированный цитокин размером от 30 до 38 кДа, который действует в качестве пептидного гормона в регуляции дифференциации клеток-предшественников зрелых эритроцитов (эритропоэз). У взрослых людей основным производителем ЭПО являются интерстициальные клетки в области перитубулярных капилляров почки. До 10-15% ЭПО синтезируется гепатоцитами и эпителиальными клетками, окружающими центральные вены печени. Минимальный уровень экспрессии гена *EPO* также присутствует в других органах и тканях (мозге, плаценте, селезенке и легких). Сигналом для синтеза ЭПО является снижение парциального давления кислорода в тканях и последующее развитие гипоксии, происходящее в результате снижения переноса кислорода из-за сокращения количества эритроцитов в циркуляции. В нормальных физиологических условиях ЭПО постоянно находится в плазме крови в невысоких концентрациях в пределах 10-15 мМЕ/мл. Рекомбинантный эритропоэтин в настоящее время широко используется для лечения анемии различной природы, поскольку дает возможность восстановить собственное кроветворение и компенсировать анемию без переливания донорской крови (Симбирцев, 2013). Мировая потребность в ЭПО оценивалась в 2003 году в 2 кг (da Cunha et al., 2014), а стоимость рекомбинантного ЭПО достигает 4000\$/мг (Kittur et al., 2013). Человеческий ЭПО гликозилирован, несет три N-связанных (Asn-24, Asn-38 и Asn-83) и одну O-связанную (Ser-126) углеводные цепи. Для стабильности в кровотоке и полноценной активности белок также требует наличия остатков сиаловой кислоты в цепочках N-гликанов, что является

характерным признаком гликопротеинов человека (Matsumoto et al., 1995, Weise et al., 2007).

ЭПО был одним из первых рекомбинантных цитокинов, полученных в клетках растений (Matsumoto et al., 1995, табл. 3). Ген эритропоэтина человека был выделен из кДНК и снабжен промотором 35S вируса мозаики цветной капусты (CaMV). Сигнальный пептид на N-конце обеспечивал внеклеточную секрецию рекомбинантного белка. Секреция наблюдалась в протопластах табака, в то время как в клеточных культурах размер белка 30 кДа был слишком велик для свободной миграции через клеточную стенку. В естественной форме ЭПО гликозилирован, что наблюдалось и в растительных клетках, однако состав и длина полисахаридных цепочек отличались от таковых у млекопитающих. К сожалению, выход рекомбинантного белка был весьма низок (0,0026% от общего растворимого белка). Белок был биологически активен *in vitro*, но не показал активности в естественных условиях. Это можно объяснить различиями в гликозилировании, которые, как известно, влияют на стабильность белка в крови (Matsumoto et al., 1995). Высокий уровень транзientной экспрессии ЭПО (до 0,250 мг/г сухого веса) был достигнут в протопластах мха *Physcomitrella patens* дикого типа и мутантных линий Δ -Fuc-T Δ -xyl-T (до 0,250 мг/г сухого веса) (Weise et al., 2007). Экспрессия гена *rhEPO* наблюдалась и в целых растениях табака и арабидопсиса. Хотя во всех трансгенных линиях был достигнут высокий уровень транскрипции, растения табака имели аномальную морфологию с запаздыванием вегетативного роста и мужской стерильностью (Cheon et al., 2004). Также rhEPO был получен в культуре «бородатых корней» *Nicotiana tabacum*, которые способны к секреции рекомбинантного белка с сигнальным пептидом в культуральную среду. Уровень экспрессии достигал 185,48 мкг/г культуры (Gurusamy et al., 2017). В другом исследовании для облегчения выделения и очистки ЭПО из листовой ткани табака к С-концу белка был присоединен Strep-tag II (пептидная последовательность, проявляющая сильное сродство к стрептавидину). Однако анализ очищенного ЭПО показал, что Strep-tag II

отсутствовал на белке. При этом Strep-tag II был обнаружен на ЭПО, который оставался в эндоплазматической сети, что позволяет предположить, что Strep-tag II отщепляется во время секреции белка (Kittur et al., 2015).

Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ, GM-CSF) является главным ростовым фактором для нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов, стимулирующим пролиферацию и дифференцировку промежуточных и поздних клеток-предшественников в нейтрофилы, эозинофилы и моноциты. Терапевтическое применение ГМ-КСФ эффективно восстанавливает число гранулоцитов в периферической крови, сниженное в результате, в частности, высокодозной химиотерапии рака, и препятствует развитию инфекционных осложнений. ГМ-КСФ может также использоваться в клинической практике для лечения нейтропении у новорожденных, в онкогематологии и для лечения инфекционных заболеваний (Симбирцев, 2013). ГМ-КСФ представляет собой небольшой белок (22 кДа), выделяемый в основном макрофагами и Т-клетками, которые участвуют в иммунном и воспалительном каскадах. ГМ-КСФ не проявляет структурной вариабельности и хорошо переносится пациентами, будучи, таким образом, кандидатом для использования в качестве фармакологического препарата (James et al., 2000).

Первоначально, рекомбинантный человеческий ГМ-КСФ был произведен в суспензионной культуре клеток табака (James et al., 2000; Lee et al., 2002) и риса (Shin et al., 2003; Kim et al., 2008;). Одним из наиболее интересных подходов к увеличению выхода белка было добавление минеральных солей или бычьего сывороточного альбумина к питательной среде, что стабилизирует секретируемый цитокин (James et al., 2000). Значительное (до 4-кратного) увеличение выхода было достигнуто и за счет добавления в среду желатина до 5% по массе. Тем не менее, в культурах старше 4 дней, желатин ингибировал рост клеток, по-видимому, активируя протеолитические ферменты (Lee et al., 2002). Более эффективный результат был достигнут в суспензионной культуре клеток риса, в частности, благодаря применению промотора амилазы Ramy3D (Shin et al.,

2003). В этой системе выход целевого белка составлял 129 мг/л культуры в отсутствие сахара, что необходимо для активности промотора. Система была впоследствии оптимизирована при помощи следующих трех подходов: (I) сайленсинг гена амилазы, доминирующего белка в клетках риса; (II) сайленсинг гена, кодирующего цистеинпротеазы риса; и (III) совместная экспрессия цитокина с ингибитором протеазы (Kim et al., 2008). Каждая из этих стратегий увеличивает выход рекомбинантного ГМ-КСФ по меньшей мере в два раза. Мышиный ГМ-КСФ (mGM-CSF) был успешно получен в суспензионной культуре клеток риса с выходом 24,6 мг/л среды (Liu et al., 2012). Этот же гликопротеин был также произведен в листьях табака с выходом 19 мкг/г свежих листьев (Gora-Sochacka et al., 2010). Биологическая активность рекомбинантного человеческого и мышиного ГМ-КСФ, полученного в суспензионной культуре клеток риса, была подтверждена с помощью ГМ-КСФ-зависимых TF1 клеток и мышиных клеток миелобластного лейкоза NFS-60 соответственно (Kim et al., 2008; Liu et al., 2012).

Для производства ГМ-КСФ использовались и полноценные взрослые растения. Максимальный выход рекомбинантного белка в листьях трансгенного сахарного тростника достигал около 0,02% (Wang et al., 2005), а в листьях табака примерно 0,22% от общего растворимого белка (Gora-Sochacka et al., 2010). В семенах трансгенного риса рекомбинантный ГМ-КСФ составлял до 1,3% от тотального белка (Sardana et al., 2007), и 0,03% от общего растворимого белка в семенах табака (Sardana et al., 2002). Наибольшее количество (до 2% белков) наблюдалось при использовании в качестве вектора вируса картофеля PVX (potato virus X) с модифицированным белком оболочки (Zhou et al., 2006). Белок также производился в таких системах экспрессии, как семена риса и семена табака с использованием промоторов рисового глютелина GT1 и GT3. В большинстве случаев биологическая активность рекомбинантного ГМ-КСФ была подтверждена *in vitro*, а также *in vivo* в эксперименте на мышах (Ning et al., 2008) и хомяках (Won et al., 2013).

Интерлейкин-2 (ИЛ-2, IL-2) играет роль ростового фактора для всех субпопуляций Т-лимфоцитов, а также активированных В-лимфоцитов, являясь, таким образом, важным стимулятором специфического иммунного ответа, также он проявляет противоопухолевую активность. ИЛ-4 воздействует в первую очередь на В-лимфоциты и ингибирует синтез некоторых провоспалительных цитокинов (TNF - фактор некроза опухолей, ИЛ-1, ИЛ-6). ИЛ-2 обладает выраженным свойством адъюванта, то есть способностью усиливать эффект вакцинации при совместном введении с антигеном (Никитина, Авдеева, 2008). Первое сообщение о биосинтезе рекомбинантных ИЛ-2 и ИЛ-4 в суспензионной культуре клеток табака было опубликовано в 1998 г. (Magnuson, et al., 1998). Клетки табака были трансформированы конструкцией, несущей последовательность кДНК *hIL-2*, производя до 0,38 мкг/г человеческого ИЛ-2/ г каллусной ткани или 0,08 мкг/ мл жидкой культуры клеток. Авторы предположили, что наличие сигнального пептида будет обеспечивать внеклеточную секрецию рекомбинантных белков. Однако эффективность секреции оставляла желать лучшего, большинство продуцируемых цитокинов оставалось в клетках, и только выделенные из среды белки демонстрировали биологическую активность, выражающуюся в способности поддерживать *in vitro* пролиферацию ИЛ-2-зависимых мышинных клеток линии CTLL-2. В ином исследовании была продемонстрирована экспрессия *hIL-2* в картофельных клубнях под контролем тканеспецифического промотора, активность рекомбинантного белка составила 115U / грамм растительной ткани (Park, Cheong, 2002). В более позднем исследовании (Redkiewicz et al., 2012) были получены различные линии трансгенных растений табака, синтезирующие зрелый ИЛ-2 как отдельно, так и в сочетании с двумя различными ингибиторами протеиназ. Рекомбинантный белок нес 6-тигистидиновый тэг либо С-Мус, а также был сшит с С-концевым сигналом локализации в эндоплазматическом ретикулуме. Выход составлял 1,8-9,5 мкг ИЛ-2 / г свежих листьев и 0,4-3,5 мкг ИЛ-2, сшитого с ингибитором протеиназы / грамм свежих листьев. Интересно, что в эксперименте на культуре клеток CTLL-2

обе формы ИЛ-2 продемонстрировали биологическую активность, невзирая на наличие поли-гистидинового тэга, С-Мус, или ингибиторов протеиназы. Примерно в то же время был проведен аналогичный эксперимент по продукции в растениях табака рекомбинантного ИЛ-2, сшитого с 6-ти-гистидиновым тэгом или С-мус и несущего сигнал локализации в эндоплазматической сети или в хлоропластах (Matakas et al., 2013). Выход белка измерен не был, но очищенный ИЛ-2 продемонстрировал активность на CD4+ Т-клетках из селезенки мыши.

Методом агробактериальной трансформации были также созданы растения, производящие интерлейкины различных семейств, обладающие биологической активностью: человеческие ИЛ-4 в суспензионной культуре клеток табака (Magnuson, et al., 1998) и картофеля (Ma et al., 2005), человеческий противовоспалительный цитокин ИЛ-10 в целых растениях табака (Menassa 2004) и суспензионной клеточной культуре (Bortesi et al., 2012; Kaldis et al., 2013), а также в растениях *Arabidopsis thaliana* (Chen et al., 2013). Это говорит о том, что пост-трансляционные модификации этих цитокинов являются совместимыми в растениях и млекопитающих. Кроме того, зрелые формы ИЛ-16, ИЛ-7, ИЛ-10, мИЛ-4 и мИЛ-18, с прикрепленным к С-концу сигналом внутриклеточного транспорта в эндоплазматический ретикулум, были синтезированы в эндосперме трансгенных растений риса (Kudo et al., 2013). Активность этих рекомбинантных интерлейкинов в клетках млекопитающих не была протестирована. Для наработки цитокинов использовались и транспластомные растения (Zhang et al., 2014). Включение последовательности слитого тэга может улучшить синтез белка и облегчить очистку белка (De Marchis et al., 2012), но может также и усложнить их использование в качестве лекарственного средства, если посторонние остатки оказывают влияние на биологическую активность или не могут быть эффективно удалены.

Другие примеры производства цитокинов I класса в трансгенных растениях включают кардиотрофин 1 (Farran et al., 2008), ИЛ-12 (Gutierrez-Ortega et al., 2004, Gutierrez-Ortega et al., 2005, Kwon et al., 2003), ИЛ-13 (Wang et al., 2008) и ИЛ-18

(Zhang et al., 2003). Интересно, что ИЛ-12, состоящий из двух мономеров, был синтезирован на уровне более 5% от тотального растворимого белка после процедуры двойной агроинфильтрации листьев *Nicotiana benthamiana* двумя штаммами *Agrobacterium*, каждый из которых индивидуально кодировал одну субъединицу (Medrano et al., 2009). В другом эксперименте ИЛ-12, полученный в трансгенных томатах, показал биологическую активность, сравнимую с таковой у препарата, наработанного в *E. coli* (Gutierrez-Ortega et al., 2005). Кардиотрофин 1 был произведен в транспластомных растениях табака с эффективностью примерно 5%. Кроме того, оказалось, что его биологическая активность ингибируется светом, который, скорее всего, нарушает конформацию белка (Farran et al., 2008).

1.6 Цитокины II класса, синтезированные в растениях

Интерлейкин-10 (ИЛ-10, IL-10) представляет собой цитокин, играющий важную роль в многочисленных реакциях иммунорегуляции и воспаления (Симбирцев, 2013). Он был успешно синтезирован в семенах риса под регуляцией промотора Glub-1, будучи сшит с сигнальным пептидом для локализации белка в эндосперме семян риса (табл. 3). Продукт, как было установлено, не отличался по гликозилированию от нативного, и выход конечного очищенного белка составил 2 мг на 40 г семян (50 мкг/г). Биологическая активность рекомбинантного ИЛ-10 была подтверждена в эксперименте на дендритных клетках костного мозга мыши (Fujiwara et al., 2010). ИЛ-10 был также произведен в тканях табака с выходом 37,0 мкг/г свежих листьев (Bortesi et al., 2009).

Интерлейкин 37 (ИЛ-37, ИЛ-1 F7), недавно обнаруженный член семейства цитокинов, играет ключевую роль в ограничении врожденного воспаления и подавлении приобретенных иммунных реакций, таким образом имея высокий потенциал для лечения широкого спектра воспалительных процессов у человека. и аутоиммунные расстройства. В трансгенных растениях табака были получены

различные формы ИЛ-37, включая несплайсированную предшественника полной длины (proIL-37b), зрелую форму (matIL-37b) и модифицированный белок, в котором ИЛ-37b был слит с соевым агглютинином (SBA-IL-37b). Экспрессия всех форм IL-37b определялась конститутивным промотором 35S. Уровень накопления proIL-37b достигал приблизительно 1% общего растворимого белка, тогда как экспрессия matIL-37b была существенно ниже (0,01%). Слияние с SBA существенно увеличивало экспрессию matIL-37b, причем уровень накопления слитого белка составлял 1%. Функциональный анализ с использованием клеточной культуры *in vitro* показал, что растительные matIL-37b и proIL-37b являются биологически активными, но растительный matIL-37b проявлял значительно большую биологическую активность, чем proIL-37b (Alqazlan et al., 2019).

Интерфероны (ИФН) представлены гликопротеидами различной молекулярной массы и являются мощными стимуляторами иммунной системы против патогенов и опухолей различной природы. Рекомбинантные интерфероны бактериального происхождения обычно используются для лечения саркомы Капоши, миелоидного лейкоза и гепатитов А и С (Schroder, 2004; Fensterl, Sen, 2009). ИФН- γ является интерфероном класса II и отвечает за регулирование противовирусного и противоопухолевого иммунного ответа (Симбирцев, 2013). Интерфероны часто выбираются в качестве кандидатов для производства в системах на основе растений. Первые сообщения о получении интерферона человека относятся к началу 90-х годов (Edelbaum et al., 1992), в том числе с использованием транспластомных растений, что определило значительный уровень синтеза в 20% от общего растворимого белка табака (Arlen et al., 2007). Стоит отметить, что в системах на растительной основе были успешно получены не только интерфероны человека, но и интерфероны курицы (Luchakivskaya et al., 2011) и лосося (Fukuzawa et al., 2010). ИФН- γ был синтезирован в суспензионной культуре клеток риса с использованием конститутивного промотора убиквитина кукурузы и индуцируемого промотора риса α Amy3 / Ramy3D. Чтобы обеспечить

секрецию рекомбинантного ИФН- γ в культуральную среду, к обоим был добавлен сигнальный пептид альфа-амилазы. Биологическая активность рекомбинантного белка была подтверждена в опыте на линии клеток человека A549, зараженных вирусом лихорадки Денге (DENV). Наибольший выход, полученный из культуральной среды под действием промотора убиквитина, составил 12 нг/мл, и 17,4 нг/мл в случае промотора α Amy3 / RAmy3D. При выделении доля ИФН- γ составляла 699,79 нг/г веса свежих клеток при использовании промотора убиквитина и 131,6 нг/г сырого веса клеток для промотора α Amy3 / RAmy3D (Chen et al., 2004). Высокий уровень накопления человеческого ИФН- γ ($119 \pm 0,8$ мкг/г свежего веса, что составляет 2,5% от общего содержания растворимого белка (TSP)) был получен в растениях *Nicotiana benthamiana* в ходе трансформации вектором на основе вируса бамбуковой мозаики (BaMV). Подобного результата удалось достичь благодаря модификации кодирующей последовательности ИФН- γ путем присоединения сигнала удержания в эндоплазматическом ретикулуме и усечения N-концевого сигнального пептида, а также благодаря коэкспрессии белка-супрессора сайленсинга P19 (Jiang et al., 2019). Также были получены трансгенные конструкции для совместной экспрессии в растениях антигенов *Mycobacterium tuberculosis* и ИФН- γ для создания «съедобных вакцин» (Патент РФ №2468082).

Прекратившая на данный момент существование компания Biolex синтезировала препарат рекомбинантного ИФН-2b растительного происхождения Locteron® на основе ряски *Lemna minor*, хорошо подходящей для крупномасштабного производства моноклональных антител и интерферонов (De Leede et al., 2008, Paul et al., 2013). Locteron® с тех пор был лицензирован голландской компанией OctoPlus NV и завершил фазу IIb клинических испытаний, став одним из первых рекомбинантных терапевтических цитокинов, достигших коммерческого применения (http://www.octoplus.nl/files/4713/4676/5370/OctoPlus_announces_publication_of_positive_Locteron_interim_Phase_IIb_data.pdf).

Фактор некроза опухолей (TNF- α), который является членом семейства TNF, был синтезирован в картофеле. Авторы использовали два типа векторов экспрессии под контролем промотора 35S CaMV. Один из векторов был дополнен последовательностью, кодирующей N-концевой сигнальный пептид и C-концевой SEQDEL пептид, ответственный за транспорт в эндоплазматический ретикулум. Тем не менее, эта стратегия не привела к какому-либо значительному увеличению накопления цитокинов. В обоих случаях выход рекомбинантного белка был похож и составил около 15 мкг биологически активного TNF- α на 1 г растительной ткани (Ohya et al., 2002).

Биологически активный человеческий фактор роста фибробластов 8b (FGF), член группы PDGF, был синтезирован в растениях табака. кДНК *hFGF8b* клонировали под контролем двойного промотора CaMV 35S. В системе транзientной экспрессии после агроинфильтрации в вакууме содержание FGF составило 2,7% и 4,1% от общего растворимого белка (90 и 150 мкг/г сырого веса) соответственно (Potula et al., 2008). Также фактор роста фибробластов 21 (FGF21) был получен в семенах трансгенного риса (Feng et al, 2019).

Другой член того же семейства PDGF, инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF-1), был эффективно получен в транспластомных растениях (Daniell et al., 2009). Анализы в человеческих клетках HU-3 продемонстрировали биологическую активность этого рекомбинантного белка.

Таблица 3. Рекомбинантные цитокины, полученные в растениях (Бурлаковский и др., 2016, с изменениями).

Цитокин	Растение	Способ выращивания	Метод трансформации	Содержание	Источник
Эритропоэтин	<i>Nicotiana tabacum</i>	Суспензия	Агробактериальная трансформация	0.0026% общего растворимого белка	Matsumoto et al., 1995

Таблица 3. Рекомбинантные цитокины, полученные в растениях (продолжение)

Цитокин	Растение	Способ выращивания	Метод трансформации	Содержание	Источник
Эритропоэтин	<i>Physcomitrella patens</i>	Суспензия	Трансформация протопластов с помощью полиэтиленгликоля	0.05 мг/г	Weise et al., 2007
Эритропоэтин	<i>Physcomitrella patens</i>	Суспензия	Трансформация протопластов с помощью полиэтиленгликоля	0.123 мг/л	Weise et al., 2007
Эритропоэтин	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Транзientная экспрессия	Агроинфильтрация	52 мкг/г	Musiychuk et al., 2013
Эритропоэтин	<i>Nicotiana tabacum</i>	«бородатые корни»	Агробактериальная трансформация	185,48 мкг/г	Gurusamy et al., 2017
Человеческий гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ)	<i>Lactuca sativa</i>	Транспластное растение	Биобаллистика	нет данных	Sharifi Tabar et al., 2013
Г-КСФ	<i>Wolffia arrhiza</i>	Целые растения	Агробактериальная трансформация	До 0,194% общего растворимого белка	Khvatkov et al., 2018
Человеческий гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ)	<i>Nicotiana tabacum</i>	Суспензия	Агробактериальная трансформация	максимум 0.25 мг/л	James et al., 2000
ГМ-КСФ	<i>Nicotiana tabacum</i>	Суспензия	Агробактериальная трансформация	максимум 0.78 мг/л	Lee et al., 2002
ГМ-КСФ	<i>Oryza sativa</i>	Суспензия	Биобаллистика	0.129 г/л	Shin et al., 2003
ГМ-КСФ	<i>Nicotiana tabacum</i>	Суспензия	Агробактериальная трансформация	0.105 мг/л	Kwon et al., 2003

Таблица 3. Рекомбинантные цитокины, полученные в растениях (продолжение)

Цитокин	Растение	Способ выращивания	Метод трансформации	Содержание	Источник
ГМ-КСФ	<i>Saccharum officinarum</i>	Целые растения	Биобаллистика	0.02% общего растворимого белка	Wang et al., 2005
ГМ-КСФ	<i>Solanum lycopersicum</i>	Суспензия	Агробактериальная трансформация	45 мкг/л	Kwon et al., 2003
ГМ-КСФ	<i>Oryza sativa</i>	Суспензия	Биобаллистика	0.25 г/л	Kim T.-G. et al., 2008
ГМ-КСФ	<i>Oryza sativa</i>	Целые растения	Агробактериальная трансформация	1.3% общего растворимого белка	Sardana et al., 2007
ГМ-КСФ	<i>N. benthamiana</i>	Транзientная экспрессия	Вирусная трансформация	максимум 2% общего растворимого белка	Zhou F. et al., 2006
Мышиный ГМ-КСФ	<i>Oryza sativa</i>	Суспензия	Биобаллистика	24.6 мг/л	Zhao et al., 2007
Мышиный ГМ-КСФ	<i>Nicotiana tabacum</i>	Целые растения	Агробактериальная трансформация	19.9 мкг/г	Gora-Sochacka et al., 2010
Мышиный ГМ-КСФ	<i>Nicotiana tabacum</i>	Целые растения	Агроинфильтрация	0,2–4 нг / мг сырой массы	Mohammadzadeh et al., 2019
ИЛ-2	<i>Nicotiana tabacum</i>	Суспензия	Агробактериальная трансформация	80 мкг/л	Magnuson et al., 1998
ИЛ-2	<i>Solanum tuberosum</i>	Целые растения	Агробактериальная трансформация	1.15- 105 ед./г	Park, Cheong, 2002
ИЛ-2	<i>Nicotiana tabacum</i>	Целые растения	Агробактериальная трансформация	9,5 мкг/г	Redkiewicz et al., 2012
ИЛ-2	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Целые растения	Агробактериальная трансформация	нет данных	Matakas et al., 2013

Таблица 3. Рекомбинантные цитокины, полученные в растениях (продолжение)

Цитокин	Растение	Способ выращивания	Метод трансформации	Содержание	Источник
ИЛ-2	<i>Nicotiana tabacum</i>	Трансплантатное растение	Биобаллистика	0.005 % общего растворимого белка	Zhang et al., 2014
ИЛ-3	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Транзientная экспрессия	Агроинфильтрация	максимум 0.144 мг/г	Musiyuchuk et al., 2013
ИЛ-4	<i>Nicotiana tabacum</i>	Суспензия	Агробактериальная трансформация	0.45 мг/л	Magnuson et al., 1998
ИЛ-4	<i>Nicotiana tabacum</i>	Целые растения	Агробактериальная трансформация	0.1% общего растворимого белка	Ma et al., 2005
ИЛ-4	<i>Nicotiana tabacum</i>	Целые растения	Агробактериальная трансформация	0.086% общего растворимого белка	Patel et al., 2007
ИЛ-4	<i>Solanum tuberosum</i>	Целые растения	Агробактериальная трансформация	0.08% общего растворимого белка	Gora-Sochacka et al., 2010
ИЛ-7	<i>Oryza sativa</i>	Целые растения	Агробактериальная трансформация	5-10 мкг/г	Kudo et al., 2013
ИЛ-10	<i>Nicotiana tabacum</i>	Целые растения	Агробактериальная трансформация	0.27% общего растворимого белка	Patel et al., 2007
ИЛ-10	<i>Nicotiana tabacum</i>	Целые растения	Агробактериальная трансформация	максимум 0.043 мг/г	Menassa et al., 2004
ИЛ-10	<i>Nicotiana tabacum</i>	Целые растения	Агробактериальная трансформация	максимум 37 мкг/г	Bortesi et al., 2009
ИЛ-10	<i>Oryza sativa</i>	Целые растения	Агробактериальная трансформация	50 мкг/г	Fujiwara et al., 2010

Таблица 3. Рекомбинантные цитокины, полученные в растениях (продолжение)

Цитокин	Растение	Способ выращивания	Метод трансформации	Содержание	Источник
ИЛ-10	Табак, Арабидопсис	Зрелые растения	Агробактериальная трансформация	0.7% общего растворимого белка	Morandini et al., 2011
ИЛ-10	<i>Nicotiana tabacum</i>	Суспензия	Агробактериальная трансформация	9,3 мкг/г	Bortesi et al., 2012
ИЛ-10	<i>Nicotiana tabacum</i>	Суспензия	Агробактериальная трансформация	3.175% общего растворимого белка	Kaldis et al., 2013
ИЛ-12	<i>Nicotiana tabacum</i>	Суспензия	Агробактериальная трансформация	0.175 мг/л	Kwon et al., 2003
ИЛ-12	<i>Nicotiana tabacum</i>	Целые растения	Агробактериальная трансформация	4×10^{-5} мг/г	Gutierrez-Ortega et al., 2004
ИЛ-12	<i>Solanum lycopersicum</i>	Целые растения	Агробактериальная трансформация	7.3 мкг/г	Gutierrez-Ortega et al., 2005
ИЛ-13	<i>Nicotiana tabacum</i>	Целые растения	Агробактериальная трансформация	0.15% общего растворимого белка	Wang et al., 2008
ИЛ-18	<i>Nicotiana tabacum</i>	Целые растения	Агробактериальная трансформация	максимум 3.51×10^{-4} мг/г	Zhang et al., 2003
ИЛ-18	<i>Nicotiana tabacum</i>	Целые растения	Агробактериальная трансформация	1,3 мкг/г	Патент РФ №2302460
ИЛ-37	<i>Nicotiana tabacum</i>	Целые растения	Агробактериальная трансформация	1% общего растворимого белка	Alqazlan et al., 2019
ИФН-α	<i>Solanum lycopersicum</i>	Суспензия	Lipofectin-mediated transformation	максимум 3.0×10^{-3} ед./г	Sawahel, 2002

Таблица 3. Рекомбинантные цитокины, полученные в растениях (продолжение)

Цитокин	Растение	Способ выращивания	Метод трансформации	Содержание	Источник
ИФН- α 2	<i>Aloe vera</i>	Целые растения	Биобаллистика	максимум 953 ед./г	Lowther et al., 2012
ИФН- α 2b	<i>Daucus carota</i>	Целые растения	Агробактериальная трансформация	максимум 26.8×10^{-3} ед./г	Luchakivskaya et al., 2011
ИФН- α 2b FN- α 8	<i>Solanum tuberosum</i>	Целые растения	Агробактериальная трансформация	560 ед./г	Ohya et al., 2001
ИФН- α 2b	<i>Nicotiana tabacum</i>	Транспластомное растение	Биобаллистика	20% общего растворимого белка	Arlen et al., 2007
Куриный ИФН- α	<i>Lactuca sativa</i>	Транзиентная экспрессия	Агроинфильтрация	0.393 мг/г	Song et al., 2008
<i>Salmo salar</i> ИФН- α 1	<i>Solanum tuberosum</i>	Целые растения	Агробактериальная трансформация	максимум 5400 ед./г	Fukuzawa et al., 2010
<i>Salmo salar</i> ИФН- α 1	<i>Oryza sativa</i>	Целые растения	Агробактериальная трансформация	максимум 820 ед./г	Fukuzawa et al., 2010
ИФН- β	<i>Lactuca sativa</i>	Транзиентная экспрессия	Агроинфильтрация	3.1×10^{-4} ед./мл	Li et al., 2007
ИФН- γ	<i>Oryza sativa</i>	Суспензия	Агробактериальная трансформация	6.99×10^{-4} мг/г клеток	Chen et al., 2004
<i>Bos taurus</i> ИФН- γ	<i>Nicotiana tabacum</i>	Целые растения	Агробактериальная трансформация	1-1,5 мкг/г	Савельева и др., 2009
Человеческий ИФН- γ	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Целые растения	<i>Bamboo mosaic virus</i>	119 ± 0.8 мкг/г	Jiang et al., 2019
Фактор роста фибробластов (FGF8b)	<i>Nicotiana tabacum</i>	Целые растения	Агробактериальная трансформация	4.1% общего растворимого белка	Potula et al., 2008

Таблица 3. Рекомбинантные цитокины, полученные в растениях (продолжение)

Цитокин	Растение	Способ выращивания	Метод трансформации	Содержание	Источник
ИФР-1	<i>Oryza sativa</i>	Зрелые растения	Биобаллистика	6.8% общего белка семян	Xie et al., 2008
ИФР-1	<i>Nicotiana tabacum</i>	Транспластомное растение	Биобаллистика	максимум 32% общего растворимого белка	Daniell et al., 2009
ИФР-1	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Транзиентная экспрессия	Агроинфильтрация	максимум 0.25 мг/г	Musiychuk et al., 2013
Человеческий фактор ингибирования лейкемии (hLIF)	<i>Oryza sativa</i>	Целые растения	Биобаллистика	нет данных	Youngblood et al., 2014
Фактор некроза опухолей TNF- α	<i>Solanum tuberosum</i>	Целые растения	Агробактериальная трансформация	15 мкг/г	Ohya et al., 2002
кардиотрофин-1	<i>Nicotiana tabacum</i>	Транспластомное растение	Биобаллистика	максимум 1.14 мг/г	Farran et al., 2008
Фактор роста стволовых клеток (SCF)	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Транзиентная экспрессия	Агроинфильтрация	максимум 0.2 мг/г	Musiychuk et al., 2013

1.7. Методы повышения производительности экспрессии чужеродных соединений в растениях

Долгое время ключевым недостатком растительных систем экспрессии считался крайне низкий уровень синтеза рекомбинантного белка, составлявший в лучших случаях 20-100 мкг/г сырой массы. Однако последние достижения в области генной инженерии позволили поднять этот показатель до 2 мг/г. Предполагая, что 1 л объема клеточной культуры приблизительно эквивалентен 1 кг растительной биомассы, можно сказать, что продуктивность растительных

систем в настоящее время находится на том же уровне, что и клетки яичника китайского хомячка (до 5 г/л) (Buyel, 2018).

