

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ ИМЕНИ АКАДЕМИКОВ М.М. ШЕМЯКИНА И
Ю.А. ОВЧИННИКОВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

на правах рукописи

Фирсов Алексей Петрович

**Получение рекомбинантных белков промышленного и фармацевтического
назначения в растительных экспрессионных системах**

Специальность 1.5.6. Биотехнология

Диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научный консультант
доктор биологических наук
Долгов Сергей Владимирович

Москва-2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

	ВВЕДЕНИЕ.....	7
1.	ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	20
1.1.	Экспрессионные системы для получения рекомбинантных белков- достоинства и недостатки.....	20
1.2.	Растения как платформа для биофарминга.....	26
1.3.	Коммерциализация рекомбинантных белков, полученных в растительных экспрессионных системах.....	34
1.4.	Растительные системы для получения рекомбинантных протеинов: стабильная трансформация и транзientная экспрессия.....	44
1.4.1.	Ядерно-трансформированные и транспластомные растения.....	45
1.4.2.	Транзientные экспрессионные системы.....	49
1.4.2.1.	Агроинфльтрация.....	49
1.4.2.2.	Экспрессионные системы на основе самореплицирующихся вирусных векторов.....	52
1.4.3.	Производство рекомбинантных белков: стабильно трансформированные растения vs. транзientных систем.....	56
1.5.	Растительные платформы для производства рекомбинантных белков на основе ядерно-трансформированных растений.....	58
1.5.1.	Ряска малая и Вольфия бескорневая как перспективные платформы для экспрессии рекомбинантных белков.....	64
1.5.2.	Томат как платформа для экспрессии рекомбинантных белков....	69
1.6.	Замкнутые культивиционные системы.....	75
1.6.1.	Теплицы.....	76
1.6.2.	Биореакторные системы.....	77
1.6.2.1.	Суспензионные культуры клеток растений.....	77
1.6.2.2.	Культура «бородатых корней» растений.....	79
1.6.2.3.	Культивирование в биореакторах растений.....	80
1.7.	Растительные экспрессионные системы: направления совершенствования.....	83
1.8.	Тауматин.....	87
1.8.1.	Биологические характеристики, свойства и применение тауматина.	87
1.8.2.	Физико-химические свойства тауматинов. Сладкий вкус.....	92
1.8.3.	Тауматины I и II в трансгенных растениях.....	95
1.8.4.	Экспрессия рекомбинантного тауматина в растениях.....	100
1.9.	Грипп птиц. Разработка вакцин широкого спектра действия против вируса гриппа.....	104
1.9.1.	Организация генома вирусов гриппа типа А.....	105
1.9.2.	Белок M2 вируса гриппа.....	107
1.9.3.	Использование пептида M2e для создания противогриппозных вакцин.....	110

1.9.4.	Экспрессия пептида M2e вируса гриппа в растительных системах..	114
1.9.5.	Адьюванты для антигенов, полученных в растительных системах..	116
1.10.	Гирудин. Структура и свойства.....	118
1.10.1.	Экспрессионные системы для получения рекомбинантного гирудина.....	119
1.11.	Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор человека.....	123
1.11.1.	Структура, функции и использование гранулоцитарного колониестимулирующего фактора.....	123
1.11.2.	Экспрессия рекомбинантного ГКСФ в гетерологичных системах....	125
	Заключение по обзору литературы.....	129
2.	ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	133
2.1.	Молекулярное клонирование ДНК. Конструирование векторов для трансформации растений.....	133
2.2.	Бактериальные штаммы и плазмиды.....	136
2.3.	Генетическая трансформация растений.....	137
2.3.1.	Генетическая трансформация табака и томата.....	137
2.3.2.	Генетическая трансформация ряски малой.....	138
2.4.	Оптимизация кодонного состава последовательностей для экспрессии в растениях ряски малой. Сборка синтетических генов.	140
2.4.1.	Пептид M2e вируса гриппа птиц H5N1.....	140
2.4.2.	Гирудин из пиявки медицинской <i>Hirudo medicinalis</i>	141
2.4.3.	Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор человека.....	142
2.5.	ПЦР и Саузерн блот анализ трансгенных растений.....	144
2.6.	Выделение РНК из растительных тканей и ОТ-ПЦР - анализ трансгенных растений.....	145
2.7.	Гистохимический анализ β -глюкуронидазы в трансгенных растениях.....	145
2.8.	Выделение общего растворимого белка из растительных тканей....	146
2.9.	Вестерн-блот анализ препаратов общего растворимого белка трансгенных растений.....	146
2.10.	Количественный иммуноферментный анализ рекомбинантных белков в трансгенных растениях.....	147
2.11.	Количественная оценка содержания субъединицы В рицина в растениях с помощью асиалофетуин-связывающего ИФА.....	148
2.12.	Аффинная хроматография с иммобилизованным асиалофетуином..	149
2.13.	Экспрессия субъединицы В рицина в <i>E.coli</i>	150
2.14.	Хроматография рекомбинантных белков, полученных в трансгенных растениях.....	150
2.15.	Органолептический анализ плодов томата, трансформированных геном тауматина II.	151
2.16.	Оценка иммуногенности рекомбинантного пептида M2e, полученного в растениях ряски.....	152
2.17.	Статистический анализ.....	153

3.	ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	154
3.1.	Экспрессия рекомбинантного тауматина в трансгенных растениях томата.....	154
3.1.1.	Влияние компартментализации на накопление рекомбинантного тауматина в трансгенных растениях табака.....	154
3.1.1.1.	Конструирование векторов для экспрессии рекомбинантного тауматина II и получение трансгенных растений табака.....	154
3.1.1.2.	Анализ экспрессии тауматина II в трансгенных растениях табака...	158
3.1.2.	Агробактериальная трансформация растений томата геном тауматина II.....	163
3.1.3.	Анализ экспрессии тауматина II в трансгенных растениях томата...	167
3.1.3.1.	Анализ экспрессии тауматина II в листьях трансгенных растений томата.....	167
3.1.3.2.	Анализ экспрессии тауматина II в плодах трансгенных растений томата.....	170
3.1.3.2.	Органолептический анализ плодов трансгенных растений томата.....	170
1.		
3.1.3.2.	Количественный анализ накопления рекомбинантного тауматина II в плодах трансгенных растений томата.....	174
2.		
3.1.3.3.	Саузерн блот анализ геномной ДНК трансгенных растений томата.	179
3.1.3.4.	Некоторые агрономические характеристики трансгенных растений томата, трансформированных вектором pVI-th35.....	181
3.1.4.	Агробактериальная трансформация растений томата геном тауматина II с апопластной локализацией рекомбинантного белка.....	187
3.1.4.1.	Анализ экспрессии тауматина II в трансгенных растениях томата, трансформированных вектором pGD-lt.....	190
3.1.4.2.	Количественный анализ экспрессии гена тауматина II в трансгенных растениях томата, трансформированных вектором pGD-lt. Органолептический анализ плодов.....	193
3.1.4.3.	Некоторые агрономические характеристики трансгенных растений томата, трансформированных вектором pGD-lt.....	196
3.1.5.	Выделение и очистка рекомбинантного тауматина из плодов томата.....	203
3.1.5.1.	Органолептический анализ рекомбинантного тауматина II из плодов томата.....	209
3.2.	Экспрессия пептида M2e вируса гриппа птиц в трансгенных растениях табака.....	214
3.2.1.	Оптимизация кодонного состава 5'-концевой последовательности гена M2 вируса гриппа птиц H5N1. Синтез и сборка синтетической нуклеотидной последовательности для экспрессии в растениях.....	214
3.2.2.	Трансформация табака <i>N. tabacum</i> вектором pVIM2. ОТ-ПЦР	

	анализ транскрипции последовательности M143 в трансгенных растениях.....	216
3.2.3.	Клонирование гена M143 в слиянии с геном β -глюкуронидазы. Анализ экспрессии слитой последовательности M143- β -глюкуронидаза в трансгенных растения табака.....	218
3.2.4.	Клонирование последовательностей M130 и M122 в слиянии с геном β -глюкуронидазы. Анализ экспрессии слитых генов в трансгенных растениях табака.....	223
3.2.5.	Клонирование нуклеотидной последовательности субъединицы В рицина из геномной ДНК клещевины <i>Ricinus communis</i>	229
3.2.6.	Клонирование и экспрессия гена субъединицы В рицина в бактериальной системе.....	234
3.2.7.	Конструирование вектора для экспрессии в растениях пептида M2e в слиянии с субъединицей В рицина.....	236
3.2.8.	Получение и анализ трансгенных растений табака, содержащих последовательность слитого гена RTB-M130.....	238
3.2.9.	Влияние внутриклеточной локализации рекомбинантной субъединицы В рицина на её экспрессию в трансгенных растениях табака.....	247
3.2.9.1.	Получение трансгенных растений с различной локализацией рекомбинантной субъединицы В рицина.....	247
3.2.9.2.	Анализ экспрессии слитого белка RTB-M130 с различной внутриклеточной локализацией в трансгенных растениях табака...	250
3.3.	Экспрессия рекомбинантного гирудина в трансгенных растениях ряски.....	255
3.4.	β -глюкуронидаза как партнёр для экспрессии слитых белков в ряске.....	259
3.4.1.	Агробактериальная трансформация ряски геном β -глюкуронидазы.	259
3.4.2.	Анализ экспрессии β -глюкуронидазы в растениях ряски, трансформированных вектором pBI121.....	262
3.5.	Экспрессия пептида M2e в трансгенных растениях ряски.....	265
3.5.1.	Анализ экспрессии слитого гена M130- β -глюкуронидаза в трансгенных растениях ряски.....	265
3.5.2.	Анализ экспрессии пептида M2e, слитого с субъединицей В рицина.....	270
3.5.3.	Иммунизация мышей пептидом M2e, экспрессированным в трансгенных растениях ряски малой.....	275
3.5.3.1.	Подготовка препарата белка ряски для иммунизации.....	275
3.5.3.2.	Иммунизация лабораторных мышей пептидом M2e в составе слитых белков RTB-M130 и M130- β -глюкуронидаза.....	278
3.6.	Агробактериальная трансформация ряски геном гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека (ГКСФ).....	282
3.6.1.	Конструирование вектора pBI-GCSF и трансформация ряски геном	

	ГКСФ.....	282
3.6.2.	Скрининг канамицинустойчивых линий ряски на экспрессию ГКСФ. ПЦР- анализ полученных линий.....	284
3.6.3.	Анализ экспрессии ГКСФ в трансгенных линиях ряски.....	286
3.6.4.	Хроматографический анализ ГКСФ - содержащих препаратов общего белка ряски.....	292
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	301
	ВЫВОДЫ.....	303
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	305
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	306

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Важнейшим направлением современной биотехнологии является производство рекомбинантных белков различного назначения. Потребность в значительных количествах рекомбинантных белков существует в медицине и ветеринарии, и во многих отраслях промышленности, в том числе пищевой и фармацевтической. Так, за период 2018-2022 гг. для использования было одобрено 94 новых медицинских препарата на основе рекомбинантных белков и пептидов [1]. В производстве рекомбинантных белков используются различные экспрессионные системы - бактериальные, дрожжевые, культуры клеток млекопитающих и насекомых, трансгенные животные. Все эти системы имеют как достоинства, так и недостатки. Так, главным достоинством бактериальных и дрожжевых систем является эффективность, относительная простота и детальная разработанность технологий микробиологических производств, основным недостатком - отсутствие (бактерии) или некорректный характер (дрожжи) посттрансляционных модификаций. В тоже время, системы на основе клеток млекопитающих или трансгенных животных характеризуются правильным, идентичным человеческому, характером посттрансляционных модификаций рекомбинантных белков и, одновременно, более высокой стоимостью их производства. Существующие ограничения вызвали необходимость поиска и разработки альтернативных экспрессионных систем, в которых модификации рекомбинантных белков осуществлялись бы аналогично таковым у человека (или максимально близко) и которые, одновременно, обеспечивали бы низкую стоимость их производства. Такой альтернативой могут быть растения - дешевой, безопасной и эффективной.

Растительные экспрессионные системы обладают рядом преимуществ перед системами, основанными на использовании микробных или животных клеток.

Растения имеют более близкий к животным белоксинтезирующий аппарат, чем бактерии или грибы. Производство белков в растениях не требует сложных и дорогостоящих биореакторов или ферментёров, что существенно снижает стоимость конечного продукта [2]. Растения не подвержены вирусным и прионным заболеваниям человека и животных, что упрощает выделение и очистку рекомбинантных белков. Экспрессионные системы на основе растений могут обеспечивать сырьём крупномасштабные производства, с возможностью его быстрого и практически неограниченного масштабирования. Использование различных вариантов генетических конструкций позволяет накапливать рекомбинантный белок в оптимальных компартментах клетки или органах, что существенно упрощает его выделение. Таким образом, возможность получения рекомбинантных белков, практически идентичных своим натуральным аналогам при одновременном снижении стоимости их производства, делает биофарминг привлекательным направлением биотехнологии [2].

В настоящее время растительные экспрессионные системы имеют ограниченное использование. Это обусловлено рядом факторов, в частности недостаточным уровнем накопления многих рекомбинантных белков в растениях-продуцентах, как в стабильно-трансформированных растениях, так и при использовании транзистентных систем. Важнейшим фактором, сдерживающим широкое внедрение технологий производства рекомбинантных белков, являются опасения общественности относительно возможного неконтролируемого распространения чужеродной ДНК в окружающей среде. Эти ограничения в настоящее время практически исключили возможность культивирования растений-продуцентов в полевых условиях. Значительную часть затрат при производстве рекомбинантных белков в растениях составляют затраты на их выделение и очистку, что обусловлено присутствием в биомассе продуцента большого количества собственных белков и разнообразных вторичных метаболитов.

Указанные проблемы могут быть успешно решены путём разработки новых экспрессионных систем и совершенствования уже существующих применительно к характеристикам целевого белка и особенностям его последующего использования. Повышение уровня накопления целевого белка возможно, в частности, путём подбора вида растения-продуцента; совершенствования структуры экспрессионных кассет, включая выбор оптимальных регуляторных элементов; транспорта целевого белка в оптимальный для его накопления компартмент клетки. Совершенствование методов выделения рекомбинантных белков из биомассы растений является принципиально важным при разработке растительных экспрессионных систем. Особенно актуальным является разработка культивационных систем, исключающих неконтролируемый вынос в окружающую среду рекомбинантной ДНК. Проведение этих исследований является необходимым и актуальным для внедрения методов и достижений биофарминга в широкое практическое использование.

Степень разработанности темы исследования

Несмотря на прогресс в области получения рекомбинантных белков с использованием растительных экспрессионных систем, эта тема требует дальнейшей разработки. Так, углубленных исследований требует вопрос повышения уровня накопления целевых белков, что подразумевает необходимость изучения различных видов растений-продуцентов, совершенствования структуры экспрессионных кассет и соответствующих регуляторных элементов. Требуют дальнейшего изучения вопросы оптимизации транспорта целевого белка в наиболее подходящие для его накопления компартменты клетки или органы растения. Особенно актуальным является разработка замкнутых систем для культивирования растений - продуцентов, исключающих неконтролируемый вынос в окружающую среду рекомбинантной ДНК. Разработка таких систем включает получение продуцентов на основе растений, наиболее подходящих для культивирования в замкнутых системах.

Разработка замкнутых культивационных систем и получение растений - продуцентов для них в настоящее время находится на ранних этапах и требует проведения дальнейших исследований. Таким образом, тема получения рекомбинантных белков различного назначения в растениях требует дальнейшей теоретической и экспериментальной разработки.

Исследование направлено на решение научной проблемы получения в растениях рекомбинантных белков различного назначения.

Цели и задачи исследования

Цель исследования: разработка и изучение растительных экспрессионных систем для получения рекомбинантных белков промышленного и фармацевтического назначения.

Исходя из цели исследования решались следующие **задачи**:

1. На примере сверхсладкого белка промышленного назначения тауматина II изучить влияние локализации рекомбинантных белков в различных компартментах клетки и органах растения на их накопление в гетерологичных продуцентах.

2. Изучить особенности экспрессии рекомбинантного тауматина II в растениях томата, органолептические свойства их плодов и агрономические характеристики линий - продуцентов, разработать лабораторный протокол выделения рекомбинантного тауматина II.

3. Изучить влияние структуры рекомбинантного белка, в том числе его слияния с различными белками – партнёрами, на экспрессию в растениях – продуцентах на примере пептида M2e вируса гриппа птиц H5N1 и гирудина 2.

4. Провести анализ особенностей экспрессии рекомбинантного пептида M2e вируса гриппа птиц H5N1 в трансгенных растениях ряски малой, оценить иммуногенность рекомбинантного пептида M2e при оральной иммунизации лабораторных животных.

5. Изучить особенности экспрессии гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека в растениях - продуцентах ряски малой.

Научная новизна

1. Показана важность оптимальной компартиментализации рекомбинантных белков для их максимального накопления в растениях-продуцентах. Максимальное накопление рекомбинантного тауматина II в трансгенных растениях наблюдалось при его экспрессии в препроформе с нативными N- и C- концевыми сигнальными пептидами. Транспорт тауматина II в апопластное пространство или в цитоплазму клетки вел к снижению уровня его накопления. Накопление тауматина II в плодах томата было в 20-100 раз выше, чем в листьях.

2. Впервые показана высокая стабильность и полное сохранение органолептических характеристик рекомбинантного тауматина II в растительных тканях.

3. Рекомбинантный тауматин II был впервые выделен из плодов томата, его идентичность натуральному была подтверждена методом MALDI-MS. Разработанный протокол обеспечивал высокий выход тауматина II и его чистоту. Органолептический анализ подтвердил полную идентичность вкусовых характеристик тауматина II, выделенного из плодов томата, вкусовым характеристикам тауматина из природного источника *T. daniellii*.

4. Пептид M2e вируса гриппа птиц H5N1 без слияния не экспрессировался, в то время как слияние пептида M2e с β -глюкуронидазой или с субъединицей В рицина вело к его стабильному накоплению в растениях. Накопление пептида M2e в тканях растений было выше при его слиянии с β -глюкуронидазой, чем с субъединицей В рицина, полученные данные указывают на существенное влияние партнёра на уровень накопления целевого белка.

5. Установлено, что оптимальным является экспрессия нуклеотидной последовательности, кодирующей а.о. 1 - 30 белка M2. Включение в экспрессируемую последовательность нижележащего трансмембранного участка белка M2 вело к снижению экспрессии пептида M2e. Установлено, что накопление слитого белка M2e - RTB не зависело от его компарментализации.

6. Впервые получены стабильно трансформированные растения ряски малой, экспрессирующие пептид M2e, слитый с RTB. Оральная иммунизация мышей препаратами белка трансгенных растений ряски, содержащими RTB - M2e, вызывала индукцию специфических к M2e антител. Иммунизация мышей слитым белком RTB - M2e вызывала существенно более сильную индукцию анти-M2e антител, чем иммунизация белком M130- β -глюкуронидаза.

7. Впервые получены трансгенные растения ряски малой, трансформированные геном ГКСФ человека, с оптимизированной для экспрессии в растениях структурой, включая оптимизацию кодонного состава гена и использование N- концевых сигналов однодольных растений. Рекомбинантный ГКСФ накапливался в тканях ряски на уровне до 70 мг/кг сырой массы, что выше, чем в большинстве экспериментов с использованием стабильно трансформированных растений.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные нами линии томата могут быть использованы для получения сверхсладкого белка тауматина II. Рекомбинантный тауматин II был выделен из плодов томата, органолептический анализ подтвердил полную идентичность его вкусовых характеристик вкусовым характеристикам тауматина из природного источника *T. daniellii*. Линия трансгенных томатов T91, накапливающая в плодах тауматин на уровне до 150 мг/кг сырой массы плодов может быть использована как продуцент этого белка для нужд пищевой и фармацевтической отраслей промышленности.

Результаты исследований продемонстрировали возможность использования трансгенных растений ряски малой для получения рекомбинантных белков различного функционального назначения. Линии ряски, накапливающие до 70 мг/кг сырой массы рекомбинантного ГКСФ человека, могут быть использованы как продуценты этого белка.

Полученные в результате исследований новые знания будут использованы при разработке методов получения рекомбинантных белков различного назначения в растениях. В частности, полученные данные актуальны для разработки подходов с использованием замкнутых культивационных систем, минимизирующих экологические риски при производстве рекомбинантных белков.

Методология и методы исследования

Диссертационная работа была выполнена в Лаборатории экспрессионных систем и модификации генома растений филиала Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, г. Пущино. Результаты, представленные в работе, получены с использованием различных современных методов биотехнологии и генетической инженерии растений, включая методы их культивирования *in vitro*, регенерации целых растений из различных соматических тканей, агробактериальной трансформации. Для создания новых генетических конструкций были использованы различные генно-инженерные методы. Для проведения молекулярно-биологических анализов растений – объектов исследования были использованы методы полимеразной цепной реакции, секвенирования ДНК, вестерн – блот анализа, иммуноферментного анализа и другие методы молекулярной биологии. Препараты рекомбинантных белков изучались с использованием методов жидкостной хроматографии, в.т.ч. аффинной и гель-фильтрации. Оценка иммуногенности рекомбинантного пептида M2e проводилась путём иммунизации мышей, все манипуляции с животными выполнялись в соответствии с

протоколами, одобренными этической комиссией ИБХ РАН. В ходе исследований были использованы различные информационные ресурсы, включая базы данных GenBank, DrugBank, ExPASy. Для дизайна и анализа последовательностей нуклеиновых кислот и аминокислот применяли программные продукты DNA2.0 Gene Designer, Gene Composer, GeneRunner, BLAST, SignalP. Статистическую обработку данных осуществляли с использованием моделей дисперсионного анализа ANOVA с использованием программы Statistica 6.1. Используемые методы позволили комплексно реализовать поставленные задачи, подробное описание использованных методик представлено в разделе «Материалы и методы» настоящей работы.

Личный вклад автора

В диссертации изложены результаты исследований, выполненных автором лично либо при его непосредственном участии. Автор принимал участие на всех этапах работы – от постановки задач и формулирования проблем, планирования и проведения ключевых экспериментов до интерпретации, анализа, обобщения и подготовки научных публикаций по результатам исследований. Имена соавторов указаны в соответствующих публикациях.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Для максимального накопления тауматина II оптимальной является его экспрессия в препроформе с нативными N- и C- концевыми сигнальными пептидами, обеспечивающими, предположительно, его вакуолярный транспорт. Локализация тауматина II в апопластном пространстве ведёт к снижению уровня его накопления, в цитоплазме клетки тауматин II не накапливается.

2. Максимальное накопление рекомбинантного тауматина II имеет место в плодах томата, в 20 – 100 раз больше, чем в листьях, и достигает 4% от общего растворимого белка.

3. Накопление рекомбинантного тауматина II в растениях томата не влияет на агрономические характеристики растений-продуцентов, включая среднюю урожайность и вес плодов. Томаты, трансформированные геном тауматина II полностью соответствуют исходной линии Ялф.

4. Органолептические характеристики рекомбинантного тауматина II, выделенного из плодов томата, полностью идентичны соответствующим характеристикам тауматина II из *T. daniellii*.

5. Разработанный лабораторный протокол выделения рекомбинантного тауматина II из плодов томата обеспечивает его выход, равный 73,7% и чистоту 93,1%. Выход тауматина II составил 5,4 мг/100г сырой массы томата.

6. Стабильная экспрессия пептида M2e вируса гриппа птиц возможна при слиянии с белками – партнерами: β -глюкуронидазой и с субъединицей В рицина. Без слияния с белком – партнёром пептид M2e не накапливается в тканях растения – продуцента, а гирудин 2 накапливается на низком уровне.

7. Пептид M2e вируса гриппа птиц, слитый с β -глюкуронидазой накапливается в трансгенных растениях ряски малой на более высоком уровне, чем при слиянии с субъединицей В рицина. Оральная иммунизация мышей препаратами белка трансгенных растений ряски, содержащими слитый белок RTB - M2e, вызывает индукцию специфических к M2e антител на более высоком уровне, чем в случае иммунизации слитым белком M130 - β -глюкуронидаза.

8. Накопление рекомбинантного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека в растениях ряски малой достигает 70 мг рекомбинантного GCSF/кг сырой массы продуцента.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 1.5.6 - Биотехнология.

Степень достоверности и апробация работы

Работа выполнена на современном оборудовании с применением реактивов и расходных материалов от ведущих мировых производителей. Для всех полученных результатов проведена надлежащая статистическая обработка данных и показана воспроизводимость в независимых сериях экспериментов.

Основные результаты работы были представлены в стендовых и устных докладах на конференциях и симпозиумах, в том числе международных: PLANT-BASED VACCINES & ANTIBODIES (Verona, Italy, 2009); MUCOSAL VACCINES ADJUVANTS & DELIVERY 2013 Conference (Copenhagen, Denmark, 2013); International Association of Plant Biotechnology Congress 2014 (Melbourne, Australia, 2014); International Conference on DUCKWEED RESEARCH and APPLICATIONS (Kerala, India, 2017); 14th Quadrennial Congress of the International-Association-of-Plant-Biotechnology (IAPB) (Дублин, Ирландия, 2018); 5th International ICDRA Conference DUCKWEED RESEARCH and APPLICATIONS (Rehovot, Israel, 2019); 6-я международная научная конференция «Генетика, геномика, биоинформатика и биотехнология растений (PlantGen2021)» (Новосибирск, Россия, 2021); IV международная научно-практическая конференция «Геномика и современные биотехнологии в размножении, селекции и сохранении растений (GenBio2024)» (Москва, Россия, 2024) и др.

Публикации

По результатам проведённых исследований опубликовано 31 научная статья в рецензируемых журналах, из них по теме диссертации 17; 3 главы в монографиях, из них по теме диссертации 2; опубликовано 20 тезисов докладов на российских и международных конференциях.

Список публикаций автора по теме диссертации

Статьи

1. **Фирсов А.П.**, Куликов И.М., Долгов С.В. Сверхсладкий белок тауматин II в селекции садовых растений // Садоводство и виноградарство. 2024. № 5. С. 5-14.
2. Фирсов Г.А., Бутанаев А.М., Суслина С.Н., **Фирсов А.П.** Сладкие белки как новые корригенты вкуса для фармацевтической промышленности: перспективы использования // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. 2024; Том 20. № 3. С. 41–51. ISSN 1996-4741
3. **Firsov A.**, Shaloiko L., Kozlov O., Vainstein A., Dolgov S. Tomatoes expressing Thaumatin II retain their sweet taste after salting and pickling processing // Journal of the Science of Food and Agriculture. 2021. Vol. 101. № 12. P. 5286–5289. DOI:10.1002/jsfa.11168.
4. Khvatkov P., **Firsov A.**, Shvedova A., Kozlov O., Chernobrovkina M., Pushin A., Shaloiko L., Dolgov S. *Wolffia arrhiza* as a promising producer of recombinant hirudin // 3 Biotech. 2021. Vol. 11. Article #209. DOI:10.1007/s13205-021-02762-3
5. Kozlov O.N., Mitiouchkina T.Y., Tarasenko I.V., Shaloiko L.A., **Firsov A.P.**, Dolgov S.V. Agrobacterium-Mediated transformation of *Lemna minor* L. with hirudin and β -glucuronidase genes // Applied Biochemistry and Microbiology. 2019. Vol. 55. № 8. P. 805–815. DOI:10.1134/S0003683819080076.
6. **Firsov A.**, Tarasenko I., Mitiouchkina T., Shaloiko L., Kozlov O., Vinokurov L., Rasskazova E., Murashev A., Vainstein A., Dolgov S. Expression and immunogenicity of M2e peptide of avian influenza virus H5N1 fused to Ricin toxin B chain produced in duckweed plants // Frontiers in Chemistry. 2018. Vol. 6. P. 22. DOI:10.3389/fchem.2018.00022.
7. Khvatkov P., **Firsov A.**, Shvedova A., Shaloiko L., Kozlov O., Chernobrovkina M., Pushin A., Tarasenko I., Chaban I., Dolgov S. Development of *Wolffia arrhiza* as a Producer for Recombinant Human Granulocyte Colony Stimulating Factor // Frontiers in Chemistry. 2018. Vol. 6. #304. DOI:10.3389/fchem.2018.00304

8. **Firsov A.**, Shaloiko L., Kozlov O., Vinokurov L., Vainstein A., Dolgov S. Purification and characterization of recombinant supersweet protein thaumatin II from tomato fruit // *Protein Expression and Purification*. 2016. Vol. 123. P. 1–5. DOI:10.1016/j.pep.2016.03.002.
9. **Фирсов А.П.**, Тарасенко И.В., Пушин А.С., Шалойко Л.А., Винокуров Л.М., Долгов С.В. Экспрессия в трансгенных растениях табака гена пептида М2е вируса гриппа птиц H5N1 в трансляционном слиянии с субъединицей Б рибосомы // *Биотехнология*. 2015. № 2. С. 55-64.
10. **Firsov A.**, Tarasenko I., Mitiouchkina T., Ismailova N., Shaloiko L., Vainstein A., Dolgov S. High-yield expression of M2e peptide of avian influenza virus H5N1 in transgenic duckweed plants // *Molecular Biotechnology*. 2015. Vol. 57. № 7. P. 653– 661. DOI:10.1007/s12033-015-9855-4.
11. Tarasenko I.V., Taranov A.I., **Firsov A.P.**, Dolgov S.V. Expression of the nucleotide sequence for the M2e peptide of avian influenza virus in transgenic tobacco plants // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2013. Vol. 49. № 8. P. 695–701. DOI:10.1134/S0003683813080061.
12. **Firsov A.P.**, Pushin A.S., Korneeva I.V., Dolgov S.V. Transgenic tomato plants as supersweet protein thaumatin II producers // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2012. Vol. 48. № 9. P. 746–750. DOI:10.1134/S0003683812090025.
13. Korneeva I.V., Varlamova N.V., Pushin A.S., **Firsov A.P.**, Dolgov S.V., Monakhos G.F., Motamedi Shalamzari A., Dzhalilov F.S. Transgenic tomato plants expressing PR-5 protein genes demonstrated disease resistance against *Phytophthora infestans* and *Xanthomonas vesicatoria* // *Acta Horticulturae*. 2011. Vol. 914. P. 415–418. DOI:10.17660/ActaHortic.2011.914.79.
14. Пушин А.С., Овчинникова Е.В., Шульга О.А., **Фирсов А.П.**, Долгов С.В. Аккумуляция рекомбинантного суперсладкого белка тауматина II в апопласте трансгенных растений табака // *Биотехнология*. 2008. № 6. С. 31-40.
15. Korneeva I.V., Shestibratov K.A., Lavrova N.V., **Firsov A.P.**, Lebedev V.G., Kharchenko P.N., Dolgov S.V. Expression of PR-5 protein thaumatin II for

- improving disease resistance and fruit quality of tomato // *Acta Horticulturae*. 2008. Vol. 789. P. 151–158. DOI:10.17660/ActaHortic.2008.789.21.
16. Popowich E.A., **Firsov A.P.**, Mitiouchkina T.Y., Filipenya V.L., Dolgov S.V., Reshetnikov V.N. Agrobacterium-mediated transformation of *Hyacinthus orientalis* with thaumatin II gene to control fungal diseases // *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 2007. Vol. 90. P. 237-244. DOI: 10.1007/s11240-007-9254-z.
17. Korneeva I., **Firsov A.**, Lebedev V., Schestibratov K., Pushin A., Shulga O., Dolgov S. Expression and subcellular localization of PR-5 protein with different signal sequences in transgenic tomato and tobacco plants // *Revue de Cytologie et Biologie végétales - Le Botaniste*. 2005. Vol. 28. P. 260-267.

Главы в монографиях

1. Khvatkov P., **Firsov A.**, Mitiouchkina T., Chernobrovkina M., Dolgov S. Duckweeds for the Production of Therapeutic Proteins // In: *Exploring Plant Cells for the Production of Compounds of Interest*. Springer, Cham. 2021. DOI: 10.1007/978-3-030-58271-5_5
2. **Firsov A.P.**, Pushin A.S., Dolgov S.V. Transgenic Plants as Producers of Supersweet Protein Thaumatin II // In: *Reference Series in Phytochemistry. Sweeteners*. Springer, Part of Springer Science+Business Media. Chapter in the book. 2016. DOI:10.1007/978-3-319-27027-2_11

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, материалов и методов, результатов и обсуждения, выводов, списка сокращений, списка цитируемой литературы, включающего 480 наименований. Работа изложена на 363 страницах и содержит 86 рисунков и 43 таблицы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Экспрессионные системы для получения рекомбинантных белков - достоинства и недостатки

Важнейшим направлением современной биотехнологии является производство рекомбинантных белков. Рекомбинантные белки находят широкое применение в медицине и пищевой промышленности. Ряд белков, например некоторые индустриальные ферменты или белки медицинского назначения (мажорные белки крови, коллаген), могут быть получены из природного сырья. Однако подавляющее большинство востребованных белков невозможно получить из природных источников. В таких случаях для их получения используют биотехнологические подходы, основанные на экспрессии белков в гетерологичных системах.

В производстве рекомбинантных белков, в т.ч. биофармацевтических, используются различные экспрессионные системы - бактериальные, дрожжевые, культуры клеток млекопитающих и насекомых, трансгенные животные [1]. За последние 10 -12 лет наиболее распространёнными экспрессионными системами стали системы, основанные на использовании культуры клеток млекопитающих. Так, за 2015 –2018 гг. в мире было одобрено к применению 62 новых рекомбинантных белка. В культуре клеток млекопитающих производится 52 из них, один рекомбинантный белок (себелипаза α) – в яйцах трансгенных кур, 5 – в *E. coli* и 4 в *S. cerevisiae* [3,4]. Важно отметить, что ряд перспективных экспрессионных систем, включая растительные, имеют ограниченное использование или используются только на лабораторном уровне. По мнению экспертов, это связано с тем, что процесс сертификации соответствующих

производство требует длительного времени и затрат больших средств, что на данном этапе не выгодно для производителей.

Выбор экспрессионной системы зависит от специфики целевого белка. Ряд небольших белков сравнительно простой структуры (например, инсулин, соматотропин, интерфероны и интерлейкины) производятся, преимущественно, в бактериальных системах. Кроме того, в бактериальных системах широко производятся различные антигены для получения вакцин и ряд ферментов (уратоксидаза, карбоксипептидаза и др.) [4,5].

Для белков со сложной структурой (антитела, большинство ферментов, факторов роста, гормонов и др.) использование бактериальных экспрессионных систем нерационально. Это обусловлено тем, что в бактериальных системах трудно получить биологически активные белки животного происхождения, поскольку процессы посттрансляционных модификаций белков бактерий и эукариот сильно отличаются.

Более перспективными являются экспрессионные системы, основанные на использовании дрожжей. Дрожжи имеют эукариотический белоксинтезирующий аппарат и метаболизм. Однако рекомбинантные белки, получаемые в клетках дрожжей, не полностью идентичны своим исходным аналогам. В частности, для рекомбинантных белков, полученных в дрожжевых системах, характерно гипергликозилирование, что существенно влияет на возможность использования такого продукта в медицинских целях [6].

Еще более продвинутыми являются экспрессионные системы на основе клеток насекомых. Это обусловлено тем фактом, что белок-синтезирующая машинерия насекомых способна осуществлять более сложные посттрансляционные модификации рекомбинантных белков, чем это возможно в случае дрожжевых систем. В частности, фолдинг рекомбинантных белков в клетках насекомых проходит более эффективно, чем в клетках грибов; тем самым существенно увеличивается выход целевых белков в растворимой форме. Чаще всего для экспрессии рекомбинантных белков в клетках насекомых используются

вектора на основе вируса полиэдроза из *Autographa californica* (*Baculoviridae*, nuclear polyhedrosis virus, NPV). Вирус содержит двунитевую кольцевую ДНК, патогенен для клеток чешуекрылых и способен легко размножаться в суспензионной культуре клеток кукурузной лиственной совки [7].

К преимуществам бакуловирусных экспрессионных систем относятся: полный спектр эукариотических посттрансляционных модификаций, корректное формирование дисульфидных связей и высокий уровень экспрессии [8]. Существенным достоинством экспрессионных систем на основе клеток насекомых является безопасность (вирусы насекомых не поражают млекопитающих), возможность одновременной экспрессии нескольких гетерологичных генов и относительно лёгкое масштабирование производства [9]. К 2016 году три препарата, полученных в культуре клеток насекомых, разрешены к применению. Это Flublok (Protein Sciences; Meriden, CT, USA) - тривалентная вакцина против гриппа на основе гемагглютинина трёх актуальных штаммов вируса гриппа; Provenge (Sipuleucel-T; Dendreon, Seattle, WA, USA) - терапевтическая вакцина для терапии рака простаты и Cervarix (GlaxoSmithKline; London) - дивалентная вакцина против вируса папилломы человека [5].

Экспрессионные системы на основе клеток насекомых не лишены ряда существенных недостатков. Главный из них - некорректное гликозилирование рекомбинантных белков. Потенциальные сайты гликозилирования часто либо полностью гликозилированы (у млекопитающих, в подавляющем большинстве случаев, гликозилируется только часть таких сайтов), либо вообще не гликозилированы, что может вести к образованию некорректных гликоформ [10,11]. При экспрессии многих гетерологичных белков это имеет принципиальное значение. Необходимо обратить внимание, что все три рекомбинантных белка, разрешенных для медицинского использования и полученных в культуре клеток насекомых, являются вакцинами, где характер гликозилирования не так важен, как например, в случае антител или факторов роста. Кроме того, в клетках насекомых многие белки экспрессируются с

образованием внутриклеточных агрегатов, что затрудняет их дальнейшее выделение и требует дополнительных усилий по растворению и рефолдингу. При этом многие гетерологичные белки характеризуются низким уровнем экспрессии и плохой секрецией в культуральную среду.

Для получения белков, для корректного функционирования которых пост-трансляционные модификации имеют принципиальное значение, используются методы экспрессии рекомбинантных белков в культуре клеток животных или гибридом (в случае моноклональных антител [12]). Для современной медицины значение таких белков очень велико. Несмотря на то, что эти белки являются трудными для получения, проблема их производства решается с использованием экспрессионных систем на основе культуры клеток млекопитающих. Главным достоинством этих систем является возможность получения аутентичных комплексных рекомбинантных гликопротеинов, чей фолдинг осуществляется *in vivo* и которые структурно и функционально идентичны своим природным аналогам.

Главным недостатком культур клеток млекопитающих является высокая стоимость производства, обусловленная затратностью процесса культивирования клеток (высокая стоимость компонентов питательных сред, большие затраты на обслуживание и амортизацию оборудования и т.п.) [13]. Другим недостатком является возможность контаминации клеток патогенами человека и животных, в том числе прионной природы. Это связано с использованием в составе сред различных сывороток и белков животного происхождения (например, альбумина, трансферрина и фибронектина). Эти компоненты получают из отходов мясоперерабатывающей промышленности, как следствие, требуются значительные затраты для постоянного контроля их качества и безопасности. Использование бессывороточных сред уменьшает потребность в компонентах животного происхождения, но не исключает их полностью.

Важно отметить, что хотя клетки животных могут синтезировать типичные для млекопитающих, в т.ч. человека, гликановые структуры, в культуре

достаточно часто наблюдается их вариабельность. Степень такой вариабельности зависит как от типа используемых для экспрессии рекомбинантного белка клеток и условий культивирования, так и от особенностей самого белка. Поэтому для производства высококачественных и гомогенных рекомбинантных гликопротеинов требуются постоянные усилия для оптимизации процесса культивирования.

Часть проблем, присущих культуре клеток млекопитающих, может быть решена путём экспрессии рекомбинантных белков в трансгенных животных. В этом направлении достигнуты значительные успехи, получены трансгенные мыши, кролики, свиньи, овцы, козы и коровы - продуценты различных рекомбинантных белков. Эти белки могут продуцироваться в составе молока, крови, мочи или семенной плазмы [13]. Выход рекомбинантных белков в молоке трансгенных животных варьирует в широких пределах - от единиц миллиграмм до нескольких грамм на один литр молока [14,15,16].

В большинстве экспериментов уровни экспрессии рекомбинантных белков составляли десятые доли грамма, изредка - до 2 г/л молока. Тем не менее, учитывая молочную продуктивность трансгенных животных (в среднем до 8000 л/год у коров, 1000 л/год у коз, 300 л/год- овцы [17]), даже сравнительно небольшие уровни накопления могут обеспечивать производство рекомбинантных протеинов в масштабах, достаточных для удовлетворения потребностей во многих классах белков фармацевтического назначения [18]. Необходимо отметить, что в подавляющем большинстве случаев, рекомбинантные белки человека, экспрессированные в трансгенных животных, по своей активности не отличались от своих нативных аналогов. В настоящее время одобрены для применения два рекомбинантных терапевтических белка, экспрессированных в молоке трансгенных животных- ингибитор С1-эстеразы человека (кролики) и антитромбин альфа (козы) [4].

Экспрессионные системы на основе трансгенных животных не лишены своих недостатков. Это, в частности, высокая стоимость получения трансгенных

животных (особенно овец и коров), длительный период времени, необходимый для отбора животных- продуцентов целевого белка и формирования стада необходимой численности. При этом, например, стоимость содержания одной коровы в условиях Good Agricultural Practices составляет более 10000\$ в год [13]. Необходимо, также, иметь в виду, что животные восприимчивы к различным патогенам человека, в частности коровы - к прионным болезням, что ведёт к дополнительным и постоянным затратам на содержание животных-продуцентов. Важно отметить, что в молоке животных содержатся различные эндогенные белки - лактоферин, лизоцим, α -лактальбумин, иммуноглобулины, концентрация которых может достигать 0,3-0,5 г/л. В случае экспрессии антител или белков молока человека, очистка рекомбинантного белка от его животных аналогов является большой дополнительной проблемой, и требует введения ряда дорогостоящих хроматографических этапов [19].

Таким образом, все используемые в настоящее время для производства рекомбинантных белков экспрессионные системы имеют как достоинства, так и недостатки. Главным достоинством микробиологических систем является относительная лёгкость производства рекомбинантных белков, основным недостатком - отсутствие (бактерии) или некорректный характер (дрожжи) посттрансляционных модификаций. В тоже время, системы на основе клеток млекопитающих или трансгенных животных характеризуются идентичным человеческому характером посттрансляционных модификаций рекомбинантных белков и, одновременно, сложностью технологий и высокой стоимостью их производства.

1.2. Растения как платформа для биофарминга

Существующие ограничения вызвали необходимость поиска и разработки альтернативных экспрессионных систем, в которых посттрансляционные модификации рекомбинантных белков осуществлялись бы аналогично таковым у человека (или максимально близко) и которые, одновременно, обеспечивали бы низкую стоимость их производства. Такой альтернативой могут являться растения.

Растительные экспрессионные системы обладают рядом важных преимуществ. Растения имеют мощный белоксинтезирующий аппарат, включающий все известные пути ко-трансляционных и пост-трансляционных модификаций. Целевые белки возможно накапливать в определённых компартментах клетки или органах, что может существенно увеличить его аккумуляцию и упростить выделение. Производство рекомбинантных белков в растениях не требует сложных биореакторов как в случае микроорганизмов или клеток млекопитающих [2]. Экспрессионные системы на основе растений могут обеспечивать сырьём крупномасштабные производства, с возможностью его быстрого и практически неограниченного масштабирования. Растения не подвержены заболеваниям человека и животных, в т.ч. вирусным и прионным, что существенно упрощает производство и очистку рекомбинантных белков. Наконец, существуют детально разработанные агротехники культивирования растений в промышленных масштабах, методы хранения и переработки полученного сырья. Преимущества и недостатки различных экспрессионных систем представлены в Таблице 1.

Таблица 1 - Преимущества и недостатки различных экспрессионных систем для получения рекомбинантных белков.

	Экспрессионная система						
	Бактерии	Дрожжи	Культура клеток насекомых	Культура клеток млекопитающих	Трансгенные животные	Культура клеток растений	Трансгенные растения
Технологические параметры							
Стоимость производства	низкая	средняя	высокая	высокая	высокая	низкая	очень низкая
Время, требуемое для начала производства	короткое	среднее	среднее	длительное	очень длительное	короткое	длительное
Масштабируемость	высокая	высокая	средняя	очень низкая	низкая	высокая	очень высокая
Стоимость хранения	умеренная	умеренная	высокая	высокая	высокая	низкая	низкая
Риски							
Терапевтические риски*	умеренные (эндотоксины)	низкие	низкие	высокие (вирусы, прионы)	высокие (вирусы, прионы)	низкий	низкий
Публичные опасения	низкие	низкие	низкие	средние	высокие	низкие	высокие ^{&} низкие ^{&&}
Технические факторы							
Уровень экспрессии	высокий	от низкого до высокого	от низкого до высокого	от низкого до умеренного	от умеренной до высокой	от умеренной до высокой	от умеренной до высокой
Гликозилирование**	отсутствует	гипергликозилирование	гипергликозилирование	аналогично человеческому	аналогично человеческому	незначительные различия	незначительные различия
Ограничения размера гетерологичного гена	требуются дополнительные исследования	требуются дополнительные исследования	требуются дополнительные исследования	да	да	требуются дополнительные исследования	нет
Корректная сборка мультимерных протеинов	нет	нет	требуются дополнительные исследования	нет	да	требуются дополнительные исследования	да
Точность фолдинга гетерологичных белков	низкая	средняя	средняя	высокая	высокая	высокая	высокая
Качество рекомбинантного белка	низкая	средняя	средняя	высокая	высокая	высокая	высокая
Гомогенность рекомбинантного белка	низкая	средняя	средняя	средняя	высокая	высокая	высокая

*- в т. ч. риск контаминации патогенами человека; **- относительно человеческих аналогов[&] - при культивировании в условиях открытого грунта; && - при культивировании в замкнутых системах

В растительных экспрессионных системах отсутствуют ограничения на размер гетерологичного гена (что характерно для культур клеток млекопитающих). В растениях с высокой точностью происходит формирование дисульфидных связей, как внутримолекулярных, так и межмолекулярных. Как следствие, фолдинг и сборка мультимерных рекомбинантных белков со сложной структурой происходят с высокой точностью. Например, в растениях возможна экспрессия функциональных секреторных антител IgA, которые представляют собой комплекс из десяти полипептидных цепей трёх различных типов, которые должны быть корректно соединены между собой при помощи нескольких дисульфидных связей [20]. У млекопитающих для корректной сборки таких антител требуется два типа клеток.