Выбор промотора — важный этап создания трансгенной конструкции для синтеза рекомбинантного белка. Наиболее часто используются конститутивные промоторы: 35S промотор, полученный из вируса мозаики цветной капусты, промотор убиквитина, выделенный из кукурузы, и промоторы генов октопин- и нопалинсинтазы *Agrobacterium tumefaciens* (Grunenvaldt et al., 2015). Основным преимуществом конститутивных промоторов является постоянная экспрессия гена во всех частях растения. Однако, конститутивные промоторы отличаются низким уровнем экспрессии и часто подвергаются сайленсингу, в том числе по причине метилирования в процессе роста трансгенных растений (Lee et al., 2012). Поэтому с развитием биотехнологий большее распространение получили методики, основанные на применении индуцибельных промоторов, которые активируются только при особых условиях, и тканеспецифичных промоторов, работающих в определенных органах растений. В отношении индуцибельных промоторов не обнаружено явление сайленсинга, однако они к настоящему времени не столь хорошо охарактеризованы, как конститутивные, что ограничивает их применение. Среди известных растительных индуцибельных промоторов стоит отметить зависимые от стероидов (эстрадиола) (Okuzaki et al., 2011); и этанола (Garoosi et al., 2005). Промотор α Amy3/RAmy3D, активирующийся в отсутствие сахара, часто используется в суспензионных клеточных культурах (Shin et al., 2003). Распространение получает промотор гена малого белка теплового шока БТШ18.2 (sHSP18.2) (Lee et al., 2007, Kuo et al., 2013). Развитие технологий моделирования сделало возможным создание синтетических промоторов с заранее заданными свойствами. Возможно даже создание двунаправленных промоторов, регулирующих экспрессию двух генов (Bai et al., 2020).

Применение промоторов со специфическим паттерном экспрессии также может приводить к увеличению содержания гетерологичного белка.

Значительный интерес представляют методы, использующие накопление продукта в семенах трансгенных растений (Sardana et al., 2007, Ning et al., 2008, Fujiwara et al., 2010). Так, сочетание сильного эндосперм-специфичного промотора Gt13a и оптимизации кодонов под экспрессию в клетках риса привели к накоплению HGM-CSF на уровне 14 мкг/кг семян. Также к последовательности белка был добавлен сигнальный пептид, обеспечивающий транспорт рекомбинантного белка в эндоплазматический ретикулум и в белковые тельца в клетках эндосперма, для защиты от деградации под действием протеаз (Ning et al., 2008). Сходные результаты были достигнуты в отношении IGF-1, модифицированного путем слияния с С-концом белка BipC, ассоциированного с просветом эндоплазматического ретикулума риса. Содержание IGF в семенах составило более 6% от растворимого белка (Xie et al., 2008). Таким образом, добавление сигнала внутриклеточного транспорта может значительно увеличить уровень накопления целевого белка, при условии, что это не влияет на его функциональность.

Для увеличения выхода рекомбинантного белка из трансгенных растений-продуцентов применяется в том числе и стратегия оптимизации кодонов в гетерологичном гене, чтобы они соответствовали наиболее распространенным кодам хозяина. Предпочтительные кодоны значительно варьируются в различных растениях, поэтому, когда чужеродный ген содержит редкие кодоны растения-хозяина, кодон становится ограничивающим фактором в трансляции белка. Например, после оптимизации кодонов трансгена было достигнуто эффективное накопление инсулиноподобного фактора роста I (IGF-1) в трансгенных хлоропластах табака. Нативный ген *IGF* (*IGF-n*) с содержанием АТ-пар 41% и синтетический ген *IGF-s* с оптимальным для хлоропластов содержанием АТ-пар 60%, клонировали в вектор, содержащий промотор psbA (гена, кодирующего субъединицу реакционного центра фотосистемы II), 5'-UTR (повышает эффективность трансляции при освещении) и 3'-UTR (повышает стабильность транскрипта). Накопление продукта *IGF-n* в трансгенных растениях

составило 9,5% растворимого белка. В *IGF-s* растениях биосинтез целевого белка составил до 11,3%, однако при непрерывном освещении содержание IGF увеличивалось до 32% растворимого белка (Bortesi et al., 2009, Daniell et al., 2009).

Одним из перспективных методов увеличения производительности растительных систем экспрессии является дополнительная генная модификация растения-хозяина, включающая снижение синтеза протеаз либо ограничение влияния сайленсинга на гетерологичный ген. Первая стратегия включает в себя нокаутирование генов, отвечающих за производство эндогенных протеаз. Результатом ограничения синтеза цистеинпротеаз явилось увеличение продукции человеческого ГМ-КСФ (hGM-CSF) в клетках риса почти вдвое, с 150,4 до 289,1 мг/л суспензии (Kim, T. G. et al., 2008). Нокаут эндогенной α -амилазы методом РНК-интерференции позволил увеличить производство чГМ-КСФ с использованием α Amy3 / RAmy3D промотора также почти в два раза, со 150 до 280 мг/л (Kim, N.-S. et al., 2008). Вторая стратегия предусматривает отключение механизма сайленсинга, который несет ответственность за снижение уровня экспрессии рекомбинантного белка. Для этого растения *Nicotiana benthamiana* заражали вирусом TBSV (tomato bushy stunt virus, вирус кустистой карликовости томата), который «отвлекал на себя» систему сайленсинга. Выход мышинового иммуноглобулина класса G возрастал в 14 раз, от 10,8 мг/г свежей листовой массы для незараженной трансгенной линии, до 147,7 мг/г сырого веса листьев для растений трансгенной линии, содержащих вирус (Voinnet et al., 2003; Boivin et al., 2010). Подобный эффект связан с рядом вирусных белков, являющихся специфичными ингибиторами сайленсинга, например P19 (Kontra et al., 2016). Коэкспрессия его совместно с целевым белком также повышает выход (Jiang et al., 2019). Третья стратегия затрагивает манипуляции с механизмами гликозилирования гетерологичных белков. Начальные неудачи в получении функциональных гетерологичных белков в трансгенных растениях, в частности эритропоэтина (Matsumoto et al., 1995), подтвердили гипотезу о том, что различия в параметрах гликозилирования растений и млекопитающих имеют важное

значение для стабильности белка и для его правильного биологического функционирования (Paulus et al., 2011).

Присоединение углеводов к полипептидной цепи происходит в эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи. Хотя многие этапы N-гликозилирования являются общими для всех эукариот, окончательная структура сложных N-гликанов у растений и млекопитающих может отличаться (Castilho et al., 2013). Так, полисахаридные цепочки человеческих гликопротеинов в большинстве случаев завершаются остатком сиаловой кислоты, однако в растениях механизм сиалилирования отсутствует. Растения также синтезируют гликаны, включающие остатки нехарактерных для человека сахаров, в том числе ксилозы, рамнозы и арабинозы (Brooks, 2004). Полисахаридные цепочки гликанов растений несут в боковых ветвях остатки β 1,2-ксилозы и α 1,3-фукозы, тогда как в гликанах млекопитающих ксилоза не представлена вовсе, а фукоза присутствует в α 1,6-форме. Наконец, в растениях отсутствует механизм O-гликозилирования муцинового типа, характерный для многих секретируемых гликопротеинов млекопитающих (Castilho et al., 2012). Отличия профиля гликозилирования рекомбинантных белков от человеческого стандарта могут приводить к утрате их функциональности и снижению времени полужизни в крови, а также вызывать иммунный ответ у организма-реципиента (Brooks, 2004, Kuo et al., 2013).

Для решения этой проблемы были созданы трансгенные растения с «гуманизированной» системой гликозилирования. Есть несколько стратегий модификации системы пост-трансляционной обработки и увеличения сходства между рекомбинантным белком, полученным в растениях, и его нативной формой. Одним из перспективных подходов является модификация рекомбинантного белка путем добавления к С-концу KDEL-последовательности, отвечающей за локализацию белка в эндоплазматическом ретикулуме. Это предотвращает попадание белка в аппарат Гольджи, где локализованы специфические растительные фукозилтрансферазы и ксилозилтрансферазы, и обеспечивает лучшее соответствие профиля гликозилирования рекомбинантного

белка человеческому стандарту. Недостатком такой методики является невозможность направить белок в какой-либо иной клеточный компартмент либо в окружающую среду, что делает обязательной стадию разрушения клеток в процессе выделения продукта (Kuo et al., 2013). Таким методом в растениях риса был получен рекомбинантный ИЛ-10 (Fujiwara et al., 2010). Еще одним подходом представляется использование в качестве продуцента мутантных растений мха *Physcomitrella patens*. Отличительным признаком *P. patens* является высокая частота гомологичной рекомбинации, что позволяет с высокой точностью нокаутировать гены α 1,3-фукозилтрансферазы и β 1,2-ксилозилтрансферазы (Koprivova et al., 2004). С использованием Δ -*fuc-t* Δ -*xyl-t* мутантной линии *P. patens* был получен рекомбинантный эритропоэтин (Weise et al., 2007). В другом исследовании, гены α -1,3-фукозилтрансферазы и β -1,2-ксилозилтрансферазы риса были нокаутированы методом РНК-интерференции в клетках риса, использованных для получения рекомбинантного ГМ-КСФ. Клетки в суспензионной культуре при этом не продемонстрировали снижения жизнеспособности (Shin et al., 2011). Также для подавления активности фукозил- и ксилозилтрансфераз использовался метод CRISPR / Cas9. Полученные растения *Nicotiana bentamiana* несли мутации в 6 генах, что было подтверждено секвенированием (Jansing et al., 2019).

Большой интерес представляет стратегия полноценной реконструкции в растительных клетках механизмов гликозилирования млекопитающих (Jez et al., 2013). Так, для производства рекомбинантного ЭПО был использован трансгенный табак, лишенный растительных гликозилтрансфераз и экспрессирующий гены, кодирующие ферменты млекопитающих: β 1,4-маннозил- β 4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазу (*GnTIII*), α 1,3-маннозил- β 1,4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазу (*GnTIV*) и α 1,6-маннозил- β 1,6-N-ацетилглюкозаминилтрансферазу (*GnTV*), что привело к присоединению к гликопротеину N-гликанов человеческого типа (Castilho et al., 2011). Наряду с N-гликозилированием, присутствие в составе гликановых цепочек остатков

сиаловой кислоты также влияет на стабильность и биологическую активность рекомбинантного ЭПО. Из мутантных *Δ-fuc-t Δ-xyl-t* табачных растений, несущих гены для ветвления полисахаридных цепей, β 1,4-галактозилирования, синтеза и транспорта сиаловой кислоты, были получены различные гликоформы биологически активного би- и мультисиалилированного ЭПО (Jez et al., 2013).

1.8. Заключение

Трансгенные растения представляют собой перспективную платформу для синтеза рекомбинантных белков медицинского назначения. Низкий уровень наработки гетерологичных белков долгое время препятствовал коммерциализации растительных систем производства биофармацевтической продукции, но достижения последнего десятилетия позволили значительно повысить их продуктивность. Использование транспластомной или транзиентной экспрессии, эффективных промоторов, оптимизации кодонов, выращивание клеток в суспензионной культуре приводят к существенному увеличению выхода рекомбинантного белка. Повышению эффективности синтеза способствует направление рекомбинантного белка в эндоплазматический ретикулум либо вакуоль благодаря присоединению к его последовательности сигнала внутриклеточного транспорта, что также позволяет избежать протеолиза и гликозилирования по растительному пути. Для увеличения выхода целевого белка применяется и снижение активности внутриклеточных ферментов путем нокаутирования соответствующих генов либо коэкспрессии ингибиторов протеиназ. Модификации трансгенных растений-продуцентов в области систем пост-трансляционной обработки белка позволяют производить сложные гликопротеины животных и человека, максимально близкие по биологической активности к нативным и не вызывающие аллергических реакций. В настоящее время наибольшие успехи в создании растений с гуманизированной системой экспрессии достигнуты в отношении растений — модельных объектов, таких как

арабидопсис, табак и *Physcomitrella patens*, и предприняты лишь первые шаги к модификации систем гликозилирования зерновых и бобовых культур, являющихся наиболее эффективными продуцентами.

Значительный прогресс в получении трансгенных организмов связан с разработкой новых методов редактирования ДНК. Одним из ключевых недостатков классических технологий трансформации является встраивание чужеродного фрагмента в случайный участок генома. Для разрешения данной проблемы необходима технология целенаправленного внесения разрывов в геномную ДНК с достаточной точностью. Редактировать конкретные участки генома позволяют ДНК-связывающие белковые домены, такие как «цинковые пальцы» или TAL-активаторы транскрипции, сшитые с ферментами рестрикции (ZFNs-zinc finger nucleases, нуклеазы с доменом «цинковые пальцы»); TALEN-нуклеазы (transcription activator-like effector nuclease — нуклеазы, сходные с транскрипционными факторами) (Joung, Sander, 2013). Недостатком данных методов является необходимость создавать новые полипептиды для каждой мишени, что затрудняет практическое применение. В настоящее время гораздо более интенсивно развивается технология CRISPR/Cas9, также основанная на использовании нуклеазы. Ее ключевым отличием является то, что используется один универсальный белок Cas9, находящий цель посредством взаимодействия с направляющей РНК (sgRNA), комплементарной последовательности-мишени. CRISPR/Cas9 используют для нокаутирования генов (когда внесенный разрыв застраивается случайными нуклеотидными последовательностями, что приводит к сдвигу рамки считывания) и для их редактирования (когда разрыв застраивается по механизму гомологичной рекомбинации с использованием привнесенной последовательности в качестве матрицы) (Chen et al., 2019; Korotkova et al., 2019).

Недавний прогресс в понимании природы многих заболеваний иммунной системы способствовал значительному увеличению спроса на цитокины по всему миру для лечения широкого круга социально значимых онкологических, инфекционных, иммунодефицитных и других заболеваний (Paul et al., 2013).

Выведение на рынок первого рекомбинантного цитокина растительного происхождения Locteron® (De Leede et al, 2008) прокладывает путь для дальнейшего развития этого направления фармакологии. К настоящему времени существуют примеры синтеза в трансгенных растениях представителей практически всех семейств цитокинов с сохранением их биологической активности. Новые технологии геномного редактирования и стратегии повышения уровня экспрессии рекомбинантных белков в растениях открывают возможности для дешевого крупномасштабного производства цитокинов с улучшенным качеством продукции и пост-трансляционными модификациями по типу млекопитающих.

ГЛАВА 2. Материалы и методы исследования

2.1. Растительный материал

Табак курительный (*Nicotiana tabacum* L., $2n = 48$), двудольное, однолетнее растение семейства пасленовых (*Solanaceae*). Данный вид является аллотетраплоидом с геномом SSTT и происходит от двух южноамериканских диплоидных видов ($2n=24$). В настоящее время является близким к ныне существующим видам *N. silvestris* (SS) и *N. tomentosiformis* (TT).

Табак используют как модельный объект биотехнологии растений, поскольку для этого растения хорошо разработаны система трансформации и регенерации, подобраны питательные среды и условия культивирования. В культуре *in vitro* табак легко размножается микрочеренкованием (Дрейпер и др., 1991).

Преимущества табака как модельного объекта генной инженерии растений:

- Пластичность *in vitro*.
- Высокая эффективность агробактериальной трансформации, легкость регенерации из каллусов.
- Короткий вегетационный период и в то же время возможность многолетнего выращивания и вегетативного размножения.
- Самоопыление.
- Высокий репродуктивный потенциал – с одного растения можно получить до 10000 семян.
- Большая биомасса растения, что дает достаточно материала для выделения белков и нуклеиновых кислот.

Недостаток табака – высокое содержание токсичных веществ, прежде всего – алкалоидов, что заставляет прибегать к процедуре очистки искомого соединения.

Родословная трансгенных растений табака.

Непосредственно в результате агробактериальной трансформации в лаборатории генной и клеточной инженерии растений кафедры генетики и селекции СПбГУ получили растения InterB и Inter311, несущие ген *sIFNG* под контролем 35S промотора (Савельева и др., 2009). С каждого из них в результате самоопыления были получены семена и выращены растения первого поколения T_1 , соответственно InterB-(1-25) и Inter311-(1-25), из которых по результатам анализа были отобраны растения B.5, B.6, B.13, 311.1, 311.2 и 311.15. Каждое из них, в свою очередь, стало родоначальником 25 растений следующего поколения T_2 (B.5-(1-25); 311.2-(1-25) и т. д.). Поколение T_3 было представлено потомками растений B.6.13, B.13.6, 311.2.6 и 311.2.7, поколение T_4 – растениями B.6.13.8-(1-24), 311.2.7.2-(1-24) и 311.2.7.3-(1-24).

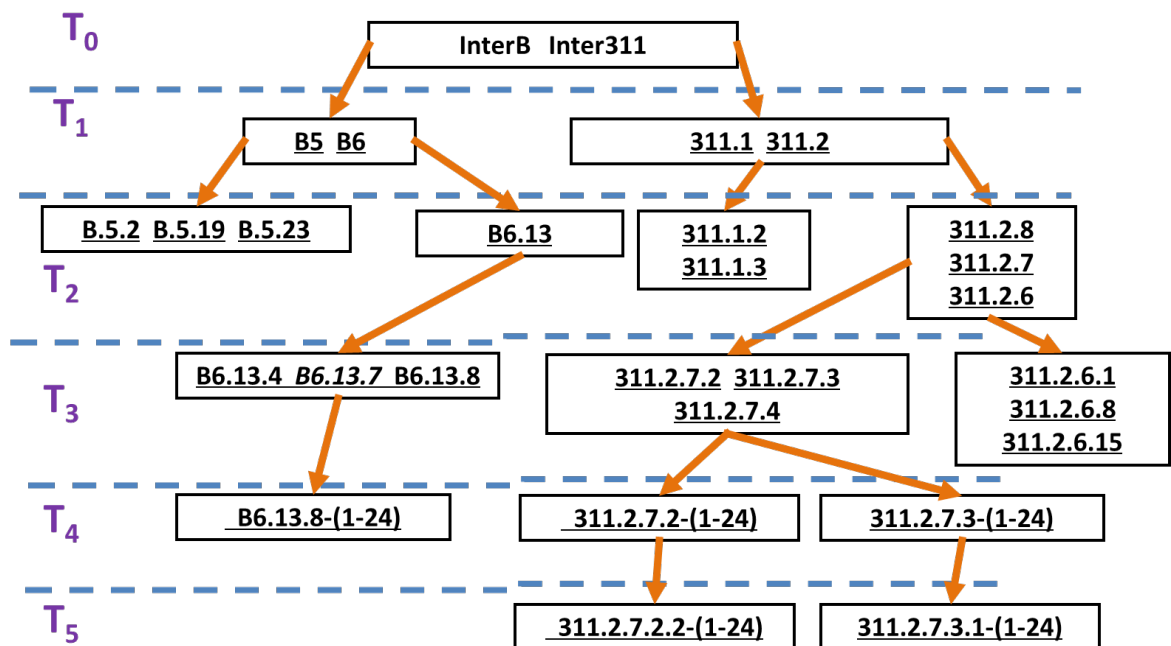


Рисунок 1. Родословная трансгенных растений табака.

Условия культивирования трансгенных растений табака.

Семена табака стерилизовали 3-5 минут в смеси 30% перекиси водорода и 96% спирта 1:1, подсушивали на стерильной фильтровальной бумаге и выкладывали на среду MS0 (Дрейпер и др., 1991) в чашки Петри. Подросшие

растения переносили и в дальнейшем поддерживали микрочеренкованием в 100-мл стаканчиках на среде MS0, при шестнадцатичасовом световом дне. Для получения значительной биомассы и семян растения пересаживали в грунт в оранжерею.

Морковь посевная (*Daucus carota* L. subsp. *sativus*, $2n = 18$) была одним из первых растений, вошедших в генноинженерную практику. Это произошло благодаря ее хорошей приспособленности к существованию *in vitro*, быстрому клеточному делению и росту тканей. Морковь отличает простота работы с корневыми дисками, восприимчивость камбиальных клеток корня к трансформации и высокая скорость формирования каллусов. Легкость агробактериальной трансформации, с применением как *A. rhizogenes*, так и *A. tumefaciens*, сделали морковь удобным модельным объектом для исследований механизма переноса Т-ДНК, а также функций *rolB* генов (Baranski et al., 2019).

Морковь - это сельскохозяйственная овощная культура, употребляемая в пищу, а также идущая в корм животным. Таким образом, созданные на ее основе растения-продуценты возможно использовать в качестве съедобных иммуномодуляторов.

В работе использовали выращенные в грунте корнеплоды сорта Нантская-4, которые подвергали поверхностной стерилизации (см. далее) и разрезали на диски для инокуляции *A. rhizogenes*.

Батат или сладкий картофель (*Ipomoea batatas* L., $2n = 6x = 90$) является седьмой по важности пищевой культурой в мире. Молекулярно-генетические исследования батата долгое время были затруднены в связи с гексаплоидностью, большим количеством хромосом и сложностью выделения нуклеиновых кислот из его тканей (Mollinari M. et al., 2020; Noh et al., 2010). Батат стал первым культурным растением, в геноме которого обнаружили естественную вставку ДНК агробактерий (Kyndt et al., 2015).

Растения, использованные в работе, не вводили в стерильную культуру. Клубни проращивали в воде, образовавшиеся побеги черенковали и пересаживали

в грунт при искусственном освещении. Для выделения ДНК использовались молодые прозрачные корни.

Кукуруза сахарная (*Zea mays* L., $2n = 20$) – представитель однодольных и одна из важнейших зерновых культур.

Семена кукурузы проращивали в воде, в открытой чашке Петри, в нестерильных условиях. Для выделения ДНК использовались недельные побеги.

2.2. Штаммы микроорганизмов

В работе использовались штаммы *E. coli*, указанные в таблице 4. Клетки выращивали на среде LB (табл. 5) (Дрейпер, 1991) при температуре 37°C с добавлением необходимого антибиотика.

Таблица 4. Использованные штаммы *Escherichia coli*.

штамм	генотип	Примечания
DH5α	F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoRnupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK- mK+), λ-	Не имеет устойчивости к ccdB и стрептомицину
DB3.1	F- gyrA462 endA1 glnV44 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(rB-, mB-) ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(SmR) xyl5 Δleu mtl1	Устойчив к ccdB и стрептомицину
TOP 10	mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), Φ80dlacZΔM15, ΔlacX74, deoR, recA1, araD139, Δ(ara-leu)7697, galU, galK, rpsL(SmR), endA1, nupG	Устойчив к стрептомицину и неустойчив к ccdB
DH10β	F ⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 endA1 recA1 deoR Δ(ara,leu)7697 araD139 galU galK nupG rpsL λ ⁻	Не имеет устойчивости к ccdB и стрептомицину

Таблица 5. Состав среды LB.

Состав среды LB	Концентрация (г/л)
Триптон	10
Дрожжевой экстракт	5
NaCl	10

Приготовление компетентных клеток бактерий *E.coli*:

Клетки *E.coli* рассевали на чашку с твёрдой средой LB и выращивали в течение ночи при 37°C. Одиночную колонию высевали в 5 мл жидкой среды LB и инкубировали при 37°C на шейкере (200 об/мин) в течение ночи. Утром к 2 мл ночной культуры добавляли 30 мл жидкой среды LB и инкубировали несколько часов до достижения оптической плотности OD600=0,5-1,0. Затем культуру охлаждали на льду в течение 10 минут, осаждали клетки центрифугированием (15 мин, 4000 об/мин, 4°C) и ресуспендировали в 10 мл холодного раствора 0,1 М CaCl₂. Клетки инкубировали на льду в течение 10-15 минут, повторно осаждали центрифугированием в тех же условиях и ресуспендировали в 5 мл холодного раствора 0,1М CaCl₂ с добавлением 15% (вес/объем) глицерола. Полученную суспензию разделяли на аликвоты объемом 100-200 мкл, которые замораживали в жидком азоте и в дальнейшем хранили при -80°C.

Трансформацию *E. coli* проводили методом теплового шока. Компетентные клетки (50 мкл) размораживали на льду, добавляли 0,2 - 5 мкг плазмидной ДНК и выдерживали в течение 10 мин на льду с периодическим встряхиванием. Затем помещали в термостат на 42°C на 1,5 мин и снова на лед на 5 мин. После этого добавляли 500 мкл жидкой среды LB и оставляли на 1 ч при постоянном перемешивании при 37°C. По истечении часа образец центрифугировали 2 мин при 4000 об., ресуспендировали осадок в 100 мкл жидкой среды LB и наносили на твёрдую среду LB с добавленными антибиотиками (в зависимости от плазмиды — канамицин 100 мг/л либо спектиномицин 100 мг/л). Чашку помещали на ночь в термостат на 37°C. К утру на среде появлялись колонии.

В работе использовали *Agrobacterium rhizogenes* штамма MSU440. Бактерии культивировали на средах YEP (табл. 6) и LB.

Таблица 6. Состав среды YEP.

Состав среды LB	Концентрация (г/л)
Триптон	10
Дрожжевой экстракт	10
NaCl	5

Культивирование агробактерий осуществлялось в чашках Петри на твердой среде, содержащей агар (20 г/л), в темноте при температуре 28⁰С. Ночную культуру выращивали в жидкой среде на шейкере в течение 12-16 часов при температуре 28⁰С.

Приготовление компетентных клеток бактерий *A. rhizogenes* проводили по следующему протоколу:

Клетки *A. rhizogenes* рассеивали на чашку с агаризованной средой YEP и выращивали в течение двух дней в термостате. Затем одиночную колонию высевали в 5 мл жидкой среды YEP и инкубировали при 30⁰С на шейкере (200 об/мин) в течение примерно 36 часов. 2 мл ночной культуры вносили в 30 мл жидкой среды YEP и инкубировали несколько часов до оптической плотности OD₆₀₀=0,5-1,0. Затем культуру охлаждали на льду в течение 10 минут, осаждали центрифугированием (15 мин, 4000 об/мин, 4⁰С) и ресуспендировали в 10 мл холодного раствора 0,1 М CaCl₂. Клетки повторно инкубировали на льду в течение 10-15 минут, осаждали центрифугированием в тех же условиях и ресуспендировали в 5 мл холодного раствора 0,1 М CaCl₂ с добавлением 15% (вес/объем) глицерола. Полученную суспензию разделяли на аликвоты объемом 100-200 мкл, замораживали в жидком азоте и хранили при -80⁰С.

Для трансформации *Agrobacterium rhizogenes* использовался метод холодного шока. Компетентные клетки (200 мкл) размораживали на льду в течение 10 мин, затем добавляли 1 мкг плазмидной ДНК и выдерживали на льду

еще 30 мин, время от времени встряхивая. Далее смесь помещали в жидкий азот на 1 мин, затем в термостат на 37⁰С на 5 мин. Затем добавляли 500 мкл среды YEP и инкубировали при 30⁰С 1-3 ч при постоянном помешивании. После этого смесь центрифугировали на 5000 оборотах 3 мин. Осадок ресуспендировали в 100мкл среды и наносили на твёрдую среду YEP с добавлением антибиотиков (спектиномицин и стрептомицин по 50 мг/л). Бактерий инкубировали при 30 °С в течение 2 дней.

2.3. Трансформация моркови *Agrobacterium (Rhizobium) rhizogenes*.

Для стерилизации корнеплоды моркови сорта Нантская-4 очищали от внешних загрязнителей и помещали в 25% раствор хлорсодержащего средства Domestos на 15 мин при постоянном помешивании. Затем корнеплоды промывали стерильной водой 6-7 раз, промывали 1 раз 96% спиртом, обжигали в пламени спиртовки и помещали на чашку Петри. Корнеплоды нарезали стерильным скальпелем на диски толщиной 1-3 мм и выкладывали на чашку Петри со средой MS^{1/2} без гормонов и антибиотиков. Выкладывали диски аксиальной стороной (стороной, обращенной к кончику корня) вверх. Многие штаммы агробактерий способны трансформировать только апикальный срез, лишь некоторые срабатывают на базальной стороне, что связано с полярным транспортом ауксинов.

Жидкую культуру *A. rhizogenes* наращивали при 28⁰С два-три дня. На диски наносили 10-20 мкл суспензии в среде LB, OD $\geq$ 0,6. Суспензию агробактерий можно наносить на всю площадь среза либо только на камбиальное кольцо, избегая стекания суспензии на среду. На каждой чашке оставляли контрольный (неинокулированный) диск. Инкубировали диски в темноте при 22-26⁰С. Через 2-3 недели в районе камбиального кольца начинали образовываться корни (Baranski et al., 2019; Danesh et al., 2006; Ranganath Reddy Rachamall, 2016).

Корни длиной 5-7 см отрезали и переносили на твердую среду MS^{1/2} с цефотаксимом 100 мг/л для элиминации агробактерий. Маркером на стекле отмечали положение концов корней, чтобы следить за их ростом. Различали два типа корней: длинные прямые (не демонстрировали автономного роста) и тонкие ветвящиеся (проявляли способность к неограниченному росту). Культуру «бородатых корней» поддерживали на чашках Петри с агаризованной средой MS^{1/2}, с добавлением селективных агентов Km (50 мг/л) или basta (10 мг/л) в зависимости от находящихся в Т-ДНК маркерных генов устойчивости.

2.4. GUS-окрашивание

Детекцию активности репортерного гена *GUS* осуществляли с помощью субстрата X-Gluc (Thermo Scientific, США). Растительные ткани инкубировали в буфере для GUS-окрашивания (100 mM Tris-Cl (pH 9.5); 100 mM NaCl; 0,5 mM K₃Fe(CN)₆; 0,5 mM K₄Fe(CN)₆; 0,5 mM X-Gluc, предварительно растворённый в диметилсульфоксиде) при 37⁰C в течение 1,5-12 часов. Далее корни фиксировали, погружая в 70% этанол.

2.5. Методы работы с нуклеиновыми кислотами

2.5.1. Выделение ДНК

Выделение плазмидной ДНК из бактериальных культур осуществляли с помощью набора Plasmid Miniprep (Евроген) в соответствии с инструкциями производителя.

ДНК из растений выделяли при помощи набора DNEasy Plant Mini Kit фирмы Qiagen. Для выделения ДНК из большого количества образцов применяли СТАВ-метод. Для этого 1-2 молодых листа с верхушки побега гомогенизировали, используя жидкий азот. Лизирование материала проводили, добавляя в каждую пробу 500 мкл двукратного СТАВ-буфера (0,1 М трис-HCl,

pH=8; 1,4 М NaCl; 20 мМ ЭДТА; 2% СТАВ по массе) и 10 мкл 20 мМ меркаптоэтанола, и инкубируя в течение 1 часа при 56⁰С. Разделение фракций выполняли, добавляя к пробе равный объем смеси фенол : хлороформ 1:1, перемешивая в течение часа и затем центрифугируя при 10000 об./мин в течение 15 минут. Верхнюю фракцию, содержащую раствор ДНК, переносили в чистый эппендорф и проводили осаждение ДНК, добавляя равный объем изопропилового спирта и инкубируя пробы 30 минут при комнатной температуре. После этого пробы центрифугировали 15 минут при 10000 об./мин и удаляли супернатант. В осадок добавляли 100 мкл 0,2 М 70% спиртового раствора ацетата натрия и осаждали в течение 12-16 часов при -4⁰С, затем вновь центрифугировали 15 минут при 10000 об./мин и удаляли супернатант. Осадок промывали 70% спиртом и растворяли в воде или ТЕ-буфере (Rogers and Bendich, 1985; Furtado, 2014). Концентрацию ДНК в полученных образцах измеряли с помощью спектрофотометра при длине волн 260/280 нм. Раствор ДНК хранили в холодильнике при температуре -20⁰С.

2.5.2. Выделение РНК

Выделение тотальной растительной мРНК осуществляли с помощью реагента Purezol (Bio-Rad, США) в соответствии с инструкциями производителя.

Полученные пробы подвергали ДНКазной обработке с использованием RapidOut DNA Removal Kit (Thermo Scientific, США). Концентрацию мРНК в пробах измеряли с помощью спектрофотометра при длине волны 260/280 нм. Раствор РНК хранили при температуре -80⁰С.

2.5.3. Обратная транскрипция

Для синтеза кДНК брали не менее 3 мкг РНК, добавляли праймер олиго-dT и инкубировали 5 минут при 70°C для его связывания с РНК. После этого в пробу добавляли фермент – ревертазу RevertAid (Thermo Scientific, США), 10x буфер и нуклеотиды (dNTP) из набора в соответствии с инструкциями производителя. Смесь инкубировали в течение часа при температуре 42°C, затем останавливали реакцию, нагревая образцы до 70°C на 10 минут. Пробы кДНК хранили при -80°C.

2.5.4. Полимеразная цепная реакция (ПЦР, ПЦР-РВ)

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) в соответствии с инструкциями производителя. Идентификацию продуктов ПЦР реакции проводили в 1% агарозном геле, приготовленном на основе 1x ТАЕ-буфера. Пробы наносили в лунки в смеси с красителем (бромистый этидий для простой детекции, SYBRsafe (Thermo Fisher Scientific, US) для дальнейшего выделения и очистки фрагмента). Электрофорез проводили в течение 45 минут при напряжении 110 В. Размер амплифицированного фрагмента определяли в сравнении с ДНК-маркерами молекулярного веса 100b+ и 1kb+ (Евроген, Россия).

Для ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) использовали набор реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя Eva Green (Синтол, Россия). ПЦР-РВ проводили на амплификаторе CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Расчеты пороговых циклов (Ct) проводили с помощью программы CFX-Manager (Bio-Rad). Количественную оценку экспрессии анализируемого гена проводили по методу 2-ΔΔCt (Livak and Schmittgen, 2001; Ребриков и др., 2009).

2.5.5. «Прогулка по геному», FPNI-PCR

Для секвенирования фрагментов, фланкирующих известные последовательности, применяли метод «прогулки по геному» FPNI-PCR (Fusion primer and nested integrated PCR, вложенной ПЦР со слитыми праймерами) (Wang et al., 2011). Для его осуществления необходимы три праймера к известной последовательности (SP1-3) и набор из 9 слитых праймеров FP, состоящий из вырожденного участка (связывающегося со случайным регионом исследуемой ДНК) и константного участка (содержащего сайты связывания праймеров FSP1-2) (рис. 2).

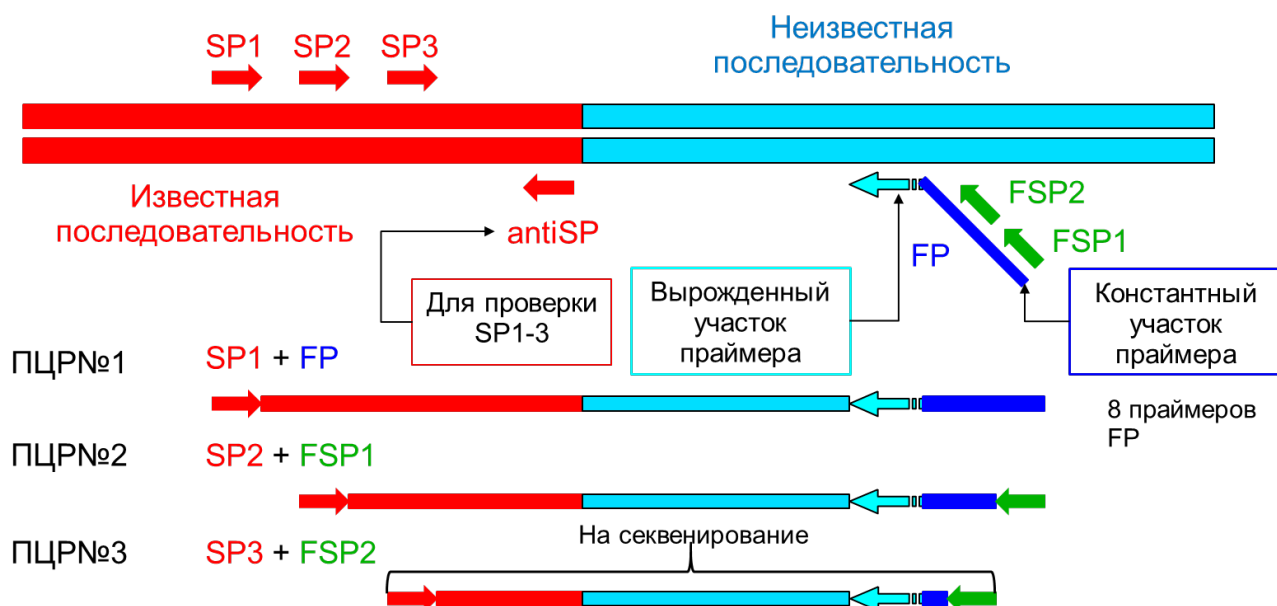


Рисунок 2. Схема FPNI-PCR.

На первом этапе проводили ПЦР с растительной ДНК и праймерами SP1 и набором праймеров FP1-9, содержащих вырожденный и консервативный участки. Реакцию проводили в объёме 25 мкл. В состав реакционной смеси входили по 0,5 мкл 10mM праймера SP1 и по 1мкл одного из праймеров FP1-9, 0,5мкл смеси dNTP 50x и 0,5 мкл Taq полимеразы. Амплификацию фрагмента проводили в соответствии с программой (табл. 7).

Таблица 7. Условия первой стадии FPNI-PCR

I	95 °С	1 мин 30 сек		1 цикл
II	94 °С	20 сек	2 цикла	6 циклов
	62 °С	30 сек		
	72 °С	1 мин 30 сек		
	95 °С	20 сек	1 цикл	
	44 °С	30 сек		
	72 °С	1 мин 30 сек		
III	72 °С	3 мин		1 цикл

Полученный продукт использовался как матрица для второго этапа, на котором проводилась ПЦР с праймером SP2 и праймерами FSP1 – к консервативной части праймеров FP. Реакцию проводили в объёме 25 мкл. В состав реакционной смеси входили по 0,5 мкл каждого праймера, 0,5мкл смеси dNTP 50x и 0,5 мкл Taq полимеразы. Амплификацию фрагмента проводили на приборе MJ Mini в соответствии с программой (табл. 8).

Таблица 8. Условия второй и третьей стадии FPNI-PCR

I	95 °C	1 мин 30 сек	1 цикл
II	94 °C	20 сек	31 цикл
	62 °C	30 сек	
	72 °C	1 мин 30 сек	
III	72 °C	1 мин	1 цикл

Полученный продукт использовался как матрица для третьего этапа, на котором проводилась ПЦР с праймером SP3 и FSP2 – дающие более короткий и специфичный фрагмент. Реакцию проводили в объёме 25 мкл. В состав реакционной смеси входили по 0,25 мкл каждого праймера, 0,5мкл смеси dNTP 50x и 0,5 мкл Taq полимеразы. Амплификацию фрагмента проводили в соответствии с программой второго этапа.

Полученные фрагменты проверяли методом электрофореза в агарозном геле, и удачные образцы (содержавшие единственный фрагмент достаточного размера) отправляли на секвенирование в Ресурсный центр СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий» (Chetverikov et al., 2019).

2.5.6. Gateway

Для создания векторных конструкций использовали ферменты Gateway BP Clonase II Enzyme mix и LR Clonase II Enzyme mix (Thermo Scientific, США) в соответствии с инструкциями производителя.

2.5.7. Плазмиды

В работе использовались плазмиды из коллекции лаборатории, в частности вектора ввода, несущие последовательности CaMV35S и терминатора, а также последовательность гена *sIFNG* (табл. 9).

2.5.8. Праймеры

Использованные в работе праймеры приведены в таблице 10. Последовательности праймеров подбирали с использованием онлайн-ресурса Primer-BLAST, используя как последовательности из открытых источников, так и полученные в результате секвенирования в ходе работы. Для амплификации фрагментов с целью детекции и секвенирования использовались простые праймеры, полностью соответствующие сайту связывания. Для модификации фрагментов путем добавления к концам attB—сайтов для их встраивания в вектора ввода по технологии Gateway, последовательности attB присоединялись к 5'-концам специфичных праймеров. Для «прогулки по геному» методом FPN-PCR использовались праймеры FP 1-9, FSP1 и FSP2 (в таблице не представлены) (Wang et al., 2011).

Таблица 9. Используемые в работе плазмиды.

Название плазмиды	Назначение
Плазмиды из коллекции лаборатории	
pDONR™ P4-P1r	Вектор ввода
pDONR 221	Вектор ввода
pENTR™ 4,1 p35S	Вектор ввода с последовательностью промотора CaMV 35S
pENTR™ 1,2 sIFNG	Вектор ввода с кодирующей последовательностью синтетического бычьего гамма-интерферона
pENTR™ 2,3 35St	Вектор ввода с последовательностью терминатора CaMV
pK43GW	Вектор назначения для создания финальной генетической конструкции и трансформации растений
pBGWFS7	Вектор назначения для визуализации области экспрессии промотора
pK43GW::p35S::sIFNG::35St	Вектор назначения с генетической конструкцией для экспрессии бычьего гамма-интерферона в растениях
Полученные в ходе работы векторы	
pENTR 4, 1:pSRD1	Вектор ввода с последовательностью промотора pIbSRD1 для создания векторов назначения на базе pK43GW
pENTR™ 4, 1:ZmRCP	Вектор ввода с последовательностью промотора pZmRCP-1 для создания векторов назначения на базе pK43GW
pENTR™ 221:pSRD1	Вектор ввода с последовательностью промотора pIbSRD1 для создания векторов назначения на базе pBGWFS7
pENTR™ 221:ZmRCP	Вектор ввода с последовательностью промотора pZmRCP-1 для создания векторов назначения на базе pBGWFS7
pK43GW::pSRD1::sIFNG::35St	Вектор назначения с генетической конструкцией для экспрессии бычьего гамма-интерферона в растениях под контролем промотора pIbSRD1
pK43GW::ZmRCP::sIFNG::35St	Вектор назначения с генетической конструкцией для экспрессии бычьего гамма-интерферона в растениях под контролем промотора pZmRCP-1
pBGWFS7:pSRD1	Вектор назначения для визуализации области экспрессии промотора pIbSRD1
pBGWFS7:ZmRCP	Вектор назначения для визуализации области экспрессии промотора pZmRCP-1

Таблица 10. Праймеры, использованные в работе (Евроген, Россия)

Назначение	Целевая последовательность	Название	Последовательность
Детекция гена <i>sIFNG</i>	<i>sIFNG</i>	sIFNG-1	TAATGCAAGTTCTCCAGATGTAGC
		sIFNG-2	ACATGGATGCTCTTCGACCT
Секвенирование трансгенной вставки	p35S (промотор вируса мозаики цветной капусты)	35S_F	CCTCCTCGGATTCCATTGCCCAG
		35S_R	GTCCATCTTTGGGACCACTGTCGG
	OCS (терминатор гена октопинсинтазы)	OCS_F	GCGAGACGCCTATGATCGCATGAT
		OCS_R	GAAACCGGCGGTAAGGATCTGAGC
	pNOS (промотор гена нопалинсинтазы)	NOS_F	CGATGACGCGGGACAAGCCGT
		NOS_R	GACCTTAGGCGACTTTTGAACGCGC
	<i>NPT II</i> (неомицин фосфотрансфераза)	NPT_F	GTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGG
		NPT_R	CGCAAGGAACGCCCCGTCGTGG
FPNI-PCR («прогулка по геному»)	p35S (промотор вируса мозаики цветной капусты) – поиск сайта встраивания	35Sm_antiSP	CTGATCATGAGCGGAGAATTAAGGGA
		35Sm_SP3	TCGGGAAACCTGTCGTGCCA
		35Sm_SP2	GCTCACTGCCCCGCTTTCCAG
		35Sm_SP1	AGTGTAAGCCTGGGGTGCCT
	NOST (терминатор гена нопалинсинтазы) – поиск сайта встраивания	NOST_antiSP	CCTAGTTTGCGCGCTATATTTTGTTC
		NOST_SP3*	GAAGCAGATCGTTCAAACATTTGGC
		NOST_SP2*	TCGTTTTGGTGCTACCCACGTT
		NOST_SP1*	CCAAGTGGCAAATCATCCAGCGT
Интерферон-индуцируемые гены быка	2',5'-oligoadenylate synthetase 1	OASLF	CCGGTCATTGAGGACTTTGT
		OASLR	CACTGCTCCACTGTCACGTT
	MX dynamin-like GTPase 1	MX1F	TAAAACTCTGCCCCTGTTGG
		MX1R	TGGAGAACTCGGCTCGTACT
	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDHF	ACCCAGAAGACTGTGGATGG
		GAPDHR	GGAGACAACCTGGTCCTCAG

Таблица 10. Праймеры, использованные в работе (продолжение)

Назначение	Целевая последовательность	Название	Последовательность
Подтверждение сайтов встраивания	Геномная ДНК табака	B6_R1	TAGCCAACATACCTCAATTGAGCTTCCT
		B6_L1	CGCAGAATGGCCGCAGAG
		B6_L2	AATGGCCGCAGAGTGAAGCA
	Геномная ДНК табака	311_L1	AGCACTTCCCAGAGCGCATATTACC
		311_L2	CCGCTTGGGAAAGGGTGTGTT
		311_R1	CAAATGAAGTTTTGATGCTAATGTATGGGAAT
		311_R2	GAAACAATTTAAATAATGAGATGGCTGGACCTA
	Сайт слияния Т-ДНК линии 311	NT_RB_F	TAAAACGGCTTGTCCCGCGT
		NT_RB_R	ACTGAAGGCGGGAAACGACA
		NT_LB_F	ACATTAAAAACGTCCGCAATGTGTT
		NT_LB_R	TGCGGACGTTTTTAATGTACTGA
Клонирование промотора pIbSRD1	pIbSRD1	SRD1_F_61	CGAATGATCTATGGCTACAAACC
		SRD1_R_3014	ATATAGCAAAGCCAAATGAAGAAATC
	pIbSRD1	SRD1_R_SP4	ACCCCGGTATGGGCTAAGATATGA
	pIbSRD1	SRD1_F_61_attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGAATGATCTATGGCTACAAACC
		SRD1_R_3014_attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATATAGCAAAGCCAAATGAAGAAATC
	pIbSRD1	SRD1_F_61_attB4	GGGGACAAGTTTGTATAGAAAAGTTGGCCGAATGATCTATGGCTACAAACC
		SRD1_R_3014_attB1r	GGGGACTGCTTTTTTGTACAACTTGATATAGCAAAGCCAAATGAAGAAATC

Таблица 10. Праймеры, использованные в работе (продолжение)

Назначение	Целевая последовательность	Название	Последовательность
Клонирование промотора <i>pZmRCP-1</i>	pZmRCP-1	ZmRCP-1 F	CCTATGTCAATTAAGGGAGTTGATG
		ZmRCP-1 R	AGCTCATACTGCTTCTGTGACTGT
	pZmRCP-1	ZmRCP-1 F_a ttB4	GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTT GGCCCTATGTCAATTAAGGGAGTTG ATG
		ZmRCP-1 R_a ttB1r	GGGGACTGCTTTTTTGTACAACTT GAGCTCATACTGCTTCTGTGACTGT
	pZmRCP-1	ZmRCP-1 F_a ttB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGC AGGCTCCTATGTCAATTAAGGGAGT TGATG
		ZmRCP-1 R_a ttB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCT GGGTAGCTCATACTGCTTCTGTGAC TGT
Проверка векторов	pDONR, pENTR, pK43GW сайты M13	M13_F	GTAAAACGACGGCCAG
		M13_R	CAGGAAACAGCTATGAC
Измерение уровня экспрессии интерферона в корнях моркови	<i>sIFNG</i>	RTsIFNG-1-2	AGGAGTATGGACATCATCAAGCA
		RTsIFNG-2-2	AGTCGTCGACCGGAATTTGA
	Ген актина <i>D. carota</i>	DC_ACT_F	GTATTGTGTTGGACTCTGGTGAT
		DC_ACT_R	CAAGGTCAAGACGGAGTATGG
	Ген фактора элонгации 1-альфа <i>D. carota</i>	DC_EF1A_F	AGGATCTCAAGCGTGGTTATGT
		DC_EF1A_R	CAATGTGGCAAGTGTGACAAT

2.6. Методы работы с белками

2.6.1. Выделение цитоплазматических растительных белков

Белки экстрагировали из ткани молодых листьев, взятых с верхушек растений. Материал гомогенизировали в охлажденных фарфоровых ступках с добавлением буфера для белковой экстракции (табл. 11) 2 мл на 1 г растительной массы, поливинилпирролидола (0.1% от массы растительной ткани) и ингибитора протеиназ PMSF (1 mM).

Таблица 11. Состав буфера белковой экстракции (pH=7,5).

Состав	Концентрация, (М/л)
MES	0,1 М
EDTA	0,001 М
глицерин	1%
сахароза	0,05 М
дитиотреитол	0,01 М
аскорбиновая кислота	0,011 М

Гомогенат пропускали через бумажный фильтр для удаления оставшихся крупных фрагментов, при этом использовали ещё 5 мл экстракционного буфера, для промывки. Объем образца достигает 10-12 мл, соответственно, операции проводят не в микропробирках, а в фальконах объемом 50 мл. Образцы центрифугировали при 4⁰С в течение 15 минут при 10000 об./мин. и переносили супернатант в новые емкости.

Высаливание белков с применением сульфата аммония

К образцу, растворенному в буфере для экстракции, медленно с перемешиванием добавляли навеску сульфата аммония до необходимой концентрации (Долсон и др., 1991). Для получения относительно чистого целевого белка высаливание проводили в два этапа. Гамма-интерферон выпадает в осадок в растворе сульфата аммония $\approx 45\%$, поэтому вначале концентрацию доводили до 40%, оставляли образец на 1 час на мешалке при 4⁰С, центрифугировали 15 минут при 10000 об./мин. на центрифуге с охлаждением, удаляли осадок, и добавляли навеску сульфата аммония до концентрации 50%, после чего вновь центрифугировали в тех же условиях и удаляли супернатант. Осадок, содержащий ИФН, растворяли в буфере для соответствующего эксперимента.

Диализ белковых проб

Метод использовался для очистки целевого белка от низкомолекулярных загрязнителей, в первую очередь сульфата аммония. Для кормления мышей диализ проводили против буфера для белковой экстракции при 4⁰С в течение 6 часов с двукратной сменой раствора. Для исследования активности интерферона на культуре клеток диализ проводился против натрий-фосфатного солевого буфера, pH=7,4 (табл. 12) при 4⁰С в течение ночи.

Таблица 12. Натрий-фосфатный буфер.

Компонент	Концентрация (М/л)
NaCl	0,14
KCl	0,027
Na ₂ HPO ₄	0,01
KH ₂ PO ₄	0,02

2.6.2. Вестерн-блот анализ

Вестерн-блот гибридизация проводилась для подтверждения наличия γ -интерферона в трансгенных растениях табака.

Электрофорез в полиакриламидном геле

Разделение белков проводили методом денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле (Laemmli, 1970). Гель для разделения белковых фракций состоит из двух фаз: концентрирующей (непосредственно вокруг лунок) и разделяющей (табл. 13). Перед нанесением на гель пробы смешивали с равным объемом двукратного SDS-буфера для нанесения, pH 8,6 (табл. 15) и кипятили в течение 5 минут на водяной бане. В лунку наносили 20 мкг белка. Электрофорез проводили в трис-глициновом буфере, pH 8,6 (табл. 14).

Разные стадии разделения проходили при разном напряжении: выход из лунок в концентрирующий гель - 50 В, при переходе белковых проб из

концентрирующего в разделяющий гель - 100 В, и 200 В - электрофорез в разделяющем геле.

Перенос проб на нитроцеллюлозную мембрану

После разделения белков в полиакриламидном геле, гелевую пластину помещали на 15 минут в ренатурирующий буфер, pH 8,6 (табл. 16), затем на 10 минут в буфер для переноса, pH 7,6, (табл. 17).

Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану проходил в системе полусухого блота (Trans-Blot SD semi-dry transfer cell, Bio-rad, США) при 10 В в течение 30 минут, в буфере для переноса, после чего мембрану промывали 10 мМ Трис HCl, pH 8,0, и инкубировали в течение 2 часов в 1х TBST-буфере (табл. 12) для блокирования.

Обработка антителами

Использовались первичные поликлональные козы антигены к рекомбинантному γ -интерферону (R&D systems, Веоикобритания, кат. № AF-2300) и вторичные поликлональные противокозьи кроличьи антигены, меченные пероксидазой хрена (МЕДГАМАЛ, Россия). Антигены разводили согласно инструкции в 1х TBST-буфере pH 7,6 (табл. 12). Поскольку азид натрия ингибирует пероксидазу, в TBST-буфер для растворения вторичных антител и отмывки его не добавляли.

Блокированную нитроцеллюлозную мембрану инкубировали с первичными антителами в течение 2 часов при 37°C на качалке. После инкубации проводили три отмывки по 5 минут 1х TBST-буфером, и затем инкубировали мембрану с вторичными антителами в течение 1 часа при 37°C. Снова три раза промывали 1х TBST-буфером и один раз проявочным буфером – 1х PBST, pH 6,0 (табл. 19).

Проявку мембраны проводили с помощью DAB (3,3'-диаминобензидина тетрагидрохлорид дигидрат), который окисляется пероксидом водорода в присутствии пероксидазы хрена с образованием нерастворимого продукта коричневого цвета. На 50 мл 1х PBST-буфера добавляли 10 мкг/100 мкл DAB и 50 мкл 33% перекиси водорода и выдерживали до появления на мембране рисунка.

Таблица 13. Полиакриламидный гель.

Компоненты	17% разделяющий гель
AL (30% AL, 0,8% bis-AL)	11,3 мл
BL (1,5 М трис HCl, pH 8,8)	5 мл
ПСА (персульфат аммония)	120 мкл
Темед	12 мкл
Вода	3,66 мл
Компоненты	6% концентрирующий гель
AL (30% AL, 0,8% bis-AL)	1,2 мл
DL (0,5 М трис HCl, pH 6,8)	1,5 мл
ПСА (персульфат аммония)	40 мкл
Темед	4 мкл
Вода	3,25 мл

Таблица 14. Трис-глицериновый буфер.

Компоненты	Количество (на 1 л)
Трис OH	3 г
Глицин	14,4 г
EDTA	0,585 г
SDS	1 г

Таблица 15. 2x SDS-буфер.

Состав	Концентрация, (М/л)
Трис HCl	0,0625 М
SDS	2%
сахароза	40%
Бромфеноловый синий	0,001%
меркаптоэтанол	5%

Таблица 16. Ренатурирующий буфер.

Состав	Концентрация, (М/л)
Мочевина	4 М
трис HCl	10 мМ
EDTA	20 мМ

Таблица 17. Буфер для переноса.

Состав	Концентрация, (М/л)
Трис HCl	25mM
глицин	190mM
Этанол	20% v/v

Таблица 18. 1x TBST-буфер.

Состав	Концентрация, (М/л)
Трис HCl	10 mM
NaCl	150 mM
альбумин бычий	1%
твин	0,05%
Азид натрия	0,02%

Таблица 19. 1x PBST-буфер.

Состав	Концентрация, (М/л)
NaCl	1,37M
KCl	27mM
Na ₂ HPO ₄	90mM
KH ₂ PO ₄	15mM
твин	20 0,5%

2.7. Оценка биологической активности рекомбинантного белка на культуре клеток быка

Растительный материал нетрансгенного табака, а также трансгенных линий 311.2.7.2-(1-6), 311.2.7.3-(1-6) и В6.13.8-(1-6) отбирали с растений, выращивавшихся в 100 мл стаканчиках на среде MS20 (рис. 1). Поскольку масса одного выращенного таким образом растения недостаточна для получения необходимого количества интерферона, образцы собирали с 12 растений, доводя суммарную массу зеленых тканей до 10 г. Образцы гомогенизировали в буфере белковой экстракции (табл. 11), фильтрованием и центрифугированием отделяли жидкую фракцию с растворенными белками и подвергали ее двухэтапному высаливанию сульфатом аммония с целью осадить белковую фракцию,

содержащую гамма-интерферон. Осадок растворяли в 1 мл натрий-фосфатного буфера и диализовали в течение 12 часов при температуре +4°C против 1 л того же буфера с двукратной сменой раствора. Из полученных образцов отбирали аликвоту 100 мкл для вестерн-блота, оставшийся объем (около 1 мл) отправляли на тест на культуре клеток.

Определение специфической противовирусной активности препарата интерферона (ИФН) проводили с использованием 2-3 суточного монослоя перевиваемой линии клеток FBT (фибробласты трахеи плодов коров). Противовирусную активность испытуемого препарата интерферона определяли в сравнении с отраслевым стандартным образцом (ОСО) человеческого лейкоцитарного интерферона альфа-2, активность которого составляет 1000 МЕ/мл. (ОФС.1.7.2.0002.15 Биологические методы испытания препаратов интерферона с использованием культур клеток. ФС 42_3433_97. Патент RU 2564115).

Культуру клеток выращивали на матрацах вместимостью 600 мл (Sarstedt, Германия), используя ростовую питательную среду (среда DMEM с 10% сыворотки крови плодов коров жидкой, с добавлением бензатилбензилпенициллина стерильного 100ед/мл и стрептомицина сульфата 50 ед./мл). Клетки инкубировали при температуре 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂. После формирования монослоя клетки снимали с подложки смесью р-ров Версена 0,02% и трипсина 0,25% в соотношении 1:1.

Монослой клеток заливали указанной смесью, выдерживали при температуре 37°C 10 мин до набухания и начала отслаивания клеток от подложки, после чего смесь Версена с трипсином сливали, а клетки диспергировали в 10 мл поддерживающей среды (среда DMEM с антибиотиками, без сыворотки плодов коров). В полученной взвеси подсчитывали количество клеток в камере Горяева и доводили концентрацию клеток до 150-300 тысяч в 1мл путем добавления ростовой питательной среды. Приготовленную таким образом взвесь клеток разливали в 96-луночные культуральные планшеты (Sarstedt, Германия) по 200

мкл в каждую лунку. Инкубировали планшеты с культурой клеток при температуре 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂.

Для определения активности препарата ИФН подготовленные клетки инкубировали с подготовленными пробами испытуемого образца и ОСО активности. Для этого готовили разведения испытуемого образца и ОСО активности в 10 раз с последующим двукратным разведением (титрованием) в поддерживающей среде. Титрование производили с помощью восьмиканальной микропипетки (Fin Pipette, Финляндия) в 96-луночном планшете для иммуноферментного анализа (Медполимер, Россия).

Из лунок культуральных планшетов удаляли ростовую среду и вносили приготовленные разведения испытуемых препаратов и ОСО активности (по 100 мкл), используя на каждое разведение не менее 3 лунок с культурой клеток. Для контроля дозы индикаторного вируса и состояния монослоя клеток оставляли по 3 лунки соответственно. В них вносили по 100 мкл поддерживающей среды, используемой для приготовления разведений испытуемых препаратов. Инокулированные и контрольные культуры клеток инкубировали в течение 24 ч при температуре 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂. Затем в каждую лунку с испытуемым материалом, ОСО и лунки контроля активности индикаторного вируса вносили рассчитанную заранее дозу вируса, соответствующую 100 ТЦД₅₀/0,1 мл (по 100 мкл). В лунки, предназначенные для контроля монослоя, вносили по 100 мкл поддерживающей среды, используемой для приготовления разведений испытуемых препаратов.

В качестве индикатора использовали вирус везикулярного стоматита (ВВС) штамм «Индиана» из коллекции ГИСК им. Л.А.Тарасевича, регистрационный № 11/82. Инокулированные и контрольные культуры клеток инкубировали в течение 18-24 ч при температуре 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂.

Через 18-24 ч инкубации, когда в лунках, содержащих никрокультуры без ИФН (контроль вируса) развивалось тотальное поражение клеточного пласта, среду удаляли, клеточный пласт окрашивали 15 мин 0,1% спиртовым раствором

кристаллического фиолетового, после чего планшеты промывали проточной водой и высушивали. Затем проводили учет реакции определения активности. Проверяли качество культуры клеток, просматривая под микроскопом (увеличение 100*) контрольные лунки (K+). Таким же образом проверяли дозу вируса (K-). Лунки должны иметь признаки цитопатического действия (ЦПД) вируса. Титром ИФН считали последнее его разведение, которое вызывало 50% подавление ЦПД ВВС по сравнению с контролем вируса.

Активность испытуемых образцов вычисляли в международных единицах по формуле:

$$A_0 = A_p \cdot T_0 / T_p$$

Где A_0 – активность исследуемого образца ИФН; A_p – активность референс-препарата (ОСО), выраженная в МЕ (международные единицы); T_0 – титр исследуемого ИФН в опыте; T_p – титр референс-препарата (ОСО) в опыте (Liu et al, 2001).

Для более точной оценки биологической активности рекомбинантного интерферона, после инкубации клеток с образцами из них выделяли РНК, проводили реакцию обратной транскрипции и подвергали полученную кДНК ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ), исследуя экспрессию интерферон-индуцируемых генов *MX1* (МХ-динамин-подобная ГТФаза 1) и *OASL* (2',5'-олигоаденилат синтетаза 1) быка *Bos taurus* (Schoggins, Rice, 2011). В качестве референсного использовали ген лицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (*GAPDH*). Последовательности праймеров представлены в табл. 10.

Выделение РНК из клеток проводили с помощью реактива Extract RNA (Evrogen, Россия) по рекомендациям производителя. Синтез кДНК осуществляли с помощью обратной транскриптазы MMLV (Evrogen, Россия) используя 100 нг РНК в качестве матрицы.

Для постановки ПЦР-РВ использовали 5х смесь qPCRmix-HS с красителями SYBR и ROX (Евроген, Россия), 2 мкл кДНК, 20 пкМ каждого из праймеров.

2.8. Испытание рекомбинантного белка на лабораторных животных

Пероральное введение растительного экстракта, содержащего гамма-интерферон, лабораторным мышам

Использовались беспородные белые мыши, самцы, возрастом 3 месяца и весом 20-30 г. Животные содержались в клетках на подстилке из опилок и сена вшестером при комнатной температуре и естественном освещении, имели свободный доступ к воде и корму. Месяц до начала эксперимента мыши содержались под наблюдением. В течение этого времени из будущих опытных групп были отсеяны самые агрессивные животные, наносившие соседям раны, и особи, у которых развились опухолевые образования. В эксперимент были включены три группы по шесть особей (табл. 20). Каждое животное в клетке отмечали индивидуальной меткой красителем бриллиантовым зеленым. Основной группе в течение шести дней перорально вводили очищенный экстракт, полученный из свежего листового материала трансгенных растений табака (311.2.7.2, 311.2.7.3 и 311.2.7.4), для которых ранее было показано наличие белка гамма-интерферона; первой контрольной группе - экстракт нетрансгенных растений табака; второй контрольной – чистый буфер белковой экстракции. Из-за нестабильности гамма-интерферона, выделение проб белка из растений проводили каждый раз непосредственно перед кормлением. Ежедневная доза гамма-интерферона для животного опытной группы составляла примерно 1 мкг.