Необходимо отметить, что у растений и животных имеются некоторые различия в характере гликозилирования. Как правило, гликопротеины растений содержат D-ксилозу и L-фукозу, соединённую α -1,3-связью с первым коровым остатком GlcNAc N-гликана. В тоже время, L-фукоза у животных присоединяется к первому коровому остатку GlcNAc с помощью α -1,6-связи, ксилоза в составе гликопротеинов животных не встречается. При этом, у растений отсутствуют терминальные остатки галактозы и сиаловой кислоты, которые характерны для гликопротеинов животных [21]. Хотя эти различия считаются незначительными, они могут влиять на эффективность медицинского применения рекомбинантных белков [22]. В настоящее время проблема гликозилирования рекомбинантных белков успешно решается методами гликоинженерии растений [23]. Интересно, что некоторые терапевтические белки, несущие гликаны растительного происхождения, оказываются эффективнее по сравнению с исходными аналогами. Одним из таких примеров является Elelyso, рекомбинантная форма человеческой глюкоцереброзидазы. Она продуцируется в клетках моркови и транспортируется в вакуоль, при этом специфичные к вакуоли растительные гликаны улучшают поглощение рекомбинантной глюкоцереброзидазы макрофагами человека [24].

В целом, рекомбинантные белки, полученные в растениях, характеризуются большей гомогенностью, чем белки, полученные в культуре клеток млекопитающих или насекомых, или в микроорганизмах. Растительные экспрессионные системы характеризуются гибкостью в масштабировании, что особенно ценно для быстрого производства больших количеств вакцин против актуальных штаммов патогенов. Кроме того, крупные масштабы производства обеспечивают возможность получения больших количеств относительно недорогих рекомбинантных белков, потребляющихся постоянно и в больших количествах в фармацевтике (например, белки крови, коллаген и другие структурные белки и т.п.) и в пищевой промышленности для производства специализированного питания (белки человеческого молока, сахарозаменители белковой природы и т.п.).

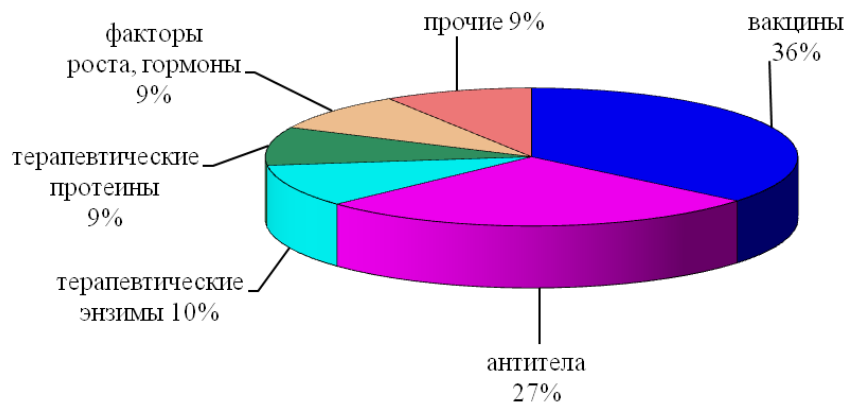


Рисунок 1 - Примерная структура исследований по получению белков медицинского и ветеринарного назначения в экспрессионных системах на основе стабильно-трансформированных растений. Указаны основные классы рекомбинантных белков и доля исследований по их получению в общем числе исследований по биофармингу. По данным [25,26,27,28,29,30,31,32].

К настоящему времени, в мире изучается возможность получения в растениях множества рекомбинантных белков медицинского и ветеринарного назначения, относящихся к самым различным классам, в том числе антител, как

терапевтических, так и диагностических; вакцин против вирусных и бактериальных патогенов; цитокинов; различных факторов роста и гормонов; белков крови; разнообразных структурных белков; ферментов и многих других (Рисунок 1). Основные усилия направлены на разработку вакцин против вирусных и бактериальных патогенов человека и животных- 36% от общего числа исследований. Это обусловлено необходимостью разработки методов производства больших количеств дешевых вакцин - как для нужд медицины (особенно бедных стран третьего мира), так и для удовлетворения потребностей индустриального животноводства, где вакцинация животных является неотъемлемой частью технологического процесса. Некоторые примеры экспрессии в стабильно - трансформированных растениях рекомбинантных антигенов для последующей разработки ветеринарных вакцин представлены в Таблице 2. Другое важное направление (27% от числа исследований)- разработка альтернативных методов производства относительно недорогих рекомбинантных антител, чье широкое внедрение в медицинскую практику сдерживается сейчас высокой стоимостью их получения в культуре клеток гибридом. Методы и подходы биофарминга являются очень перспективными для решения этой задачи.

Значительные усилия направлены на разработку методов получения других классов рекомбинантных белков человека медицинского назначения – ферментов, факторов роста и гормонов, разнообразных терапевтических, том числе структурных, белков (в сумме 28% от общего числа исследований). Таким образом, разработка экспрессионных систем на основе растений для получения разнообразных рекомбинантных белков медицинского назначения, сочетающих достоинства микробиологического производства и культуры клеток животных, при этом максимально свободных от их недостатков, является актуальной задачей, на решение которой в настоящее время направлены существенные усилия.

Таблица 2 - Примеры экспрессии в стабильно трансформированных растениях рекомбинантных антигенов для разработки вакцин ветеринарного назначения.

Антиген	Болезнь (патоген)	Вид растения	Уровень экспрессии	Ссылка
Протеин G	Бешенство (вирус бешенства)	Морковь	0,4%-1,2% ОРБ	[33]
Протеин G	Бешенство (вирус бешенства)	Кукуруза	25 мкг/г свежего веса семян	[34]
Протеин G слитый с RTB	Бешенство (вирус бешенства)	Томат, бородатый корень	0,9%-1,1% ОРБ	[35]
F1-V	Чума (<i>Yersinia pestis</i>)	Латук	0,08% ОРБ	[36]
F1-V	Чума (<i>Yersinia pestis</i>)	Морковь	0,3% ОРБ	[37]
Гликопротеин E2	Классическая чума свиней (вирус классической чумы свиней, CSFV)	Латук, люцерна	10 мкг/г сухого веса листьев люцерны, 160 мкг/г сухого веса листьев латука	[38]
Гликопротеин E2	Классическая чума свиней (вирус классической чумы свиней, CSFV)	Рис (суспензионн ая культура)	5,1 мкг/мг трансгенного каллуса	[39]
Ген NA	Грипп птиц (вирус гриппа птиц H1N1)	Латук	0,018%–0,045% ОРБ	[40]
Ген H5 штамма A HPAI	Грипп птиц (вирус гриппа птиц)	Арабидопсис	700 мкг/г сухого веса или 140 мкг/г свежего веса листьев при локализации в ЭПР	[41]

Продолжение Таблицы 2				
Ген NP	Грипп птиц (вирус гриппа птиц H3N2)	Кукуруза	8,0-35 мкг/г семян	[42]
Антигены ESAT6 и CFP10	Туберкулёз (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)	Морковь	0,002%-0,056% ОРБ	[43]
Антигены CFP10-ESAT6-dIFN	Туберкулёз (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)	Морковь	0,035% ОРБ	[44]
Ген MOMP, слитый с LTB	Орнитоз, (пситтакоз) (<i>Chlamydoiphila psittaci</i>)	Рис	0,0033%-0,0054% ОРБ	[45]
Протеин S вируса TGEV	Гастроэнтерит (трансмиссибельный вирус гастроэнтерита TGEV)	Кукуруза	0,1%–0,8% ОРБ	[46]
Антигены G1 и G2	Конго-крымская геморрагическая лихорадка (вирус CCHFV)	Табак (культура бородатых корней)	0,45% ОРБ	[47]
Протеин E	Вирус японского энцефалита	Рис	1,1–1,9 мкг/мг ОРБ	[48]
Антиген GS60	Пастереллёз (<i>Pasteurella multocida</i>)	Люцерна	0,02% ОРБ	[49]
Ген HN	Болезнь Ньюкасла (вирус NDV болезни Ньюкасла)	Табак	0,069% ОРБ	[50]
Гены F и HN	Болезнь Ньюкасла (вирус NDV болезни Ньюкасла)	Картофель	0,3–0,6 мкг/мг ОРБ	[51]
Ген HN	Болезнь Ньюкасла (вирус NDV болезни Ньюкасла)	Табак	0,2%–0,4% ОРБ	[52]
Ген F	Болезнь Ньюкасла (вирус NDV болезни Ньюкасла)	Рис	40,3 мкг/г зерна	[53]
Гены F и HN	Болезнь Ньюкасла (вирус NDV болезни Ньюкасла)	Кукуруза	Протеин F – 0,5% ОРБ; протеин HN – 0,8% ОРБ.	[54]

Продолжение Таблицы 2				
Ген Р1	Ящур (болезнь Foot-and-Mouth, вирус FMDV)	Рис	0,6–1,3 мкг/мг ОРБ	[55]
Два серотипа VP1, тип О-А	Ящур (болезнь Foot-and-Mouth, вирус FMDV)	Кротальярия ситниковая (<i>Crotalaria juncea</i>)	1–12 мкг/мг ОРБ	[56]
Stx2EB	Отёчная болезнь поросят (oedema diseases)	Латук	0,8 мг/г сырого веса	[57]
Vt2e-B и F18	Отёчная болезнь поросят (oedema diseases)	Табак	0,3% ОРБ	[58]
СОЕ, слитый с СТВ	Эпидемическая диарея свиней (вирус PEDV)	Латук	0,0065% ОРБ	[59]
		Рис	0,083% ОРБ	
ORF5	Репродуктивный и респираторный синдром свиней (вирус PRRSV)	Табак	0,011% ОРБ	[60]
ORF5	Репродуктивный и респираторный синдром свиней (вирус PRRSV)	Банан	0,021%–0,037% ОРБ	[61]
Ген VP60	Геморрагическая лихорадка кроликов (вирус RHDV)	Различные виды	0,01%-0,7% ОРБ	[62]
Протеин L1	Папилломы, кролик (cottontail rabbit papillomavirus CRPV)	Табак	1,0 мг/кг сырого веса	[63]
Протеин ТМ-1	Хроническая респираторная болезнь кур (<i>Mycoplasma gallisepticum</i>)	Пшеница	1,03 мг/г сухого веса эндосперма семян	[64]

1.3. Коммерциализация рекомбинантных белков, полученных в растительных экспрессионных системах

В настоящее время растительные экспрессионные системы уже перешли в область реального производства. В Таблице 3 представлены примеры рекомбинантных белков индустриального назначения, которые уже коммерциализированы и присутствуют на рынке. Главным конкурентным преимуществом этих белков является низкая цена и отсутствие примесей животного происхождения, что делает их особенно ценными для использования в исследованиях и в биофармацевтических производствах.

В ранних исследованиях стоимость производства рекомбинантных белков в растениях оценивалась, в среднем, как равная 2-10% стоимости их производства в бактериальных или дрожжевых системах, и в 0,03-0,1% стоимости производства в культуре клеток млекопитающих [65,66,67]. Необходимо отметить, что в этих исследованиях не учитывались затраты, связанные с культивированием трансгенных растений в соответствии с Good Agricultural Practice (GAP), и с выделением целевых белков из биомассы продуцентов. Но даже с учетом этих затрат себестоимость производства рекомбинантных белков в растительных системах существенно ниже, чем в культуре клеток млекопитающих или в трансгенных животных.

По данным Kaufman и Kalaitzandonakes себестоимость производства рекомбинантных белков в растениях оценивалась в диапазоне от 6 до 34% от стоимости их производства в культуре клеток млекопитающих [2]. Spök и Karner [68] оценили среднюю стоимость производства рекомбинантных белков в растениях в 5-25% от стоимости их производства в культуре клеток млекопитающих с учетом затрат на выделение и очистку. Себестоимость рекомбинантных белков, полученных в растительных системах, варьировала по

данным этих авторов в широком диапазоне - от 24 до 1300 евро/г, главным фактором, её определяющим, являлся уровень экспрессии целевого белка.

По данным исследования [2] в случае производства моноклональных антител в трансгенных растениях, их себестоимость снижается примерно на 1/3 по сравнению с производством в культуре клеток млекопитающих. По нашему мнению, эта оценка экономической эффективности растительных экспрессионных систем больше соответствует реальности, чем сделанные ранее. Кроме того, первоначальные капиталовложения в случае организации производства на основе растительных систем оказались почти в 2 раза ниже, чем в случае строительства производства с использованием культур клеток СНО.

Растительные экспрессионные системы уже вполне конкурентны с микробиологическими системами, в частности, с системами на основе грибов. В исследовании Tusé и др. [69] проведена сравнительная оценка затрат на производство индустриального фермента целлюлазы. Рекомбинантная целлюлаза экспрессировалась в листьях трансгенных растений табака, растения-продуценты культивировали в поле. Грибы - продуценты культивировали в ферментёрах ёмкостью 280 000л, годовой объём производства целлюлазы в обоих случаях - 2800т. Целлюлаза поставлялась на рынок в виде препарата с низкой степенью очистки. Из данных, представленных в [69] следует, что в случае производства рекомбинантной целлюлазы в трансгенных растениях табака, её себестоимость снижалась на 1/3 по сравнению с производством в ферментёрах. При этом первоначальные капиталовложения, необходимые для запуска производства, при использовании трансгенных растений составили всего 14% от затрат при организации ферментационного производства. Это особенно важно для небольших и средних компаний, так как повышает возможности их выхода на быстрорастущий биотехнологический рынок. Таким образом, растительные экспрессионные системы могут быть экономически эффективны не только в случае производства дорогих биофармацевтических белков, но и в случае производства относительно дешевых белков индустриального назначения.

Производство рекомбинантных белков в растениях в настоящее время особенно выгодно для небольших молодых инновационных компаний, выходящих на рынок с каким-либо новым продуктом. По мнению экспертов, это связано с тем, что процесс сертификации соответствующих производств требует длительного времени и затрат больших средств, что на данном этапе не выгодно для больших производителей. Главными участниками рынка в настоящее время являются относительно небольшие компании, такие как, например, Icon Genetics (Германия), Center for Molecular Biotechnology (США), Synthon (Нидерланды), Medicago (Канада), Protalix (Израиль) и др. Как правило, такие компании специализируются на производстве небольшой группы родственных продуктов на основе проприетарной экспрессионной платформы. Эти компании, производящие различные рекомбинантные белки, вносят значительный вклад в развитие рынка биотехнологий (Таблица 3).

В 2012г в США был одобрен и начались продажи препарата Elelyso (рекомбинантная глюкоцереброзидаза человека) для заместительной терапии болезни Гоше, редкого лизосомального расстройства. Это первый препарат, полученный в растительной экспрессионной системе, одобренный и разрешенный для применения в медицине. Рекомбинантная глюкоцереброзидаза производится в культуре клеток моркови с использованием одноразовой биореакторной системы ProCellEx (сайт компании Protalix).

Таблица 3 - Примеры коммерциализированных рекомбинантных белков промышленного назначения, полученных с использованием растительных экспрессионных систем*.

Продукт	Компания	Назначение	Экспрессионная система	Страна	Преимущества	Ссылка
Трипсин, авидин, эндо-1,4-β-D-глюканаза	ProdiGene/ Sigma- Aldrich	Технические реагенты	Кукуруза, семена, стабильная	США	Низкая цена, отсутствие примесей животного происхождения	http://www.sigmaaldrich.com
Целлобиогидролаза I	Infinite Enzymes/ Sigma- Aldrich	Технический реагент	Кукуруза, семена, стабильная	США	Низкая цена	http://www.sigmaaldrich.com
Факторы роста, цитокины, тиоредоксин, TIMP-2	Agrenvec	Исследовательские реагенты	Табак, листья, транзистная	Испания	Низкая цена, отсутствие примесей животного происхождения	http://www.agrenvec.com
Факторы роста, цитокины	ORF Genetics	Исследовательские реагенты	Ячмень, семена, стабильная	Исландия	Низкая цена, отсутствие примесей животного происхождения	http://www.orfgenetics.com
Фактор роста эпителия	Sif Cosmetics	Косметика	Ячмень, семена, стабильная	Исландия	Низкая цена, отсутствие примесей животного происхождения	http://www.sifcosmetics.com

Продолжение Таблицы 3

Альбумин, лактоферрин, лизоцим, трансферрин, инсулин	Ventria Bioscience/In Vitria	Исследовательск ие реагенты	Рис, семена, стабильная	США	Низкая цена, отсутствие примесей животного происхождения	http://www.invitria.com
Апротинин	Kentucky Bio- Processing	Исследовательск ий реагент	Табак, листья, транзиентная	США	Низкая цена	http://www.kbpllc.com
Коллаген	CollPlant	Исследовательск ий реагент, культура тканей, медицинские применения	Табак, листья, стабильная	Израиль	Низкая цена, отсутствие примесей животного происхождения	http://www.collplant.com
Трипсин, энтерокиназа, факторы роста, цитокнины	Natural Bio- Materials	Исследовательск ие реагенты, косметика	Рис, культура клеток, стабильная	Южная Корея	Низкая цена, отсутствие примесей животного происхождения	http://www.nbms.co.kr
Антитела	Center for Genetic Engineering and Biotechnolog y	Очистка вакцин против гепатита В	Табак, листья, стабильная	Куба	Низкая цена, для индустриальных применений	http://gndp.cigb.edu.cu
α -амилаза	Syngenta	Производство биоэтанола	Кукуруза, семе- на, стабильная	США	Низкая цена (экст- ракт биомассы семян)	http://www.syngenta.com

Продолжение Таблицы 3

Фитаза	Origin Agritech	Корма для животных	Кукуруза, семена, стабильная	Китай	Низкая цена (в составе биомассы семян)	http://www.originseed.com.cn
Факторы роста	NexGen	Компоненты культуры клеток и тканей	Табак, листья, транзистентная	Южная Корея	Низкая цена, отсутствие примесей животного происхождения	http://www.nexgen.com
Факторы роста. Сывороточный альбумин, фибронектин, α -1 антитрипсин и др. рекомбинантные белки человека.	Wuhan Healthgen Biotechnology Corp.	Исследовательские и промышленные (косметическая промышленность) применения	Рис	Китай	Низкая цена, отсутствие примесей животного происхождения	https://www.oryzogen.net

*- по данным [70], с дополнениями.

Из литературных источников следует, что в настоящее время разрабатывается получение методами биофарминга порядка 100-120 различных рекомбинатных белков биофармацевтического назначения. Активные исследования ведутся как в направлении разработки фундаментальных основ биофарминга, так и в области коммерциализации полученных результатов (разработка промышленных технологий получения рекомбинантных протеинов из растений, проведение доклинических и клинических испытаний, сертификация и регистрация полученных препаратов и т.д.).

В Таблице 4 представлены примеры белков медицинского назначения, находящихся на различных этапах клинических испытаний. Из представленных в этой таблице данных видно, что основное внимание уделяется разработке вакцин- из 21 клинического испытания 10 направлено на изучение вакцин. Это обусловлено спецификой растительных экспрессионных систем, которые оптимальны для производства либо недорогих, постоянно требующихся в большом количестве, вакцин (вакцины против гепатита В, сибирской язвы и т.п., получаемые в стабильно трансформированных растениях), либо вакцин для пандемических болезней, когда требуется их быстрое производство, а цена менее существенна (вакцины против пандемических штаммов гриппа, вируса Эбола и т.п., получаемые с помощью транзientной экспрессии).

Значительные усилия направлены на разработку методов получения рекомбинантных антител- такие антитела изучаются в 6 клинических испытаниях. Изучаются антитела P2G12 против ВИЧ, экспрессированные в стабильно трансформированных растениях табака; антитела, направленные против *Streptococcus mutans* для лечения и профилактики кариеса (стабильно трансформированный табак); антитела для лечения неходжкинской лимфомы (ряска, стабильно трансформированные растения). Кроме того, проводятся испытания вакцин на основе моноклональных антител, полученных в растениях

Таблица 4 - Примеры белков медицинского назначения, полученных в растительных экспрессионных системах, и прошедшие различные этапы клинических испытаний*

Продукт	Экспрессионная система	Болезнь	Статус	Инвентор
Талиглуцераза альфа (рекомбинантная глюкоцереброзидаза, prGCD)	Культура клеток моркови и табака (стабильная трансформация)	Болезнь Гоше	Утверждено FDA (2012)	Pfizer/Protalix, Israel
PRX-102, рекомбинантная альфа-галактозидаза А человека	Культура клеток табака (стабильная трансформация)	Болезнь Фабри	Фаза 3, клинические испытания (2016)	Protalix, Israel
Антитела P2G12	Табак (стабильная трансформация)	ВИЧ	Фаза 1 завершена (2011)	University of Surrey, UK
Пандемические вакцины против гриппа на основе гемагглютинина вируса гриппа в составе вирусоподобных частиц	Табак <i>Nicotiana benthamiana</i> , (стабильная трансформация и транзientная экспрессия, (агроинфилтрация))	Грипп	Клинические испытания, завершены Фазы 1 и 2 в период 2009-2013гг	Medicago, Canada
VEN150, рекомбинантный лактоферин человека	Рис, семена (стабильная трансформация)	ВИЧ, хроническое воспаление	Фаза 2, клинические испытания (2016)	Ventria Bioscience, USA
ZMApp, набор из трёх различных моноклональных антител	Табак <i>Nicotiana benthamiana</i> (транзientная экспрессия)	Вирус Эбола	Фаза 2 (2015), клинические испытания (2016)	National Institute of Allergy and Infectious Diseases, USA
Антитела для лечения неходжкинской лимфомы	Ряска (стабильная трансформация)	Неходжкинская лимфома	Преклинические испытания	Synthon, Netherlands

Продолжение Таблицы 4				
Антитела P2G12	Табак (стабильная трансформация)	ВИЧ	Фаза 1, клинические испытания (2011)	Fraunhofer IME, Germany
Моноклональные антитела CaroRx к <i>Streptococcus mutans</i>	Табак (стабильная трансформация)	Профилактика и лечение кариеса зубов	Одобрено к применению в ЕС.	PlanetBiotechnology, USA
Вакцина Pfs25 VLP, белок Pfs25 <i>Plasmodium falciparum</i> в составе VLP на основе вируса мозаики люцерны	Табак (транзientная экспрессия)	Малярия	Фаза 1, клинические испытания (2015)	Center for Molecular Biotechnology, USA
Вакцина PA83-FhCMB, рекомбинантный протективный антиген PA сибирской язвы	Табак (транзientная экспрессия)	Сибирская язва	Фаза 1, клинические испытания (2014)	Center for Molecular Biotechnology, USA
Вакцина HAI-05, гемагглютинин вируса гриппа H5N1	Табак (транзientная экспрессия)	Грипп	Фаза 1, клинические испытания (2011)	Center for Molecular Biotechnology, USA
Рекомбинантный внутренний фактор (IF) человека	Арабидопсис (транзientная экспрессия)	Дефицит витамина B12	Фаза 2 завершена (2006)	University in Aarhus, Denmark
Вакцина H5-VLP+GLA-AF, гемагглютинин вируса гриппа H5N1 в составе VLP	Табак <i>Nicotiana benthamiana</i> (транзientная экспрессия)	Грипп	Фаза 1 завершена (2014)	Infectious Disease Research Institute, USA

Продолжение Таблицы 4				
Вакцина, гибридное антитело, содержащее гипервариабельные участки легкой и тяжелой цепи опухоле-ассоциированных антител, слитые с обычным IgG1-каркасом человека	Табак <i>Nicotiana benthamiana</i> (транзиентная экспрессия)	Неходжкинская лимфома	Фаза 1 завершена (2014)	Icon Genetics, Germany
Вакцина против вируса гриппа H1N1	Табак <i>Nicotiana benthamiana</i> (транзиентная экспрессия)	Грипп	Фаза 1 завершена (2016)	Fraunhofer CMB/iBio, USA
Вакцина против фолликулярной лимфомы	Табак <i>Nicotiana benthamiana</i> (транзиентная экспрессия)	Фолликулярная лимфома	Фаза 1 завершена (2014)	Icon Genetics, Germany
Вакцина против диареи, субъединица В лабильного токсина <i>E. coli</i> ETEC	Кукуруза, картофель (стабильная трансформация)	Диарея путешественников	Фаза 1 завершена (2007)	University of Maryland, USA
Вакцина, поверхностный антиген гепатита В HBsAg	Картофель (стабильная трансформация)	Гепатит В	Фаза 1 (2011)	Roswell Park Cancer Institute, USA
Вакцина, поверхностный антиген гепатита В HBsAg	Картофель, салат (стабильная трансформация)	Гепатит В	Фаза 2 (2010)	Arizona University/T. Jefferson University, USA
SBS-1000, рекомбинантный инсулин человека	Сафлор, семена (стабильная трансформация)	Диабет	Фаза 3 (2012)	SemBioSys Genetics Inc., Canada
Вакцина, модифицированный S белок SARS-CoV-2 в составе VLP.	Табак <i>Nicotiana benthamiana</i> (транзиентная экспрессия)	SARS-CoV-2	Фаза 3 (2022)	Medicago, Canada

* По материалам [71,72,73], с дополнениями.