Таблица 20. Лабораторные животные.

Группа	Вводимое вещество
K-- (Контроль --)	Буфер для белковой экстракции
Wt (Контроль -)	Экстракт нетрансгенных растений табака
IFNG (Опыт)	Экстракт трансгенного табака линии Inter311

Анализ динамики массы мышечей

Отбор проб производили за день до начала терапии и еще дважды, через 16 и 30 дней. Животных взвешивали и отбирали пробы периферической крови из кончика хвоста.

Получение препаратов крови

Мышь помещали в пластиковый бюкс объемом 50 мл с отверстиями в дне и крышке, оставляя хвост снаружи. С кончика хвоста отрезали фрагмент длиной не более миллиметра. Первая капля крови переносилась на предметное стекло для получения мазка, остальные отбирались в микропробирку для иммуноферментного анализа (до 200 мкл). Инструменты и раны дезинфицировали спиртом.

Пробы крови для иммуноферментного анализа как можно быстрее подвергались центрифугированию для осаждения форменных элементов. Плазму крови переносили в новые микропробирки и замораживали при -80°C .

Иммуноферментный анализ (ИФА) общего содержания иммуноглобулинов плазмы крови

Плазма крови мышечей была подвергнута иммуноферментному анализу для определения общего уровня антител. Использовались стандартные полистироловые 96-луночные планшеты (8x12) с плоским дном, измерения проводились на ИФА-анализаторе ФФМ-1 (Россия).

Пробы плазмы крови, выровненные по белку, разводили в 1000 раз 1x TBST-буфером (табл. 12) без азида натрия и твина и разливались в планшеты по 100 мкл на лунку. Чтобы нивелировать погрешность планшетов, каждую пробу наносили в 8 лунок, расположенных в разном порядке. Планшеты инкубировали при 37°C в течение часа, после чего пробы сливали, а лунки трижды промывали 200 мкл 1x TBST-буфера без азида натрия (табл. 11) и добавляли антитела против мышечных иммуноглобулинов (МЕДГАМАЛ, Россия) (по 100 мкл на лунку), меченные пероксидазой хрена, разведенные 1xTBST-буфером согласно инструкции (1:10000). Снова инкубировали при 37°C в течение часа, после чего промывали

дважды промывочным раствором (готовый ФСБ-Т) и 1 раз фосфоцитратным буфером, рН 5,0 (табл. 21).

Проявку проводили, нанося в лунки 100 мкл субстрата пероксидазы хрена: фосфоцитратного буфера с растворенным фенилендиамином (5 мг на 10 мл), с добавлением 5 мкл 33% перекиси водорода. Через 10-15 минут реакцию останавливали коммерческим стоп-реагентом (3 М серная кислота).

Таблица 21. Фосфо-цитратный буфер.

Состав	На 100 мл	
Раствор А	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$	5,4 г
Раствор В	Лимонная кислота $\times \text{H}_2\text{O}$	9,03 г
50 мл фосфоцитратного буфера = 45мл А + 5мл В; рН подводится р-ром А либо В		

Получение и окраска мазков крови. Для микроскопического анализа использовали стандартные предметные стекла 75x25x1 мм. Каплю крови наносили на стекло и сразу же размазывали гранью другого стекла для получения тонкого сплошного мазка. Препарат оставляли на воздухе до полного высыхания. Окраска производилась по методу Романовского-Гимзы. Если препарат окрашивался непосредственно после получения, производили процедуру фиксации (погружением в метиловый спирт). Если с момента получения до окраски проходило более двух недель, фиксация не требовалась

Для окраски препарат погружали в рабочий раствор красителя на 20 минут, затем промывали чистым 1xPBS буфером (табл. 11) и подсушивался. Если интенсивность окраски оказывалась недостаточна, процедура повторялась и соответственно увеличивалось время пребывания в рабочем растворе для остальных препаратов.

Мазки анализировались методом подсчета лейкоцитарной формулы под оптическим микроскопом. Подсчет производился посередине мазка до 100 клеток

в образце, при этом поле зрения перемещалось «змейкой» поперек мазка от края до края.

Учитывались следующие типы клеток (рис. 3):

Базофилы. Крупные клетки, в цитоплазме которых содержится множество гранул, эффективно окрашиваемых основным компонентом красителя Гимзы; в отличие от других лейкоцитов, не поглощают кислый компонент (эозин). Ядро полностью скрыто гранулами. Базофилы принимают участие в развитии аллергических реакций. Нормальная встречаемость в крови мышей 0-2%.

Эозинофилы. Цитоплазматические гранулы интенсивно окрашиваются кислым красителем эозином. Ядро сегментировано. В аллергических реакциях эозинофилы могут играть роль как активаторов, так и гасителей. Встречаемость в крови мышей в норме 0-3%.

Моноциты. Самые крупные клетки периферической крови. Ядро бобовидное, несегментированное. Наиболее значимая функция – фагоцитарная. Нормальная встречаемость в крови мышей 2-6%.

Нейтрофилы. При окраске по Романовскому поглощают как кислый, так и основной краситель. Зрелые клетки имеют сегментированное ядро (сегментоядерные нейтрофилы); юные – палочковидное ядро без выраженных перемычек (палочкоядерные нейтрофилы). Ответственны за ранний неспецифичный ответ на воспаления и бактериальные инфекции. Встречаемость в крови мышей палочкоядерных нейтрофилов в норме 1-5%, сегментоядерных 20-25%.

Лимфоциты. Небольшие клетки с плотным округлым ядром. Обеспечивают поздний специфический иммунный ответ, как гуморальный (выработка антител), так и клеточный (цитотоксичность). Самые распространенные клетки периферической крови, встречаемость может достигать 70% (McGarry et al., 2010).

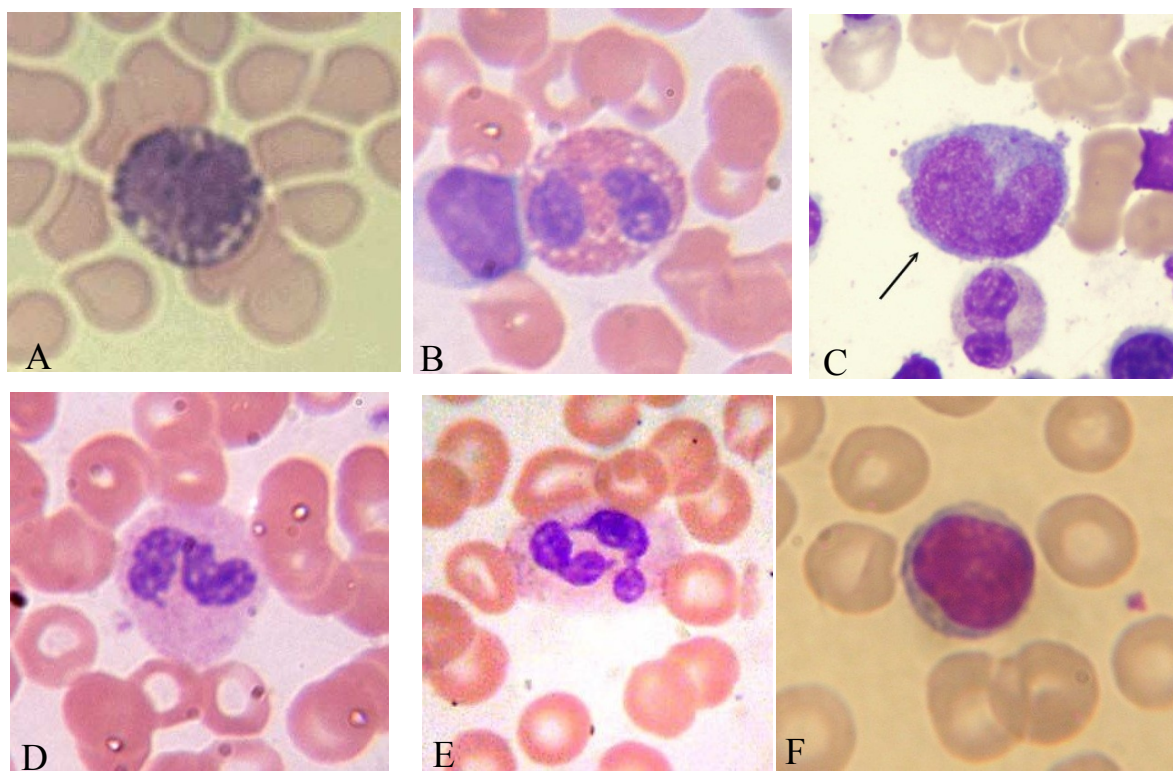


Рисунок 3. Типы клеток крови, учитывавшиеся в работе (McGarry et al., 2010). А: базофил. В: эозинофил. С: моноцит. D: палочкоядерный нейтрофил. Е: сегментоядерный нейтрофил. F: лимфоцит.

2.9. Статистические методы и компьютерные программы. используемые в работе

Для работы с последовательностями ДНК использовали онлайн-ресурс Blast (NCBI), программы ApE (M. Wayne Davis, <https://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/appe/>) 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).

ГЛАВА 3. Результаты

3.1. Исследование трансгенных растений табака (*Nicotiana tabacum*) поколения T₄-T₅

Ранее в лаборатории генной и клеточной инженерии растений кафедры генетики и селекции СПбГУ в результате агробактериальной трансформации были получены растения InterB и Inter311, несущие ген *sIFNG* под контролем 35S промотора (Савельева и др., 2009). Первичные трансформанты были отобраны на селективной среде с канамицином. С каждого растения в результате самоопыления получали семена, из которых выращивали 25 особей следующего поколения, подвергавшихся анализу на наличие трансгенной вставки и ее активность, а также присутствие в тканях белка гамма-интерферона. Семьи, демонстрировавшие расщепление во втором поколении, выбраковывали. В результате отбора на протяжении четырех поколений, были созданы гомозиготные линии трансгенных растений — потомков трансформантов Inter311 и InterB, демонстрирующие 100% наследование гена *sIFNG* (рис. 1) (Савельева и др., 2009; Савельева и др., 2015).

3.1.1. Анализ наследования гетерологичного гена *sIFNG*

Наличие в геноме растения трансгенной вставки определяли ПЦР-анализом тотальной растительной ДНК с праймерами *sIFNG*-1 и *sIFNG*-2, подобранными к гену гамма-интерферона *sIFNG*. В качестве положительного контроля выступала бактериальная плаزمида pART27INT6, использованная для трансформации табака, в качестве отрицательного контроля — вода и ДНК нетрансгенных растений табака.

В данной работе ПЦР-анализу на наличие трансгенной вставки впервые подвергали растения поколений T₄ и T₅.

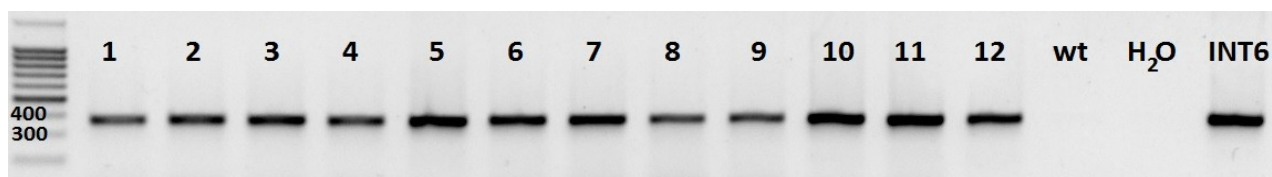


Рисунок 4. Электрофореграмма результатов ПЦР-анализа ДНК растений Inter311.2.7.2.2-(1-12). Образец Wt – ДНК нетрансгенного растения табака, образец INT6 – плазмида, использованная для трансформации растений T_0 .

Все исследованные растения поколения T_4 продемонстрировали присутствие гена *sIFNG*. ПЦР-анализ также выявил наличие гетерологичного гена у всех 48 исследованных трансгенных растений табака поколения T_5 (рис. 4), что свидетельствует о стабильном наследовании гена гамма-интерферона в линии Inter311.2.7. У нетрансгенных растений присутствие гена *sIFNG* не обнаружено.

3.1.2. Анализ экспрессии гена гамма-интерферона у трансгенных растений табака поколения T_5

После получения доказательств присутствия трансгенной вставки в геноме исследованного растения требуется подтвердить ее активность. Для этого растения поколения T_5 (линии 311.2.7) были подвергнуты ОТ-ПЦР анализу. Полученную кДНК исследовали методом ПЦР с праймерами к гену *sIFNG*.

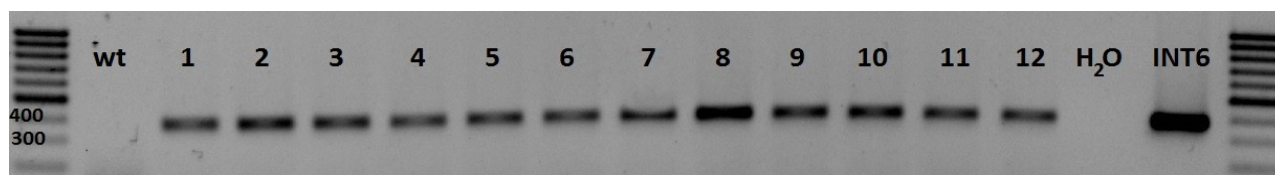


Рисунок 5. ПЦР-анализ кДНК растений Inter311.2.7.2.2-(1-12). Образец Wt – кДНК нетрансгенного табака, образец INT6 – плазмида, использованная для трансформации растений T_0 .

Все 48 исследованных растений поколения T_5 характеризовались присутствием мРНК, соответствующей гену sIFNG (Рис. 5), что подтверждает активность вставки.

3.2. Белок гамма-интерферон из трансгенных растений

3.2.1. Анализ трансгенных растений табака на наличие гетерологичного белка гамма-интерферона

Вестерн-блот анализу подвергались белковые пробы, выделенные из растений 3 и 4 поколений и предназначенные для испытаний на биологическую активность. Все исследованные образцы продемонстрировали присутствие в тканях белка гамма-интерферона (Рис. 6).

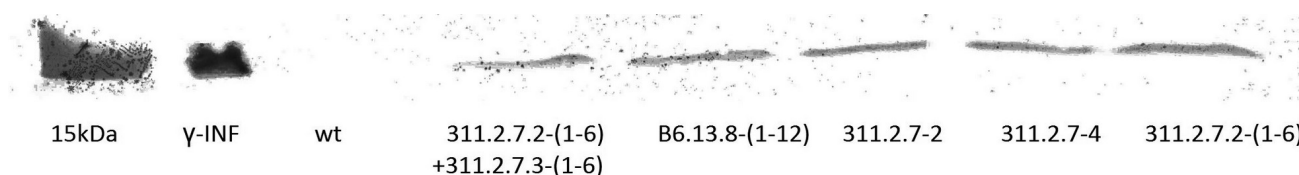


Рисунок 6. Результат вестерн-блот гибридизации белковых проб, полученных из трангенных растений поколений T_{3-4} . γ -INF — коммерческий гамма-интерферон быка, WT — нетрансгенный табак, 15 kDa — маркер молекулярного веса.

3.2.2. Измерение активности рекомбинантного белка на культуре клеток быка

В сотрудничестве с лабораторией биохимической генетики был проведен анализ биологической активности рекомбинантного интерферона растительного происхождения на культуре клеток быка.

Таблица 22. Биологическая активность препаратов ИФНГ из трансгенных 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)	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 линии 311.2.7.2 (1-6)	320 МЕ/мл	320 МЕ/мл	120 МЕ/мл	160 МЕ/мл
экстракт трансгенных растений табака В6.13.8 (1-12)	80 МЕ/мл	100 МЕ/мл	0 МЕ/мл	0 МЕ/мл
экстракт замороженных 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

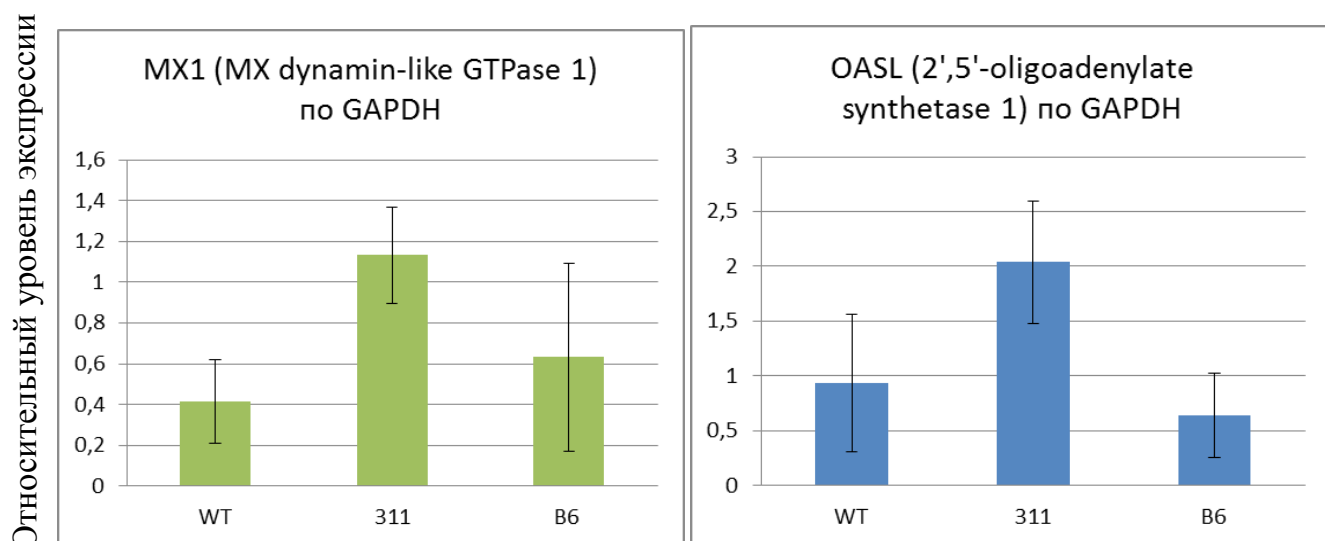


Рисунок 7. Активность интерферон-зависимых генов в культуре клеток после обработки рекомбинантным гамма-интерфероном, выделенным из трансгенных (311, B6) и нетрансгенных (WT) растений табака. На графиках представлены результаты полуколичественного анализа ($\Delta\Delta C_t$). В качестве референсного гена использовался *GAPDH* (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase). Исследовали экспрессию интерферон-индуцируемых генов *MX1* (MX dynamin-like GTPase 1) и *OASL* (2',5'-oligoadenylate synthetase 1) *Bos taurus*. Эксперимент проводился в трех аналитических повторностях, для которых на графике отложена стандартная ошибка среднего.

Интерферон, синтезируемый растениями линии Inter311, обладал противовирусной активностью, сопоставимой с таковой у коммерческого белка, наработанного в трансгенных микроорганизмах (табл. 22). Продукт линии InterB6 был гораздо менее эффективен. Анализ активности интерферон-индуцируемых генов быка не выявил достоверных отличий между группами, несмотря на видимую тенденцию (рис. 7). Экстракт трансгенных растений, подвергавшихся долговременному хранению при заморозке, значительно утрачивал активность. Вероятнее всего, деградация рекомбинантного белка в тканях связана с высвобождением протеаз из клеточных компартментов вследствие разрушения мембран кристаллами льда в процессе замораживания-оттаивания.

Отсутствие противовирусной активности экстракта растений линии В6 может быть объяснено меньшим уровнем наработки рекомбинантного белка в растениях данной линии, поскольку пробы выравнивались по массе сырой растительной ткани. По данным вестерн-блот анализа, все исследованные образцы содержали белок гамма-интерферон в концентрации, достаточной для обнаружения.

3.2.3. Изучение активности рекомбинантного белка при пероральном применении

Анализ динамики массы мышей

Скорость набора веса – просто измеряемая и одновременно информативная характеристика, отражающая многие происходящие в организме животных процессы. К моменту начала эксперимента мыши не достигли взрослого состояния и продолжали расти. Массу животных измеряли за день до начала терапии, через 16 и через 30 дней.

На рисунке 8 отражено изменение массы мышей из трех экспериментальных групп (табл. 14). Снижение скорости роста можно объяснить возрастом животных и угнетающим воздействием пробоотбора. Статистическая обработка результатов методом дисперсионного анализа не выявила значимых различий между группами. Таким образом, можно утверждать, что присутствие в пище рекомбинантного гамма-интерферона не влияет на скорость набора массы. Также не было отмечено различий во внешнем виде, качестве шерстного покрова и поведении животных из разных групп.

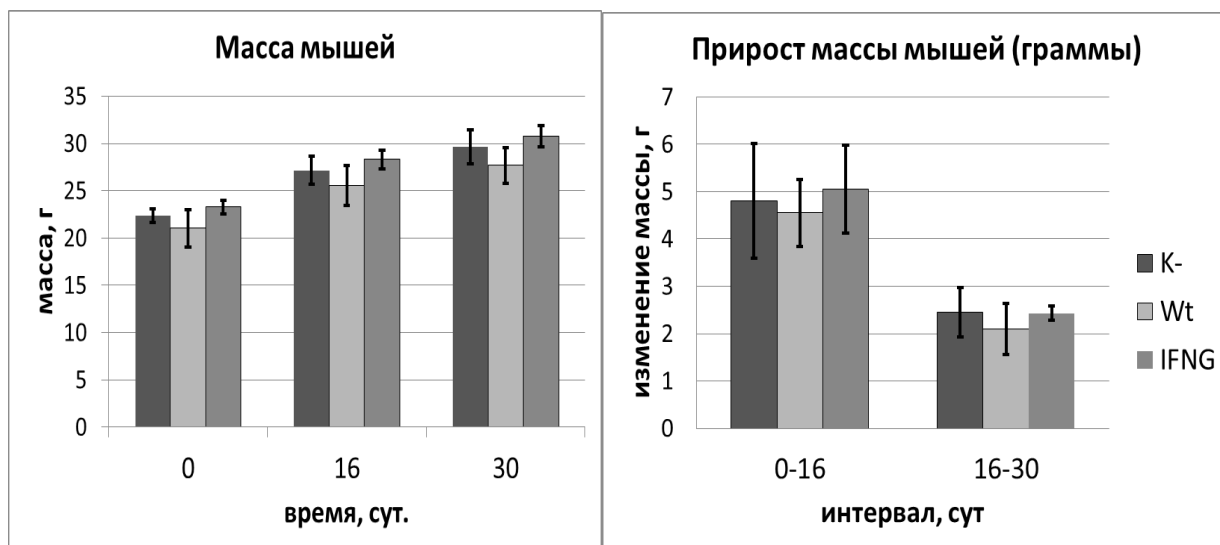


Рисунок 8. Действие недельной терапии белковыми экстрактами из трансгенных (IFNG) и нетрансгенных (Wt) растений табака, а также буфера белковой экстракции (K-), на скорость набора веса подопытными животными. На графике отложена стандартная ошибка среднего.

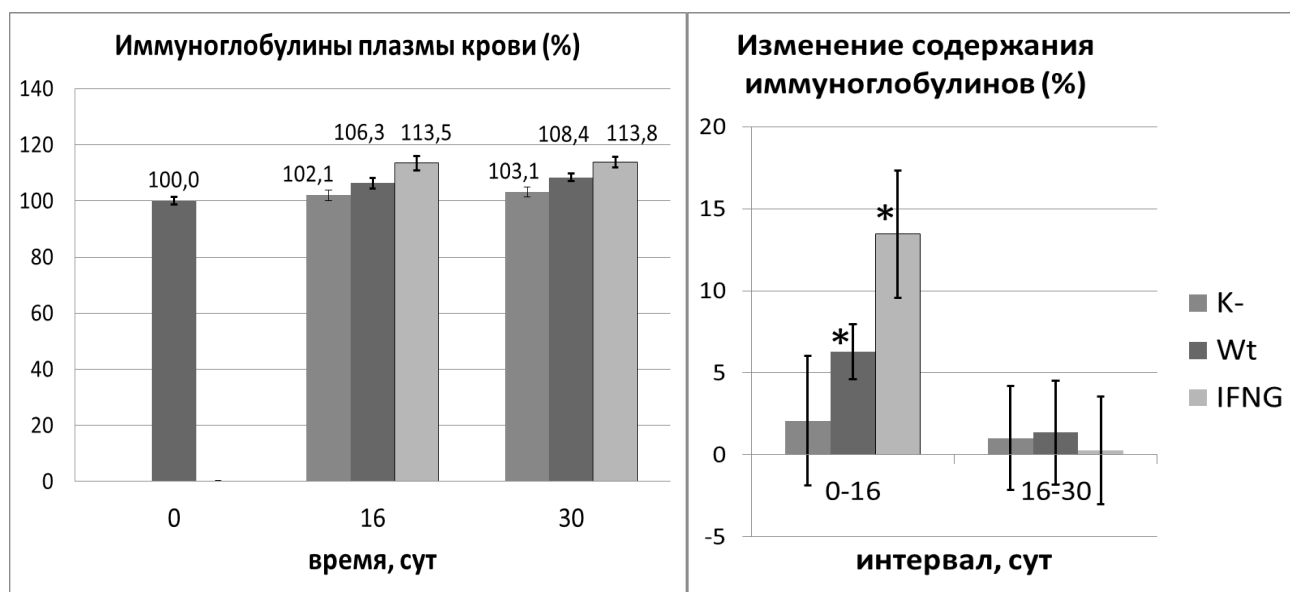


Рисунок 9. Действие недельной терапии белковыми экстрактами из трансгенных (IFNG) и нетрансгенных (Wt) растений табака, а также буфера белковой экстракции (K-), на общий уровень антител плазмы крови мышей. На графике отложена стандартная ошибка среднего. Символом * обозначены достоверные ($p < 0,05$) изменения.

Иммуноферментный анализ (ИФА) общего титра иммуноглобулинов плазмы крови

Ig M и Ig G начинают активно вырабатываться В-лимфоцитами при активации иммунитета в ответ на индукторы вирусной и бактериальной природы у всех видов млекопитающих. У человека пик IgG наблюдается на 28-30 день, у мыши – уже на 13-16 день после активации иммунного ответа.

В результате эксперимента методами анализа повторных измерений было выявлено достоверное повышение общего уровня Ig у мышей, получавших экстракт из трансгенных и нетрансгенных растений, на первом этапе эксперимента (0-16). Это может свидетельствовать о развитии реакции на белки и низкомолекулярные токсины табака. Хотя группа, получавшая экстракт трансгенных растений, демонстрирует наибольший прирост уровня Ig, достоверных различий между группами обнаружено не было. Однако подобный результат устойчиво повторяется в ходе нескольких экспериментов (Савельева и др., 2009, Burlakovskiy et al., 2015), что дает основания говорить о стимулирующем воздействии гамма-интерферона.

Анализ лейкоцитарной формулы крови животных

Обработаны 72 препарата мазков крови, взятых у подопытных животных на разных стадиях эксперимента (в день начала терапии, через 16 и 30 дней) (табл. 23, рис. 10).

Было показано статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение совокупного уровня базофилов и эозинофилов в начальный период в группах, получавших растительные экстракты, по сравнению с контрольной группой, получавшей чистый буфер экстракции (рис. 11). Это свидетельствует о развитии в течение 16 суток после начала терапии аллергических реакций на собственные растительные белки табака, что говорит о недостаточной очистке экстракта. При этом не наблюдается разницы между группами, получавшими экстракт трансгенного и нетрансгенного табака, что свидетельствует об отсутствии влияния гамма-интерферона на протекание аллергических реакций.

Во всех группах наблюдался достоверный спад уровня нейтрофилов (нейтропения) и увеличение содержания лимфоцитов (лимфоцитоз) в ходе эксперимента. Вероятнее всего, это физиологический лимфоцитоз, следствие кровопотери при отборе проб крови. При этом показано различие в характере изменений. У группы, получавшей экстракт табака, содержащий гамма-интерферон, изменения на 16 день более выражены, чем у контрольных групп, но к 30 дню после окончания терапии наблюдается тенденция к восстановлению исходного соотношения (повышение уровня нейтрофилов и спад уровня лимфоцитов), тогда как в контрольных группах характер изменений остается неизменным (рис. 12) (Burlakovskiy et al., 2015).

Табак показал себя не лучшим объектом для наработки рекомбинантных белков в силу большого содержания токсичных веществ. Это служит доводом в пользу дальнейшего получения продуцентов на базе съедобных растений, поскольку совершенствование технологий очистки рекомбинантного белка приведет к существенному усложнению и удорожанию процесса.

Таблица 23. Соотношение клеток крови различных типов у мышей на разных этапах эксперимента (%). * - достоверное уменьшение, ** - достоверное увеличение ($p < 0,05$).

	Буфер экстракции			Табак контроль			Трансгенный табак		
День	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

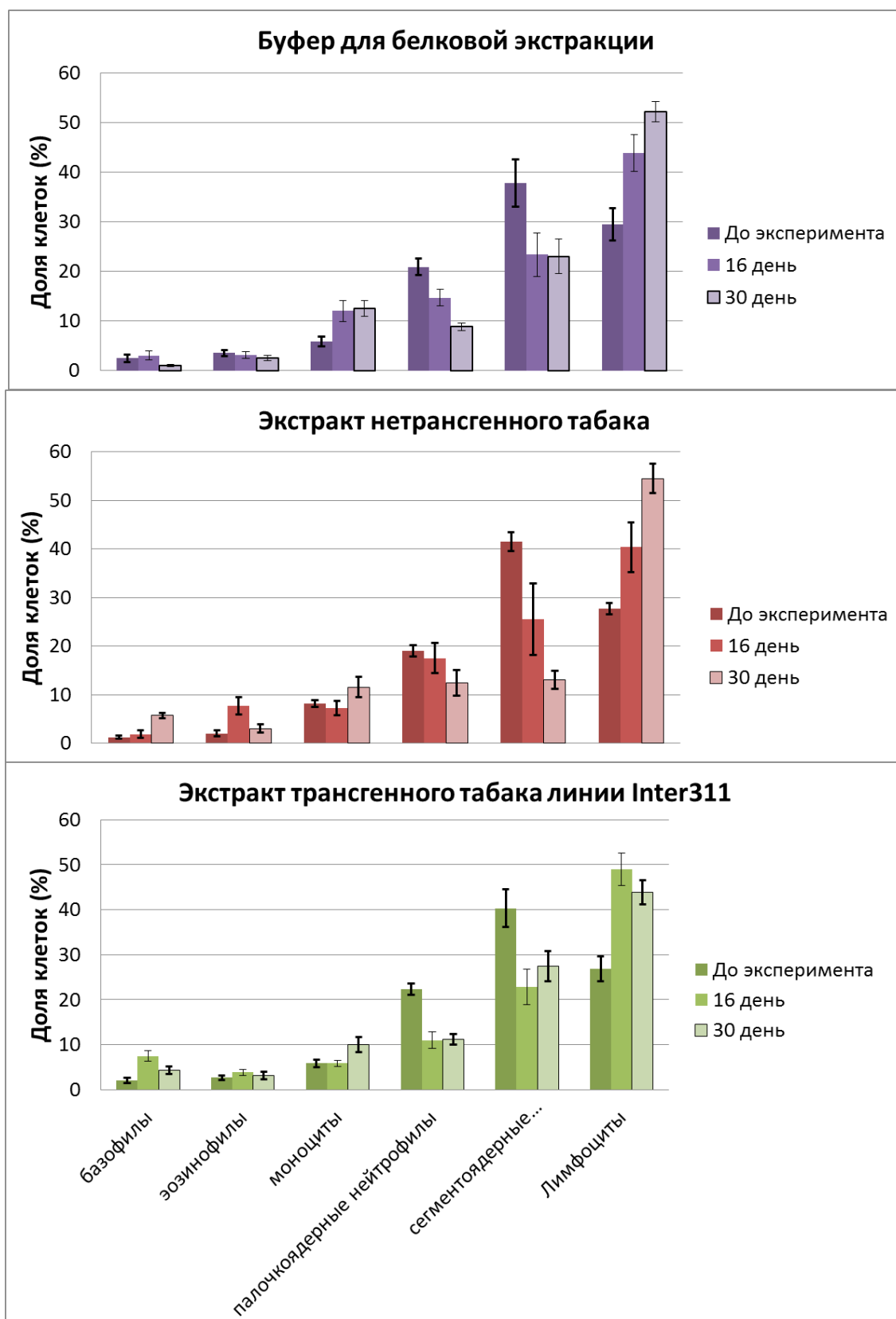


Рисунок 10. Соотношение клеток крови различных типов (%) у мышей трех групп, получавших различные экстракты, на разных этапах эксперимента. На графике отложена стандартная ошибка среднего.

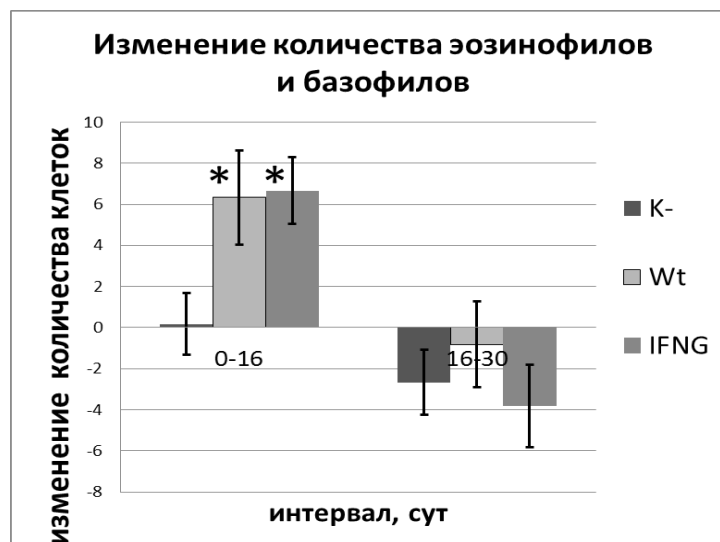


Рисунок 11. Изменение суммарного содержания эозинофилов и базофилов в крови животных под действием шестидневной терапии белковыми экстрактами трансгенных (IFNG) и нетрансгенных (Wt) растений табака, а также буфера белковой экстракции (K-). Символом * обозначены достоверные изменения ($p < 0,05$).

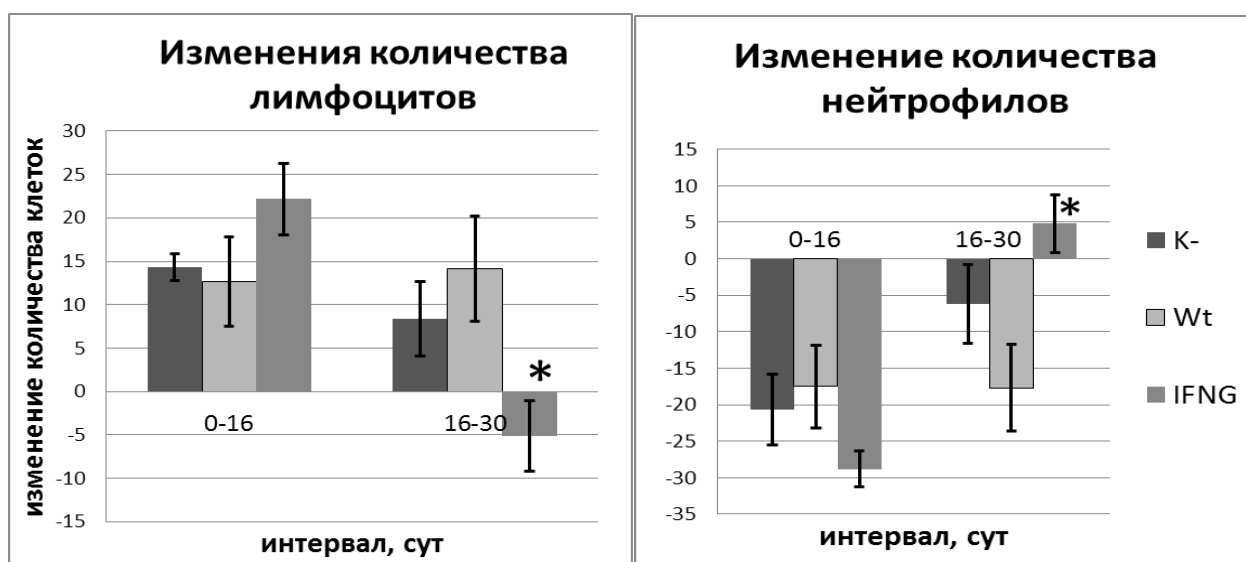


Рисунок 12. Изменение содержания лимфоцитов и нейтрофилов в крови животных под действием шестидневной терапии белковыми экстрактами трансгенных (IFNG) и нетрансгенных (Wt) растений табака, а также буфера белковой экстракции (K-). Символом * отмечен отличающийся характер изменений.

Таким образом, на первом этапе работы были получены доказательства биологической активности рекомбинантного белка, и подтверждена возможность производства функционального бычьего гамма-интерферона в тканях трансгенных растений-продуцентов. Также обнаружено, что экстракты рекомбинантного гамма-интерферона, выделенные из равных по массе навесок ткани растений линий Inter311 и InterB6, демонстрировали различную биологическую активность. Обе линии были получены в результате трансформации одной и той же трансгенной конструкцией, и поиск причины данных различий стал следующей задачей работы.

3.3. Причины различия в продуктивности между линиями растений табака Inter311 и InterB6

3.3.1. Последовательность Т-ДНК вставки у растений

Растения табака — основатели линий InterB и Inter311 были трансформированы штаммом *Agrobacterium tumefaciens* EHA105, несущим плазмиду pART27-INT6 (рис. 13) (Патент РФ №2564115), созданной на основе вектора pART27 (Gleave 1992). Область Т-ДНК, встраиваемая в геном растения, ограничена короткими последовательностями RB и LB (Right and left borders) и включает целевой ген *sIFNG* под контролем p35S промотора и терминатора октопинсинтазы OCST, и ген устойчивости к канамицину *nptII* (кодирующий неомицин фосфотрансферазу II) с промотором и терминатором нопалинсинтазы pNOS и NOST.

Первая гипотеза, объясняющая различия между растениями линий Inter311 и InterB6 в продукции рекомбинантного белка, связывала их с мутацией в целевом гене, которая могла возникнуть либо в процессе встраивания Т-ДНК в геном растения, либо позднее. Для проверки данной гипотезы было решено секвенировать трансгенные вставки обеих линий. К имеющимся в открытом

доступе последовательностям были подобраны праймеры, так что трансгенная вставка оказалась перекрыта фрагментами не более 1000 пар нуклеотидов (рис. 14).

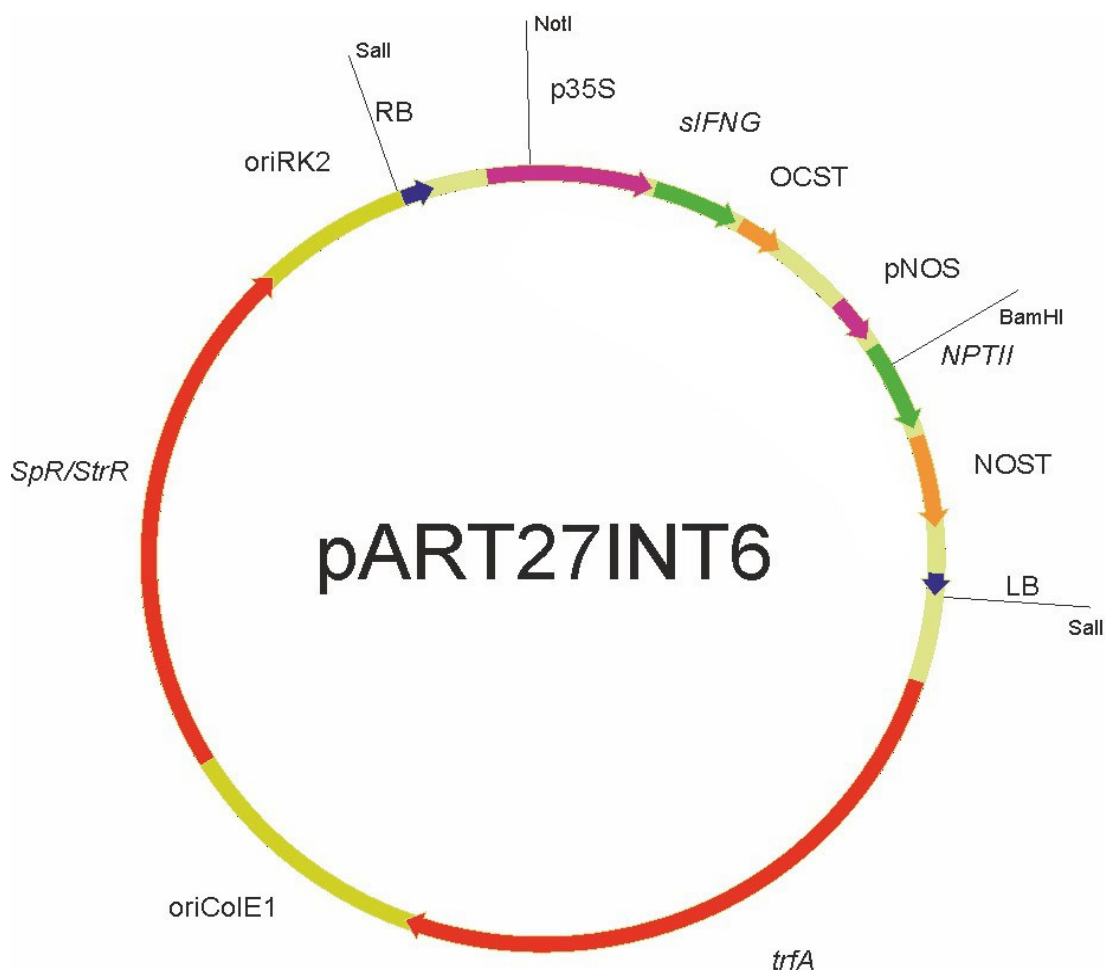


Рисунок 13. Схема плазмиды pART27-INT6

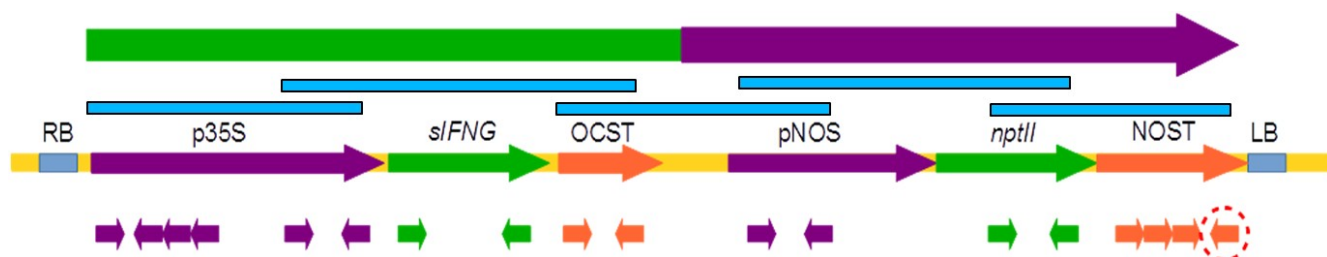


Рисунок 14. Структура Т-ДНК вставки, расположение секвенированных фрагментов и праймеров, один из которых (NOST_antiSP, обведен) показал различие между линиями 311 и B6.

В результате было показано, что трансгенные вставки растений 311.2.7.2-2 и B6.13.8-17 в исследованных районах были полностью идентичны друг другу и соответствующей области Т-ДНК плазмиды pART27-INT6 (Рис. 15). Не было обнаружено мутаций в последовательности гена *sIFNG*. Все функциональные последовательности демонстрировали 100% сходство с аналогами из баз данных *sIFNG* (GenBank: X07902.1).

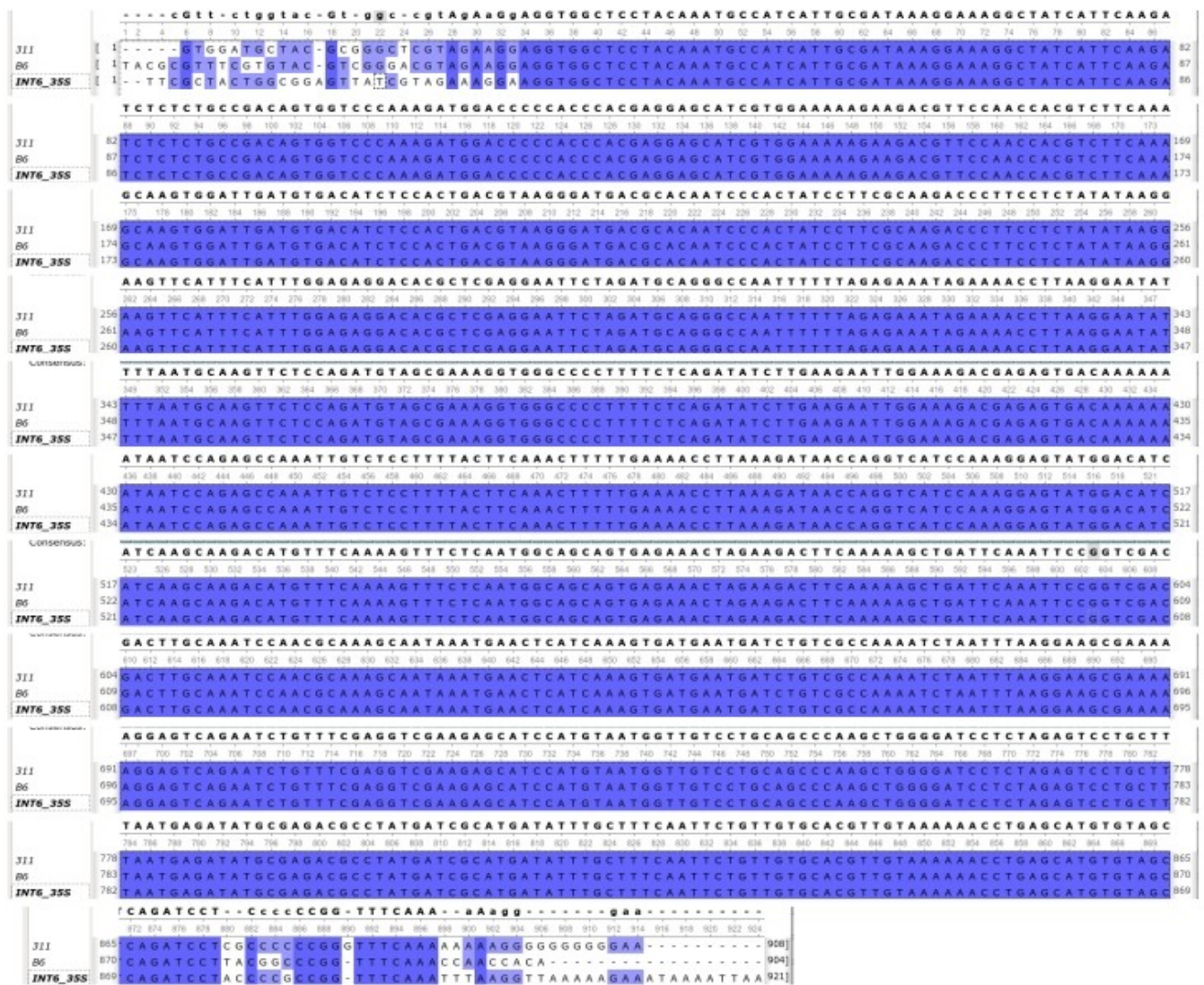


Рисунок 15. Сравнение последовательностей трансгенной вставки растений Inter311.2.7.2-2 и InterB6.13.8-17, а также плазмиды pART27-INT6. Фрагмент 35S_F – OCS_R. Концевые несоответствия – артефакты секвенирования.

Таким образом, не было обнаружено различий в последовательности Т-ДНК между растениями линий Inter311 и InterB6, которые могли бы объяснить разницу в биологической активности их экстрактов.

3.3.2. Поиск сайтов встраивания Т-ДНК

Следующая выдвинутая гипотеза объясняет различия между линиями InterB и Inter311 в продукции рекомбинантного белка интеграцией трансгена в районы генома с разной транскрипционной активностью.

Для секвенирования участков геномной ДНК табака, фланкирующих Т-ДНК вставки, использовался метод «прогулки по геному» FPNI-PCR. Были подобраны праймеры к участкам Т-ДНК, граничащим с правой и левой границами вставки (табл. 10). В качестве исходных использовались последовательности, полученные в результате секвенирования.

Вначале была проведена ПЦР с целью проверки праймеров (SPn – anti_SP). Для 35S она прошла успешно для обеих линий, однако не было обнаружено продуктов реакции NOST для линии Inter311. Таким образом, можно было сделать вывод, что в концевой части терминатора нопалинсинтазы линии Inter311 произошли перестройки. Тем не менее, поскольку для линии InterB6 в сходных реакциях были получены продукты ожидаемого размера, было решено провести FPNI-PCR для всех случаев. В результате были получены сиквенсы фрагментов размером до 968 п. н., включающие до 750 п. н. участки геномной ДНК табака.

С использованием BLAST найдены последовательности геномной ДНК табака, гомологичные обнаруженным. Установлено, что Т-ДНК в случае линии InterB6 встроилась в центромерный участок неопределенной хромосомы, в район повторов и ретротранспозонов (рис. 16). Данный вывод сделан на основе повторяющихся результатов FPNI-PCR с обоих концов Т-ДНК. Полученные сиквенсы фрагментов геномной ДНК соответствуют участкам последовательности NW_015800096.1 (NCBI Reference Sequence).

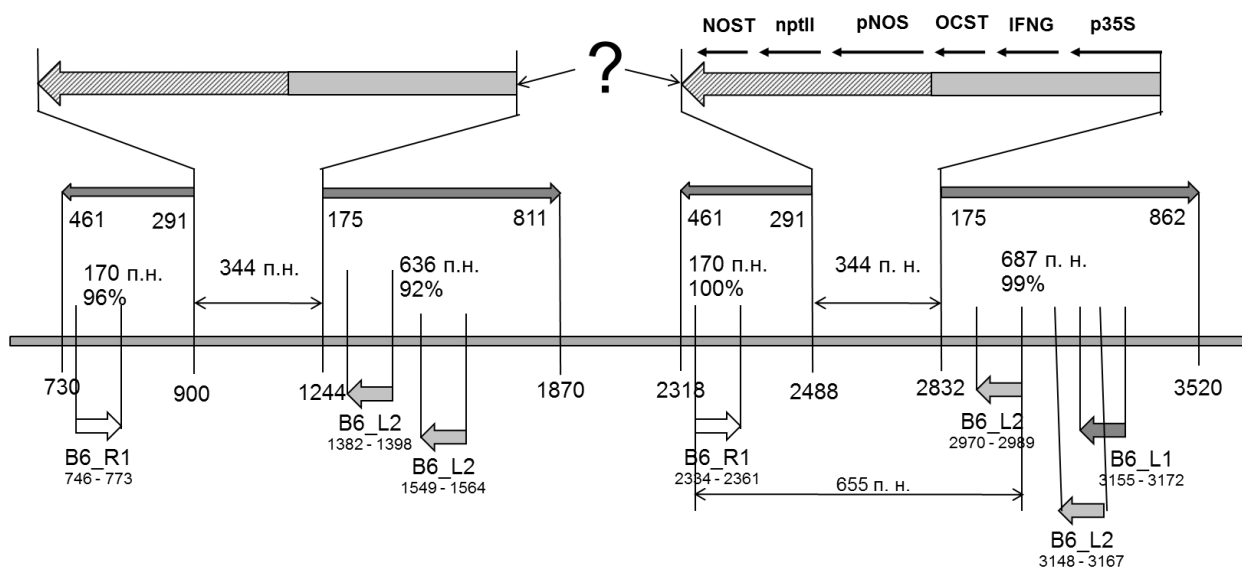


Рисунок 16. Структура вставки линии InterB6 в участок геномной ДНК табака NW_015800096.1. Указаны два возможных сайта встраивания. Цифрами обозначены номера нуклеотидов в последовательностях, длина совпадающих участков и % совпадений.

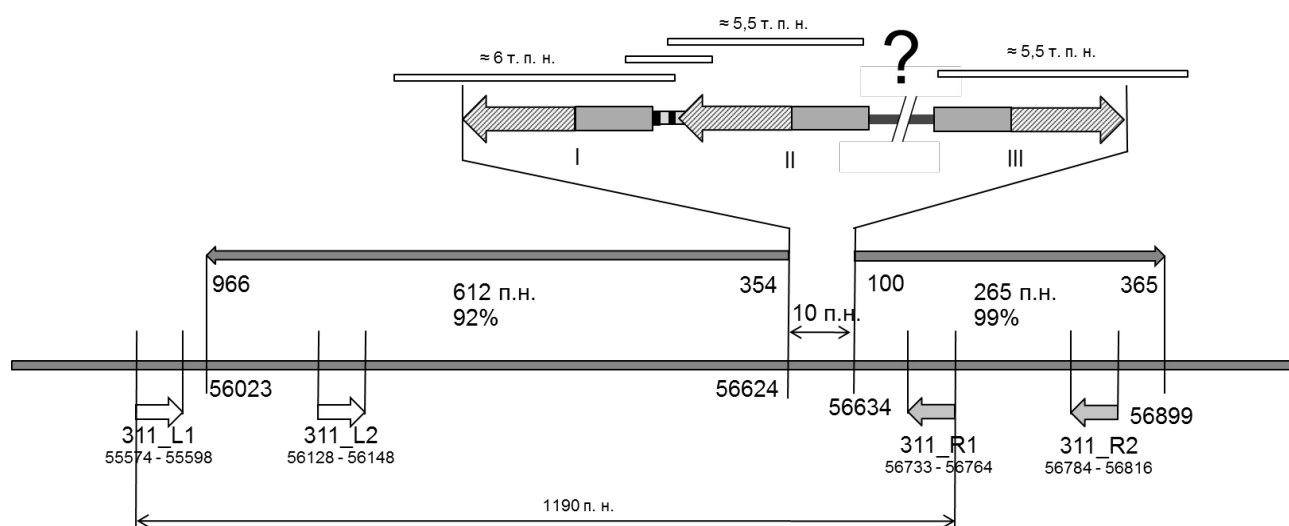


Рисунок 17. Структура вставки линии Inter311 в участок геномной ДНК табака NW_015801991.1 и подтверждающие ее ПЦР-фрагменты. Цифрами обозначены номера нуклеотидов в последовательностях, длина совпадающих участков и % совпадений.

В случае линии Inter311 встраивание произошло также в неопределенный, но более активный участок генома (рис. 17): в непосредственной близости расположены гены «*Nicotiana tabacum* 60S ribosomal protein L39-like» (LOC107799127), «eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M-like» (LOC107799143), «receptor-like protein kinase FERONIA» (LOC104086005) и «chloroplastic methylesterase 11» (LOC107799161). Стоит отметить, что встраивание не нарушило ни одну из открытых рамок считывания, т. е. не привело к событию Т-ДНК инсерционного мутагенеза.

Также в результате секвенирования граничных последовательностей было обнаружено, что линия Inter311 несет кластер как минимум из трех вставок в ориентации «хвост-к-хвосту—голова-к-хвосту» (рис. 17). ПЦР со специфичными праймерами подтверждает, что с геномной ДНК граничат только последовательности NOST, и в геноме присутствует соединение вставок «голова-к-хвосту».

Обращает на себя внимание различие в размерах инсерционных сайтов – в случае линии 311 Т-ДНК заместила всего 10 нуклеотидов геномной ДНК, в случае же линии InterB6 исчезло 344 нуклеотида исходной последовательности.

Для подтверждения правильности определения точек встраивания были подобраны праймеры к последовательностям геномной ДНК, фланкирующим инсерционные сайты обеих линий. ПЦР с праймерами для линии Inter311 показала, что соответствующий фрагмент (1092 п. н.) появляется в пробах нетрансгенного табака (Wt) и InterB6, но отсутствует в пробе Inter311, в которой между сайтами связывания этих праймеров встроился значительный по длине участок (Т-ДНК) (рис. 18). Данный факт подтверждает правильность определения сайта встраивания, а также то, что в геноме растений линии 311 не осталось немодифицированных копий данного участка, то есть линия гомозиготна по рекомбинантному гену.

Аналогичная реакция с праймерами для сайта встраивания линии InterB6 показала значительный уровень неспецифического связывания для всех образцов.

Это подтверждает встраивание вставки в район повторов и не дает возможности однозначно установить факт встраивания, как в случае растений линии 311. Сделать это удалось в ходе ПЦР с праймерами к участку геномной ДНК InterB6 (B6_R1) и участку Т-ДНК (Nost_SP2*) - амплифицированный фрагмент появился только в образце с ДНК линии InterB6 (рис. 18).

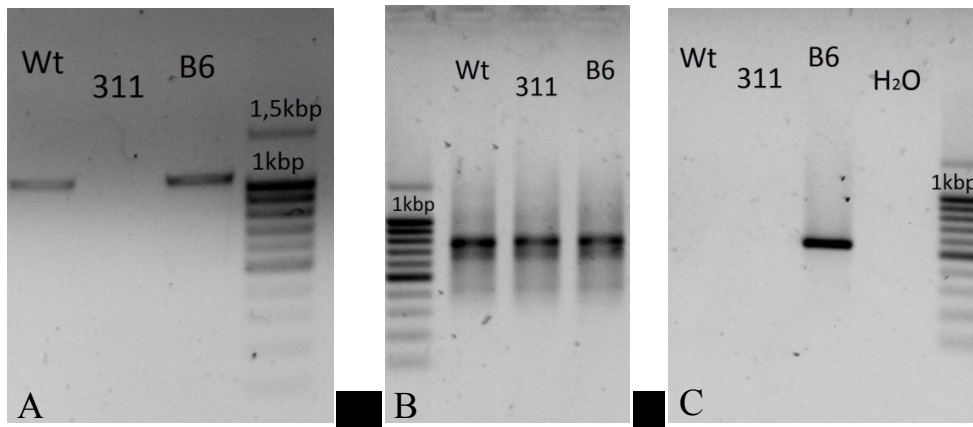


Рисунок 18. ПЦР-подтверждение сайта встраивания Т-ДНК в геном растений табака линий Inter311 и InterB6. А - праймеры 311_L1 — 311_R1. В - праймеры B6_L1 – B6_R1. С - праймеры B6_R1 – Nost_SP2*. Образец Wt – ДНК нетрансгенного растения табака, 311 и B6 — ДНК трансгенных растений.

В концевой части терминатора нопалинсинтазы линии Inter311 произошли перестройки, что было отмечено в ходе проверки праймеров для FPNI-PCR. В случае растений линии B6 присутствует полноразмерный терминатор NOST, отделенный от генома растения участком плазмидной ДНК, соответствующим укороченной левой границе LB. В случае линии 311 в обеих точках соединения Т-ДНК и геномной ДНК растения отсутствуют всякие следы LB, и участок комплементарности плазмидной ДНК оказался укорочен на 160-200 п. н. Наиболее интересно устроен сайт соединения двух вставок в ориентации «голова-к-хвосту»: участок Т-ДНК размером 91 п. н., включающий фрагмент NOST и LB, был развернут на 180 градусов (рис. 19). Данные перестройки не повлияли на функциональность терминатора NOST, судя по тому, что растения линии Inter311 успешно прошли этап канамициновой селекции.

Это соответствует имеющимся знаниям о механизме встраивания Т-ДНК в геном растения: при вырезании из Ti-плазмиды от RB остается фрагмент 3 п. н. LB сохраняется практически полностью (около 20 п. н.), но в момент достройки второй цепи Т-ДНК ферментами хозяина и интеграции в геном левая граница зачастую подвергается значительным перестройкам.

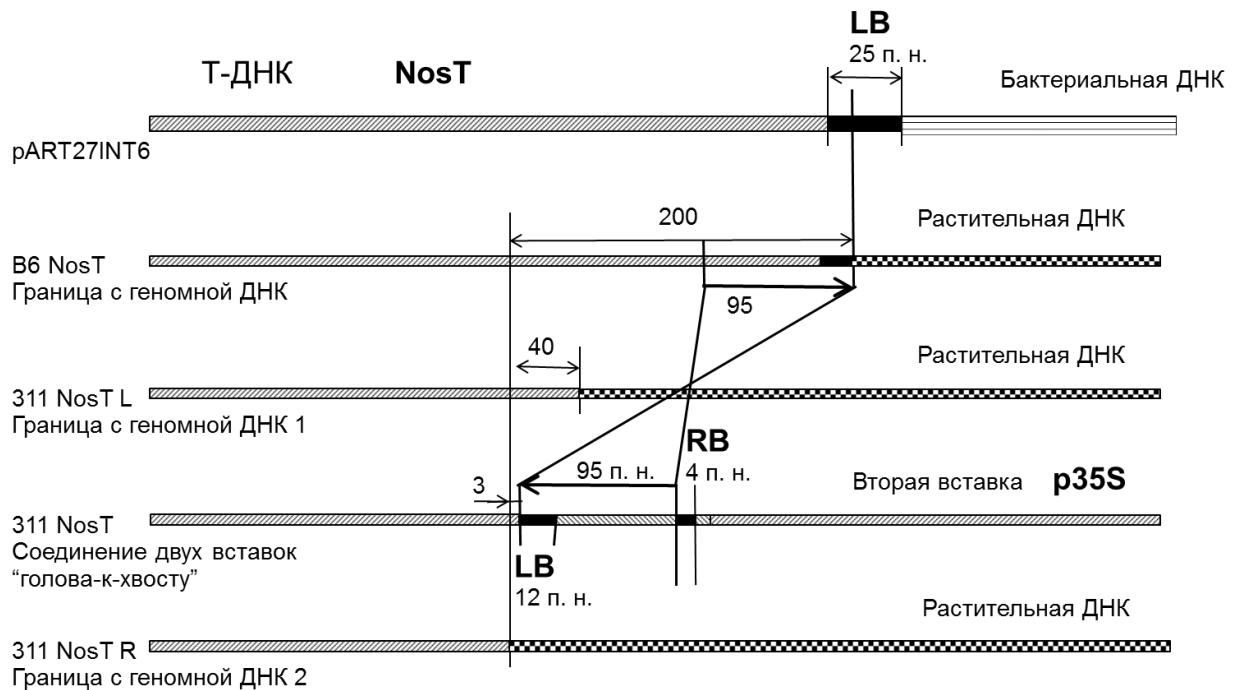


Рисунок 19. Схема границ Т-ДНК и геномной ДНК, а также точка соединения вставок линии 311.

Неизвестна структура соединения вставок «хвост-к-хвосту» - данный участок не удалось амплифицировать ни в ходе FPNI-PCR, ни стандартной ПЦР с праймерами 35Sm-SP. Это свидетельствует о включении между ними значительного участка неизвестной последовательности. Согласно литературным данным, известны случаи встраивания в геном трансгенного растения дополнительных последовательностей, образованных растительной и/или плазмидной ДНК (Логинова и др., 2010).

Таким образом, различия в продукции рекомбинантного белка линиями Inter311 и InterB6 связаны с разным количеством Т-ДНК вставок и встраиванием

их в регионы генома с разной транскрипционной активностью. Это необходимо учитывать в будущем при отборе растений-продуцентов.