Nicotiana benthamiana (транзиентная экспрессия)- ZMApp (набор из трёх различных антител против вируса Эбола) и персонализированных вакцин для лечения пациентов с фолликулярной неходжкинской лимфомой.

Рекомбинантная глюкоцереброзидаза человека (талиглюцераза альфа, prGCD), получаемая в культуре клеток моркови, уже разрешена к применению (препарат Elelyso), рекомбинантная альфа-галактозидаза А человека для лечения болезни Фабри в 2016 г. проходит финальную фазу 3 клинических испытаний. Рекомбинантные белки человека- лактоферин, внутренний фактор IF и инсулин находятся на различных этапах клинических испытаний. Несомненно, многие из этих протеинов успешно пройдут все стадии клинических испытаний и будут впоследствии коммерциализированы.

1.4. Растительные системы для получения рекомбинантных протеинов: стабильная трансформация и транзиентная экспрессия

Экспрессионные системы на основе растений могут быть разделены на две большие группы - системы, в которых происходит стабильная интеграция гетерологичного гена в геномы органелл растительной клетки (ядра, пластид или митохондрий), и транзиентные, когда гетерологичный ген не интегрируется в геном, а его экспрессия имеет временный характер.

В случае ядерной трансформации гетерологичный ген стабильно интегрируется в хромосомы и наследуется в поколениях в соответствии с законами Менделя. К настоящему времени получены ядерно-трансформированные растения множества видов, в том числе всех основных сельскохозяйственных культур, как двудольных, так и однодольных.

1.4.1. Ядерно-трансформированные и транспластомные растения

Наиболее разработанными методами ядерной трансформации являются методы агробактериальной и биолиственной трансформации. Метод агробактериальной трансформации базируется на способности почвенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens* переносить в растительную клетку часть ДНК векторной плазмиды (Т-ДНК), которая затем стабильно интегрируется в ядерный геном. В Т-ДНК локализованы последовательности целевых генов с соответствующими регуляторными элементами, а также вспомогательные генетические последовательности (селективные и маркерные гены, регуляторные элементы). В ходе трансформации механизмы вирулентности *A. tumefaciens* обеспечивают перенос Т-ДНК вектора в клетку и её стабильную интеграцию в хромосому растения; далее, с помощью селективных генов осуществляется отбор трансгенных растений. Необходимо отметить, что агробактериальная трансформация наиболее эффективна для двудольных растений. Первое трансгенное растение (табак) было получено методом агробактериальной трансформации около 40 лет назад, в 1984г [74]. В настоящее время процедура агробактериальной трансформации для большинства видов двудольных растений, в том числе сельскохозяйственных, является рутинной.

Биолиственной метод трансформации относится к группе физических методов трансформации растений. В этом случае ДНК вектора, включающего целевой и селективные гены, обратимо связывается с частицами золота или вольфрама размером 1-2 микрометра. Эти частицы в особом устройстве (биолиственная «пушка») разгоняются при помощи сжатого газа до высокой скорости и «выстреливаются» по растительной ткани. Металлические частицы за счет своей кинетической энергии пробивают несколько слоёв клеток и замедляются. ДНК, иммобилизованная на поверхности металлических частиц, высвобождается и интегрируется в хромосому. Далее, с помощью селективного

гена, осуществляется отбор трансгенных растений. С использованием метода биолистической трансформации трансгенные двудольные растения были впервые получены в 1988г (табак), первое однодольное растение - кукуруза - в 1990 [75,76].

В течение последних 20 лет разработке биолистического метода уделялось большое внимание, так как он позволяет осуществлять генетическую трансформацию однодольных растений, которые неэффективно трансформируются с помощью *A. tumefaciens*. Кроме того, биолистический метод используется при трансформации некоторых видов двудольных растений, плохо трансформируемых при помощи агробактерий, например подсолнечника и бобовых. К настоящему времени метод биолистической трансформации разработан для всех основных однодольных сельскохозяйственных растений, включая рис, пшеницу и кукурузу, представляющих наибольший интерес для разработки экспрессионных систем [77,78].

Необходимо отметить, что оба метода трансформации имеют ряд принципиальных недостатков. Это, в частности, относительно большое время, необходимое для получения трансгенных растений (как правило, 1-2 года); интеграция гетерологичного гена в случайные участки генома растения; большое количество вставок чужеродной ДНК, в том числе дефектных, в геном (до 100 вставок в случае биолистической трансформации); интеграция в геном растения случайных последовательностей ДНК вектора. Большинство этих проблем успешно решаются посредством получения большего количества независимых трансгенных линий (десятки и сотни), их детального молекулярно-биологического анализа и отбора из них линий с оптимальными характеристиками.

С прикладной точки зрения, главной проблемой ядерно-трансформированных растений считается возможность неконтролируемого распространения в окружающей среде чужеродного генетического материала с пыльцой и растительными остатками. С другой стороны, стабильность трансгена

в поколениях привлекательна для практических целей, так как снижает себестоимость рекомбинантных белков и позволяет быстро масштабировать производство.

В случае транспластомных растений гетерологичный ген стабильно интегрируется в геном хлорофиллсодержащих пластид - хлоропластов (методы трансформации митохондрий к настоящему времени еще не разработаны). Хлоропласты возникли около 1,5 млрд. лет назад, в результате развития эндосимбиотических отношений между древними примитивными растениями и фотосинтезирующими цианобактериями [79]. Пластиды имеют собственный рудиментарный кольцевой геном (пластом) размером от 107 до 218 т.п.н., который кодирует 100-250 генов [80]. Пластом характеризуется чрезвычайно высокой плоидностью - около 10000, так как один хлоропласт содержит примерно 100 копий генома, в растительной клетке имеется, в среднем, 100 хлоропластов [81]. Таким образом, трансформация хлоропластов может, потенциально, обеспечить чрезвычайно высокий уровень накопления рекомбинантного белка за счет высокой дозы его гена. Кроме того, важно отметить, что в хлоропластах не происходит замалчивания трансгена, что часто наблюдается в случае ядерной трансформации. В хлоропластах возможно, также, ко-экспрессировать несколько генов путем создания искусственных оперонов [82].

Трансформация пластид осуществляется биолистическим методом [83,84]. К настоящему времени имеются сообщения о трансформации хлоропластов многих видов растений, однако эффективные и хорошо воспроизводимые методы трансформации хлоропластов разработаны только для табака и латука. Методы трансформации других видов растений являются плохо воспроизводимыми. В результате, экспрессионные системы для получения рекомбинантных белков разрабатываются сейчас почти исключительно на основе транспластомных растений табака и, в меньшей степени, латука [82,84,85,86].

Транспластомные растения обеспечивают экспрессию рекомбинантных белков, в среднем, на более высоком уровне, чем ядерно-трансформированные.

Как правило, накопление рекомбинантных белков варьирует в диапазоне от 1-2 до 7-8% от ОРБ, в редких случаях целевые белки могут накапливаться до уровня 20-30% ОРБ [82,84,87].

К числу достоинств транспластомных растений, помимо высокого уровня экспрессии гетерологичных белков, относится стабильное наследование трансгена. Важнейшим преимуществом транспластомных растений является факт материнского наследования пластид, т.е. трансгенные пластиды не переносятся с пыльцой. По имеющимся данным, горизонтальный перенос пластидной ДНК у растений отсутствует полностью или является пренебрежимо малым [88,89,90]. В целом риск неконтролируемого переноса генно-модифицированной ДНК транспластомных растений, в том числе риск переноса в микроорганизмы генов устойчивости к антибиотикам, является очень низким [91]. Эта особенность транспластомных растений существенно уменьшает опасения, относительно неконтролируемого переноса генно-модифицированной ДНК в окружающую среду, и упрощает получение разрешений на проведение полевых испытаний [92].

Вместе с тем, транспластомные растения имеют принципиально важный недостаток- рекомбинантные белки, экспрессированные в транспластомных растениях не гликозилированы (в отличие от ядерно-трансформированных, где рекомбинантные белки могут подвергаться всем типам пост-трансляционных модификаций). Это обусловлено бактериальным генезисом пластид, белок-синтезирующий механизм которых имеют больше сходства с белок-синтезирующим механизмом бактерий, а не растений. В случае экспрессии гетерологичных белков, не подвергающихся пост-трансляционным модификациям, эта особенность транспластомных растений не имеет особого значения. К таким белкам относятся, в первую очередь, различные бактериальные и вирусные антигены; учитывая высокий уровень накопления рекомбинантных белков, транспластомные растения могут быть привлекательны для разработки съедобных вакцин.

В тоже время многие белки терапевтического назначения требуют сложных пост-трансляционных модификаций. Экспрессия этих белков в хлоропластах в настоящее время считается нецелесообразной, т. к. не модифицированные рекомбинантные белки характеризуются низкой активностью и часто функционируют некорректно. Это существенно ограничивает возможности использования транспластомных растений для производства рекомбинантных белков. В настоящее время исследования по использованию транспластомных растений для получения рекомбинантных белков терапевтического назначения практически не ведутся.

Другой большой группой белков, перспективных для экспрессии в хлоропластах, являются различные промышленные ферменты - целлюлазы, ксиланазы, эндо-глюконазы и др., используемые для производства спирта, биотоплива, комбикормов для животных и т.п. Эти ферменты имеют бактериальное или грибное происхождение и не требуют пост-трансляционных модификаций. Производство такого рода ферментов в транспластомных растениях существенно дешевле, чем в бактериальных системах и экономически выгодно уже сейчас [93,94,95].

1.4.2. Транзиентные экспрессионные системы

1.4.2.1. Агроинфильтрация

В ходе разработки методов агробактериальной трансформации растений было отмечено, что только очень незначительная часть молекул Т-ДНК стабильно интегрируется в геном, большая их часть в геном не интегрируется, но при этом остаётся транскрипционно и трансляционно активной в течение нескольких дней.

Экспрессия экстрахромосомного трансгена не требует интеграции в геном растения и не зависит от эффекта положения [96].

Метод агроинfiltrации для экспрессии рекомбинантных белков был впервые разработан Karila и др. [97]. Достоинства этого метода - быстрота, простота технологических операций, дешевизна, высокие выходы целевых белков, быстрая масштабируемость - обусловили значительные усилия, которые были направлены на разработку этого метода. Как правило, максимальный выход рекомбинантных белков наблюдается спустя 1-2 недели после агроинfiltrации [98]. Накопление рекомбинантных белков в случае агроинfiltrации варьирует в широких пределах, от нескольких миллиграмм до нескольких грамм рекомбинантного белка в 1 кг растительной массы. В большинстве случаев накопление рекомбинантных белков находится в диапазоне 100-300 мг/кг биомассы растений [96,98,99].

Выход целевых белков в экспрессионных системах, основанных на агроинfiltrации, зависит от многих факторов, включая выбор оптимального промотора, оптимизацию нуклеотидной последовательности целевого гена для экспрессии в растениях, стабильность рекомбинантного белка и его внутриклеточную локализацию [100]. Важным фактором, определяющим уровень экспрессии рекомбинантных белков, является пост-транскрипционное замолкание трансгена (PTGS). Механизм PTGS индуцируется в ответ на вирусную инфекцию (или другого патогена), когда в растение попадает чужеродная ДНК [101,102]. PTGS является одной из главных причин низкой экспрессии рекомбинантных белков при агроинfiltrации. Эта проблема решается экспрессией одновременно с целевым геном, гена - супрессора PTGS. Чаще всего в качестве такого супрессора используется ген p19 вируса кустистой карликовости томатов [103,104]. В настоящее время использование генов - супрессоров PTGS является рутинной практикой [102].

Метод агроинfiltrации обладает рядом очевидных достоинств. В их числе необходимо отметить тот факт, что рекомбинантный белок может

подвергаться различным пост-трансляционным модификациям, что принципиально важно для экспрессии многих белков медицинского назначения, в частности, терапевтических антител. Кроме того, для метода агроинfiltrации, по-видимому, нет ограничения на размер гетерологичного гена. В тоже время, этот метод не лишен ряда важных недостатков. В частности, процедура агроинfiltrации хорошо разработана для весьма ограниченного числа видов растений-продуцентов, основной массив исследований в области агроинfiltrации выполнен на растениях *Nicotiana tabacum* и *Nicotiana benthamiana*, в меньшей степени - на растениях салата-латука *Lactuca sativa* и арабидопсиса *Arabidopsis thaliana* [31,105]. Для крупномасштабного получения рекомбинантных белков методом агроинfiltrации используется почти исключительно *Nicotiana benthamiana* [96]. Необходимо отметить, что в исследованиях по агроинfiltrации часто наблюдается нестабильность выхода целевого белка, что, по-видимому, связано с варьированием физиологического статуса растений-продуцентов.

Метод агроинfiltrации является недорогим методом экспрессии рекомбинантных белков при небольших масштабах их получения, при индустриальном производстве необходимы дорогостоящие технологические линии для вакуумной инfiltrации агробактерий в ткани растений-продуцентов. Объёмы агробактериальной суспензии, необходимые для крупномасштабного производства, исчисляются десятками и сотнями кубических метров, что обуславливает высокий риск попадания агробактерий в окружающую среду и необходимость усилий на предотвращение этого. Опасения, связанные с экологическими рисками, существенно усложняют и удорожают получение разрешений регулятивных органов на организацию производств, базирующихся на методах транзientной экспрессии.

1.4.2.2. Экспрессионные системы на основе самореплицирующихся вирусных векторов

Для агроинfiltrации используются обычные бинарные вектора, эти плазмиды не способны к репликации и к транспорту из клетки в клетку. Экспрессия рекомбинантных белков происходит только в инфицированных клетках, что ограничивает её уровень. В тоже время известно, что вирусы растений активно реплицируются и способны к межклеточному транспорту, что ведёт к системной инфекции растения - хозяина. Эти факторы обеспечивают огромную дозу гена, что может обеспечить чрезвычайно высокий уровень накопления вирусных белков. Исследования в области разработки систем для экспрессии рекомбинантных белков на основе вирусов растений стартовали в начале 1980 годов, но к большому успеху они не привели [106,107]. Это было обусловлено тем, что в большинстве исследований был использован ДНК-содержащий вирус мозаики цветной капусты, имеющий жесткие ограничения на длину гетерологичной последовательности [108,109].

Разработка методов получения полноразмерных кДНК геномов однонитевых РНК-содержащих вирусов [110] позволило вовлечь в исследования этот наиболее широко представленный в природе тип вирусов. Другим важным достижением была разработка методов использования бактерий *A. tumefaciens* для заражения растений рекомбинантными вирусами. Для этого кДНК генома вируса клонируется в последовательность Т-ДНК вектора для трансформации растений, после агробактериальной инфекции и переноса Т-ДНК в растительную клетку вирусная кДНК начинает автономно реплицироваться. Использование *A. tumefaciens* (агроинфекция) позволило обеспечить эффективный и направленный перенос вирусной кДНК в ядро растительной клетки [111,112]. С этого момента развитие систем транзientной экспрессии, базирующихся на самореплицирующихся вирусных векторах, происходило быстрыми темпами.

К настоящему времени вирусные векторы для экспрессии рекомбинантных белков разработаны на основе представителей различных родов - тобамовирусов (чаще всего - вируса табачной мозаики, TMV); потексвирусов (вирус X картофеля, PVX); потивирусов (вирус гравировки табака, TEV) и других. В качестве растения-продуцента используется почти исключительно вид табака *Nicotiana benthamiana*, другие виды растений практически не исследованы. Достижения и проблемы в области разработки и использования транзientных экспрессионных систем на основе вирусных векторов детально рассмотрены в обзорах [31,96,102,113,114].

Основным достоинством транзientных систем с использованием вирусных векторов является высокий уровень экспрессии рекомбинантных белков. В большинстве исследований накопление рекомбинантного белка варьировало в диапазоне от 20-30 до 300-400 мг/кг сырой массы продуцента [115,116,117]. В некоторых случаях накопление целевого белка было существенно выше [118].

Необходимо отметить, что до сих пор практически не проводились систематические исследования по сравнению эффективности различных систем для экспрессии одного и того же белка. Данные, полученные из литературных источников, об экспрессии рекомбинантных белков - антигенов в различных системах представлены в Таблице 5. Из этих данных следует, что уровень накопления рекомбинантных белков в транзientных системах варьирует в широких пределах - от 3-4 мг/кг сырой массы листьев (белок E7 вируса папилломы человека HPV-16, [119]) до 4 г/кг (протеин N вируса бешенства, [120]). В тоже время, в ядерно-трансформированных растениях аккумуляция рекомбинантных белков, в целом, ниже, но может достигать 1-2 г в 1 кг сухой массы плодов томата или клубней картофеля [121,122], что сравнимо с накоплением рекомбинантных белков в транзientных системах.

Таблица 5 - Уровень накопления рекомбинантных белков в различных экспрессионных системах на примере вакцинных белков.

Патоген/антиген	Система экспрессии	Растение	Уровень экспрессии		Ссылка
			% от ОРБ	мкг/г сырой массы	
Вирус ящура (FMDV) VP1	Транзиентная	<i>N. benthamiana</i>		50–150 мкг/г	[126]
	Транспластомная	<i>N. tabacum</i>	51%		[123]
Вирус геморрагической болезни кроликов (RHDV) VP60	Транзиентная	Арабидопсис	0,3%-0,8%		[127]
	Ядерная	<i>N. tabacum</i> , <i>S. tuberosum</i> , <i>B. napus</i> , <i>P. sativum</i>	0,01%-0,7%		[62]
Вирус папилломы человека (HPV-16) E7	Транзиентная	<i>N. benthamiana</i>		3–4 мкг/г	[119]
	E7::LicKM Ядерная	<i>N. benthamiana</i>		400 мкг/г	[128]
Токсоплазмоз SAG1	Ядерная	<i>N. tabacum</i>		0,1–1,3 мкг/г	[129]
	SAG1 Транспластомная	<i>N. tabacum</i>		0,1–0,2 мкг/г	[130]
Вирус иммунодефицита человека (HIV-1) Tat	Транзиентная	<i>Spinacia oleraceae</i>		300 мкг/г	[131]
	CTB::Tat Ядерная	Картофель	0.005-0.007%	1000-2000 мкг/г	[122]

Продолжение Таблицы 5.

Чума (<i>Yersinia pestis</i>)					[125]
F1::V	Транзиентная	<i>N. benthamiana</i>		1000-2000 мкг/г	
F1::V - lichenase	Транзиентная	<i>N. benthamiana</i>		120-380 мкг/г	[132]
F1::V	Ядерная	Латук	0.08%		[36]
F1::V	Ядерная	Морковь	0.3%		[37]
F1::V	Ядерная	Клетки <i>N. tabacum</i> NT1	0.4-0.9%		[133]
F1::V	Ядерная	Люцерна	0.015-0.023%		[133]
F1::V	Ядерная	Томат	4-10%	700-1300 мкг/г (сухой вес плодов)	[121]
F1::V	Транспластомная	<i>N. tabacum</i>	14.8%	1010 мкг/г (сухой вес листьев)	[124]
Вирус бешенства протеин N	Ядерная	Томат	1-5%	100-500 мкг/г	[120]
	Транзиентная	<i>N. benthamiana</i>	45%	4000 мкг/г	

В случае транспластомных растений накопление рекомбинантного белка достигало 51% от ОРБ (белок VP1 вируса ящура, [123]). Накопление белка F1::V *Y. pestis* в транспластомных растениях *N. tabacum* составило 14,8% от ОРБ, что соответствовало 1 г/кг сухого веса листьев [124]. В транзientной экспрессионной системе (*N. benthamiana*) накопление этого же белка составляло 1-2 г/кг сырой массы листьев [125], в ядерно-трансформированных растениях томата- 0,7-1,3 г/кг сухого веса плодов [121]. Таким образом, накопление вакцинного белка F1::V из *Y. pestis* в разных экспрессионных системах (транзientной, на основе ядерно-трансформированных и транспластомных растений) происходило на сравнимом уровне. Исходя из имеющихся данных, можно предполагать, что уровень экспрессии рекомбинантных белков зависит не столько от типа использованной экспрессионной системы, но, главным образом, от свойств самого белка, его стабильности и способности накапливаться в клетках растений.

1.4.3. Экспрессионные системы для получения рекомбинантных белков: стабильно трансформированные растения vs. транзientных систем

Корректный анализ эффективности транзientных экспрессионных систем затруднён. Это связано с тем, что в научной литературе отсутствуют реальные данные об экономической эффективности этих систем, все данные, представленные в литературе, являются расчетными. В целом по имеющимся данным можно заключить, что по стоимости производства рекомбинантных белков (на примере моноклональных антител), транзientные системы занимают промежуточное положение между стабильно трансформированными растениями (культивируемыми в поле или в условиях защищенного грунта) и культурой клеток растений, культивируемой в биореакторах [2,134,135].

Таким образом, все типы растительных экспрессионных систем имеют как преимущества, так и недостатки (Таблица 6). Системы, основанные на использовании ядерно-трансформированных растений, обеспечивают самую низкую себестоимость рекомбинантных белков и требуют минимальных вложений для организации производства, однако их внедрение тормозится из-за экологических опасений. Частично эта проблема решается путём культивирования продуцентов не в поле, а в теплицах. В частности, ядерно-трансформированные растения успешно используют для получения рекомбинантных белков такие фирмы, как Kentucky BioProcessing (США), Icon Genetics (Германия) и Medicago (США).

Таблица 6 - Преимущества и недостатки различных растительных экспрессионных систем.

Система экспрессии	На основе ядерно-трансформированных растений	На основе транспластомных растений	Транзиентная
Продолжительность периода до начала производства	Длительный (около 2 лет)	Длительный (около 2 лет)	Короткий (несколько недель)
Уровень накопления целевого белка в 1 кг сырой массы растений	Умеренный (от нескольких десятков до 100-200 миллиграмм)	Высокий (от сотен миллиграмм до нескольких грамм)	Высокий (от 200-300 миллиграмм до 2-4 грамм)
Возможность посттрансляционных модификаций рекомбинантных белков	Все типы посттрансляционных модификаций	Рекомбинантные белки не гликозилируются	Все типы посттрансляционных модификаций
Масштабируемость производства	Высокая	Высокая	Низкая
Себестоимость производства	Низкая	Низкая	Высокая
Капиталоёмкость	Низкая	Низкая	Высокая
Экологические опасения в массовом сознании	Высокие	Умеренные	Умеренные

Транзиентные экспрессионные системы вызывают меньше опасений у населения, хотя масштабное производство на основе этих систем подразумевает использование десятков и сотен кубических метров суспензии клеток агробактерий, которые несут самореплицирующиеся вектора, сконструированные на базе растительных вирусов. Тем не менее, транзиентные экспрессионные системы успешно используются, помимо указанных выше компаний, транзиентные системы успешно используют Caliber Biotherapeutics (США) и FhСMB (Германия). Кроме того, существует целый ряд небольших компаний, предлагающих услуги по экспрессии рекомбинантных белков в транзиентных системах, например, PlantForm (Канада), Leaf Expression Systems (Великобритания), VTT (Финляндия) и др. В конечном счете, выбор оптимальной экспрессионной системы будет определяться свойствами целевого белка и задачами исследования.