3.4. Создание генетических конструкций для высокоэффективной тканеспецифичной экспрессии

Выбор промотора — важный этап создания трансгенной конструкции для синтеза рекомбинантного белка. Наиболее часто используются конститутивные промоторы: 35S промотор, полученный из вируса мозаики цветной капусты, и промотор убиквитина, выделенный из кукурузы. Основным преимуществом конститутивных промоторов является постоянная экспрессия гена во всех частях растения. Однако конститутивные промоторы отличаются низким уровнем экспрессии и часто подвергаются сайленсингу, в том числе по причине метилирования в процессе роста трансгенных растений (Lee et al., 2012). Поэтому с развитием биотехнологий все большее распространение получили методы, основанные на применении индуцибельных промоторов, которые активируются только при особых условиях, и тканеспецифичных промоторов, работающих в определенных органах растений.

В литературе описан промотор регуляторного гена *SRD1* батата (*Ipomoea batatas*), обеспечивающий экспрессию генов в подземных частях растения на уровне в 10 раз большем, нежели 35S промотор (Noh et al., 2012). Для данного промотора показана активность в корнях растений моркови и арабидопсиса, а также в клубнях картофеля.

Также в литературе было найдено описание промотора кукурузы pZmRCP-1, использованного для экспрессии в корнях синтетических пептидов для защиты от поражения нематодами (Onyango Et al., 2016).

Было решено использовать данные промоторы для дальнейших работ с растениями моркови-продуцентами гамма-интерферона животных.

3.4.1. Клонирование промотора pZmRCP-1 кукурузы

С использованием последовательностей праймеров из оригинальной статьи (Onyango Et al., 2016) удалось с первого раза амплифицировать нужный участок ДНК, что было подтверждено секвенированием (праймеры ZmRCP-1_F и ZmRCP-1_R, табл. 10; параметры температурных циклов: денатурация – 98°C, 10 с; отжиг праймеров – 62°C, 20 с; элонгация – 72°C, 60 с; 35 циклов). Была получена последовательность размером 2 т. п. н. После этого к концам последовательности методом ПЦР с праймерами ZmRCP-1-attN были добавлены attB-сайты для Gateway рекомбинации, и промотор успешно заклонирован в векторы ввода pDONRTM 4-1r и pDONRTM221, соответственно с получением плазмид pENTRTM 4,1:pZmRCP и pENTRTM 1,2:pZmRCP.

3.4.2. Клонирование промотора pIbSRD1 батата

В случае промотора батата последовательность была амплифицирована с помощью праймеров SRD1_F_61 и SRD1_R_3014 (параметры температурных циклов: денатурация – 98°C, 10 с; отжиг праймеров – 66°C, 20 с; элонгация – 72°C, 90 с; 35 циклов). Полученная последовательность размером 3 т. п. н. продемонстрировала 96% сходство с AY655162.1 (GenBank). В ходе следующей ПЦР с праймерами SRD1-attN к концам фрагмента были добавлены attB-сайты с дальнейшим получением векторов ввода pENTRTM 4,1:pSRD1 и pENTRTM 1,2:pSRD1.

3.4.3. Создание векторов для визуализации экспрессии методом Gateway

Первым этапом стала проверка функциональности полученных промоторов путем создания векторов для визуализации области экспрессии на базе вектора pBGWFS7, в котором исследуемый промотор регулирует экспрессию

репортерных генов глюкуронидазы (*GUS*) и зеленого флуоресцентного белка (*GFP*). Для создания целевой плазмиды использовали вектор назначения pBGWFS7 и полученные как указано выше векторы ввода pENTRTM 1,2:pSRD1 либо pENTRTM 1,2:ZmRCP (рис. 20). Таким образом были созданы плазмиды pBGWFS7:pSRD1 и pBGWFS7:ZmRCP.

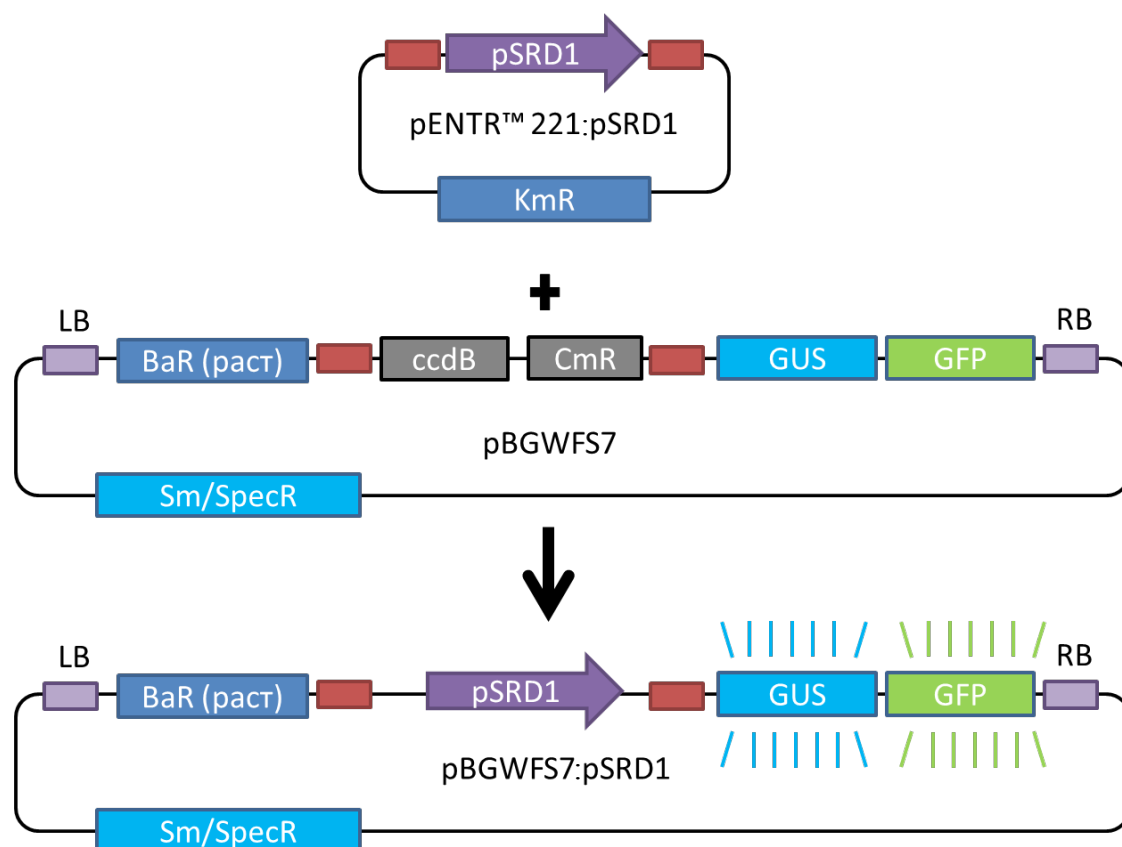


Рисунок 20. Создание векторов для визуализации области экспрессии промотора на примере pIbSRD1.

3.4.4. Создание векторов для синтеза бычьего гамма-интерферона

Вектора для наработки рекомбинантного белка в растениях создавали методом multi-site Gateway рекомбинации, с использованием трех векторов ввода (несущих промотор, целевой ген и терминатор) и вектора назначения pK43GW (рис. 21) (Wall et al., 2014). Полученные векторы подвергались проверке рестрикцией (рис. 22) и секвенированием.

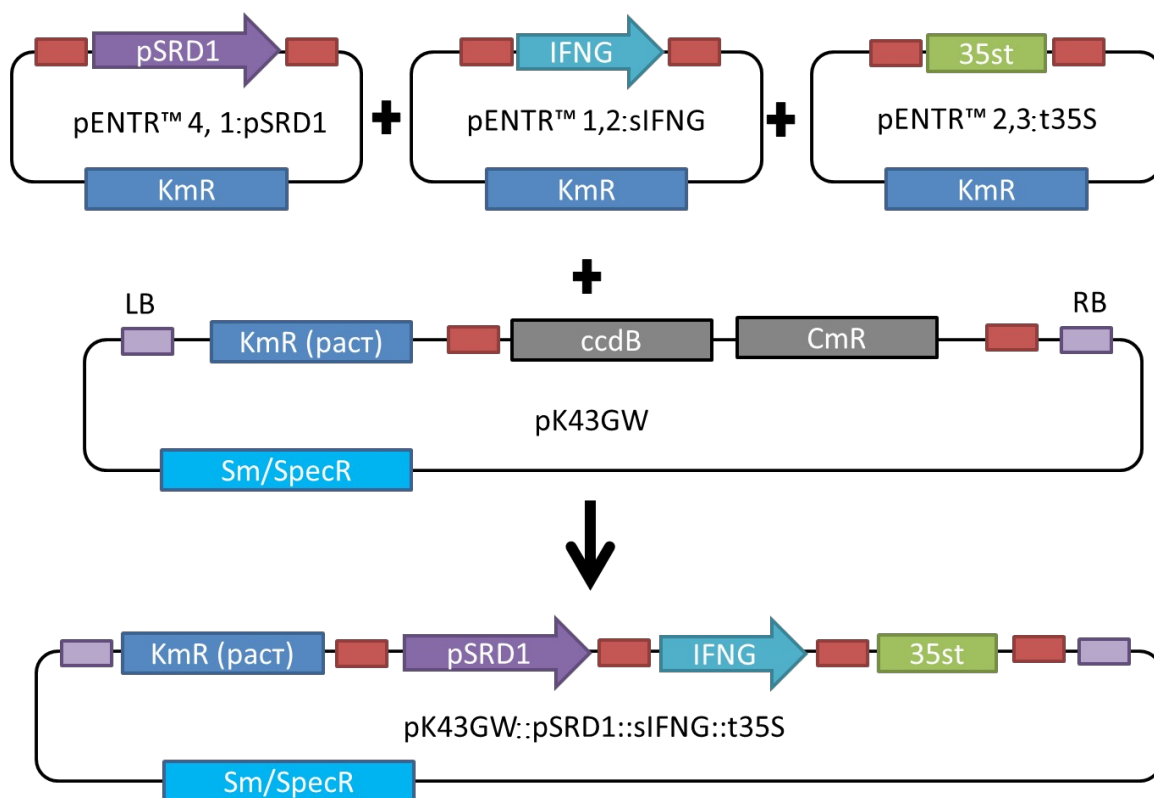


Рисунок 21. Создание вектора для синтеза бычьего гамма-интерферона в растениях под контролем промотора pIbSRD1.

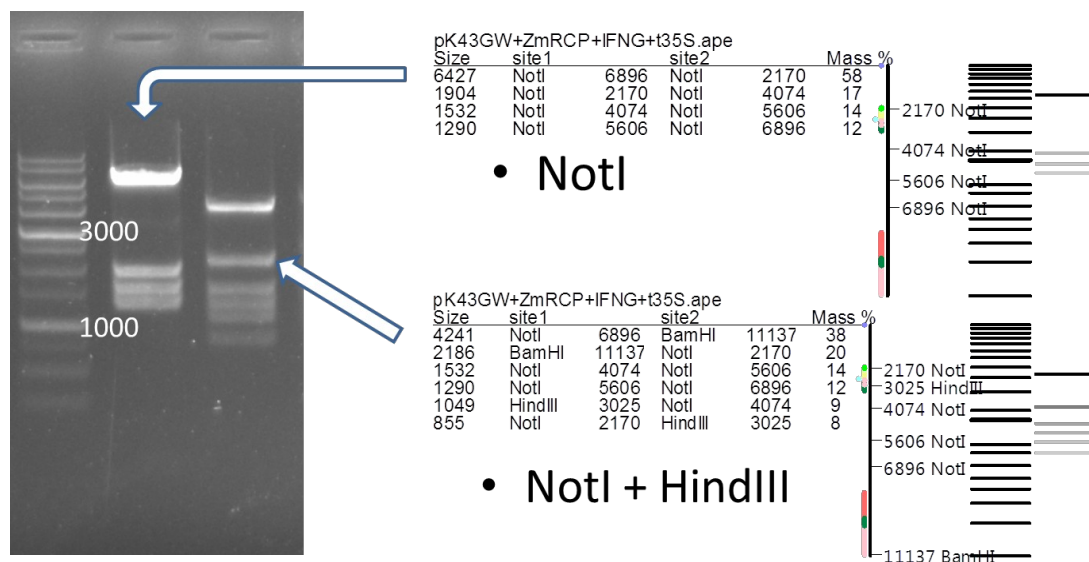


Рисунок 22. Проверка плазмиды pK43GW::ZmRCP::sIFNG::35St рестрикционным анализом. Сравнение практических результатов электрофореза и симуляции в программе ApE.

На основе данных векторов были созданы штаммы *A. rhizogenes*, использованные для трансформации корневых дисков моркови и получения «бородатых корней».

3.5. Создание трансгенных растений моркови в результате трансформации *A. rhizogenes*

3.5.1. Визуализация зон экспрессии промоторов pZmRCP-1 и pIbSRD1

Штаммами *A. rhizogenes*, несущими полученные векторы, трансформировали корневые диски моркови.



Рисунок 23. Инокулированные корневые диски моркови и «бородатые корни» на селективной среде.

На первом этапе использовали агробактерии, несущие векторы для визуализации области экспрессии промоторов 35S, pIbSRD1 и pZmRCP-1. Полученные «бородатые корни» (рис. 23) переносили на чашки Петри со средой MS^{1/2}, содержащей 500 мг/л цефотаксима для элиминации бактерий и 10 мг/л Basta[™] для селекции успешно трансформированных корней. Попытки обнаружить свечение зеленого флуоресцентного белка в «бородатых корнях», растущих на селективной среде, не увенчались успехом вследствие сильной фоновой засветки, предположительно создаваемой элементами клеточной стенки моркови. GUS-окрашивание принесло гораздо более четкий результат (рис. 24).

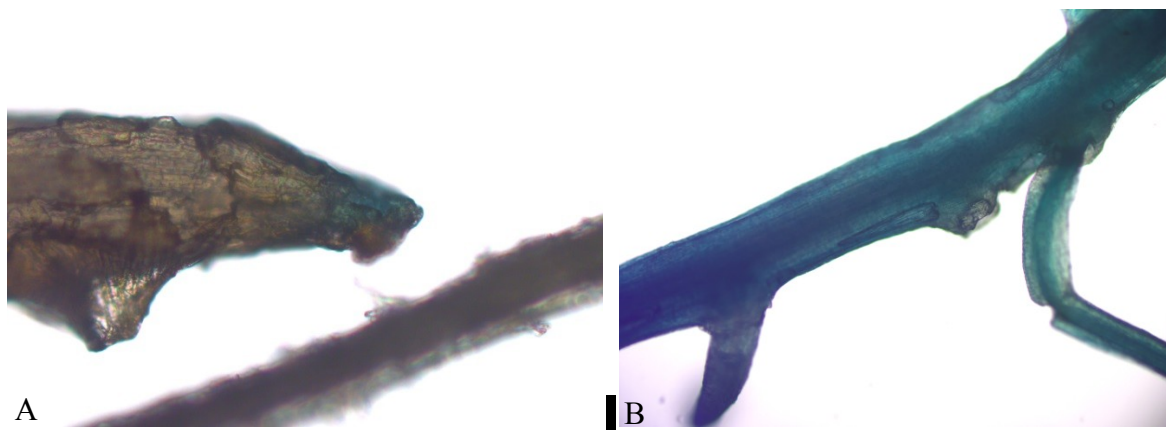


Рисунок 24. Результаты GUS-окрашивания трансгенных корней. Под контролем промотора pZmRCP глюкуронидаза экспрессируется только в кончике корня (А); промотор pIbSRD1 обеспечивает экспрессию во всех тканях корня (В).

В результате GUS-окрашивания было установлено, что ген под контролем промотора pIbSRD1 активно экспрессируется во всех тканях «бородатых корней», а под контролем pZmRCP-1 – только в кончиках корней. Таким образом, только промотор pIbSRD1 подходит для использования в данных растениях.

По результатам эксперимента было решено не использовать промотор pZmRCP-1 для дальнейших экспериментов в силу его значительно меньшей эффективности в сравнении с pIbSRD1.

3.5.2. Создание “бородатых корней” моркови, продуцирующих бычий гамма-интерферон

Вторым этапом стало получение трансгенных корней для наработки рекомбинантного гамма-интерферона быка. Использовали агробактерии, несущие векторы для синтеза гамма-интерферона pK43GW::pSRD1::sIFNG::35St (созданный впервые) и pKGW-MGW::p35S::sIFNG::35St (из коллекции лаборатории). Штамм с плазмидой pK43GW::ZmRCP::sIFNG::35St использован не был по результатам предыдущего эксперимента. Полученные «бородатые корни»

переносили на среду MS^{1/2}, содержащую 500 мг/л цефотаксима для элиминации агробактерий и 25 мг/л канамицина для отбора трансформантов.

Для сравнения эффективности промоторов 35S и pIbSRD1 в трансгенных корнях измеряли уровень экспрессии гена *sIFNG* по отношению к референсным генам актина и фактора элонгации 1-альфа. Использовали пары праймеров RTsIFNG-1-2 — RtsIFNG-2-2 для амплификации фрагмента гена *sIFNG*, и пары праймеров DC_ACT_F - R, DC_EF1A_F — R для амплификации референсных генов актина и фактора элонгации моркови (Tian C. et al., 2015). По результатам ПЦР в реальном времени было обнаружено, что уровень экспрессии интерферона в корнях, трансформированных конструкцией с промотором pIbSRD1, более чем в тысячу раз ниже, чем под контролем промотора 35S (рис. 25). Неоднократные повторения эксперимента не изменили результата.

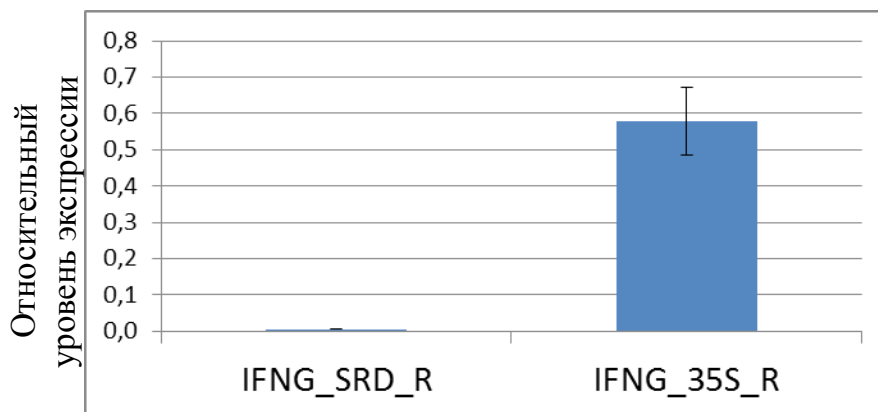


Рисунок 25. Результаты ОТ-ПЦР-РВ с праймерами к бычьему гамма-интерферону. Образцы — кДНК «бородатых корней», трансформированных конструкциями для синтеза гамма-интерферона под контролем промоторов pSRD1 и p35S. За единицу принят уровень синтеза референсного гена *ACT*.

Приведены значения стандартных отклонений.

Изучение последовательности плазмид для синтеза рекомбинантного интерферона не выявило мутаций в белок-кодирующей последовательности, но позволило обнаружить различия в последовательности промотора pIbSRD1 (рис.

26). Вероятно, именно с присутствием вставки размером 40 п. н. связана столь низкая активность промотора в векторе для синтеза интерферона.



Рисунок 26. Несовпадения в последовательности промотора pIbSRD1 из плазмид для визуализации области экспрессии (сверху) и плазмид для производства гамма-интерферона (снизу). Неактивная форма промотора отличается наличием вставки размером 40 п. н.

Чтобы определить, на каком этапе создания трансгенных конструкций произошло расхождение, была проведена ПЦР с праймерами SRD1_R_SP4 и SRD1_R_3014 (первый использовался для поиска концов промотора, второй – для его клонирования), окружающими район вставки (Рис. 27).

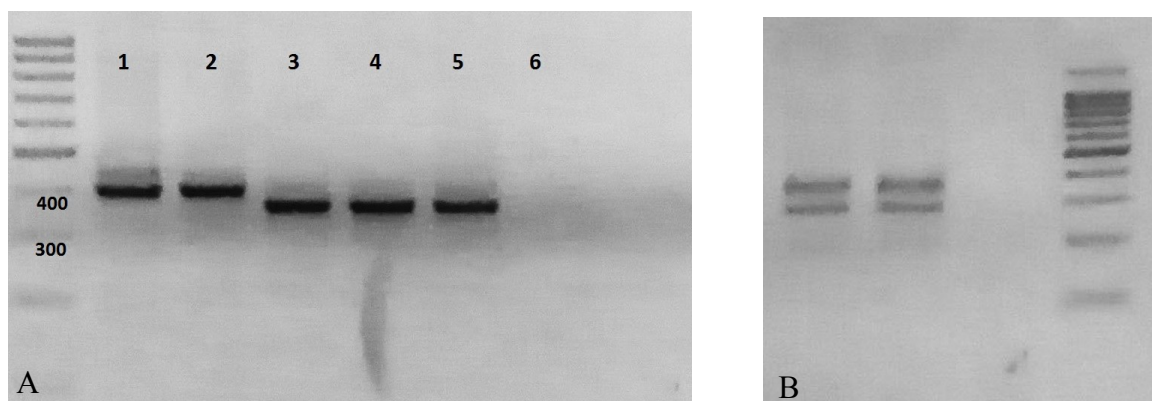


Рисунок 27. Детекция присутствия вставки 40 п. н. в промоторе pIbSRD1 методом ПЦР с праймерами SRD1_R_SP4 и SRD1_R_3014. Размер фрагмента 407 п. н. в случае присутствия вставки, 367 п. н. в случае ее отсутствия. А: образцы 1, 2 – плазмиды для синтеза гамма-интерферона; 3, 4, 5 – плазмиды для визуализации области экспрессии; 6 – отрицательный контроль (вода). В: результаты ПЦР с геномной ДНК батата.

Было обнаружено, что все плазмиды, относящиеся к векторам для визуализации экспрессии, несут промотор без вставки, а все плазмиды для синтеза интерферона – неактивную версию со вставкой. В геноме батата обнаружены обе формы, являющиеся либо паралогичными генами, либо аллелями одного гена.

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 в растениях на основе активной формы промотора pIbSRD1.

ГЛАВА 4. Обсуждение

4.1. Растения табака стабильно наследуют и экспрессируют бычий гамма-интерферон на протяжении пяти поколений

Генотип растения, подвергнувшегося трансформации, может быть определен как гемизигота, поскольку вставка содержится только в одной из гомологичных хромосом. Встроившийся в геном участок чужеродной ДНК наследуется доминантно в соответствии с законами Менделя. В результате самоопыления трансформантов наблюдается расщепление 3:1 в случае встраивания единственной копии чужеродного гена. Это справедливо и для некоторых полиплоидных видов растений, например, для табака (*Nicotiana tabacum*), который является автополиплоидом и содержит тетраплоидный набор хромосом (Грант, 1989). Таким образом, анализируя расщепление в первом поколении T_1 , возможно выделить изначальных трансформантов T_0 , несущих одну трансгенную вставку (по расщеплению 3:1), анализ же расщепления в поколении T_2 позволяет отобрать гомозиготные особи T_1 , все потомки которых от самоопыления несут гетерологичный ген. Гомозиготизация линии Inter311 произошла в 3 поколении, линии InterB — в четвертом.

Результаты проверки наследования и экспрессии привнесенного гена в растениях табака 4-5 поколений полностью совпадают с ожидаемыми, учитывая, что линия Inter311.2.7 начиная с 3 поколения является гомозиготной. Появление растений, не несущих трансгенную вставку, характерно для первых поколений отбора, где это объясняется как рекомбинацией, так и случаями, когда чужеродная ДНК, попав в ядро, не интегрировалась в геном.

Потеря активности трансгенной вставки может свидетельствовать о появлении в ней мутации. Подобные события, при которых чужеродная ДНК при встраивании в геном претерпевает существенные перестройки, возникают достаточно часто и приводят либо к полной инактивации гетерологичного гена, либо к снижению его экспрессии (Глик, Пастернак, 2002). Причиной подавления

активности функционального гетерологичного гена также может быть сайленсинг – результат работы растительной системы противостояния экспрессии чужеродной ДНК, в первую очередь вирусной; вероятность ее активации резко возрастает при наличии в трансгенной вставке участка 100-300 пар оснований, гомологичного гену реципиента, либо при встраивании множества копий чужеродного гена на один геном (Маренкова и др., 2012; Маренкова, Дейнеко, 2015). Сайленсингу часто подвергаются конструкции, включающие конститутивные промоторы, экспрессирующиеся на низком уровне во всех тканях независимо от внешних условий (Lee et al., 2012). В случае исследованных растений полной потери экспрессии вставки обнаружено не было.

4.2. Рекомбинантный бычий гамма-интерферон растительного происхождения проявляет биологическую активность

Воспроизведение последовательности аминокислот рекомбинантного белка не гарантирует его функциональности, учитывая, что его созревание происходит в чужеродном метаболическом окружении. Так, гамма-интерферон в норме состоит из двух одинаковых субъединиц, и вопрос его адекватной сборки в растительном организме остается открытым. Впрочем, по литературным данным, интерлейкин-12, состоящий из двух различающихся мономеров, был синтезирован на уровне более 5% от тотального растворимого белка после процедуры двойной агроинфильтрации листьев *Nicotiana benthamiana* двумя штаммами *Agrobacterium*, каждый из которых индивидуально кодировал одну субъединицу (Medrano et al., 2009).

Рекомбинантный гамма-интерферон растительного происхождения доказал в эксперименте на культуре клеток противовирусную активность, сравнимую с коммерческим препаратом интерферона, наработанным в бактериях. Препарат тканей растений линии Inter311, подвергнутых заморозке, практически утратил противовирусную активность. Таким образом, замораживание растений-

продуцентов бычьего гамма-интерферона не может быть использовано для их хранения перед очисткой – белок необходимо выделять из свежей зеленой массы.

У опытной группы лабораторных животных, получавшей экстракт трансгенного табака, наблюдали более острый ответ на физиологическое воздействие (ускоренный переход от неспецифичного нейтрофильного ответа к специфичному лимфоцитарному) и ускоренную адаптацию (тенденцию к восстановлению исходного соотношения нейтрофилов и лимфоцитов на 30 день эксперимента), что может быть следствием стимулирующего воздействия гамма-интерферона (рис. 12). Группы, получавшие экстракт растений, как трансгенных, так и нетрансгенных, демонстрировали отличия от контрольной группы, получавшей чистый буфер белковой экстракции. У них повышался титр иммуноглобулинов плазмы крови и совокупное содержание эозинофилов и базофилов, что свидетельствует об аллергической реакции на растительные белки табака (рис. 9, 11).

Была подтверждена принципиальная возможность производства в трансгенных растениях биологически активного бычьего гамма-интерферона и его перорального применения. Однако использование существующих растений затруднено из-за необходимости выделения и очистки действующего вещества. Получение высокоочищенных препаратов рекомбинантного белка из растений табака возможно, в частности, с применением аффинной хроматографии (Rybicki, 2014). Однако это приведет к значительному усложнению и удорожанию процесса. Наилучшим решением будет полностью избавиться от процедуры выделения и очистки искомого соединения, путем создания съедобных растений-продуцентов. Второй обнаруженной проблемой является низкий уровень синтеза целевого белка. Максимальная достигнутая противовирусная активность составила 32 международных единицы (МЕ) на грамм растительной ткани. Для достижения терапевтической дозы в миллионы МЕ (Симбирцев, 2013) потребуется переработать около сотни килограммов зеленой массы табака. Таким

образом, желательно повысить уровень накопления рекомбинантного белка в тканях растений.

4.3. Разница в продуктивности между линиями табака обусловлена разными сайтами встраивания и многокопийной встройкой

Для коммерческого применения важное значение имеет стабильность концентрации действующего вещества в используемом материале. Хотя интерфероны способны действовать в крайне малых концентрациях и практически не имеют максимальной летальной дозы (Хрянин, Решетников, 2015), желательно обеспечить однородность свойств растений-продуцентов.

Первой гипотезой, объясняющей различия между растениями линий Inter311 и InterB6 в уровне продукции рекомбинантного белка, стала мутация в целевом гене. Процесс встраивания Т-ДНК в геном хозяина нельзя назвать точным, он зачастую сопровождается сложными перестройками (Singer, 2018). Однако в результате секвенирования центральной части трансгенных вставок обеих линий не было обнаружено различий в последовательности Т-ДНК.

Вторая гипотеза объясняет различия в продуктивности трансгенных вставок их интеграцией в разные участки генома. Проверка данной гипотезы требовала локализации сайтов встраивания трансгенных вставок в обеих исследуемых линиях, что было исполнено с применением метода FPNI-PCR, позволившего получить сиквенсы участков геномной ДНК, фланкирующих трансгенные вставки. Анализ полученных последовательностей показал, что в случае линии Inter311 встраивание действительно произошло в транскрипционно активный регион генома. Для линии B6 обнаружено встраивание вставки в район центромерных повторов. Полученные данные подтвердили гипотезу встраивания Т-ДНК в участки генома с различной транскрипционной активностью, что может объяснять больший уровень наработки рекомбинантного белка в растениях линии Inter311.

Инсерции трансгена в геном могут быть представлены в виде как одно-, так и многокопийных встроек, состоящих из нескольких копий Т-ДНК в различной ориентации. Особи со столь тесно сцепленными вставками по расщеплению в потомстве ничем не отличаются от особей, несущих единственную встройку. Хотя присутствие нескольких копий гена теоретически повышает уровень синтеза белка, у растений с подобными сложно организованными вставками экспрессия трансгена зачастую снижена (Логинова и др., 2010).

Анализ последовательностей, наработанных в ходе FPNI-PCR, действительно показал, что вставка линии 311 имеет сложную тримерную структуру и состоит из трех идентичных копий Т-ДНК в ориентации «хвост-к-хвосту – голова-к-хвосту». Несмотря на то, что многокопийная вставка могла спровоцировать сайленсинг (Логинова и др., 2010), этого не произошло. Таким образом, встраивание в транскрипционно активную часть генома имеет большее значение, чем потенциальный эффект сайленсинга вследствие многокопийной встройки.

Обнаружены сложные перестройки в концевом регионе NOST вставки Inter311. Маловероятно, что они влияют на функциональность целевого гена гамма-интерферона. Возможно, данные перестройки являются следствием ошибок системы репарации растения в ходе встраивания Т-ДНК, которые привели к кластерной структуре трансгена.

В целом, результаты сложно назвать необычными, поскольку встраивание Т-ДНК в геном зачастую сопровождается перестройками (Логинова и др., 2010, Kleinboelting et al, 2015). В дальнейших экспериментах по получению растений-продуцентов анализ сайта встраивания и числа копий Т-ДНК будет проводиться на ранних этапах селекции. Оптимальным считается присутствие в геноме растения единственной трансгенной вставки, встроившейся в транскрипционно активный участок генома (Šubr et al. 2006; Głowacka et al., 2016).

4.4. Промотор pIbSRD1 может быть использован для получения растений-продуцентов

Немало исследований посвящено поиску гетерологичных промоторов, которые бы обеспечивали высокий уровень экспрессии генов интереса. Наиболее известны конститутивный промотор вируса мозаики цветной капусты (CaMV) 35S и агробактериальные промоторы нопалинсинтазы (nos) и маннопинсинтазы (mas). Повышение эффективности p35S достигается такими методами, как присоединение к нему энхансера ноктопинсинтазы, либо использованием двух и более слитых p35S. Также известен промотор убиквитина арабидопсиса (*Arabidopsis* sp.) (UBQ3), промотор убиквитина кукурузы ubi-1 несколько менее эффективен (Baranski et al., 2019).