1.5. Растительные платформы для производства рекомбинантных белков на основе стабильно-трансформированных растений

Для разработки экспрессионных систем на основе стабильной трансформации в настоящее время чаще всего используются сельскохозяйственные растения - табак, томаты, рис, картофель и кукуруза (Рисунок 2). Выбор этих культур обусловлен лёгкостью получения трансгенных растений, хорошей изученностью их генетики, биохимии и физиологии, наличием соответствующих агротехнологий. Эти культуры могут быть использованы в качестве корма для животных (за исключением табака), для них детально разработаны промышленные технологии хранения и переработки. Важно отметить, что удачный выбор растения-продуцента определяется не только его изученностью и лёгкостью получения трансгенов, но соответствием его биохимии

поставленным задачам. Это особенно важно при экспрессии веществ небелковой природы, когда наличие соответствующих предшественников принципиально важно для биосинтеза целевого продукта.

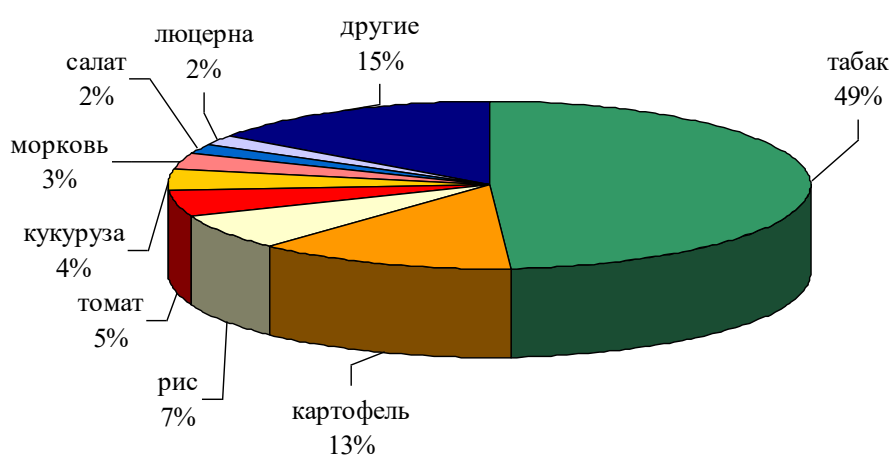


Рисунок 2 - Растения, используемые в исследованиях по получению рекомбинантных белков в экспрессионных системах на основе стабильно-трансформированных растений. Указаны доли различных видов растений в исследованиях по биофармингу [25,26,27,28,29,30,31,32,136].

Наиболее популярным растением для разработки экспрессионных систем является табак обыкновенный (*Nicotiana tabacum* L.), около 50% исследований в области биофарминга выполнено с его использованием. Это обусловлено легкостью генетической трансформации табака, хорошей изученностью его генетики и биохимии. Табак является важной технической культурой, для него детально разработаны промышленные технологии выращивания, хранения и переработки. Также, для табака разработаны эффективные протоколы выделения и очистки различных рекомбинантных белков. Необходимо отметить, что в транзientных экспрессионных системах, как лабораторного уровня, так и

индустриальных, сейчас используется почти исключительно табак вида *Nicotiana benthamiana* Domin.

Другим популярным растением для экспрессии рекомбинантных белков является картофель (*Solanum tuberosum* L.), в области биофарминга 13% исследований выполнено с его использованием. Картофель является важнейшей пищевой и технической культурой, для него детально разработаны индустриальные технологии выращивания, хранения и переработки. Как и табак, картофель легко трансформируется, его генетика и биохимия подробно изучены. Важно отметить, что целевые белки могут быть экспрессированы с помощью орган-специфических промоторов в клубнях, что существенно упрощает их выделение и очистку.

В последние 10-15 лет все большее значение как платформа для биофарминга приобретает рис посевной (*Oryza sativa* L.). Это связано как с развитием биотехнологии в странах Дальнего Востока и Юго-Восточной Азии, так и с рядом ценных для биофарминга свойств самого риса. Будучи глобальной зерновой культурой, генетика и биохимия риса хорошо изучены. Рис легко трансформируется при помощи агробактерий, целевые белки могут быть экспрессированы с помощью орган-специфических промоторов в зерне, что существенно упрощает их выделение и очистку.

Другой культурой, широко используемой в исследованиях по биофармингу, является томат *Solanum lycopersicum* L. (5% исследований). Томат является важнейшей овощной культурой, этим обусловлена хорошая изученность его биологии. Для томата существуют детально разработанные технологии выращивания, как в условиях открытого грунта, так и в теплицах. Томат легко трансформируется и является модельным объектом для исследований в области генетики, молекулярной биологии, физиологии и патологии растений. Плоды томата съедобны и могут довольно продолжительное время храниться, поэтому томат является популярной экспрессионной платформой в исследованиях по съедобным вакцинам.

Кукуруза (*Zea mays* L) является одной из важнейших зерновых культур в мире. Кукуруза легко трансформируется, рекомбинантные белки могут быть экспрессированы в семенах, которые хорошо хранятся без существенной деградации целевых белков. Зерно кукурузы может скармливаться животным без дополнительной обработки в составе комбикормов. Также разработаны простые и эффективные методы выделения рекомбинантных белков из зерна. В связи с дешевизной культивирования и очистки, в семенах кукурузы экономически эффективно производить самые разнообразные белки, в том числе недорогие ферменты индустриального назначения. Кукуруза является ветроопыляемым растением и это является её принципиальным недостатком применительно к задачам биофарминга. Потенциальная возможность опыления нетрансгенных посевов сильно ограничивает использование кукурузы для производства рекомбинантных белков.

В исследованиях по биофармингу довольно часто используются экспрессионные системы, созданные на основе таких культур, как морковь (*Daucus carota subsp. sativus* (Hoffm.) Arcang., в 3% исследований), салат латук (*Lactuca sativa* L., 2%) и люцерна посевная (*Medicago sativa* L., 2%). Морковь представлена в биофарминге почти исключительно как культура клеток. Экспрессионная система на основе культуры клеток хорошо изучена и достигла уровня практического применения. Единственный пока рекомбинантный белок, полученный в растительной экспрессионной системе и разрешенный к терапевтическому применению, получен в суспензионной культуре клеток моркови (талиглуцераза альфа; препарат ELEYLYSO™, разработан компаниями Protalix и Pfizer). Салат латук легко трансформируется, характеризуется высокой скоростью роста, может скармливаться животным и употребляться в пищу в сыром виде. Поэтому латук часто используется в исследованиях по разработке съедобных вакцин. Люцерна является важной кормовой культурой, зелёная масса люцерны может скармливаться травоядным животным. Кроме того, рекомбинантные белки могут накапливаться в семенах. Эти особенности делают

люцерну перспективной культурой для разработки рекомбинантных белков, в т.ч. съедобных вакцин. Главный недостаток люцерны, как и кукурузы, - возможность случайного опыления нетрансгенных посевов.

Выбор растений для экспрессии рекомбинантных белков не ограничивается рассмотренными выше культурами. В исследованиях по получению рекомбинантных белков используются и другие виды, в зависимости от задач исследований. Например, значительное внимание направлено на разработку методов получения рекомбинантных антигенов в растениях папайи и банана [61,137,138,139,140]. Это связано с тем, что эти растения широко культивируются в бедных тропических странах Африки и Азии и представляют удобную платформу для получения съедобных вакцин против инфекционных болезней человека и животных.

Компанией SemBioSys были получены растения сафлора (*Carthamus tinctorius* L.), продуценты инсулина человека [141]. В результате исследований была подтверждена биоэквивалентность рекомбинантного инсулина инсулину человека. Компанией SemBioSys были проведены клинические испытания полученного инсулина, фаза I/II испытаний была успешно завершена [31].

Для получения рекомбинантных белков могут быть с успехом использованы многие виды растений, например, шпинат, ячмень, фасоль, клевер, соя, пшеница и другие [26,27,28,29,30,31,32,136]. Однако в последние годы происходит сокращение числа видов, используемых для получения рекомбинантных белков. В настоящее время в исследованиях по биофармингу с использованием ядерно-трансформированных растений используются, преимущественно, табак и рис, реже – томат. Связано это, по нашему мнению, с фактом законодательного и регулятивного ограничения культивирования трансгенных растений в открытом грунте. Известны опасения общественности относительно неконтролируемого переноса гетерологичной ДНК (особенно содержащей в своём составе гены человека или его патогенов) в окружающую среду через перекрёстное опыление нетрансгенных сортов и дикорастущих

родственных видов, а также опасения интрогрессии гетерологичной ДНК в бактериальные или вирусные геномы. Особенно настороженно общественность относится к культивированию растений - продуцентов рекомбинантных белков медицинского и ветеринарного назначения даже в тех странах, где давно разрешено выращивание сортов трансгенных растений в полевых условиях, например, в США [142]. Все эти страхи и опасения привели к дополнительным требованиям к культивированию трансгенных растений для производства биофармацевтических субстанций, что резко ограничивает их культивирование [143].

Подавляющее большинство видов, изучавшихся как экспрессионные платформы, являются сельскохозяйственными ветро- или насекомо- опыляемыми растениями, имеют дикорастущих родственников, используются в пищу и не приспособлены для экономически эффективного культивирования в теплицах. Таким образом, использование большинства растений в качестве экспрессионных платформ для производства рекомбинантных белков в силу вышеописанных ограничений в настоящее время не имеет смысла. Лучшим решением данной проблемы является культивирование растений-продуцентов в максимально изолированных от окружающей среды системах, например, в теплицах. Необходимо отметить, что рис и табак - преимущественно самоопыляемые культуры, а что касается томата, то существуют его многочисленные самоопыляемые сорта. Кроме того, томат и табак могут с успехом культивироваться в теплицах.

1.5.1. Ряска малая и Вольфия бескорневая как перспективные платформы для экспрессии рекомбинантных белков

Представители семейства Рясковые (*Lemnaceae*), в частности, ряска малая (*Lemna minor* L) и вольфия бескорневая (*Wolffia arrhiza* (L.) Horkel ex Wimm.) - это маленькие однодольные водные растения. Тело ряски - листец (или фронд), состоит главным образом из паренхимных клеток хлоренхимы, разделенных большими, заполненными воздухом межклетниками.

Листец ряски малой представляет собой округлую или обратнойцевидную пластинку 2-4,5мм длиной, 2-3 мм шириной, с верхней стороны слабовыпуклую или с выдающимся горбовидным шипиком (до 1 мм по толщине), снизу плоскую, толстоватую, непрозрачную, с тремя жилками. Вольфия бескорневая представляет собой плавающие на поверхности воды зелёные эллиптические пластинки размером около 1 мм. Корни у ряски малой слабо развиты и выполняют, главным образом, функцию якоря, предотвращая переворачивание растений. У вольфии бескорневой корневая система отсутствует полностью. Питательные вещества поглощаются в основном через поверхность листеца. Размножаются ряска и вольфия почти исключительно вегетативным путем, с помощью почек, находящихся в меристематических кармашках. Цветут рясковые очень редко.

Благодаря высокому содержанию белка, в странах Юго-Восточной Азии ряска традиционно употребляется в пищу и используется в сельском хозяйстве как кормовая культура [144,145]. Равномерное распределение ряски по поверхности воды обеспечивает её легкий сбор. Высокая урожайность биомассы ряски и удачный химический состав обусловили интерес к ряске как перспективной платформе для получения биотоплива, в частности, этанола.

Ряска и вольфия обладают рядом ценных для биотехнологии свойств. Рясковые отличаются высоким содержанием белка - до 40% от сухого веса растения. Рясковые могут культивироваться на недорогих минеральных средах

простого состава, осуществляя фотосинтез по всему растению, в том числе и в корнях. При этом растения секретируют некоторые вещества, в том числе белковой природы, в среду. Это является ее защитным механизмом, позволяющим подавлять рост водорослей и бактерий на поверхности листочков.

Растут рясковые очень быстро, время удвоения биомассы в оптимальных условиях составляет около 36 часов. Такая скорость роста в сочетании с высоким содержанием белка делает культуру ряски сравнимой с дрожжевыми экспрессионными системами. Вегетативный способ размножения также представляет большое преимущество, так как ряска не производит пыльцы, что позволяет легко предотвращать контаминацию окружающей среды [146,147]. Таким образом, обладая биотехнологическими характеристиками, близкими к микробным системам и являясь в то же время высшими растениями, рясковые являются перспективными представителями царства растений для использования в биотехнологии [148,149]. В связи с этим, в последние годы начали активно изучаться фундаментальные и прикладные аспекты биологии рясковых. В частности, сиквенирован геном ряски малой [150] и спироделлы многокорневой (*Spirodella polyrhiza* L.), другого представителя семейства Рясковые [151,152]. Это позволило существенно продвинуться в понимании различных аспектов генетики, биохимии и физиологии рясковых.

До 2000г. исследований по биотехнологии рясковых проводились преимущественно с видом ряски горбатой *Lemna gibba* [153]. Первые сообщения о разработке методов биотехнологии ряски малой относятся к 1991г. [154]. Эффективная и воспроизводимая методика генетической трансформации этого вида была разработана в 2001г. [155]. В результате этих исследований были получены трансгенные линии, трансформированные геном GUS и различными селективными маркерами. В дальнейшем протокол агробактериальной трансформации ряски малой был усовершенствован применительно к генетическим и физиологическим особенностям её различных изолятов [156,157,158,159].

На основе достижений в области генетической инженерии ряски малой и ряски горбатой (*Lemna gibba* L.), компанией Biolex Therapeutics (США) была разработана экспрессионная платформа LEX System, где для производства рекомбинантных белков использовались растения ряски малой.

Для исследований была выбрана группа белков, в которую входили α -2b-интерферон, инсулин, гормон роста человека, β -глюкоцереброзидаза, ретинобластомный белок, p53, ангиостатин, лептин, сывороточный альбумин, гемоглобин, коллаген, p450 оксидаза, моноклональные антитела. Гормон роста экспрессировался в ряске на уровне 800 мг/кг сырой массы, моноклональные антитела накапливались в растении в количестве до 4% от общего растворимого белка (8,62 г/кг сухой массы ряски), накопление Fab-фрагментов антител составило 2,6% от общего растворимого белка (5,6 г/кг сухой массы) [148]. В этих же исследованиях была показана секреция рекомбинантных белков в среду культивирования. Так, гормон роста накапливался в среде на уровне 609 мг/л, а α -2b-интерферон человека - в количестве 15 мг/л. Необходимо отметить, что эти величины получены из информационных материалов, опубликованных Biolex Therapeutics и из её патентов [160,161]. В научной литературе описания этих исследований и данные об особенностях экспрессии изучаемых белков не представлены. В настоящее время права на экспрессионную платформу LEX System принадлежат компании Synthon (Нидерланды), которая продолжает её совершенствование. В частности, компания ведёт разработку технологии получения рекомбинантных антител для лечения неходжкинской лимфомы [71].

Помимо коммерческих компаний, работы в области экспрессии рекомбинантных белков в ряске проводились в ряде научных организаций. Основные усилия были направлены на экспрессию в ряске различных антигенов и ферментов промышленного назначения (Таблица 7). Так, в частности, в ряске малой были экспрессированы протективный антиген вируса эпидемической диареи свиней [162]; белки Ag85B и ESAT6 *Mycobacterium tuberculosis* [163];

Таблица 7 - Экспрессия рекомбинантных белков в растениях семейства рясковые.

Вид ряски	Целевой белок	Уровень экспрессии	Примечание	Ссылка
<i>Lemna minor</i> 8627	Эндоглюканаза E1 из <i>Acidothermus cellulolyticus</i>	до 0,24% от ОРБ	Показана активность рекомбинантной эндоглюканазы	[165]
<i>Lemna minor</i>	mAb против CD30 человека	н.д.	Выполнялась оптимизация состава гликанов	[169]
<i>Lemna minor</i>	Протективный антиген вируса эпидемической диареи свиней	н.д.		[162]
<i>Lemna minor</i>	Белки Ag85B и ESAT6 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	0,4–0,5 µг/г сырой массы		[163]
<i>Lemna minor</i>	Гемагглютинин вируса гриппа птиц H5N1	н.д.	Полная защита кур от летальных доз вируса гриппа	[164]
<i>Lemna minor</i>	Фитаза <i>Aspergillus nidulans</i>	н.д.	Изучалась как кормовая добавка для кур	[166]
<i>Spirodela polyrhiza</i>	Гемагглютинин вируса гриппа птиц H5N1	н.д.		[168]
<i>Spirodela polyrhiza</i>	апротинин	3,7% от ОРБ (секреция в среду культивирования на уровне 0,65 мг/л)	Подтверждён корректный сплайсинг рекомбинантного апротинина.	[167]

гемагглютинин вируса гриппа птиц H5N1 [164]. В экспериментах [164] была подтверждена способность рекомбинантного гемагглютинина индуцировать

иммунный ответ у кур, достаточный для их полной защиты от летальных доз вируса гриппа. Также в ряске малой были успешно экспрессированы ферменты промышленного назначения эндоглюканаза E1 из *Acidothermus cellulolyticus* и фитаза из *Aspergillus nidulans* [165,166].

Эксперименты по экспрессии гетерологичных белков проводились и с другим видом ряски- спироделлой многокорневой (*Spirodela polyrhiza* L). В трансгенных растениях спироделлы были успешно получены рекомбинантные апротинин [167] и гемагглютинин вируса гриппа птиц H5N1 [168].

В большинстве исследований не был указан уровень экспрессии рекомбинантных белков в трансгенных растениях. В исследовании [165] эндоглюканаза E1 экспрессировалась в тканях растений на уровне 0,24% от ОРБ, апротинин в растениях спироделлы накапливался на уровне 3,7% [167]. В этом же исследовании была показана секреция апротинина в среду культивирования – до 0,65 мг/л.

Определённые усилия были направлены на совершенствование ряски малой как экспрессионной платформы. Сох с соавторами [169] исследовали возможность оптимизации состава гликанов в ряске малой. Растения, экспрессирующие mAb против CD30 человека, были трансформированы РНК-интерференционной конструкцией, включающей антисмысловые последовательности генов α -1,3-фукозилтрансферазы и β -1,2-ксилозилтрансферазы. В результате было показано, что рекомбинантные анти-CD30 mAb не содержали детектируемых количеств специфических растительных N-гликанов. Было также показано, что полученные антитела характеризовались лучшими рецептор-связывающими свойствами и показателями цитотоксичности, чем соответствующие антитела, полученные в культуре клеток CHO.

Были также изучены некоторые аспекты очистки рекомбинантных белков из растений ряски. Особое внимание в этих исследованиях уделялось разработке методов удаления из растительных экстрактов фенольных соединений. Путём

оптимизации состава экстракционных буферов и условий экстракции (рН, продолжительности экстракции, подбора анионообменных смол) удалось добиться удаления из экстрактов загрязняющих фенольных соединений, не удорожая при этом существенно процедуры очистки [170,171].

1.5.2. Томат как платформа для экспрессии рекомбинантных белков

Томат (*Solanum lycopersicum* или *Lycopersicon esculentum* MILL) - однолетнее растение, род Паслён (*Solanum*) семейства Паслёновые (*Solanaceae*). В настоящее время томат является самой распространённой в мире овощной культурой, общий объем мирового производства томатов в 2019 году составил более 182 млн. тонн (FruitNews). Плоды томата широко используют как в свежем виде, так и для различных видов переработки - консервирования, изготовления томатной пасты, сока, кетчупов и др.

Важность томата для сельскохозяйственного производства обусловила высокую изученность его генетики, биохимии и физиологии. В частности, в 2012г. был секвенирован геном томата [172], что открыло новые перспективы совершенствования сортов этой культуры. Томат является модельной культурой в исследованиях по физиологии и биохимии растений, и, также, в различных областях omics- технологий [173]. Начало исследований в области биотехнологии томата относится к середине 1930-х годов, когда P.R. White впервые разработал методику культивирования изолированных корней томата *in vitro*. В 1986г. McCormick с соавторами [174] были получены методом агробактериальной трансформации первые трансгенные растения этой культуры. В 1994г. трансгенные растения томата получили разрешения US Food and Drug

Administration для выращивания с коммерческими целями (сорт FlavrSavr с замедленным созреванием плодов, Calgene Inc., США), это была первая в мире ГМО- культура, разрешенная для производства [175].

После разработки методики генетической трансформации томата, начались интенсивные исследования в области разработки экспрессионных систем на основе этой культуры. Первое сообщение об успешной экспрессии рекомбинантного белка в растениях томата относится к 1993г., когда были получены растения, трансформированные геном ангиотензин-1-конвертирующего фермента [176]. В 1995г. McGarvey с соавторами были впервые получены растения, экспрессирующие гликопротеин вируса бешенства [177]; с этого момента началось широкое использование томата в исследованиях по биофармингу, особенно в области разработки рекомбинантных вакцин. Некоторые примеры экспрессии рекомбинантных белков в растениях томата представлены в Таблице 8.

Таблица 8 - Примеры экспрессии различных рекомбинантных белков в ядерно-трансформированных растениях томата.

Рекомбинантн ый белок	Источник	Уровень экспрессии	Функциональность	Ссылка
Вакцины				
СТВ	<i>Vibrio cholerae</i>	0,02 – 0,04% ОРБ листьев	Сборка пентамерных белков	[178]
СТВ-Р4; СТВ-Р6 и ТСРА	<i>Vibrio cholerae</i>	0,17%; 0,096% и 0,12% ОРБ плодов	Сборка химерных пентамерных белков	[179]
СТВ	<i>Vibrio cholerae</i>	0,081% ОРБ плодов	Иммуногенен в экспериментах на мышцах	[180]
АСФА и АСФА-СТВ	<i>Vibrio cholerae</i>	0,25% и 0,08% ОРБ плодов	Нет данных	[181]

Продолжение Таблицы 8				
Tat-GUS	HIV-1	2–4 µg/mg ОРБ растения	Иммуногенен в экспериментах на мышцах	[182]
Tat	HIV-1	1 µg/mg плодов (сухой вес)	Иммуногенен в экспериментах на мышцах	[183]
PRS-S1S2S (модифицированный большой поверхностный антиген HBV)	HBV (Вирус гепатита В)	0,02% ОРБ плодов	Сборка капсомеров и VLP	[184]
HBsAg	HBV (Вирус гепатита В)	100,36 нг/г сырой массы листьев, 127,54 нг/г сырой массы плодов	Нет данных	[185]
Nucleoprotein N	Вирус бешенства	1%–5% ОРБ плодов	Иммуногенен в экспериментах на мышцах	[120]
sDPT	<i>Corynebacterium diphtheria</i> , <i>Bordetella pertussis</i> , <i>Clostridium tetani</i>	до 270 нг/г лиофилизированных плодов	Иммуногенен в экспериментах на мышцах	[186]
L1-E6/E7 (химерный белок, включающий последовательности L1, E6 и E7 HPV 16)	HPV 16 (вирус папилломы человека 16)	0,1% ОРБ плодов	Иммуногенен в экспериментах на мышцах	[187]
P1-2A3C (структурный полипротеин P1-2A и протеиназа 3C вируса FMDV)	FMDV (вирус ящура)	Нет данных	Иммуногенен в экспериментах на морских свинках	[188]

Продолжение Таблицы 8				
CP NV	NV (вирус Норволк)	8% ОРБ плодов	Иммуногенен в экспериментах на мышцах	[189]
VP1	Энтеровирус 71 (EV71)	27 мкг/г сырой массы плодов	Иммуногенен в экспериментах на мышцах	[190]
Химерный белок VP1-Fc (VP1 слит с Fc – фрагментом антител)	Вирус гепатита А	0.57 мкг очищенного VP1-Fc в 1 г сырой массы листьев	Иммуногенен в экспериментах на мышцах	[191]
p24-Nef (антигены p24 и Nef HIV-1)	HIV-1 (вирус иммунодефицита человека)	40% ОРБ листьев, 2,5% ОРБ плодов (транспластомные растения)	Нет данных	[192]
Терапевтические белки				
β -amyloid	Человек	80–58 ng/mL экстракта	Иммуногенен в экспериментах на мышцах	[193]
α 1-антитрипсин	Человек	1,55% ОРБ листьев	Биологически активен	[194]
EGF (эпидермальный фактор роста)	Человек	3,48 ng/g сырого веса плодов	Защищал мышей от алкоголь-индуцированного гастрита	[195]
ВАСЕ1 (фермент 1, расщепляющий β -сайт белка-предшественника амилоида APP)	Человек	136 \pm 7 ng/mg ОРБ плодов	Биологически активен	[196]
α 1-PI (ингибитор α -протеиназы 1)	Человек	1,5%–3,2% ОРБ листьев	Биологически активен	[197]
IgA2A1 (IgA против пептида VP8 ротавируса SA11)	Человек	3,6% \pm 0,8% ОРБ плодов	Нейтрализация ротавирусной инфекции <i>in vitro</i>	[198]

Продолжение Таблицы 8.				
PfCP-2.9 (слитые антигены <i>MSP1</i> и <i>AMA1</i>)	<i>Plasmodium falciparum</i>	Нет данных	Нет данных	[199]
Индустриальные белки				
Miraculin	<i>Synsepalum dulcificum</i>	90 мкг/г сырой массы плодов	Сладкий вкус	[200]
Miraculin	<i>Synsepalum dulcificum</i>	0,87 – 0,12% ОРБ плодов	Сладкий вкус	[201]
Miraculin	<i>Synsepalum dulcificum</i>	131 – 287 мкг/г сырой массы плодов	Сладкий вкус	[202]
cry1Ab	<i>Bacillus thu- ringiensis</i>	0,47 ± 0,01% ОРБ листьев	Биологически активен	[203]

Чаще всего экспрессионные платформы на основе растений томата используются для получения вакцинных белков и рекомбинантных белков терапевтического назначения, применяемых орально. Это обусловлено тем фактом, что плоды томата съедобны для человека и животных, и могут быть легко использованы в экспериментах по иммунизации. Помимо вакцин, на основе растений томата были разработаны экспрессионные системы для получения сладкого белка индустриального назначения миракулина из западно-африканского растения *Synsepalum dulcificum* [202] и Bt-токсина *Bacillus thuringiensis* [203].

Уровень экспрессии рекомбинантных белков в трансгенных растениях томата варьирует в широких пределах – от сотых долей до 5-8 процентов ОРБ (Таблица 8). Накопление целевого белка определяется, в основном, его стабильностью в растительных клетках. Так, например, экспрессия различных антигенов, сконструированных на основе белков вируса гепатита В или субъединицы В токсина холеры, обычно не превышала двух-трёх десятых

процента ОРБ, в то время как накопление рекомбинантного нуклеопротеина N вируса бешенства составляло до 5% ОРБ [120], а белка оболочки вируса Норволк составило 8% ОРБ плодов [189]. Накопление различных рекомбинантных терапевтических белков в томатах также сильно варьировало. Так, если экспрессия ВАСЕ1 (фермент 1, расщепляющий β -сайт белка-предшественника амилоида APP) составила 0,014% ОРБ плодов, то экспрессия в листьях α 1-антитрипсина человека достигала 3,2% ОРБ, а иммуноглобулина IgA2A1 – 3,6% ОРБ плодов (Таблица 8). Рекомбинантный миракулин, после оптимизации структуры экспрессируемой последовательности, накапливался в плодах томата на очень высоком уровне – до 290 мг/кг сырой массы, что находится на уровне большинства транзистных экспрессионных систем [202].

Необходимо отметить тенденцию более высокого накопления рекомбинантных белков в плодах томата, чем в листьях. Возможно, что это обусловлено меньшей протеолитической активностью в тканях плодов, по сравнению с листьями. Также существенно, что зрелые плоды томата имеют более простой белковый состав, чем листья. В частности, в зрелых плодах томата существенно меньше белка Рубиско (рибулозобисфосфат-карбоксилаза-оксигеназа), содержание которого может достигать 40% ОРБ в листьях, и который может существенно затруднять выделение и очистку рекомбинантных белков из плодов трансгенных растений. Плодоспецифические промоторы томата клонированы и хорошо изучены [204,205]. В частности, плодоспецифический промотор E8 был успешно использован для получения различных вакцинных белков в плодах томата [28] и суперсладкого белка тауматина II [206].

Как было отмечено выше, в настоящее время имеются высокопродуктивные сорта и детально разработаны технологии культивирования томата в условиях защищенного грунта. Современные технологии возделывания томата в теплицах с использованием LED- светокультуры, малообъемных гидропонных установок, компьютеризованных и автоматизированных систем управления температурой, освещенностью и влажностью воздуха, поливом, составом подкормок уже сейчас

позволяют достигать в современных тепличных комплексах урожайности 70-90 кг/м²·год. Это открывает возможности разработки на основе растений томата замкнутых культивационных систем. Таким образом, растения томата являются перспективной платформой для разработки экспрессионных систем для получения рекомбинантных белков различного назначения, как медицинского, так индустриального.

1.6. Замкнутые культивационные системы

Как было отмечено выше, использование трансгенных растений для получения рекомбинантных белков ограничивают опасения относительно безопасности их культивирования в полевых условиях. Результатом этих опасений является запрет выращивания трансгенных растений в полевых условиях, действующий в России (федеральный закон от 03.07.2016 г. № 358-ФЗ). Вместе с тем, различные регуляторные, экологические и общественные опасения существенно ниже при культивировании растений-продуцентов в замкнутых культивационных системах. К таким системам можно отнести теплицы, культивационные камеры, биореакторы и ферментёры различной конструкции. Растения в замкнутых культивационных системах физически изолированы от природной среды, культивирование растений происходит в полностью контролируемых условиях, исключающих случайное попадание рекомбинантной ДНК в окружающую среду. При выращивании продуцентов в контролируемых условиях возможно обеспечить существенно более высокое накопление целевого белка в растениях, чем при их культивировании в поле. Кроме того, при использовании замкнутых систем происходит значительное снижение количества растительных отходов, подлежащих уничтожению и утилизации, и резкое уменьшение площадей, которые должны мониториться для предотвращения

неконтролируемого переноса трансгенов. В совокупности это ведёт к заметному снижению затрат на производство рекомбинантных белков.

1.6.1. Теплицы

Использование замкнутых культивационных систем является неотъемлемой частью производства рекомбинантных белков в транзиентных системах. Растения – продуценты культивируются в теплицах как до их инфильтрации агробактериями, так и после – в период накопления в биомассе целевых белков. Лидер в использовании транзиентных экспрессионных систем для производства рекомбинантных белков - Kentucky BioProcessing (США) – имеет теплицы площадью около 5000 м², с единовременной ёмкостью более 3 млн. растений (Kentucky BioProcessing: Elevating the Meaning of Transforming Tobacco June 14, 2018). Другой лидер биофармы, iBio Inc (США), имеет инновационную культивационную систему для выращивания растений продуцентов площадью около 5100 м². Эта система обеспечивает производство до 150 кг mAb/год. Интересно, что капитальные затраты на создание этой системы составили около 150 млн. долларов, в то время как строительство завода аналогичной мощности по производству mAb в культуре клеток СНО оценивается более чем в 300 млн. долларов [207,208]. Существование и функционирование этих производств до настоящего времени не вызывали каких-либо проблем с регуляторными органами или экологической общественностью.

Значительный интерес к культивированию продуцентов в теплицах (или в различных теплице – подобных конструкциях) наблюдается и в случае использования стабильно трансформированных растений. Это обусловлено очевидными преимуществами замкнутых систем: быстрым и эффективным ростом растений благодаря оптимизированным условиям культивирования

(температура, освещенность, влажность, содержание CO₂ и т.д.); значительно более высоким качеством растений благодаря окружающей среде, свободной от насекомых, патогенов и колебаний погодных условий; высокой производительностью на единицу площади (которая достигается за счет автоматизации процессов, использования многослойных полок, высокой плотности посадки, более короткого периода роста, полного контроля над развитием растений)) [209].

Так, например, в исследовании Farran и др. [210] выход рекомбинантного кардиотропина человека в растениях табака составил 1,9 мг на одно растение за период культивирования в 7 дней. При использовании коммерчески доступной закрытой продукционной системы с рабочей площадью 22м² выход рекомбинантного кардиотропина составил более 3 кг/год, что оказалось достаточно для удовлетворения глобальной потребности в этой субстанции [209].

Замкнутые культивационные системы на основе теплиц различной конструкции были успешно использованы в исследованиях компаний Fraunhofer IME (Германия) для получения антител P2G12 в растениях табака [20]; ORF Genetics (Исландия) для производства различных цитокинов и факторов роста в ячмене, которые коммерциализированы под торговыми наименованиями BioeffectTMEGF и ISOKINETM [211]; и в ряде других исследований.

1.6.2. Биореакторные системы

1.6.2.1. Суспензионные культуры клеток растений

Для культивирования суспензионных культур клеток растений используются биореакторные системы. Биореакторы широко используются в

биотехнологии для производства рекомбинантных белков и вторичных метаболитов [212]. Единственный на данный момент препарат, одобренный для применения в медицине и полученный в растительной системе - рекомбинантная глюкоцереброзидаза человека (препарат Elelyso, Protalix Biotherapeutics, Израиль) - производится в культуре клеток моркови с использованием одноразовой биореакторной системы ProCellEx.

Преимуществами биореакторных систем являются лёгкость контроля условий культивирования, что обеспечивает постоянный выход целевого продукта, а также его секрция (в некоторых случаях) в культуральную среду. Это существенно упрощает выделение и очистку целевого белка [213].

Чаще всего для получения рекомбинантных белков в суспензионной культуре клеток используют клеточные линии, полученные из табака *Nicotiana tabacum* сортов Bright Yellow 2 (BY-2) и NT-1. К числу других активно используемых клеточных линий относятся линии, полученные из риса (*Oriza sativa*), сои (*Glycine max*), люцерны (*Medicago sativa*) и моркови (*Daucus carota*). Их особенностями являются способность к быстрому росту, синхронизации клеточных циклов, лёгкость трансформации агробактериями. Продуктивность этих культур варьирует в широких пределах от 4,5 до 247 мг рекомбинантного белка на один литр объёма биореактора. Чаще всего выход целевого продукта составляет несколько десятков мг/литр культуральной среды.

Системы на основе суспензионной культуры растительных клеток имеют и свои недостатки. В частности, типичной проблемой является контаминация культуры при её культивировании в биореакторах, что требует проведения затратных мероприятий по стерилизации среды и самих биореакторов, и поддержанию стерильности в ходе культивирования. При использовании суспензионной культуры в производственных масштабах, затраты делаются сопоставимыми с соответствующими затратами при культивировании клеток млекопитающих [214]. Более детально особенности использования

суспензионных культур клеток растений для получения рекомбинантных белков, их достоинства и недостатки рассматриваются в обзорах [213,215,216,217,218].

1.6.2.2. Культура «бородатых корней» растений

«Бородатые корни» представляют собой корни с дифференцированными тканями, полученные в результате трансформации растений бактериями *Rhizobium rhizogenes* (ранее рассматривались как *Agrobacterium rhizogenes*). Эти бактерии вызывают индукцию корней в районе поранения, корни способны к росту на безгормональной среде. «Бородатые корни» генетически стабильны и в биохимическом смысле аналогичны нормальным корням растений. Культура «бородатых корней» в наибольшей степени подходит для получения вторичных метаболитов. В настоящее время она используется в промышленных масштабах для коммерческого производства различных метаболитов растений, как в фармацевтических целях, так и для нужд пищевой промышленности. Более детально использование культуры «бородатых корней» для производства вторичных метаболитов рассматривается в обзоре Dhiman и др. [219].

Другим перспективным направлением использования культуры «бородатых корней» является получение рекомбинантных белков. Экспрессионные системы на их основе имеют ряд преимуществ перед суспензионными культурами клеток. Это, в частности, генетическая стабильность «бородатых корней», масштабируемость, возможность культивирования «бородатых корней» в биореакторах достаточно простой конструкции.

Основной проблемой, сдерживающей использование культуры «бородатых корней» для получения рекомбинантных белков, является недостаточный уровень их накопления в тканях корней и в среде культивирования. В настоящее время накопление рекомбинантных белков в тканях составляет, в среднем, единицы

микрограмм на грамм сырого веса. При использовании ризосекреции, накопление рекомбинантных белков в среде культивирования также невелико и составляет, в большинстве случаев, несколько миллиграмм на литр среды [219]. Например, в экспериментах Pham и др. накопление рекомбинантного тауматина II в среде культивирования составило 2,6 мг/л, в исследовании Martínez и др. накопление антител 14D9 достигло 6 мг/л [220,221]. Большинство исследователей считает, что одним из основных факторов низкого накопления рекомбинантных белков в среде культивирования является их деградация под воздействием секретируемых в среду протеиназ. Использование различных протеин-стабилизирующих агентов и ингибиторов протеиназ является перспективным направлением для увеличения накопления рекомбинантных белков в среде культивирования [222].

Необходимо отметить, что несмотря на то, что культура «бородатых корней» известна уже 40 лет [223], исследования по её использованию для получения рекомбинантных белков находятся сейчас, по сути, на начальных этапах. Более подробно использование культуры «бородатых корней» для получения рекомбинантных белков; перспективы и направления развития экспрессионных систем на её основе рассматриваются в обзорах [219,224,225].

1.6.2.3. Культивирование растений в биореакторах

Многообещающим направлением в развитии биореакторных технологий является их использование для культивирования растений. Так как растения являются фототрофными организмами, оптимальным является их культивирование в фотобиореакторах, утилизирующих энергию солнечного света для роста растений. Наиболее подходящими объектами для выращивания в фотобиореакторах являются виды, адаптированные к водному образу жизни - микроводоросли, цианобактерии и некоторые виды водных высших растений. К

таким растениям, в первую очередь, относятся виды подсемейства Рясковые (*Lemnoideae*) семейства Ароидные (*Araceae*).

Как уже было отмечено выше, рясковые обладают рядом ценных для биотехнологии свойств - быстрым ростом на минеральных средах простого состава, высоким содержанием белка, нетребовательностью к условиям культивирования. Вольфия шаровидная (*Wolffia globosa* (Roxb.) Hartog & Plas) и Вольфия бескорневая (*Wolffia arrhiza* (L.) Horkel ex Wimm.) пригодны, также, для глубинного культивирования в фотобиореакторах различных типов [226].

Высокое содержание крахмала (до 45% сухого веса у *Spirodela polyrhiza* и до 53% у *Landoltia punctata* [227,228]) сделало рясковые привлекательным объектом для производства биотоплива - этанола и бутанола. Рясковые являются источником полноценного белка, пригодного для использования в пищевой промышленности и непосредственного употребления в пищу человеком. Производство белка пищевого назначения из рясковых уже начато компаниями Parabel (США) и Ajinomoto Co., Inc (Япония) (сайты компаний www.parabel.com и www.hinoman.com).

Для производства пищевого белка или биотоплива ряску чаще всего выращивают в культиваторах бассейнового типа при естественном освещении и температуре. При этом регулируется состав питательной среды, её аэрация и температура (Рисунок 3, А). Очевидно, что для производства рекомбинантных белков индустриального или медицинского назначения эти культивационные системы не подходят.

Для производства рекомбинантных белков в растениях рясковых используются замкнутые, полностью изолированные от окружающей среды, конструкции биореакторов. Так, компанией Biolex разработана культивационная система LEX для выращивания растений ряски *Lemna minor* для получения рекомбинантных белков. Растения - продуценты культивируются в одноразовых пластиковых сосудах-мешках (Рисунок 3, Б), что существенно упрощает и

удешевляет процесс подготовки сред, поддержание стерильности и контроль условий роста. Технология отличается лёгкой масштабируемостью [147].

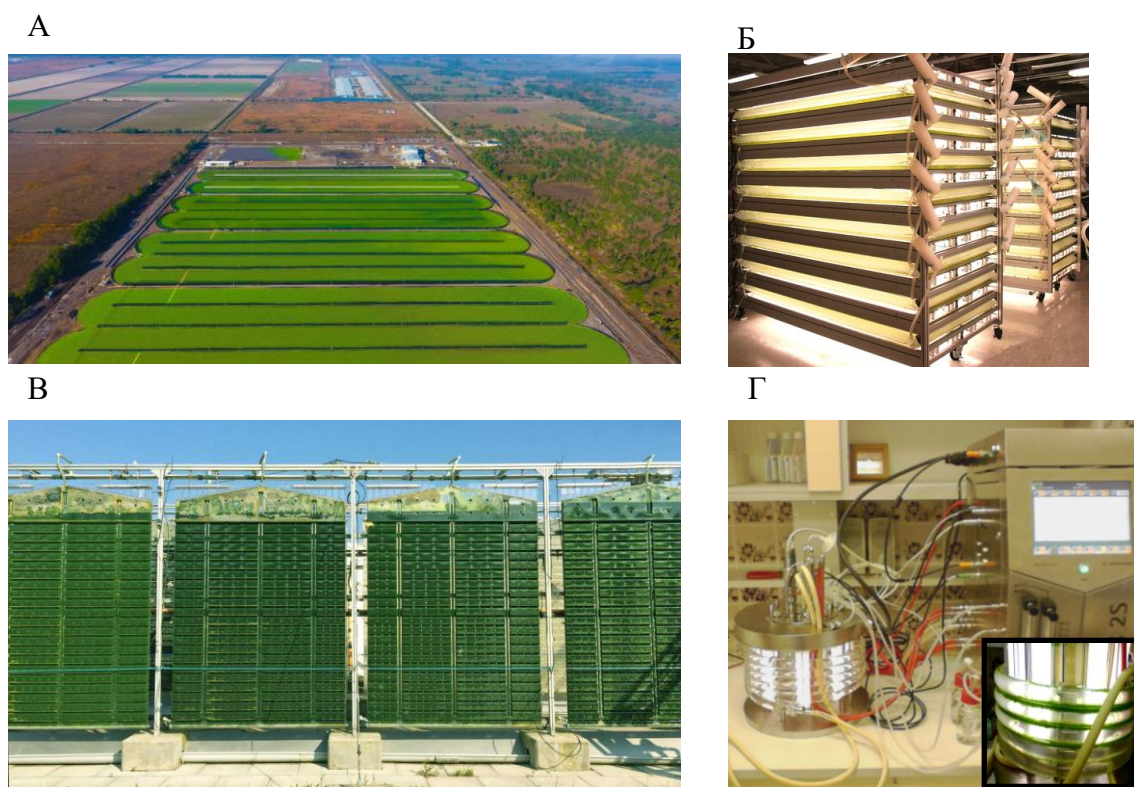


Рисунок 3 - А. Выращивание ряски в культиваторах бассейнового типа, компания Parabel (с сайта компании). Б. Выращивание ряски в культивационной системе LEX [147]. В. Эрлифтный реакторный модуль на пилотном заводе в Hamburg-Reitbrook для выращивания ряски малой *Letna minor*. Г. Культивирование *Wolffia arrhiza* в фотобиореакторе для получения рекомбинантных белков [229].

Биореакторы эрлифтного типа для культивирования ряски малой разработаны в Гамбургском технологическом университете (Рисунок 3, В). Эти установки предназначены для получения биомассы ряски с целью производства биоэтанола, а также различных белков (сайт проекта ABiRe www.abire.org). Исследования по культивированию Вольфии бескорневой в биореакторных системах для получения рекомбинантных белков проводятся в

России в ВНИИСБ. В частности, разработаны методы её культивирования *in vitro* в фотобиореакторах (Рисунок 3, Г) [229].

Важно отметить, что исследования в области культивирования рясковых в биореакторах для получения рекомбинантных белков до сих пор весьма немногочисленны. В большинстве случаев они сводятся к оптимизации состава питательных сред, культивирование осуществляется в колбах или аналогичных сосудах на качалках. Влияние состава воздушной среды, интенсивности и спектрального состава света, конструкции биореакторов, различных добавок на скорость роста и выход целевого белка практически не изучалось. Практически не изучено влияние вышеуказанных факторов на состав вторичных метаболитов рясковых и их влияние на процессы выделения и очистки рекомбинантных белков. Отдельной и интересной задачей является модификация вторичного метаболизма рясковых для оптимизации их физиологических и биохимических характеристик применительно к особенностям использования этих растений в качестве производственных платформ для биофарминга. В целом, исследования в области культивирования рясковых в биореакторах по сути находятся на начальных этапах и требуют дальнейшего развития для разработки эффективных и недорогих производственных систем на базе этих растений.

1.7. Растительные экспрессионные системы: направления совершенствования

Как отмечалось выше, одним из недостатков растительных экспрессионных систем является невысокий уровень накопления целевых белков. По данным Buyel и Fischer производство рекомбинантных белков в растениях не конкурентно при уровне их экспрессии менее 20-50 мг/кг биомассы [230,231]. Необходимо иметь в виду, что в своём исследовании Buyel и Fischer рассматривали

производство рекомбинантных белков, экспрессирующихся в листьях и требующих тщательной очистки. Производство рекомбинантных белков, которые не требуют высокой степени очистки (в первую очередь, промышленных ферментов) может быть рентабельно и при этих уровнях экспрессии. Уровень экспрессии рекомбинантных белков в сочных органах ядерно-трансформированных растений (листья, плоды, клубни, корнеплоды) обычно находится в диапазоне десятых долей процента, чаще всего в диапазоне 0,1 - 0,5% ОРБ, в некоторых случаях выше - около 1%. Как правило, это соответствует нескольким десяткам миллиграмм рекомбинантного белка на один килограмм сырого веса биомассы, обычно до 20-30 мг/кг, хотя эта величина сильно зависит от содержания общего белка в растениях, обводнённости биомассы и условий культивирования растений. В Таблице 2 представлены типичные примеры экспрессии в сельскохозяйственных растениях некоторых рекомбинантных антигенов против возбудителей болезней животных, полученных разными методами.

Задача повышения уровня экспрессии рекомбинантных белков в ядерно-трансформированных растениях обычно решается с использованием стандартных молекулярно-биологических подходов - оптимизации кодонного состава экспрессируемой последовательности, подбора сильных промоторов, оптимизации структуры гетерологичного гена и др. [232,233]. Основные молекулярно-биологические методы, используемые для повышения экспрессии, представлены в Таблице 9.