Более современные исследования посвящены поиску тканеспецифичных, в частности корнеспецифичных, промоторов. Происходящий из *A. rhizogenes* промотор гена *rolD* вчетверо эффективнее работает в корнях моркови, чем в листьях, но даже там он 15-18 раз менее эффективен, чем d35S. Похожими характеристиками обладает промотор агропинсинтазы. Более эффективны промоторы из других растений: pDJ3S запасного белка ямса (*Dioscorea japonica*) и pMe1 промотор гена маниока (*Manihot esculenta*) с неизвестной функцией. pMe1 демонстрирует в корнях моркови сходный уровень активности с 35S и вдвое меньшую активность в иных тканях. pDJ3S вдвое более эффективен, чем 35S, в корне и всемерно слабее проявляется в других органах. pDJ3S работает в первую очередь во вторичной ксилеме, pMe1 обеспечивает экспрессию во всех тканях корня кроме ксилемы (Baranski et al., 2019).

Наибольший интерес представляет ауксин-зависимый промотор гена батата (*Ipomoea batatas*) *SRD1*. Продукт гена *SRD1* – это транскрипционный фактор, содержащий MADS-box домен. Промотор pIbSRD1 демонстрирует в корнях моркови активность, десятикратно превышающую 35S, и не активен в надземных органах растения (Baranski et al., 2019; Noh et al., 2012). Таким образом, он

выглядит перспективным для создания растений моркови – продуцентов рекомбинантных белков.

Морковь *D. carota* в настоящее время является самым известным видом растений для производства фармацевтических препаратов. С использованием трансгенной моркови были получены более десяти вакцина против кори, вируса гепатита В (HBV), вируса иммунодефицита человека, *Y. pestis*, *Chlamydia trachomatis*, туберкулеза, *Corynebacterium diphtheria*, *Clostridium tetani*, *Bordetella pertussis* и *Helicobacter pylori*, находящиеся на разных стадиях испытаний и применения (Rosales-Mendoza, Tello-Olea, 2015).

Экспериментальная проверка показала, что промотор pIbSRD1 обеспечивает экспрессию белков не только в корнях полноценных растений, но и в «бородатых корнях» моркови, и может быть использован для создания эффективных растений-продуцентов.

4.5. Существуют две формы промотора pIbSRD1, различающиеся по активности.

Активность промотора pIbSRD1 в «бородатых корнях» моркови была продемонстрирована путем экспрессии под его контролем гена *GUS*. Однако синтезировать гамма-интерферон под контролем данного промотора не удалось, поскольку в плазмиды для продукции рекомбинантного белка попала неактивная версия промотора, отличающаяся присутствием фрагмента размером 40 п. н. Данное событие произошло вследствие существования в геноме батата нескольких аллельных форм, либо паралогичных копий данного промотора. Это возможно, учитывая сложную структуру генома батата, гексаплоидность и большое количество хромосом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результатом работы стало подтверждение сохранения трансгенной вставки в геноме трансгенных 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, различавшаяся для двух исследованных линий.

Проведено секвенирование трансгенной вставки, подтвердившее отсутствие в рекомбинантном гене мутаций. Обнаружено, что причиной различий двух линий табака по активности рекомбинантного белка стало встраивание трансгенной вставки в разные районы генома и в разных количествах.

Для дальнейших экспериментов с высокоэффективными растениями-продуцентами клонирован промотор гена *SRD1* батата (*Ipomoea batatas*), способный обеспечить высокий уровень экспрессии трансгена в подземных частях растений.

Полученные результаты предполагают продолжение исследований по следующим направлениям:

1. Использование активной формы промотора pIbSRD1 для получения «бородатых корней» и целых трансгенных растений-продуцентов интерферона.
2. Сравнение эффективности промоторов pIbSRD1 и p35S.
3. Создание трансгенных конструкций с укороченным геном бычьего интерферона, менее подверженным ферментативным воздействиям, и сравнение эффективности экспрессии и биологической активности с полноразмерным интерфероном;
4. Получение растений-продуцентов гамма-интерферона курицы (*Gallus gallus*) на основе люцерны (*Medicago* sp.)

ВЫВОДЫ

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

1.1. Трансгенная вставки 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. В тканях исследованных растений присутствует рекомбинантный белок бычий гамма-интерферон.

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 неспецифичного нейтрофильного ответа к специфичному лимфоцитарному), при этом не влияет на скорость набора массы и не вызывает в организме лабораторных мышей патологических изменений.

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 центромерный участок, в район повторов и транспозонов.

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 *SRD1*, 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 сокращений

CTAB – цетил триметил аммоний бромид

EDTA – этилен диамин тетрауксусная кислота

GAPDH – ген глицеральдегидфосфат-дегидрогеназы

Ig – иммуноглобулины

Km – канамицин

LB – среда Lysogeny broth для выращивания бактерий

MS0 – среда Мурасиге-Скуга

MS20 – среда Мурасиге-Скуга с содержанием сахара 20 г/л

MS^{1/2} - среда Мурасиге-Скуга с половинным содержанием компонентов

sIFNG – синтетический ген бычьего гамма-интерферона

Sp/Str – спектиномицин/стрептомицин

Г-КСФ – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор

ГМ-КСФ – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

ИФА – иммуноферментный анализ

ИФН – интерферон

ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с кДНК, полученной с помощью реакции обратной транскрипции

ПАА, ПААГ – полиакриламидный гель

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ – ПЦР в реальном времени

Т-ДНК – фрагмент плазмидной ДНК, переносимый в геном растения в ходе агробактериальной трансформации

ТЦД₅₀ — тканевая цитопатогенная доза вируса, поражающая 50% чувствительных объектов

ЭПО – эритропоэтин

Список литературы

1. Авдеева, Ж. И. Иммуноадьювантный эффект цитокинов / Ж. И. Авдеева, Н. А. Алпатова, С. Е. Акользина, Н. В. Медуницын // Тихоокеанский медицинский журнал. - 2009. - № 3. – С. 19-21.
2. 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]
3. Гланц С. Медико-биологическая статистика. / С. Гланц. - Москва: Практика, 1999. - 462 с.
4. Глик Б. Молекулярная биотехнология: принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. - 591 с.
5. Градобоева А. Е. Изучение влияния продукции гетерологичного белка на физиологическое состояние дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris* / А. Е. Градобоева, М. В. Падкина // Вестник СПбГУ. - 2008. - сер. 3. - № 2. - С. 58-63.
6. Грант В. Эволюционный процесс / В. Грант. - М.: Мир, 1989. – 589 с.
7. Дейнеко Е. В. Генетически модифицированные растения — продуценты белков медицинского назначения / Е. В. Дейнеко // Вестник Томского государственного университета. Биология. - 2012. - № 2. - С. 41-51.
8. Дейнеко Е. В., Загорская А. А. Растительные системы экспрессии в качестве продуцентов рекомбинантных фармацевтически ценных белков / Е. В. Дейнеко, А. А. Загорская // Вавиловский журнал генетики и селекции. - 2017. - 21(8). - С. 979-985.

9. Дейнеко Е.В. Т-ДНК индуцированные мутации у трансгенных растений / Е.В. Дейнеко, А.А. Загорская, В.К. Шумный // Генетика. - 2007. - Том 43. - С. 5-17.
10. Долсон Р. Справочник биохимика / Р. Долсон, Д. Эллиот, У. Эллиот, К. Джонс. - Москва: Мир, 1991. – 386 с.
11. Дрейпер Дж. Генная инженерия растений / Дж. Дрейпер, Р. Скотт, Ф. Армитидж, Р. Уолден. – М.: Мир, 1991. - 408 с.
12. Ершов Ф.И. Система интерферона в норме и при патологии. / Ф. И. Ершов. - М.: Медицина, 1996. - 240 с.
13. Карабельский А. В. Очистка химерного белка альбурона16 из культуральной среды дрожжей *Pichia pastoris* / А. В. Карабельский, М. В. Падкина // Прикладная биохимия и микробиология. - 2012. - Т. 48. - № 4. - С. 457-462.
14. Карабельский А. В. Создание штаммов дрожжей *Pichia pastoris* продуцентов химерных белков «альбумин-интерлейкин-2» и «альбумин-интерферон-α16». / А. В. Карабельский, Ю. Г. Зиновьева, М. Н. Смирнов, М. В. Падкина // Вестник СПбГУ. - 2009. - сер. 3. - № 2. - С. 53-63.
15. Катохин А. В. миРНК — новые регуляторы активности генов у эукариот / А. В. Катохин, Т. Н. Кузнецова, Н. А. Омелянчук // Вестник ВОГиС. - 2006. - Т. 10. - С. 241-272.
16. Леднева А.В. Цитокилотерапия в клинической практике / А. В. Леднева, С. Н. Стяжкина, М. Л. Черненкова, Т. А. Борисова и др. // Современные проблемы науки и образования. – 2011. – № 6. DOI: 10.17513/spno.2011.6
17. Логинова Д. Б. Особенности организации Т-ДНК встройки у трансгенных растений табака линии NU 21 / Д. Б. Логинова, В. К. Шумный, Е. В. Дейнеко // Вестник ВОГиС. - 2010. - Том 14. - С. 134-140.
18. Лутова Л.А. Биотехнология высших растений / Л.А. Лутова. - Санкт-Петербург: СПбГУ, 2010. - 240 с.

19. Маренкова Т. В. Мозаичный характер экспрессии трансгенов у растений / Т. В. Маренкова, Д. Б. Логинова, Е. В. Дейнеко // Генетика. - 2012. - Том 48. - С. 293-306.
20. Маренкова Т. В. Трансгенные растения как модели для изучения эпигенетической регуляции экспрессии генов / Т. В. Маренкова, Е. В. Дейнеко // Вавиловский журнал генетики и селекции. - 2015. - Том 19. - №5. - С. 545-551.
21. Матвеева Т. В. Биологические особенности природно-трансгенных растений и их роль в эволюции / Т. В. Матвеева, С. В. Сокорнова // Физиология растений. – 2017. - Том 64. - № 5. - С. 323–336
22. Никитина Т. Н. Иммуноадьювантное действие цитокинов / Т. Н. Никитина, Ж. И. Авдеева // Биопрепараты. - 2008. - №1. - С. 16-20.
23. Падкина М. В. Синтез гетерологичных интерферонов в клетках дрожжей *Pichia pastoris* / М. В. Падкина, Л. В. Парфенова, А. Е. Градобоева, Е. В. Самбук // Прикладная биохимия и микробиология. - 2010. – Том 46. - № 4. - С. 448-455.
24. Патент РФ №2302460, 10.07.2007
25. Патент РФ №2564115, 24.07.2014
26. Ребриков Д.В. ПЦР в реальном времени / Д. В. Ребриков, Г. А. Саматов, Д. Ю. Трофимов, П. А. Семёнов - 2-е издание. – Москва: Бином, 2009. - 223 с.
27. Рукавцева Е.Б., Бурьянов Я.И., Шульга Н.Я., Быков В.А. Трансгенные растения для фармакологии / Е. Б. Рукавцева, Я. И. Бурьянов, Н. Я. Шульга, В. А. Быков // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. - 2006. - № 2. - С. 3-12.
28. Рябушкина Н. А. Специфика выделения днк из растительных объектов / Н. А. Рябушкина, М. Е. Омашева, Н. Н. Галиакпаров // Биотехнология. Теория и практика. - 2012. - № 2. - С. 9-26.

29. Савельева Н. В. Создание растений-продуцентов гамма-интерферона для профилактики туберкулеза и лейкемии крупного рогатого скота / Н. В. Савельева, И. Д. Курдюков, Е. Э. Дудник, В. В. Емельянов, М. В. Падкина, Л. А. Лутова // Вестник СПбГУ. – 2009. - Сер. 3. - вып. 4. - С. 65-80.
30. 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]
31. Симбирцев А. С. Достижения и перспективы использования рекомбинантных цитокинов в клинической практике / А. С. Симбирцев // Медицинский академический журнал. - 2013. - Том 13. - № 1. – С. 7-22.
32. Симбирцев А.С. Новые возможности применения рекомбинантных цитокинов в качестве адъювантов при вакцинации / А. С. Симбирцев, А. В. Петров, Н. В. Пигарева, А. Т. Николаев // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. - 2011. - №1 (41). – С 16-20.
33. Хаитов Р.М. Иммунология / Р. М. Хаитов, Г. А. Игнатьева, И. Г. Сидорович. - Москва: Медицина, 2000. - 624 с.
34. Хрянин А. А. Интерферон-гамма: горизонты терапии / А. А. Хрянин, О. В. Решетников // Антибиотики и химиотерапия. - 2016. – Том 61; - №. 3-4. – С. 3-8.
35. Цыганков М. А. Синтез модифицированных, устойчивых к протеолитической деградации интерферонов-гамма в дрожжах *Pichia*

- pastoris* / М. А. Цыганков, А. Е. Зобнина, М. В. Падкина // Прикладная биохимия и микробиология. - 2014. - Том 50. - С. 429-436.
36. Шахов А. Г. Применение цитокинов и их индукторов молодняку сельскохозяйственных животных (обзор) / А. Г. Шахов, Л. Ю. Сашнина, Ю. Ю. Владимирова, К. В. Тараканова, Н. В. Карманова // Ветеринарная патология. - 2019. - № 2 (68). – С. 70-80.
 37. Abiri R. A critical review of the concept of transgenic plants: insights into pharmaceutical biotechnology and molecular farming / R. Abiri, A. Valdiani, M. Maziah, N.A. Shaharuddin, M. Sahebi, Z. Yusof, N. Atabaki, D. Talei // Current Issues in Molecular Biology. - 2016. - Vol. 18. - P. 21-42.
 38. Alqazlan N. Production of functional human interleukin 37 using plants / N. Alqazlan, H. Diao, A. M. Jevnikar, S. Ma // Plant Cell Reports. - 2019. – Vol. 38, - P. 391–401.
 39. Arlen P. Field production and functional evaluation of chloroplast–derived interferon- $\alpha 2b$ / P. A. Arlen, R. Falconer, S. Cherukumilli, A. Cole, A. M. Cole, K. K. Oishi, H. Daniell // Plant Biotechnology journal. - 2007. – Vol. 5. - № 4. – P. 511–525.
 40. Assenberg R. Advances in recombinant protein expression for use in pharmaceutical research / R. Assenberg, P. Wan, S. Geisse, L. Mayr // Current opinion in structural biology. - 2013. – Vol. 23. – № 3. - P. 393-402.
 41. Bai J. Comprehensive construction strategy of bidirectional green tissue-specific synthetic promoters / J. Bai, X. Wang, H. Wu, F. Ling, Y. Zhao, Y. Lin, R. Wang // Plant Biotechnology Journal. - 2020. – Vol. 18. – P. 668-678.
 42. Baldo B. Side effects of cytokines approved for therapy / B. Baldo // Drug safety. - 2014. - Vol. 37. - P. 921-943.
 43. Baranski R. Genetic engineering of carrot / R. Baranski, A. Lukasiewicz // In: Simon P., Iorizzo M., Grzebelus D., Baranski R. (eds) The carrot genome. Compendium of plant genomes. Springer, 2019. – P. 149-186.

44. Barta A. The expression of a napoline synthase human growth hormone chimeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue / A. Barta, K. Sommergruber, D. Thompson, K. Hartmuth, M. Matzke, A.J.M. Matzke // *Plant Molecular Biology*. - 1986. - Vol. 6. - P. 347–357.
45. Bevan M. A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation / M. Bevan, R. Flavell, M. D. Chilton // *Biotechnology*. - 1983. - Vol. 24. – P. 367–370.
46. Boivin E. Transient expression of antibodies in suspension plant cell suspension cultures is enhanced when co-transformed with the tomato bushy stunt virus p19 viral suppressor of gene silencing / E. Boivin, E. Lepage, D. Matton, G. De Crescenzo, M. Jolicoeur // *Biotechnology Progress*. - 2010. – Vol. 26. - № 6. – P. 1534–1543.
47. Bortesi L. Development of an optimized tetracycline-inducible expression system to increase the accumulation of interleukin-10 in tobacco BY-2 suspension cells / L. Bortesi, T. Rademacher, A. Schiermeyer, F. Schuster, M. Pezzotti, S. Schillberg // *BMC Biotechnology*. - 2012. – Vol. 12. - № 40. DOI: 10.1186/1472-6750-12-40
48. Bortesi L. Viral and murine interleukin–10 are correctly processed and retain their biological activity when produced in tobacco / L. Bortesi, M. Rossato, F. Schuster, N. Raven, J. Stadlmann, L. Avesani, A. Falorni, F. Bazzoni, R. Bock, S. Schillberg, M. Pezzotti // *BMC Biotechnology*. - 2009. – Vol. 9. – № 22. - P. 1–13. DOI: 10.1186/1472-6750-9-22
49. Bosze Z. Producing recombinant human milk proteins in the milk of livestock species / Z. Bosze, M. Baranyi, C. Whitelaw // *Advances in experimental medicine and biology*. - 2008. – Vol. 606. – P. 357-393
50. Brooks S. Appropriate glycosylation of recombinant proteins for human use, implications of choice of expression system / S. Brooks // *Molecular Biotechnology*. - 2004. - Vol. 28. - P. 241-255.

51. Broothaerts W. Gene transfer to plants by diverse species of bacteria / W. Broothaerts, H. Mitchell, B. Weir, S. Kaines, L. Smith, W. Yang, J. Maye, C. Roa-Rodriguez, R. Jefferson // *Nature*. - 2005. – Vol. 433. – P. 629–633.
52. Burlakovskiy M.S. Production of bovine interferon-gamma in transgenic tobacco plants. / M. S. Burlakovskiy, V. V. Yemelyanov, N.V. Saveleva, 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
53. Burnouf T. Recombinant plasma proteins / T. Burnouf // *Vox Sanguinis*. - 2011, - Vol. 100, - P. 68–83.
54. Buyel J. Plant molecular farming – integration and exploitation of side streams to achieve sustainable biomanufacturing / J. Buyel // *Frontiers in plant Science*. - 2019. - Vol. 9. – P. 1-17. DOI: 10.3389/fpls.2018.01893
55. Castilho A. Engineering of sialylated mucin-type O-glycosylation in plants / A. Castilho, L. Neumann, S. Daskalova, H. S. Mason, H. Steinkellner, F. Altmann, R. Strasser // *The Journal of Biological Chemistry*. - 2012. - Vol. 287. - P. 36518-36526.
56. Castilho A. Generation of biologically active multi-sialylated recombinant human EPOFc in plants / A. Castilho, L. Neumann, P. Gattinger, R. Strasser, K. Vorauer-Uhl, T. Sterovsky, F. Altmann, H. Steinkellner // *PLoS One*. - 2013. - Vol. 8. DOI: 10.1371/journal.pone.0054836
57. Castilho A. Glyco-engineering in plants to produce human-like N-glycan structures / A. Castilho, H. Steinkellner // *Biotechnology journal*. - 2012. – Vol. 7. - № 9. - P. 1088–1098.
58. Castilho A. N-Glycosylation engineering of plants for the biosynthesis of glycoproteins with bisected and branched complex N-glycans / A. Castilho, P. Gattinger, J. Grass, J. Jez, M. Pabst, F. Altmann, M. Gorfer, R. Strasser, H. Steinkellner // *Glycobiology*. - 2011. - Vol. 21. - № 6 - P. 813–823.
59. Chen K. CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture / K. Chen, Y. Wang, R. Zhang, H. Zhang, C. Gao // *Annual Review of Plant Biology*. - 2019. - Vol. 70. – P. 667-697.

60. Chen L. Identification of the factors that control synthesis and accumulation of a therapeutic protein, human immune-regulatory interleukin-10, in *Arabidopsis thaliana* / L. Chen, B. Dempsey, L. Gyenis, R. Menassa, J. Brandle, S. Dhaubhadel // Plant Biotechnology Journal. - 2013. - Vol. 11. – P. 546–554.
61. Chen T.-L. Expression of bioactive human interferon–gamma in transgenic rice cell suspension cultures / T.-L. Chen, Y.-L. Lin, Y.-L. Lee, N.-S. Yang, M.-T. Chan // Transgenic research. - 2004. – Vol. 13. – P. 499–510.
62. Cheon B. Overexpression of human erythropoietin (EPO) affects plant morphologies: retarded vegetative growth in tobacco and male sterility in tobacco and Arabidopsis / B. Cheon, H. Kim, K. Oh, S. Bahn, J. Ahn, J. Choi, S. Ok, J. Bae, J. Shin // Transgenic Research. - 2004. - Vol. 13. -P. 541-549.
63. 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. - №. 9. - P. 1631-1652. DOI:10.11158/saa.24.9.5
64. da Cunha N. Molecular farming of human cytokines and blood products from plants: challenges in biosynthesis and detection of plant-produced recombinant proteins / N. da Cunha, G. Vianna, T. da Almeida Lima, E. Rech // Biotechnology Journal. - 2014. - Vol. 9. - P. 39-50.
65. Daniell H. Optimization of codon composition and regulatory elements for expression of human insulin like growth factor–1 in transgenic chloroplasts and evaluation of structural identity and function / H. Daniell, G. Ruiz, B. Denes, L. Sandberg, W. Langridge // BMC Biotechnology. - 2009. - Vol. 9. - P. 1–16. DOI: 10.1186/1472-6750-9-33
66. Daniell H. Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals / H. Daniell, N. Singh, H. Mason, J. Streatfield // Trends in Plant Science. - 2009. - Vol. 14. - № 12. - P. 669-679.

67. De Leede L. Novel controlled release *Lemna*-derived IFN- α 2b (Locteron): pharmacokinetics, pharmacodynamics, and tolerability in a phase I clinical trial / L. De Leede, J. Humphries, A. Bechet, E. Van Hoogdalem, R. Verrijck, D. Spencer // Journal of Interferon & cytokine research. - 2008. - Vol 28. - № 2. - P. 113–122.
68. De Marchis F. Plastid proteostasis and heterologous protein accumulation in transplastomic plants / F. De Marchis, A. Pompa, M. Bellucci // Plant Physiology. - 2012. - Vol. 160. - P. 571–581.
69. Desai P. Production of heterologous proteins in plants: strategies for optimal expression / P. Desai, N. Shrivastava, H. Padh // Biotechnology advances. - 2010. - Vol. 28. - № 4. - P. 427-435.
70. Edelbaum O. Expression of active human interferon-beta in transgenic plants / O. Edelbaum, D. Stein, N. Holland, Y. Gafni, O. Livneh, D. Novick, M. Rubinstein, I. Sela // Journal of interferon research. - 1992. - Vol. 12. - № 6. - P. 449–453.
71. Escobar M. A. *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease / M. A. Escobar, A. M. Dandekar // Trends in plant science. - 2003. - Vol 8. - № 8. - P. 380–386.
72. Fahad S. Recent developments in therapeutic protein expression technologies in plants / S. Fahad, F. Khan, N. Pandupuspitasari, M. Ahmed, Y. Liao, M. Waheed, M. Sameeullah, Darkhshan, S. Hussain, S. Saud, S. Hassan, A. Jan, M. Jan, C. Wu, M. Chun, J. Huang // Biotechnology letters. - 2015. - Vol. 37 - № 2. - P. 265-279.
73. Farran I. High-density seedling expression system for the production of bioactive human cardiotrophin-1, a potential therapeutic cytokine, in transgenic tobacco chloroplasts / I. Farran, F. RHO-Manterola, M. Iniguez, S. Garate, J. Prieto, A. Mingo-Castel // Plant Biotechnology journal. - 2008. - Vol. 6. № 5. - P. 516–527.

74. Feng M. Analyses of transgenic fibroblast growth factor 21 mature rice seeds / M. Feng, H. Cai, Y. Guan, J. Sun, L. Zhang, J. Cang // *Breeding Science*. - 2019. - Vol. 69. - № 2. - P. 279-288.
75. Fensterl V. Interferons and viral infections / V. Fensterl, G. C. Sen // *Biofactors*. - 2009. - Vol. 35. - № 1. - P 14-20.
76. Flynn J. L. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection / J. L. Flynn, J. Chan, K. J. Triebold, D. K. Dalton, T. A. Stewart, B. R. Bloom // *The Journal of experimental medicine*. - 1993. - Vol. 178. - № 6. - P. 2249-2253.
77. Fujiwara Y. Extraction and purification of human interleukin-10 from transgenic rice seeds / Y. Fujiwara, Y. Aiki, L. Yang, F. Takaiwa, A. Kosaka, N. Tsuji, K. Shiraki, K. Sekikawa // *Protein expression and purification*. - 2010. - Vol. 72. - № 1. - P. 125–130.
78. Fukuzawa N. Production of biologically active Atlantic salmon interferon in transgenic potato and rice plants / N. Fukuzawa, N. Tabayashi, Y. Okinaka, R. Furusawa, K. Furuta, U. Kagaya, T. Matsumura // *Journal of bioscience and bioengineering*. - 2010. - Vol. 110. - № 2. - P. 201–207.
79. Furtado A. DNA Extraction from Vegetative Tissue for Next-Generation Sequencing / A. Furtado // *Cereal Genomics. Methods and Protocols*. Totowa.: Humana press, 2014. - P. 1-5.
80. Gao C. Comparison between *Agrobacterium*-mediated and direct gene transfer using the gene gun / C. Gao, K. Nielsen // *Methods in molecular biology*. - 2013. - Vol. 940. - P. 3-16.
81. Garoosi G. Characterization of the ethanol-inducible alc gene expression system in tomato / G. Garoosi , M. Salter , M. Caddick , A. Tomsett // *Journal of experimental botany*. - 2005. - Vol. 56. - № 415. - P. 1635–1642.
82. Gelvin S. B. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool / S. B. Gelvin // *Microbiology and molecular biology reviews*. - 2003. - Vol. 67. - № 1. - P. 16–37.

83. Gleave A. P. A versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome / A. P. Gleave // Plant molecular biology. - 1992. - Vol. 20. - P. 1203-1207.
84. Gleba Y. Magniffection – a new platform for expressing recombinant vaccines in plants / Y. Gleba, V. Klimyuk, S. Marillonnet // Vaccine. - 2005. - Vol. 23. - № 17-18. - P. 2042–2048.
85. Gleba Y. Plant viral vectors for delivery by *Agrobacterium* / Y. Gleba , D. Tusé , A. Giritch // Currents topics in microbiology and immunology. - 2014. - Vol. 375. - P. 155-192.
86. Głowacka K. An evaluation of new and established methods to determine T-DNA copy number and homozygosity in transgenic plants / K. Głowacka, J. Kromdijk, L. Leonelli, K. K. Niyogi, T. E. Clemente, S. P. Long // Plant cell environment. - 2016. - Vol. 39. - № 4. - P. 908-917.
87. Gomord V. Plant-specific glycosylation patterns in the context of therapeutic protein production / V. Gomord, A. Fitchette, L. Menu-Bouaouiche, C. Saint-Jore-Dupas, C. Plasson, D. Michaud, L. Faye // Plant Biotechnology journal. - 2010. - Vol. 8. - № 5. - P. 564–587.
88. Gora-Sochacka A. Recombinant mouse granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is glycosylated in transgenic tobacco and maintains its biological activity / A. Gora-Sochacka, P. Redkiewicz, B. Napiorkowska, D. Gaganidze, R. Brodzik, A. Sirko // Journal of interferon & cytokine research. - 2010. - Vol. 30. - № 3. - P. 135–142.
89. Grunennvaldt R. Promoters used in genetic transformation of plants / R. Grunennvaldt, J. Degenhardt-Goldbach, I. Gerhardt, M. Quoirin // Research journal of biological sciences. - 2015. - Vol. 10. - № 1. - P. 1-9.
90. Gurusamy P. Biologically active recombinant human erythropoietin expressed in hairy root cultures and regenerated plantlets of *Nicotiana tabacum* L. / P.

- Gurusamy, H. Schäfer, S. Ramamoorthy, M. Wink // PLoS ONE. - 2017. - Vol. 12. - № 8. - P. 1-23. DOI: 10.36478/rjbsci.2015.1.9
91. Gutierrez-Ortega A. Expression of a single-chain human interleukin-12 gene in transgenic tobacco plants and functional studies / A. Gutierrez-Ortega, F. Avila-Moreno, L. Saucedo-Arias, Sanchez-C. Torres, M. Gymez-Lim // Biotechnology and bioengineering. - 2004. - Vol. 85. - № 7. - P. 734–740.
 92. Gutierrez-Ortega A. Expression of functional Interleukin-12 from mouse in transgenic tomato plants / A. Gutierrez-Ortega, C. Sandoval-Montes, T. Olivera-Flores, L. Santos-Argumedo, M. Gymez-Lim // Transgenic research. - 2005. - Vol. 14. - № 6. -P. 877–885.
 93. Hefferon K. Recent advances in virus expression vector strategies for vaccine production in plants / K. Hefferon // Virology & Mycology. - 2012. - Vol. 1. - № 2. - P. 1-5. DOI: 10.4172/scientificreports.174
 94. Hiatt A. Production of antibodies in transgenic plants / A. Hiatt, R. Cafferkey, K. Bowdish // Nature. - 1989. - Vol. 342. - P. 76–78.
 95. Holtz, B. R. Commercial-scale biotherapeutics manufacturing facility for plant-made pharmaceuticals / B. R. Holtz, B. R. Berquist, L. D. Bennett, V. J. Kommineni, R. K. Munigunti, E. L. White, D. C. Wilkerson, K. Y. Wong, L. H. Ly, S. Marcel // Plant biotechnoljgy journal. - 2015, - Vol. 13. - № 8. - P. 1180–1190.
 96. Hood E. Commercial production of avidin from transgenic maize: Characterization of transformant, production, processing, extraction and purification / E. Hood, D. Witcher, S. Maddock, T. Meyer, C. Baszczynski, M. Bailey, P. Flynn, J. Register, L. Marshall, D. Bon, E. Kulisek, A. Kusnadi, R. Evangelista, Z. Nikolov, C. Wooge, R. Mehig, R. Hernan, W. Kappel, D. Ritland, C. Li, J.Howard // Molecular breeding. - 1997. - Vol. 3. - P. 291–306.
 97. Huang T. Bioreactor systems for in vitro production of foreign proteins using plant cell cultures / T. Huang, K. McDonald // Biotechnology advances. - 2012. - Vol. 30. - № 2. - P. 398–409.