Комплексное использование этих методов позволяет существенно, иногда на два-три порядка, увеличить уровень накопления рекомбинантных белков в трансгенных растениях, по сравнению с вариантами, где такая оптимизация не проводилась. Например, использование орган-специфического промотора глобулина I кукурузы позволило обеспечить экспрессию рекомбинантного трипсина в семенах на уровне, равном 3,3% от ОРБ (соответствовало 58 мг трипсина на 1 кг семян) по сравнению с экспрессией в 0,08% при использовании

конституитивного промотора убиквитина. Этого уровня аккумуляции трипсина оказалось достаточно для разработки коммерчески рентабельного производства рекомбинантного трипсина [234]. Препарат трипсина TrypZean® коммерциализирован и реализуется компанией SigmaAldrich (www.sigmaaldrich.com).

Таблица 9 - Молекулярно-биологические методы, используемые для повышения экспрессии в ядерно-трансформированных растениях.

- Использование сильных промоторов вирусного, агробактериального или растительного происхождения, а также химерных промоторов
- Оптимизация кодонного состава гетерологичных генов, оптимизация нуклеотидной последовательности в районе старта трансляции
- Использование гетерологичных 3' нетранслируемых регионов для стабилизации мРНК и 5' нетранслируемых регионов для усиления трансляции
- Локализация гетерологичных белков в компартментах клетки, наиболее подходящих для их аккумуляции
- Экспрессия рекомбинантных белков в наиболее подходящих для этого органах (как правило, запасающих), использование ткане- и орган-специфических промоторов.
- Экспрессия рекомбинантного белка в составе слитых белков для улучшения их стабильности
- Увеличение экспрессии посредством скрещивания трансгенных линий между собой, использование линий с оптимальным для экспрессии гетерологичных белков генетическим бэкграундом
- Включение в структуру экспрессионной кассеты последовательностей ДНК, обладающих способностью связываться с ядерным матриксом (scaffold attachment regions)
- Ко-экспрессия факторов транскрипции и трансляции

Использование химерной конструкции, включающую синтетическую последовательность гена целлюбиогидролазы II (из *Hydrocrea jecorina* Cel6A) под контролем семя-специфического промотора глютелина риса, 3'-нетранслируемого фрагмента гена ингибитора протеиназы II картофеля и сигнального пептида α -амилазы ячменя, обеспечило накопление рекомбинантной целлюбиогидролазы в семенах кукурузы на уровне более 8% от ОРБ, что вполне достаточно для её индустриального производства [235]. Рекомбинантная целлюбиогидролаза, полученная из семян трансгенной кукурузы, коммерциализирована компанией SigmaAldrich и находится в продаже (www.sigmaaldrich.com).

Экспрессия рекомбинантных белков в запасающих органах, какими являются семена и клубни, является удачным подходом для повышения уровня экспрессии гетерологичных белков в ядерно-трансформированных растениях. Чаще всего для экспрессии в семенах используются кукуруза и рис, в клубнях-картофель.

В настоящее время рекомбинантные ферменты индустриального назначения получают, главным образом, в семенах кукурузы, особенно те, которые не требуют тщательной очистки, как например, целлюбиогидролаза (производство биотоплива), фитаза (производство комбикормов для животных), эндо-1,4- β -D-глюканаза (пищевая промышленность) и др. (Таблица 3).

Другой важной платформой для биофарминга являются трансгенные растения риса. Экспрессия гетерологичных белков под контролем семя-специфических промоторов обеспечивает в некоторых случаях очень высокий уровень их накопления в семенах. Так, экспрессия гена глюкагон-подобного пептида 1 (GLP-1) под контролем промотора глобулина обеспечивала накопление GLP-1 в семенах до 2,5 г/кг [236]. Рекомбинантный GM-CSF человека накапливался в семенах риса на уровне 1,3% от ОРБ, а инсулин-подобный фактора роста 1 человека (hIGF-1) - около 7,0% [237,238].

Таким образом, комплексное использование молекулярно-биологических методов, в т.ч. органоспецифической экспрессии рекомбинантных белков, является одной из важнейших предпосылок успеха в работе по совершенствованию растительных экспрессионных платформ.

1.8. Тауматин

1.8.1. Биологические характеристики, свойства и применение тауматина

Тауматин - сладкий белок из плодов растения катемфе (*Thaumatococcus daniellii Benth.*), произрастающего в Западной Африке. Плоды катемфе издавна использовались местным населением как подсластитель, в частности при изготовлении вина и детского питания. Тауматин локализован в мясистом ариллусе, окружающем семена катемфе. Содержание тауматина в ариллусах зрелых плодов составляет 30-55 мг/г сырой массы (около 50% от общего растворимого белка), варьируя в широком диапазоне в зависимости от степени зрелости плодов и района произрастания [239]. Средний вес плода катемфе варьирует в диапазоне от 6 до 30г, масса ариллуса составляет 4-6% массы плода [240,241].

В местах естественного произрастания катемфе существует его мелкомасштабное фермерское производство. Объёмы производства плодов катемфе достоверно неизвестны и сильно колеблются по годам в зависимости от погодных условий текущего сезона. Так, производство ариллусов катемфе в Кот-д'Ивуар в 1984-1991гг оценивалось от 7,5 до 26 тонн ежегодно [242], примерно

такой же объём составило производство в Гане [241]. Полученное сырьё практически полностью отправляется на переработку в Европу.

Белковая природа сладкой субстанции, присутствующей в ариллусах, была впервые установлена van Der Wel и Loeve в 1972г [243]. Эти исследователи показали, что сладкий вкус вызывается смесью двух белков, очень похожих по своим свойствам, и названных тауматин I и тауматин II. Эти белки слаще сахарозы в 3000 раз по весовому соотношению и в 100000 по молярному. Нуклеотидная последовательность кДНК, кодирующая тауматин II, была клонирована Edens с соавторами в 1982г, это позволило определить аминокислотную последовательность этого белка [244]. Аминокислотная последовательность тауматина I была определена методом прямого секвенирования [245], нуклеотидная последовательность кДНК тауматина I была установлена Ide с соавторами в 2007г [246]. Аминокислотные последовательности тауматина I и тауматина II были дополнительно уточнены в исследованиях Lee и др., и Ide и др. (Рисунок 4) [246,247].

О структуре генов тауматинов и об их организации в геноме *T. daniellii* известно немного. Ledebouer и др. изолировали из ДНК *T. daniellii* пять различных клонов, гомологичных структурным гена тауматина II [248]. Было показано, что все изолированные гены относятся к одному семейству и включают два маленьких (менее 100 п.н.) интрона, локализованных в разных позициях в последовательностях изучаемых генов, что характерно для генов запасяющих белков семян. Данные о других структурных элементах генов тауматинов и об организации этих генов в геноме *T. daniellii* до сих пор отсутствуют.

GenBank ID	Ссылка	1	75
Thaumatococcus II Lee et al., 1988	(1)	-----ATFEIVNRC	SYTVWAAASKGDAALDAGGRQLNSGESWTINVEPGTKGGKIWAR
Thaumatococcus II Edens et al., 1982	(1)	MAATTCFFFLFPFL LLLLLTL SRA	ATFEIVNRC
Thaumatococcus I Iyengar et al., 1979	(1)	-----ATFEIVNRC	SYTVWAAASKGDAALDAGGRQLNSGESWTINVEPGTNGGKIWAR
Thaumatococcus I Lee et al., 1988	(1)	-----M	ATFEIVNRC
Thaumatococcus I Kaneko et al., 2001	(1)	-----ATFEIVNRC	SYTVWAAASKGDAALDAGGRQLNSGESWTINVEPGTNGGKIWAR
76			
Thaumatococcus II Lee et al., 1988	(54)	TDCYFDDSGSGICK	TGDCGGLLRCKRFGRPPTTLAEFSLNQYGKDYIDISNIKGFNVPMDFSP
Thaumatococcus II Edens et al., 1982	(76)	TDCYFDDSGR	GICRTGDCGGLLRCKRFGRPPTTLAEFSLNQYGKDYIDISNIKGFNVPMDFSP
Thaumatococcus I Iyengar et al., 1979	(54)	TDCYFDDSGSGICK	TGDCGGLLRCKRFGRPPTTLAEFSLNQYGKDYIDISNIKGFNVPMDFSP
Thaumatococcus I Lee et al., 1988	(55)	TDCYFDDSGSGICK	TGDCGGLLRCKRFGRPPTTLAEFSLNQYGKDYIDISNIKGFNVPMDFSP
Thaumatococcus I Kaneko et al., 2001	(54)	TDCYFDDSGSGICK	TGDCGGLLRCKRFGRPPTTLAEFSLNQYGKDYIDISNIKGFNVPMDFSP
151			
Thaumatococcus II Lee et al., 1988	(129)	DIVGQCPAKLKAPGGGCNDACTVFQTSEY	CCTTGKCGPTEYSRFFKRLCPDAFSYVLDKPTTVTC
Thaumatococcus II Edens et al., 1982	(151)	DIVGQCPAKLKAPGGGCNDACTVFQTSEY	CCTTGKCGPTEYSRFFKRLCPDAFSYVLDKPTTVTC
Thaumatococcus I Iyengar et al., 1979	(129)	DIVGQCPAKLKAPGGGCNDACTVFQTSEY	CCTTGKCGPTEYSRFFKRLCPDAFSYVLDKPTTVTC
Thaumatococcus I Lee et al., 1988	(130)	DIVGQCPAKLKAPGGGCNDACTVFQTSEY	CCTTGKCGPTEYSRFFKRLCPDAFSYVLDKPTTVTC
Thaumatococcus I Kaneko et al., 2001	(129)	DIVGQCPAKLKAPGGGCNDACTVFQTSEY	CCTTGKCGPTEYSRFFKRLCPDAFSYVLDKPTTVTC
226			
Thaumatococcus II Lee et al., 1988	(204)	CPTA	-----
Thaumatococcus II Edens et al., 1982	(226)	CPTA	LELEDE
Thaumatococcus I Iyengar et al., 1979	(204)	CPTA	-----
Thaumatococcus I Lee et al., 1988	(205)	CPTA	-----
Thaumatococcus I Kaneko et al., 2001	(204)	CPTA	-----

Рисунок 4 - Аминокислотные последовательности тауматинов I и II. Жирным шрифтом показан N- концевой сигнальный пептид тауматина II, курсивом- его C- концевой пропептид. Различия в аминокислотных последовательностях показаны цветом.

Биологические функции тауматина в растениях *T. daniellii* до настоящего времени детально не изучены. Предполагается, что основной функцией тауматина является защита семян и плодов *T. daniellii* от грибных патогенов и, возможно, от абиотических стрессов. Тауматин относится к семейству «тауматин-подобных» белков (TLP) [249]. Экспрессия тауматин-подобных белков происходит в ответ на различные стрессы, включая атаки патогенов и вредителей, а также на засуху, холод и механические повреждения. Соответственно с этим, тауматин и тауматин-подобные белки были классифицированы как семейство 5 *pathogenesis-related* протеинов (PR5) [250]. PR5 протеины являются важной частью системы защиты растений от атак патогенов, в первую очередь грибных [251,252]. Антигрибная активность тауматина была неоднократно подтверждена экспериментально (см. ниже). Точный механизм антигрибной активности тауматина II (как и всего класса PR5 белков) до настоящего времени детально не известен. Предполагается, что антигрибная активность PR5 белков связана со способностью нарушать регуляцию синтеза клеточных стенок патогенных грибов или вызывать их повреждения [253].

Сочетание сладкого вкуса, необычной устойчивости к повышенным температурам и стабильности в кислых средах является уникальным и вызвало большой интерес к тауматину. Исторически сложилось, что основной объём исследований был выполнен с использованием тауматина II, интенсивно изучалась возможность его использования в пищевой промышленности как низкокалорийного заменителя сахара. В настоящее время свойства тауматина II детально изучены и подтверждена его полная безопасность. Тауматин II разрешен к использованию в странах ЕС, Израиле и Японии как заменитель сахара (пищевая добавка E957 [254]) и в США как модификатор вкуса [255]. Важно отметить, что тауматины относятся к семейству PR5 белков, многие члены которого являются сильными аллергенами [256]. Однако до сих пор не имеется ни одного сообщения об аллергенных свойствах тауматинов I и II, как натурального происхождения, так и рекомбинантного.

Эксперименты по экспрессии тауматина II в бактериальных системах в целом оказались неудачными, т.к. рекомбинантный тауматин оказался не сладким. Попытки получения рекомбинантного тауматина II в системах на основе дрожжей или нитчатых грибов оказались более успешными. В экспериментах с использованием дрожжей *S. cerevisiae* и нитчатого гриба *Aspergillus oryzae*, максимальное накопление тауматина составило 140 и 150 мг/л культуральной среды, соответственно. Однако из опубликованных работ не ясно, сохранял ли полученный в этих грибах тауматин II сладкий вкус и если да, то в какой степени [257]. Необходимо отметить, что в доступной нам литературе отсутствуют упоминания о микробиологическом производстве тауматина II.

Повидимому, трудности экспрессии тауматина II в микробиологических системах связаны с необходимостью поддержания его корректной конформации (в частности, образования 8 дисульфидных связей), что не всегда получается достаточно эффективно. Необходимо отметить, что тауматин относится к семейству PR5 протеинов, характерным свойством которых является выраженная антигрибная активность [258]. Кроме того, показана антибактериальная активность тауматина против некоторых видов бактерий [259]. Эти факторы, вероятно, могут оказывать определённое влияние на эффективность микробиологического производства рекомбинантного тауматина.

Проблема сохранения свойств тауматина II вполне решается путём использования экспрессионных систем на основе растений. К настоящему времени получено значительное количество сельскохозяйственных растений, трансформированных геном тауматина II. Большинство исследований было направлено на повышение сладости плодов и на повышение устойчивости растений к грибным фитопатогенам. Полученные растения характеризовались сладким вкусом плодов и вегетативных органов. Было показано частичное повышение устойчивости трансгенных растений к некоторым фитопатогенным грибам, например, *Alternaria brassicae* и *Botrytis cinerea*. В тоже время практически отсутствуют исследования, направленные на изучение возможности

использования трансгенных растений как продуцентов рекомбинантного тауматина II для последующего его использования в пищевой и фармацевтической промышленности.

В большинстве исследований отсутствуют количественные данные о накоплении тауматина II в растениях, что необходимо для оценки возможности их использования как продуцентов этого белка. Не разработаны методы выделения рекомбинантного тауматина II из трансгенных растений, отсутствуют данные о его вкусовых характеристиках. Таким образом, разработка экспрессионных платформ на основе трансгенных растений для получения рекомбинантного тауматина II является отдельной научной задачей, требующей своего решения.

1.8.2. Физико-химические свойства тауматинов. Сладкий вкус

Тауматин II экспрессируется в растениях *T. daniellii* в форме препротауматина длиной 235 а.о. Аминокислотная последовательность препротауматина II включает N-концевой сигнальный пептид (а.о. 1-22) и C-концевой пропептид LELEDE (а.о. 230-235). Зрелая форма тауматина II состоит из одной цепи длиной 207 а.о. (а.о. 23-229) молекулярной массой 22286.44 Да и не включает каких-либо необычных аминокислот или углеводов. В зрелой форме тауматина II имеется 8 дисульфидных связей. В процессе созревания тауматина II происходит отщепление N-концевого сигнального пептида и C-концевого пропептида с образованием зрелой формы. Функция C-концевого пропептида LELEDE пока не ясна, в зрелых формах тауматина I и тауматина II этот пептид отсутствует.

Трехмерная структура тауматинов I и II к настоящему времени изучена детально и с высоким разрешением. Молекула тауматина состоит из 3 доменов-корового (а.о. 1–53, 85–127 и 178–207), большого (а.о. 128–177) и малого (а.о. 54–

84) регионов, богатых дисульфидными связями [260,261,262]. Однако однозначной связи между конформацией молекулы тауматина и его сладким вкусом эти исследования не выявили.

Сладкий вкус тауматина существенно отличается от вкуса сахарозы. Ощущение сладости, вызванное тауматином, наступает с задержкой на 10-15 сек по сравнению с сахарозой и развивается постепенно, с четко выраженной фазой нарастания. Ощущение сладости, вызванное тауматином, является продолжительным, оно длится несколько минут, при этом тауматин обладает длительным и характерным сладким послевкусием. Сладкий вкус тауматина ощущают только человек и высшие приматы, но не низшие обезьяны Нового Света или грызуны [263,264].

Особенности вкуса тауматина могут затруднять его широкое использование как подсластителя в пищевой промышленности. В связи с этим были предприняты определённые усилия по модификации вкуса тауматина, что бы сделать его более «сахароподобным». С использованием сайт-направленного мутагенеза были получены варианты гена тауматина I с различными аминокислотными заменами. Некоторые из этих них имели меньшую длительность послевкусия. В целом, результаты, полученные в данном направлении, оказались незначительными [265].

Минимальная концентрация тауматина II, которая вызывает ощущение сладкого вкуса, равна 48нМ, т.е. тауматин по соотношению молярных масс примерно в 100000 раз слаще сахарозы [243]. По весовому эквиваленту тауматин слаще сахарозы в 1600-3000 раз. Точное определение этой величины затруднено, т.к. при повышении концентрации тауматина наблюдается снижение его относительной сладости [265,266].

Точный молекулярный механизм, вызывающий ощущение сладкого вкуса тауматина, окончательно не ясен. Показано, что принципиально важным фактором является сохранение интактной структуры молекулы тауматина- даже частичная редукция дисульфидных связей в молекуле тауматина ведёт к потере

его сладкого вкуса [243,267]. Рефолдинг рекомбинантного тауматина, экспресированного в тельцах включения *E. coli*, вёл к полному восстановлению его сладкого вкуса [268].

Возможный механизм взаимодействия тауматина и других сладких белков (монеллина и браззеина) с рецептором сладкого вкуса T1R2-T1R3 предлагается в модели «клина». В соответствии ней предполагается, что сладкий белок связывается с вторичным сайтом связывания на поверхности рецептора, переводя его в активную форму без участия низкомолекулярного лиганда [269,270,271]. Многократно подтверждено, что мутации в аминокислотной последовательности тауматина, изменяющие заряд поверхности его молекулы, и, таким образом, характер связывания с T1R2-T1R3, вели к ослаблению или полному исчезновению сладкого вкуса [272,273,274]. В исследовании Masuda и др., базирующейся на модели «клина», было получено несколько вариантов тауматина I [275]. Один из этих вариантов (D21N) оказался существенно более сладким, чем нативный - пороговая концентрация, при которой надёжно детектировался сладкий вкус, составила 31 ± 4 нМ. Таким образом, модель «клина» получила дополнительное экспериментальное подтверждение.

Помимо сладкого вкуса, тауматин II характеризуется высокой стабильностью при нагревании в кислых условиях. Он полностью сохранял сладкий вкус в течение 30 мин при температуре 80 °С при pH 2,0; при нагревании в течение 2 часов минимальная концентрация, вызывающая ощущение сладкого вкуса составила 100 нМ, т.е. сладость тауматина II снизилась только в 2 раза. В тоже время при нагревании при pH 7.0, тауматин II в течение 30 мин полностью терял сладкий вкус [276, 277]. Причина терморезистентности тауматина при кислых условиях окончательно неясна, возможно, это связано с наличием в молекуле тауматина большого количества дисульфидных связей.

Имеются отдельные сообщения, что тауматин II демонстрирует свойства ингибитора протеиназ [278] и устойчив к деградации протеиназами [279]. Однако до сих пор эти свойства тауматина II детально не изучены.

1.8.3. Тауматины I и II в трансгенных растениях

Сладкий вкус и антигрибная активность тауматина сделали его привлекательным объектом для генетической инженерии сельскохозяйственных растений. К настоящему времени многих виды сельскохозяйственных культур были трансформированы геном тауматина II (Таблица 10).

На первоначальном этапе исследований основное внимание уделялось улучшению вкуса плодов и съедобных частей растений - повышению их сладости. В 1990г . Witty впервые показал, что экспрессия гена тауматина II в картофеле вызывает появление сладкого вкуса [280]. Линии огурца [281], томата [282,283] и земляники [284], трансформированные геном тауматина II, также характеризовались сладким вкусом плодов и листьев. Сладкий вкус корнеплодов был хорошо выражен у трансгенных растений моркови [285]. В этих экспериментах растения трансформировали геном препротауматина II с собственными N- и C- концевыми сигналами под контролем 35S промотора вируса мозаики цветной капусты. Сладкий вкус трансгенных растений подтвердил корректный процессинг препротауматина в широком ряду гетерологичных растительных систем.

Геном тауматина II были трансформированы многолетние плодовые растения- яблоня и груша, листья полученных трансформантов характеризовались сладким вкусом [286,287]. Полученные трансгенные растения яблони и груши далее культивировались в полевых условиях и в 2009-2010гг. вступили в плодоношение. Плоды груши, трансформированной тауматином, по результатам органолептического анализа, характеризовались сильным сладким вкусом, типичным для тауматина [288]. Плоды яблони характеризовались менее выраженным сладким вкусом, но, тем не менее, были достоверно слаще, чем плоды контрольных нетрансформированных растений (не опубликованные данные).

Плоды и вегетативные органы различных растений, трансформированных геном тауматина II, обладали сладким вкусом, сила которого варьировала от слабого до очень сильного. Вкус был типичным для тауматина, с характерным длительным послевкусием и привкусом лакрицы.

Вкусовые свойства огурца, трансформированного геном тауматина II, были подробно изучены Szwaska с соавторами [289]. В результате этих исследований было показано, что трансгенные огурцы в свежем виде оценивались более высоко, чем плоды контрольных нетрансгенных растений. В тоже время, в составе салатов или в маринованном виде, вкусовые качества трансгенных огурцов оценивались на уровне контрольных. Этими же авторами было отмечено, что огурцы трансформированные тауматином являются более ароматными, чем нетрансгенные, за счет увеличения содержания главного ароматического вещества огурца (E,Z)-2,6-нонадиеналя [289,290].

Таблица 10 - Трансгенные растения, трансформированные геном тауматина.