98. Itakura K. Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin / K. Itakura, T. Hirose, R. Crea, A. Riggs, H. Heyneker, F. Bolivar, H. Boyer // Science. - 1977. - Vol. 198. - № 4321. - P. 1056–1063
99. James E. Production and characterization of biologically active human GM-CSF secreted by genetically modified plant cells / E. James, C. Wang, Z. Wang, R. Reeves, J. Shin, N. Magnuson, J. Lee // Protein expression and purification. - 2000. - Vol. 19. - № 1. - P. 131–138.
100. Jansing, J. CRISPR/Cas9-mediated knockout of six glycosyltransferase genes in *Nicotiana benthamiana* for the production of recombinant proteins lacking β -1,2-xylose and core α -1,3-fucose / J. Jansing, M. Sack, S. M. Augustine, R. Fischer, L. Bortesi // Plant Biotechnology Journal. - 2019. - Vol. 17. - № 2. - P. 350–361.
101. Jez J. Expression of functionally active sialylated human erythropoietin in plants / J. Jez, A. Castilho, J. Grass, K. Vorauer-Uhl, T. Sterovsky, F. Altmann, H. Steinkellner // Biotechnology Journal. - 2013. - Vol. 8. - № 3. - P. 371–382.
102. Jiang M. Production of human IFN γ protein in *Nicotiana benthamiana* plant through an enhanced expression system based on *Bamboo mosaic virus* / M. Jiang, C. Hu, N. Lin, Y. Hsu // Viruses - 2019. - Vol. 11. - № 6. - P. 1–18. DOI: 10.3390/v11060509.
103. Joung J. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing / J. Joung, J. Sander // Nature reviews. Molecular cell biology. - 2013. - Vol. 14. - № 1. - P. 49–55
104. Kaldis A. High-level production of human interleukin-10 fusions in tobacco cell suspension cultures / A. Kaldis, A. Ahmad, A. Reid, B. McGarvey, J. Brandle, S. Ma, A. Jevnikar, S. Kohalmi, R. Menassa // Plant biotechnology journal. - 2013. - Vol. 11. - № 5. - P. 535–545.
105. Kanagarajan S. Transient expression of hemagglutinin antigen from low pathogenic avian influenza A (H7N7) in *Nicotiana benthamiana* /

- S. Kanagarajan, C. Tolf, A. Lundgren, J. Waldenstrom, P. Brodelius // PLoS ONE. - 2012. - Vol. 7. - № 3. - P. 1-10. DOI: 10.1371/journal.pone.0033010
106. Khvatkov P. Development of *Wolffia arrhiza* as a producer for recombinant human granulocyte colony-stimulating factor / P. Khvatkov, A. Firsov, A. Shvedova, L. Shaloiko, O. Kozlov, M. Chernobrovkina, A. Pushin, I. Tarasenko, I. Chaban, S. Dolgov // Frontiers in Chemistry. - 2018. - Vol. 6. - № 304. - P. 1-10. DOI: [10.3389/fchem.2018.00304](https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00304)
 107. Kim H. The glycosylation and in vivo stability of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor produced in rice cells / H. Kim, D. Lee, D. Kim, G. Han // Biological & pharmaceutical bulletin. - 2008. - Vol. 31. - № 2. - P. 290–294.
 108. Kim N. Amylase gene silencing by RNA interference improves recombinant hGM-CSF production in rice suspension culture / N. Kim, T. Kim, Y. Jang, Y. Shin, T. Kwon, M. Yang // Plant molecular biology. - 2008. - Vol. 68. - № 4-5. - P. 369–377.
 109. Kim N. Improvement of recombinant hGM-CSF production by suppression of cysteine proteinase gene expression using RNA interference in a transgenic rice culture / N. Kim, T. Kim, O. Kim, E. Ko, Y. Jang, E. Jung, T. Kwon, M. Yang // Plant molecular biology. - 2008. - Vol. 68. - № 3. - P. 263–275.
 110. Kim S. I. Genome-wide analysis of Agrobacterium T-DNA integration sites in the *Arabidopsis* genome generated under non-selective conditions / S. I. Kim, Veena, S. B. Gelvin // The plant journal: for cell and molecular biology. - 2007. - Vol. 51. - № 5. - P. 779-791.
 111. Kim T. G. Co-expression of proteinase inhibitor enhances recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor production in transgenic rice cell suspension culture / T. G. Kim, H. J. Lee, Y. S. Jang, Y. J. Shin, T. H. Kwon, M. S. Yang // Protein expression and purification. 2008. - Vol. 61. - № 2. - P. 117–121.

112. Kittur F. C. Cytoprotective effect of recombinant human erythropoietin produced in transgenic tobacco plants / F. C. Kittur, M. Bah, S. Archer-Hartmann, C. Hung, P. Azadi, M. Ishihara, D. Sane, J. Xie // PLOS ONE. - 2013. - Vol. 8. - № 10. - P. 1-10. DOI: 10.1371/journal.pone.0076468
113. Kittur F. C. Terminally fused affinity Strep-tag II is removed by proteolysis from recombinant human erythropoietin expressed in transgenic tobacco plants / F. Kittur, M. Lalgondar, C. Hung, D. Sane, J. Xie // Plant cell reports. - 2015. - Vol. 34. - № 3. - P. 507–516.
114. Kleinboelting N. The Structural features of thousands of T-DNA insertion sites are consistent with a double-strand break repair-based insertion mechanism / N. Kleinboelting, G. Huep, I. Appelhagen, P. Viehoveer, Y. Li, B. Weisshaar // Molecular plant. - 2015. - Vol. 8. - № 11. - P. 1651-1664.
115. Kontra L. Distinct effects of p19 RNA silencing suppressor on small RNA mediated pathways in plants / L. Kontra, T. Csorba, M. Tavazza, A. Lucoli, R. Tavazza, S. Moxon, V. Tisza, A. Medzihradszky, M. Turina, J. Burgyán // PLoS pathogens. - 2016. - Vol. 12. - № 10. - P. 1-26. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005935
116. Koprivova A. Targeted knockouts of Physcomitrella lacking plant—specific immunogenic N—glycans / A. Koprivova, C. Stemmer, F. Altmann, A. Hoffmann, S. Kopriva, G. Gorr, R. Reski, E. Decker // Plant biotechnology journal. - 2004. - Vol. 2. - № 5. - P. 517–523.
117. Korotkova A. M. Current achievements in modifying crop genes using CRISPR/Cas system / A. M. Korotkova, S. V. Gerasimova, E. K. Khlestkina // Vavilov journal of genetics and breeding. - 2019, - Vol. 23. - № 1. - P. 29-37.
118. Kudo F. ER stress response induced by the production of human IL-7 in rice endosperm cells / F. Kudo, M. Ohta, L. Yang, Y. Wakasa, S. Takahashi, F. Takaiwa // Plant molecular biology. - 2013. - Vol. 81. - № 4-5. - P. 461–475.

119. Kuo Y. Improving Pharmaceutical Protein Production in *Oryza sativa* / Y. Kuo, C. Tan, J. Ku, W. Hsu, S. Su, C. Lu, L. Huang // International journal of molecular sciences. - 2013. - Vol. 14. - № 5. - P. 8719-8739.
120. Kwon T. Expression and secretion of the heterodimeric protein interleukin-12 in plant cell suspension culture / T. Kwon, J. Seo, J. Kim, J. Lee, Y. Jang, M. Yang // Biotechnology and bioengineering. - 2003. - Vol. 81. - № 7. - P. 870–875.
121. Kwon T. Production and secretion of biologically active human granulocyte–macrophage colony stimulating factor in transgenic tomato suspension cultures / T. Kwon, Y. Kim, J. Lee, M. Yang // Biotechnology letters. - 2003. - Vol. 25. - № 18. - P. 1571–1574.
122. Kyndt T. The genome of cultivated sweet potato contains *Agrobacterium* T-DNAs with expressed genes: An example of a naturally transgenic food crop / T. Kyndt, D. Quispe, H. Zhai, R. Jarret, M. Ghislain, Q. Liu, G. Gheysen, J. F. Kreuze // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. - 2015. - Vol. 112. - № 18. - P. 5844–5849.
123. Lacroix B. Pathways of DNA transfer to plants from *Agrobacterium tumefaciens* and related bacterial species / B. Lacroix, V. Citovsky // Annual review of phytopathology. - 2019. - Vol 57. - P. 231-251.
124. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during te assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // Nature. – 1970. – Vol. 227. – P. 680-683.
125. Lambertz C. Challenges and advances in the heterologous expression of cellulolytic enzymes: a review / C. Lambertz, M. Garvey, J. Klinger, D. Heesel, H. Klose, R. Fischer, U. Commandeur // Biotechnology for biofuels. - 2014. - Vol. 7. - № 1. - P 1-15. DOI: 10.1186/s13068-014-0135-5
126. Larosa V. Transformation of the mitochondrial genome / V. Larosa, C. Remacle // The international journal of developmental biology. - 2013. - Vol. 57. - № 6-8. - P. 659-665.

127. Lee G. Aberrant promoter methylation occurred from multicopy transgene and SU(VAR)3–9 homolog 9 (SUVH9) gene in transgenic *Nicotiana benthamiana* / G. Lee, S. Sohn, E. Park, Y. Park // Functional Plant Biology. - 2012. - Vol. 39. - P. 764-773.
128. Lee J. Increased production of human granulocyte–macrophage colony stimulating factor (hGM–CSF) by the addition of stabilizing polymer in plant suspension cultures / J. Lee, N. Kim, T. Kwon, Y. Jang, M. Yang // Journal of biotechnology. - 2002. - Vol. 96. - № 3. - P. 205–211.
129. Lee K. Heat-inducible production of beta-glucuronidase in tobacco hairy root cultures / K. Lee, S. Chen, B. Chiang, T. Yamakawa // Applied microbiology and biotechnology. - 2007. - Vol. 73. - № 5. - P. 1047–1053.
130. Li J. Improved cell-free RNA and protein synthesis system / J. Li, L. Gu, J. Aach, G. Church // PLoS One. - 2014. - Vol. 9. - № 9. - P. 1-11. DOI: 10.1371/journal.pone.0106232
131. Li J. Transient expression of an active human interferon–beta in lettuce / J. Li, M. Chen, X. Liu, H. Zhang, F. Shen, G. Wang // Scientia horticulturae. - 2007. - Vol. 112. - № 3. - P. 258–265.
132. Li X. *Agrobacterium* delivers VirE2 protein into host cells via clathrin-mediated endocytosis / X. Li, S. Q. Pan // Science advances. - 2017. - Vol. 3. - № 3. - P. 1-11. DOI: 10.1126/sciadv.1601528
133. Lienard D. Pharming and transgenic plants / D. Lienard, C. Sourrouille, V. Gomord, L. Faye // Biotechnology annual review. - 2007. - Vol. 13. - P. 115–147.
134. Liu P. T. High-Yield Expression and Purification of Human Interferon α -1 in *Pichia pastoris* / P. T. Liu, T. V. Ta, L. H. Villarete // Protein expression and purification. - 2001. - Vol. 22. - № 3. - P. 381-387.
135. Liu Y. Production of mouse granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by gateway technology and transgenic rice cell culture / Y. Liu, L. Huang,

- S. Ho, C. Liao, H. Liu, Y. Lai, S. Yu, C. Lu // Biotechnology and bioengineering. - 2012. - Vol. 109. - № 5. - P. 1239–1247.
136. Lowther W. Expression of biologically active human interferon alpha 2 in *Aloe vera* / W. Lowther, K. Lorick, S. Lawrence, W. Yeow // Transgenic research. - 2012. - Vol. 21. - № 6. - P. 1349–1357.
 137. Luchakivskaya Y. High-level expression of human interferon alpha-2b in transgenic carrot (*Daucus carota* L.) plants / Y. Luchakivskaya, O. Kishchenko, O. Gerasymenko, Z. Olevinskaya Y. Simonenko, M. Spivak, M. Kuchuk // Plant cell reports. - 2011. - Vol. 30. - № 3. - P. 407–415.
 138. Ma S. Production of biologically active human interleukin-4 in transgenic tobacco and potato / S. Ma, Y. Huang, A. Davis, Z. Yin, Q. Mi, R. Menassa, J. Brandle, A. Jevnikar // Plant biotechnology journal. - 2005. - Vol. 3. - № 3. - P. 309–318.
 139. Magnuson N. Secretion of biologically active human interleukin-2 and interleukin-4 from genetically modified tobacco cells in suspension culture / N. Magnuson, P. Linzmaier, R. Reeves, G. An, K. HayGlass, J. Le // Protein expression and purification. - 1998. - Vol. 13. - № 1. - P. 45–52.
 140. Matakas J. Plant-produced recombinant human interleukin-2 and its activity against splenic CD4 T-cells / J. Matakas, V. Balan, W. Carson, D. Gao, F. Brandizzi, S. Kunkel // International journal of life sciences biotechnology and pharma research. - 2013. - Vol. 2. - № 2. - P. 192–203.
 141. Matsumoto S. Characterization of a human glycoprotein (erythropoietin) produced in cultured tobacco cells / S. Matsumoto, K. Ikura, M. Ueda, R. Sasaki // Plant Molecular Biology. - 1995. - Vol. 27. - № 6. - P. 1163-1172.
 142. McGarry M. P. Mouse Hematology: A Laboratory Manual / M. P. McGarry, C. A. Protheroe, J. J. Lee. - N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2010. - 99 p.

143. Medrano J. Rapid system for evaluating bioproduction capacity of complex pharmaceutical proteins in plants / J. Medrano, M. Reidy, J. Liu, M. Ayala, M. Dolan, C. Cramer // *Methods in molecular biology*. - 2009. - Vol. 483. - P. 41-67.
144. Menassa R. Subcellular targeting of human interleukin-10 in plants / R. Menassa, W. Kennette, V. Nguyen, R. Rymerson, A. Jevnikar, J. Brandle // *Journal of biotechnology*. - 2004. - Vol. 108. - № 2. - P. 179–183.
145. Merlin M. Enhanced gad65 production in plants using the magnicon transient expression system: Optimization of upstream production and downstream processing / M. Merlin, E. Gecchele, E. Arcalis, S. Remelli, A. Brozzetti, M. Pezzotti, L. Avesani, // *Biotechnology Journal*. - 2016, - Vol. 11. - № 4. - P. 542–553.
146. Mohammadzadeh S. Construction of bicistronic cassette for co-expressing hepatitis B surface antigen and mouse granulocyte-macrophage colony stimulating factor as adjuvant in tobacco plant / S. Mohammadzadeh, H. Ofoghi, M. Ebrahimi-Rad, P. Ehsani // *Pharmaceutical Biology*. - 2019. - Vol. 57. - № 1. - P. 669-675.
147. Mollinari M. Unraveling the hexaploid sweetpotato inheritance using ultra-dense multilocus mapping / M. Mollinari, A. B. Olukolu, G. D. S. Pereira, A. Khan, D. Gemenet, G. C. Yencho, Z. B. Zeng. // *Genes, genomes, genetics*. - 2020. - Vol. 10. - № 1. - P. 281-292.
148. Moon K. B.. Development of systems for the production of plant-derived biopharmaceuticals / K. B. Moon, J. S. Park, Y. I. Park, I. J. Song, H. J. Lee, H. S. Cho, J. H. Jeon H. S. Kim. // *Plants*. - 2020. - Vol. 9. - № 1. - P. 1-21. DOI: 10.3390/plants9010030
149. Morandini F. Non-food/feed seeds as biofactories for the high-yield production of recombinant pharmaceutical / F. Morandini, L. Avesani, L. Bortesi, B. Van Droogenbroeck, K. De Wilde, E. Arcalis, F. Bazzoni, L. Santi, A. Brozzetti, A. Falorni, E. Stoger, A. Depicker, M. Pezzotti // *Plant biotechnology journal*. - 2011. - Vol. 9. - № 8. - P. 911–921.

150. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Physiologia plantarum*. - 1962. - Vol. 15. - № 3. - P. 473—497.
151. Musiychuk K. Plant-produced human recombinant erythropoietic growth factors support erythroid differentiation in vitro / K. Musiychuk, R. Sivalenka, J. Jaje, H. Bi, R. Flores, B. Shaw, R. Jones, T. Golovina, J. Schnipper, L. Khandker, R. Sun, C. Li, L. Kang, V. Voskianarian-Berse, X. Zhang, S. Streatfield, J. Hambor, S. Abbot, V. Yusibov // *Stem cells and development*. - 2013. - Vol. 22. - № 16. - P. 2326—40.
152. Napoli C. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans / C. Napoli, C. Lemieux, R. Jorgensen // *The plant cell*. - 1990. - Vol. 2. - № 4. - P. 279-289.
153. Nicolia A. An insight into T-DNA integration events in *Medicago sativa* / A. Nicolia, N. Ferradini, F. Veronesi, D. Rosellini // *International journal of molecular science*. - 2017. - Vol. 18. - № 9. - P. 1-16. DOI: 10.3390/ijms18091951
154. Ning T. Oral administration of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor expressed in rice endosperm can increase leukocytes in mice / T. Ning, T. Xie, Q. Qiu, W. Yang, S. Zhou, L. Zhou, C. Zheng, Y. Zhu, D. Yang // *Biotechnology letters*. - 2008. - Vol. 30. - № 9. - P.1679—1686.
155. Noh S. A. A sweetpotato *SRDI* promoter confers strong root taproot and tuber specific expression in *Arabidopsis* / S. A. Noh, H. S. Lee, G. H. Huh, M. J. Oh, K. H. Paek, J. S. Shin, J. M. Bae // *Transgenic Research*. - 2012. - Vol. 21. - № 2. - P. 265-278.
156. Obembe O. Advances in plant molecular farming / O. Obembe, J. Popoola, S. Leelavathi, S. Reddy // *Biotechnology Advances*. - 2011. - Vol. 29. - № 2. - P. 210-222.
157. Oey M. Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic / M. Oey, M. Lohse,

- B. Kreikemeyer, R. Bock // The plant journal: for cell and molecular biology. - 2009. - Vol. 57. - № 3. - P. 436–445.
158. Ohya K. Expression of biologically active human tumor necrosis factor–alpha in transgenic potato plant / K. Ohya, N. Itchoda, K. Ohashi, M. Onuma // Journal of interferon & cytokine research. - 2002. - Vol. 22. - № 3. - P. 371–378.
 159. Ohya K. Expression of two subtypes of human IFN–alpha in transgenic potato plants / K. Ohya, T. Matsumura, K. Ohashi, M. Onuma, C. Sugimoto // Journal of interferon & cytokine research. - 2001. - Vol. 21. - m№ 8. - P. 595–602.
 160. Okuzaki A. Estrogen-inducible GFP expression patterns in rice (*Oryza sativa* L.) / A. kuzaki, K. Konagaya, Y. Nanasato, M. Tsuda, Y. Tabei // Plant cell reports. - 2011. - Vol. 30. - № 4. - P. 529–538.
 161. Onyango S. O. The *ZmRCP-1* promoter of maize provides root tip specific expression of transgenes in plantain / S. O. Onyango, H. Roderic, J. N. Tripathi, R. Collins, H. J. Atkinson, R. O. Oduor, L. Tripathi // Journal of biological research. - 2016. - Vol. 23. - № 4. - P. 1-9. DOI: 10.1186/s40709-016-0041-z
 162. Owczarek B. Brief reminder of systems of production and chromatography-based recovery of recombinant protein biopharmaceuticals / B. Owczarek, A. Gerszberg, K. Hnatuszko-Konka // BioMed Research International. - 2019. - Vol. 20. 13 p. DOI: 10.1155/2019/4216060
 163. Park Y. Expression and production of recombinant human interleukin–2 in potato plants / Y. Park, H. Cheong // Protein expression and purification. - 2002. - Vol. 25. - № 1. - P. 160–165.
 164. Patel J. Elastin–like polypeptide fusions enhance the accumulation of recombinant proteins in tobacco leaves / J. Patel, H. Zhu, R. Menassa, L. Gyenis, A. Richman, J. Brandle // Transgenic research. - 2007. - Vol. 16. - № 2. - P. 239–249.
 165. Paul M. Target product selection –where can Molecular Pharming make the difference? / M. Paul, A. Teh, R. Twyman, J. Ma // Current pharmaceutical design. - 2013. - Vol. 19. - № 31. - P. 5478-5485.

166. Paulus K. Silencing β 1,2-xylosyltransferase in transgenic tomato fruits reveals xylose as constitutive component of IgE binding epitopes / K. Paulus, V. Mahler, M. Pabst, K. Kogel, F. Altmann, U. Sonnewald // *Frontiers in Plant Science*. - 2011. - Vol. 2. - P. 1-12. DOI: 10.3389/fpls.2011.00042
167. Potula H. Transient expression, purification and characterization of bioactive human fibroblast growth factor 8b in tobacco plants / H. Potula, S. Kathuria, A. Ghosh, T. Maiti, S. Dey // *Transgenic research*. - 2008. - Vol. 17. - № 1. - P. 19–32.
168. Rachamallu R. Hairy roots production through *Agrobacterium rhizogenes* genetic transformation from *Daucus carota* explants / R. Rachamallu // *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*. - 2016. - Vol. 3. - № 8. - P. 23-27.
169. Rech E. L. Seeds, recombinant DNA and biodiversity / E. L. Rech // *Seed science research*. - 2012. - Vol. 22. - P. 36–44.
170. Redkiewicz P. Transgenic tobacco plants as production platform for biologically active human interleukin 2 and its fusion with proteinase inhibitors / P. Redkiewicz, A. Wiesyk, A. Gora-Sochacka, A. Sirko // *Plant biotechnology journal*. - 2012. - Vol. 10. - № 7. - P. 806–814.
171. Rogers S. O. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues / S. O. Rogers, A. J. Bendich // *Plant molecular biology*. - 1985. - Vol. 5. - P. 69-71.
172. Ronald P. Plant genetics, sustainable agriculture and global food security / P. Ronald // *Genetics*. - 2011. - Vol. 188. - № 1. - P. 11–20.
173. Rosales-Mendoza S. Carrot cells: a pioneering platform for biopharmaceuticals production / S. Rosales-Mendoza, M. A. Tello-Olea // *Molecular biotechnology*. - 2015. - Vol. 57. - № 3. - P. 219–232.
174. Rosano G. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges / G. Rosano, E. Ceccarelli // *Frontiers in microbiology*. - 2014. - Vol. 5. - P. 1-17. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00172

175. Rybicki E. Plant-based vaccines against viruses / E. Rybicki // Virology journal. - 2014. - Vol. 11. - № 205. - P. 1-20. DOI: 10.1186/s12985-014-0205-0
176. Sardana R. Biological activity of human granulocyte—macrophage colony stimulating factor is maintained in a fusion with seed glutelin peptide / R. Sardana, Z. Alli, A. Dudani, E. Tackaberry, M. Panahi, M. Narayanan, P. Ganz, I. Altosaar // Transgenic research. - 2002. - Vol. 11. - № 5. - P. 521–531.
177. Sardana R. Biologically active human GM-CSF produced in the seeds of transgenic rice plants / R. Sardana, A. Dudani, E. Tackaberry, Z. Alli, S. Porter, K. Rowlandson, P. Ganz, I. Altosaar // Transgenic research. - 2007. - Vol. 16. - № 6. - P. 713–721.
178. Sawahel W. The production of transgenic potato plants expressing human alpha–interferon using lipofectin-mediated transformation / W. Sawahel // Cellular & molecular biology letters. - 2002. 7- Vol. 7. - № 1. - P. 19–29.
179. Schoggins J. Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions / J. Schoggins, C. Rice // Current opinion in virology. - 2011. - Vol. 1. - № 6. - P. 519–525.
180. Schroder K. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions / K. Schroder, P. Hertzog, T. Ravasi, D. Hume // Journal of leukocyte biology. - 2004. - Vol. 75. - № 2. - P. 163-189.
181. Shahid N. Plant-based oral vaccines against zoonotic and non-zoonotic diseases / N. Shahi, H. Daniell // Plant Biotechnology Journal. - 2016. - Vol. 14. - № 11. - P. 2079–2099.
182. Sharifi Tabar M. Rajabi Memari H. Human granulocyte colony-stimulating factor (hG-CSF) expression in plastids of *Lactuca sativa* / M. Sharifi Taba, A. Habashi, H. Rajabi Memari // Iran biomedical journal. - 2013. - Vol. 17. - № 3. - P. 158-64.
183. Shin Y. High level of expression of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor in transgenic rice cell suspension culture /

- Y. Shin, S. Hong, T. Kwon, Y. Jang, M. Yang // *Biotechnology and bioengineering*. - 2003. - Vol. 82. - № 7. - P. 778–783.
184. Shin Y. Production of recombinant human granulocyte macrophage-colony stimulating factor in rice cell suspension culture with a human-like N-glycan structure / Y. Shin, Y. Chong, M. Yang, T. Kwon // *Plant biotechnology journal*. - 2011. - Vol. 9. - № 9. - P. 1109–1119.
 185. Singer K. Formation of complex extrachromosomal T-DNA structures in *Agrobacterium tumefaciens*-infected plants / K. Singer, Y. M. Shibolet, J. Li, T. Tzfira // *Plant physiology*. - 2012. - Vol. 160. - № 1. - P. 511–522
 186. Singer K. The mechanism of T-DNA integration: some major unresolved questions / K. Singer // *Current topics in microbiology and immunology*. - 2018. - Vol. 418, - P. 287-317.
 187. Sirko A. Recombinant cytokines from plants / A. Sirko, T. Vanek, A. Gora-Sochacka, P. Redkiewicz // *International journal of molecular science*. - 2011. - Vol. 12. - № 6. - P. 3536–3552.
 188. Song L. Transient expression of chicken alpha interferon gene in lettuce / L. Song, D. Zhao, Y. Wu, Y. Li // *Journal of Zhejiang University. Science. B*. - 2008. - Vol. 9. - № 5. - P. 351–355.
 189. Stiles A. Hairy root culture: bioreactor design and process intensification / A. Stiles, C. Liu // *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. - 2013. - Vol. 134. - P. 91-114.
 190. Šubr Z. Detection of transgene copy number by analysis of the T₁ generation of tobacco plants with introduced P3 gene of potato virus A / Z. Šubr, S. Novakova, H. Drahovska // *Acta Virologica*. - 2006. - Vol. 50. - № 2. - P. 135-138.
 191. Sujatha M. Transformation of nuclear DNA in meristematic and embryogenic tissues / M. Sujatha, K. Visarada // *Methods in molecular biology*. - 2013. - Vol. 940. - P. 27-44.
 192. Tian C. Selection of suitable reference genes for qPCR normalization under abiotic stresses and hormone stimuli in carrot leaves / C. Tian, Q. Jiang, F. Wang,

- G. L. Wang, Z. S. Xu, A. S. Xiong // PLoS One. - 2015. - Vol. 10. - № 2. - P. 1-16. DOI: 10.1371/journal.pone.0117569
193. Tremblay R. Tobacco, a highly efficient green bioreactor for production of therapeutic proteins / R. Tremblay, D. Wang, A. Jevnikar, S. Ma // Biotechnology advances. - 2010. - Vol. 28. - № 2. - P. 214–221.
 194. Vesosky B. Th1 cytokines facilitate CD8-T-cell-mediated early resistance to infection with Mycobacterium tuberculosis in old mice / B. Vesosky, D. Flaherty, J. Turner // Infection and immunity. - 2006. - Vol. 74. - № 6. - P. 3314-3324.
 195. Voinnet O. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus / O. Voinnet, S. Rivas, P. Mestre, D. Baulcombe // The plant journal: for cell and molecular biology. - 2003. - Vol. 33. - № 5. - P. 949–956.
 196. Wall V. E. Combinatorial assembly of clone libraries using site-specific recombination / L. A. Garvey, J. L. Mehalko, L. V. Procter, D. Esposito // DNA cloning and assembly methods. - Humana press, 2014. - P. 193-208.
 197. Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2018 / G. Walsh // Nature Biotechnology. - 2018. - Vol. 36. - № 12. - P. 1136–1145.
 198. Wang D. A novel platform for biologically active recombinant human interleukin–13 production / D. Wang, M. Brandsma, Z. Yin, A. Wang, A. Jevnikar, S. Ma // Plant biotechnology journal. - 2008. - Vol. 6. - № 5. - P. 504–515.
 199. Wang M. Production of biologically active GM-CSF in sugarcane: a secure biofactory / M. Wang, C. Goldstein, W. Su, P. Moore, H. Albert // Transgenic research. - 2005. - Vol. 14. - № 2. - P. 167–178.
 200. Wang Z. Fusion primer and nested integrated PCR (FPNI-PCR): a new high-efficiency strategy for rapid chromosome walking or flanking sequence cloning / Z. Wang, S. Ye, J. Li, B. Zheng, M. Bao, G. Ning // BMC Biotechnology. - 2011. - Vol. 11. - № 109. - P. 1-12. DOI: 10.1186/1472-6750-11-109

201. Weise A. High-level expression of secreted complex glycosylated recombinant human erythropoietin in the *Physcomitrella* Δ -fuc-t Δ -xyl-t mutant / A. Weise, F. Altmann, M. Rodriguez-Franco, E. Sjöberg, W. Bäumer, H. Launhardt, M. Kietzmann, G. Gorr // *Plant biotechnology journal*. - 2007. - Vol. 5. - № 3. - P. 389–401.
202. Won J. Effect of rice cell-derived human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on 5-fluorouracil-induced mucositis in hamsters / J. Won, J. Ji, K. Ahn, S. Kim, J. Choi, H. Ha, H. Kim, C. Yun, K. Han, D. Kim // *Biological & pharmaceutical bulletin*. - 2013. - Vol. 36. - № 3. - P. 425–431.
203. Xie T. A biologically active rhIGF-1 fusion accumulated in transgenic rice seeds can reduce blood glucose in diabetic mice via oral delivery / T. Xie, Q. Qiu, W. Zhang, T. Ning, W. Yang, C. Zheng, C. Wang, Y. Zhu, D. Yang // *Peptides*. - 2008. - Vol. 29. - № 11. - P. 1862–1870.
204. Xie Y. Expression, purification and characterization of human IFN-1 in *Pichia pastoris* / Y. Xie, H. Chen, B. Huang // *Journal of biotechnology*. - 2007. - Vol. 129. - № 3. - P. 472–480.
205. Xu J. Towards high-yield production of pharmaceutical proteins with plant cell suspension cultures / J. Xu, X. Ge, M. Dolan // *Biotechnology advances*. - 2011. - Vol. 29. - № 3. - mP. 278–299.
206. Youngblood B. Application of recombinant human leukemia inhibitory factor (LIF) produced in rice (*Oryza sativa* L.) for maintenance of mouse embryonic stem cells / B. Youngblood, R. Alfano, S. Pettit, D. Zhang, H. Dallmann, N. Huang, C. Macdonald // *Journal of biotechnology*. - 2014. - Vol. 20. - № 172. - P. 67-72
207. Zavaleta, N. Efficacy of rice-based oral rehydration solution containing recombinant human lactoferrin and lysozyme in peruvian children with acute diarrhea / N. Zavaleta, D. Figueroa, J. Rivera, J. Sánchez, S. Alfaro, B. Lönnnerdal // *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. - 2007. - Vol. 44. - № 2. - P. 258–264.

208. Zhang B. Expression and production of bioactive human interleukin-18 in transgenic tobacco plants / B. Zhang, Y. Yang, Y. Lin, Q. Rao, G. Zheng, K. Wu // *Biotechnology letters*. - 2003. - Vol. 25. - № 19. - P. 1629–1635.
209. Zhang X. Production of functional native human interleukin-2 in tobacco chloroplasts / X. Zhang, P. Keating, X. Wang, Y. Huang, J. Martin, J. Hartmann, A. Liu // *Molecular Biotechnology*. - 2014. - Vol. 56. - № 4. - P. 369-376.
210. Zhao Y. Hereditary behavior of bar gene cassette is complex in rice mediated by particle bombardment / Y. Zhao, Q. Qian, H. Wang, D. Huang // *Journal of genetics and genomics*. - 2007. - Vol. 34. - № 9, - P. 824–835.
211. Zhou F. Efficient transient expression of human GM-CSF protein in *Nicotiana benthamiana* using potato virus X vector / F. Zhou, M. Wang, H. Albert, P. Moore, Y. ZPhu // *Applied microbiology and biotechnology*. - 2006. - Vol. 72. - № 4. - P. 756–762.

БЛАГОДАРНОСТИ

Я хотел бы выразить искреннюю благодарность своему научному руководителю – профессору, д.б.н. Лутовой Людмиле Алексеевне, за предоставленную возможность выполнить данную работу на базе лаборатории генной и клеточной инженерии растений СПбГУ, а также за безграничное терпение.

Хотелось бы поблагодарить доцента, к. б. н. Емельянова Владислава Владимировича, помогавшего проводить белковый анализ трансгенных растений, и научных сотрудников лаборатории биохимической генетики Анастасию Евгеньевну Зобнину и Наталью Юрьевну Швед, проводивших анализ биологической активности белка на культуре клеток.

Отдельно хотелось бы поблагодарить Ксению Игоревну Носову за ее вклад в данную работу и помощь в клонировании промоторов.

И наконец, хочется поблагодарить коллег из лаборатории генной и клеточной инженерии растений, а также весь коллектив кафедры генетики и биотехнологии, за создание дружеской атмосферы и предоставленные знания.