Растение	Уровень экспрессии тауматина II	Особенности трансгенных растений	Примечания	Ссылка
Картофель <i>Solanum tuberosum</i> L. cv. Iwa	~ 2.0 мкг/г сырой массы корней	сладкий вкус вегетативных тканей	препротауматин II промотор 35S CaMV	[280,295]
Огурец <i>Cucumis sativus</i> L. cv. Borszczagowski, line Bc	до 1% ОРБ	сладкий вкус плодов	препротауматин II промотор 35S CaMV	[281]
Томат <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. cv. «Beta», line nor	не определяли	сладкий вкус плодов	препротауматин II промотор 35S CaMV	[282]
Груша <i>Pyrus communis</i> L. cv. Burakovka	не определяли	сладкий вкус вегетативных тканей	препротауматин II промотор 35S CaMV	[286]
Яблоня <i>Malus domestica</i> Borkh. cv. Мельба	не определяли	сладкий вкус вегетативных тканей	препротауматин II промотор 35S CaMV	[287]
Томат <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. cv. Yalf	0,007 - 0,17% ОРБ	сладкий вкус плодов и вегетативных тканей	препротауматин II промотор 35S CaMV	[283]
Земляника садовая <i>Fragaria x ananassa</i> Duch. cv. Firework	не определяли	сладкий вкус плодов повышенная устойчивость к <i>Botrytis cinerea</i>	препротауматин II промотор 35S CaMV	[284]
Земляника садовая <i>Fragaria x ananassa</i> Duch. cv. Selekt	не определяли	сладкий вкус плодов повышенная устойчивость к <i>Botrytis cinerea</i>	препротауматин II промотор 35S CaMV	[291]
Гиацинт восточный <i>Hyacinthus orientalis</i> L. cvs. Edisson и Chine Pink	0.06-0.28% ОРБ	повышенная устойчивость лукович к <i>Fusarium culmorum</i> и <i>Botrytis cinerea</i>	препротауматин II промотор 35S CaMV	[292]

Продолжение Таблицы 10

Табак <i>Nicotiana tabaccum</i> L. var. Xanthii	не определяли	повышенная устойчивость к <i>Pythium aphanidermatum</i> и <i>Rhizoctonia solani</i> ; к засолению и засухе	препротауматин II промотор 35S CaMV	[293]
Морковь <i>Daucus sativus</i> L. cv. Nantskaya 4	не определяли	повышенная устойчивость к <i>Fusarium avenaceum</i>	препротауматин II промотор 35S CaMV	[285]
Морковь <i>Daucus sativus</i> L. cvs. Nantska, Korotel, Red Giant и Perfektziya Сельдерей <i>Apium graveolens</i> L. cvs. Paskal, Zephyr, Yablochnyi	не определяли	антибактериальная активность растительных экстрактов, отсутствие антигрибной активности, повышенная устойчивость к засолению и засухе	тауматин II слитый с сигнальным пептидом транспорта в пластиды промотор 35S CaMV	[259]
Ячмень <i>Hordeum vulgare</i> L.	более 3 г/кг зерна	получение рекомбинантного тауматина I	препротауматин I под контролем промотора D-гордеина ячменя или зрелый тауматин I под контролем промотора и N-терминального сигнального пептида D-гордеина ячменя	[294]
Табак <i>Nicotiana tabaccum</i> L. культура бородатых корней	1.4-2.6 мг/л среды культивирования	получение рекомбинантного тауматина I	тауматин I без сигнальной последовательности или слитый с N-терминальным сигнальным пептидом калретикулина промотор 35S CaMV	[220]

Детального изучения вкусовых характеристик других трансгенных растений- яблони, груши, томатов, земляники, моркови до настоящего времени не было проведено. Исследователи, работающие с этими культурами, в основном ограничивались констатацией наличия сладкого вкуса и его оценкой по сравнению с контрольными растениями. Повышение сладости плодов и вегетативных частей растений, трансформированных тауматином, было неоднократно подтверждено. Тем не менее, использование гена тауматина II для улучшения вкусовых характеристик сельскохозяйственных культур пока не получило широкого распространения, что связано, скорее всего, с недостаточным «сахароподобием» вкуса тауматина и наличием характерного послевкуся.

Важным свойством тауматина является его способность действовать как усилитель вкуса, в том числе продуктов растительного происхождения [265]. Способность тауматина улучшать вкус и аромат огурцов, даже при относительно невысоких уровнях экспрессии, подтверждена в исследованиях [289,290]. Улучшение вкуса трансгенных фруктов и овощей, таким образом, может достигаться не только за счет повышения сладости, но и за счет усиления выраженности их собственного вкуса.

Другим активно развиваемым направлением исследований являлось повышение устойчивости сельскохозяйственных растений к грибным патогенам. Повышенная устойчивость растений, трансформированных геном тауматина, была подтверждена в ряде экспериментов. Так, растения земляники продемонстрировали повышенную устойчивость к *Botrytis cinerea* [284,291]. Растения гиацинта, трансформированные геном тауматина II, характеризовались повышенной устойчивостью луковиц к возбудителям гнилей *B. cinerea* и *Fusarium culmorum*, развитие симптомов болезни у трансгенных растений замедлялось на 7-8 дней по сравнению с нетрансформированными растениями [292]. Существенное возрастание устойчивости трансгенных растений табака к возбудителям ризоктониоза *Rhizoctonia solani* и корневой гнили *Pythium aphanidermatum* показано в исследовании Rajam с соавторами [293]. Растения моркови,

экспрессирующие ген тауматина II, продемонстрировали существенное возрастание устойчивости к фитопатогенному грибу *F. avenaceum*. Интересно, что некоторые линии продемонстрировали полную невосприимчивость к этому патогену [285].

В ряде исследований показано возрастание устойчивости растений, трансформированных геном тауматина, к абиотическим стрессам- засухе и засолению [259,293]. Точный механизм повышения устойчивости к этим стрессам под влиянием тауматина не ясен, хотя известно, что экспрессия TLR индуцируется в том числе, и как ответ на различные абиотические стрессы. Имеются данные, что растительные PR5 белки могут узнавать различные сигнальные молекулы и участвовать в сигнальных взаимодействиях в роли рецептора или лиганда [249]. Возможно, что повышение устойчивости растений к абиотическим стрессам реализуется через участие тауматина в различных сигнальных системах, связанных с адаптацией растений.

Необходимо отметить, что тауматин является хорошо изученным белком, разрешенным к применению в пищевых целях, и его использование для повышения устойчивости к грибным патогенам не должно вызывать опасений потребителей относительно безопасности пищевых продуктов, полученных из трансгенных растений.

1.8.4. Экспрессия рекомбинантного тауматина в растениях

Как отмечалось выше, потенциальная возможность использования тауматина в пищевой промышленности и ограниченность его природных источников, вызвала значительный интерес к разработке методов получения рекомбинантного тауматина в гетерологичных экспрессионных системах. Использование экспрессионных платформ на основе трансгенных растений, по

нашему мнению, является наиболее перспективным подходом для получения рекомбинантного тауматина. Тем не менее, исследований, направленных на получение трансгенных растений- продуцентов рекомбинантного тауматина нам известно немного.

Так, Stahl с соавторами были получены трансгенные растения ячменя, трансформированные нуклеотидной последовательностью, кодирующей тауматин I [294]. Экспрессируемая последовательность находилась под контролем промотора D-гордеина ячменя, что обеспечивало накопление рекомбинантного тауматина в зерне. Тауматин экспрессировался в двух вариантах- как нативный препротауматин I или в виде зрелого тауматина I, слитого с N- терминальным сигнальным пептидом D-гордеина ячменя. По уровню накопления рекомбинантного тауматина эти варианты не различались. Показано, что N- и C- терминальные пептиды препротауматина I нормально отщеплялись в растениях ячменя. Уровень накопления рекомбинантного тауматина в лучших линиях превысил 3 г/кг зерна. Авторы также отметили относительную легкость выделения и очистки тауматина I из зерна ячменя.

В работе Pham с соавторами для получения тауматина I была использована культура бородатых корней табака [220]. Были изучены два варианта тауматина - без сигнальной последовательности и с N- концевым сигнальным пептидом калретикулина. В варианте, когда тауматин I был слит с сигнальным пептидом калретикулина, наблюдалась секреция рекомбинантного тауматина в культуральную среду, максимальный уровень накопления тауматина составил 0,21 мг/л. В случае трансформации растений тауматином без N- концевой сигнальной последовательности, целевой белок в культуральной среде не детектировался. Уровень накопления тауматина достигал максимального на 30 день культивирования бородатых корней и далее снижался. Обогащение среды PVP (до 1,5%) и NaCl (100мМ) вело к возрастанию накопления рекомбинантного тауматина в среде до 1,4 и 2,6 мг/л, соответственно. Таким образом, данное исследование показало принципиальную возможность разработки замкнутой

экспрессионной системы на основе ризосекреции для получения рекомбинантного тауматина, хотя необходимы дальнейшие исследования по повышению уровня накопления целевого белка и ингибированию протеиназной активности в культуральной среде.

В результате более чем 30-летних исследований тауматин стал одним из наиболее изученных белков растений, особенно в прикладном отношении. С использованием трансгенных растений неоднократно подтверждена возможность улучшения вкуса урожая и повышения устойчивости сельскохозяйственных культур к грибным патогенам. Подробно изучены физико-химические свойства тауматина, важные для использования в промышленности, неоднократно подтверждена его безопасность для потребителей [296].

Основной проблемой использования тауматина как подсластителя, по нашему мнению, является недостаточное «сахароподобие» вкуса тауматина, в частности наличие длительного и характерного послевкусия. К сожалению, усилия по совершенствованию вкуса тауматина пока не привели к необходимому результату, и это является одним из направлений дальнейших исследований. Необходимо отметить, что в случае плодовых и ягодных растений (особенно земляники и яблони) послевкусие тауматина в значительной степени маскируется собственным вкусом плодов. Особенно это характерно при умеренных уровнях накопления рекомбинантного тауматина. При оптимальном уровне экспрессии тауматина в трансгенных плодах проблема специфичности его вкуса в значительной степени снимается.

Кроме того, улучшение вкуса фруктов и овощей может достигаться не только за счет повышения сладости, но и за счет усиления выраженности их собственного вкуса. В этом случае тауматин выступает скорее как усилитель вкуса, чем подсластитель. Однако требуются дальнейшие исследования для более подробного изучения этого свойства тауматина в трансгенных плодах.

Тауматин в настоящее время разрешен к применению во многих странах как низко-калорийный сахарозаменитель и модификатор вкуса. Тауматин,

потенциально, может быть широко использован как компонент диет для лиц, страдающих диабетом, патологическими формами ожирения и различными метаболическими расстройствами. С учетом ограниченности ресурсов природного тауматина, это подразумевает разработку методов получения рекомбинантного тауматина в промышленных масштабах.

По нашему мнению, оптимальным является разработка экспрессионных систем на основе трансгенных растений. Это позволяет не только получать необходимые количества дешёвого сырья для переработки, но, также, упрощает и удешевляет последующие этапы выделения рекомбинантного тауматина. При использовании сельскохозяйственных растений как продуцентов нет необходимости тщательной очистки получаемого препарата от компонентов сред и белковых примесей, как это необходимо в случае микробиологического производства. При использовании рекомбинантного тауматина в пищевом производстве наличие незначительной примеси белков растения-продуцента вряд ли будет иметь существенное значение. Важно отметить, что современные подходы в области генетической инженерии растений позволяют получать цисгенные растения, т.е. растения, трансформированные только целевым геном, без генов устойчивости к селективным антибиотикам. Тем самым снимается одно из главных опасений потребителей перед генно-модифицированными растениями [296].

1.9. Грипп птиц. Разработка вакцин широкого спектра действия против вируса гриппа

Грипп - острое респираторное инфекционное заболевание дыхательных путей, вызываемое вирусом гриппа. Вирус гриппа поражает человека, различные виды млекопитающих и птиц. В настоящее время грипп птиц представляет особую опасность для птицеводства. Это связано, в первую очередь, с концентрацией производства на крупных птицефабриках. Вирус гриппа является легко мутирующим вирусом. Это ведёт к постоянному появлению новых патогенных штаммов, что позволяет вирусу преодолевать защиту иммунной системы хозяина. Заболевание характеризуется высокой летальностью и при неблагоприятных условиях может привести к полной гибели поголовья. Огромные экономические потери от вспышек гриппа птиц обусловлены необходимостью уничтожения всего поголовья на птицеводческих предприятиях. Так, например, вспышка гриппа птиц в США в конце 2024 – начале 2025 гг. привела к необходимости забоя 46 миллионов кур-несушек, что составляет 15% поголовья во всей стране [297]. Важно отметить, что вирус гриппа птиц не передается человеку напрямую от птиц и не циркулирует среди людей.

Главным природным резервуаром вируса гриппа птиц являются дикие птицы, в первую очередь, водоплавающие. Чаще всего переносчиком гриппа являются дикие утки, которые в отличие от домашних птиц относительно устойчивы к вирусу. Утки и гуси являются перелётными птицами и могут преодолевать огромные расстояния, тем самым чрезвычайно затрудняя борьбу с заболеванием. При этом эпидемиологический контроль популяций диких водоплавающих птиц представляется нереальным. Наиболее эффективным средством борьбы с вирусом гриппа птиц сейчас представляется вакцинация.

1.9.1. Организация генома вирусов гриппа типа А

Вирус гриппа относится к семейству *Orthomyxoviridae* и имеет сегментированный (-)РНК-геном. Цикл репликации вируса (Рисунок 5) включает следующие стадии: связывание вириона с сиаловыми кислотами клеточных рецепторов; поглощение вириона клеткой в составе «ранней» эндосомы; высвобождение генетического материала вируса в цитоплазму и его транспорт в ядро; репликация мРНК и синтез вирусных белков; сборка новых вирусных частиц на плазматической мембране клетки [298].

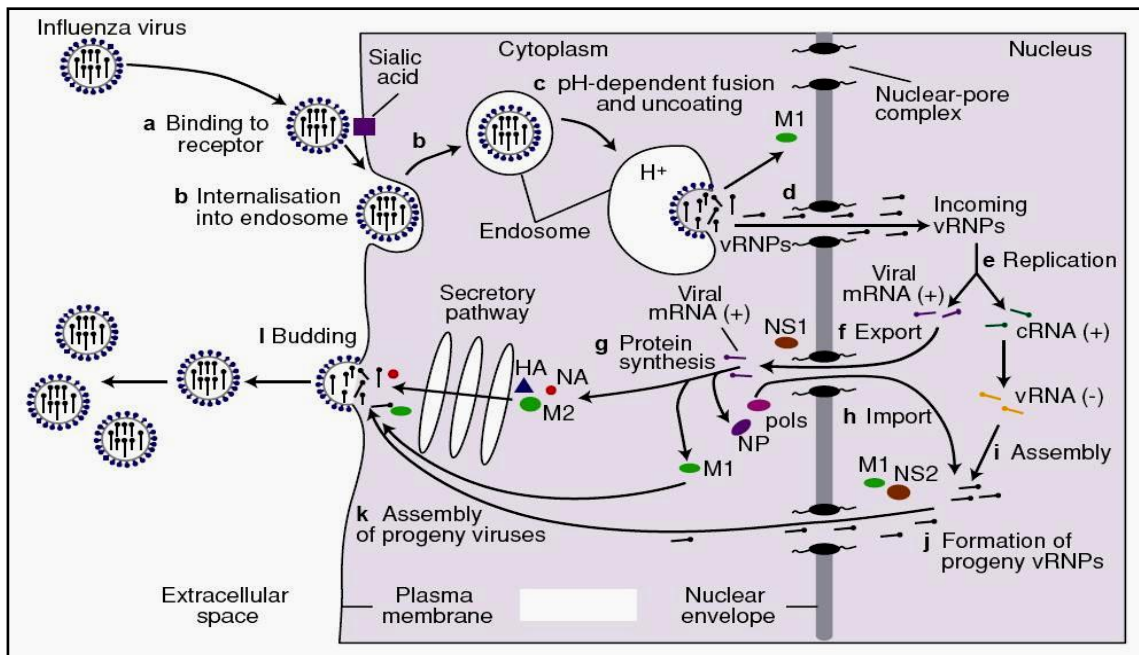


Рисунок 5 - Цикл репликации вируса гриппа [298].

Известно три типа вирусов гриппа - А, В и С. Геном вируса гриппа типа А кодирует 11 вирусных белков и включает 8 сегментов РНК (Таблица 11). В свою очередь типы делятся на подтипы, классификация которых основана на различиях

антигенных свойств гликопротеинов гемагглютинина (НА) и нейраминидазы (N), локализованных на поверхности вирусной частицы. Различают 16 подтипов гемагглютинина и 9 подтипов нейраминидазы [299].

Таблица 11 - Структура генома вируса гриппа типа А и функциональная роль вирусных белков в репликативном цикле вируса (по Книре и др. [299]).

Сегмент, длина, п.н.	Кодируемые белки	Функции белков
I, 2341	PВ2	Компонент транскриптазного комплекса: связывание 5'-концевых кэпов мРНК
II, 2341	PВ1; PВ1-F2	Компоненты транскриптазного комплекса: элонгация синтеза РНК
III, 2233	РА	Компонент транскриптазного комплекса: эндонуклеаза
IV, 1778	НА	Гемагглютинин: распознавание и связывание с рецептором. фьюзогенные пептиды НА2 формируют атакующий комплекс.
V, 1565	NP	Нуклеопротеин: основной компонент вирусного РНП, компонент транскриптазного комплекса, осуществляет контроль ядерно-цитоплазматического транспорта РНК
VI, 1413	NA	Нейраминидаза: отщепление остатков сиаловых кислот, освобождение вирусов от рецептора плазматических мембран, почкование.
VII, 1027	M1; M2	Обеспечивают процессы самосборки вирусных частиц и их почкование. Образуют ионный канал.
VIII, 890	NS1; NS2 (NEP)	Неструктурные белки: контролируют сплайсинг и полиаденилирование, и ядерно-цитоплазматический транспорт мРНК

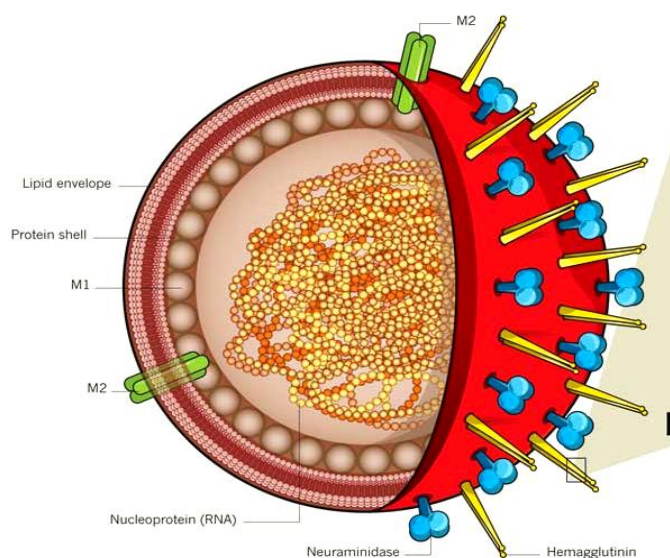


Рисунок 6 - Структура частицы вируса гриппа типа А.

Наиболее патогенными для птиц являются вирусы гриппа типа А с антигенной формулой H7N7 и H5N1. Помимо гемагглютинина и нейраминидазы, в состав оболочки вирусной частицы гриппа А входит белок М2, участвующий в репликативном цикле вируса (Рисунок 6). С точки зрения патогенности наибольший интерес представляют гемагглютинин, нейраминидаза, белки М2, NS1 и PB1-F2.

1.9.2. Белок М2 вируса гриппа

Белок М2 представляет собой мембранный белок, тетрамер, формирующий протонный канал в стенке капсида (Рисунок 6). Вирус попадает в клетку хозяина посредством эндоцитоза (Рисунок 5). В ходе инфекционного процесса происходит связывание вирионов с сиаловыми кислотами клеточных рецепторов клетки, формируется «ранняя» эндосома, которая интернализуется внутрь клетки. АТФ-зависимые протонные каналы мембраны эндосомы накачивают ионы H^+ из

цитозоля клетки хозяина в эндосому, в результате формируется «поздняя» эндосома. В ответ на закисление внутренней среды «поздней» эндосомы запускается транспорт ионов H^+ через протонный канал M2 внутрь вириона. Поступление протонов вызывает диссоциацию рибонуклеопротеинового комплекса, разборку вириона и высвобождение генетического материала вируса в цитоплазму клетки-хозяина. Инактивация протонного канала M2 полностью блокирует инфекционный процесс [299].

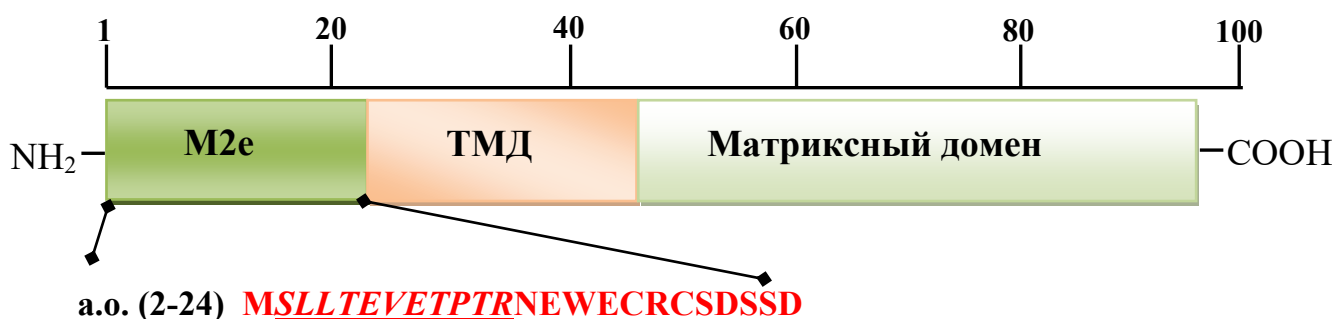


Рисунок 7 - Структура белка M2 вируса гриппа. Красным цветом показана аминокислотная последовательность пептида M2e. Подчеркнут антигенный эпитоп пептида M2e. ТМД - трансмембранный домен.

Белок M2 имеет длину 97 а.о. и включает N- концевой экстрамембранный фрагмент, называемый пептид M2e (а.о. 2 - 24.); трансмембранный участок (с 25 по 43 а.о.) и С- концевой фрагмент (с 44 по 97 а.о.), локализованный на внутренней стороне мембраны (Рисунок 7) [300]. С- концевой фрагмент M2 взаимодействует с матричным белком M1 и участвует в формировании вирусной частицы [301]. Трансмембранный участок включает четыре α -спирали и формирует пору протонного канала. Пептид M2e, N- концевой экстрамембранный домен, участвует во включении белка M2 в состав оболочки капсида [302].

Изучение последовательностей пептида M2e у различных штаммов вируса, выявило удивительную стабильность его антигенного эпитопа [303] (Рисунок 8). Последовательность пептида M2e остается почти неизменной с 1918 г., что делает

M2e перспективным объектом для создания «универсальной» противогриппозной вакцины [301,304].

	(1)	1	10	24
A/WS/1933	(1)	MSLLTEVETPTIRNEWGCR	NDSSD	
A/PR/8/1934	(1)	MSLLTEVETPTIRNEWGCR	NDSSD	
A/USSR/90/1977	(1)	MSLLTEVETPTIRNEWGCR	NDSSD	
A/Singapore/1/1957	(1)	MSLLTEVETPTIRNEWGCR	NDSSD	
A/Leningrad/134/1957	(1)	MSLLTEVETPTIRNEWGCR	NDSSD	
A/Bangkok/1/1979	(1)	MSLLTEVETPTIRNEWGCR	NDSSD	
A/Guangdong/39/1989	(1)	MSLLTEVETPTIRNEWGCR	NDSSD	
A/blow	(1)	MSLLTEVETPTRNEWECRC	SDSSD	
A/chicken/Hubei/327/2004(H5N1)	(1)	MSLLTEVETPTRNEWECRC	SDSSD	
A/chicken/Kurgan/3/2005(H5N1)	(1)	MSLLTEVETPTRNEWECRC	SDSSD	
A/domestic	(1)	MSLLTEVETPTRNEWECRC	SDSSD	
A/duck/Omsk/1822/2006(H5N1)	(1)	MSLLTEVETPTRNEWECRC	SDSSD	
A/pigeon/Rostov-on-Don/6/2007(H5N1)	(1)	MSLLTEVETPTRNEWECRC	SDSSD	
A/chicken/Nigeria/1071-30/2007(H5N1)	(1)	MSLLTEVETPTRNEWECRC	SDSSD	
A/chicken/Laos/37/2008(H5N1)	(1)	MSLLTEVETPTRNEWECRC	SDSSD	
A/chicken/India/WB-NIV92456/	(1)	MSLLTEVETPTRNEWECRC	SDSSD	
A/bean	(1)	MSLLTEVETPTRNEWECRC	SDSSD	
A/common	(1)	MSLLTEVETPTRNEWECRC	SDSSD	
Consensus	(1)	MSLLTEVETPTRNEWECRC	SDSSD	

Рисунок 8 - Аминокислотные последовательности пептида M2e в различных изолятах вируса гриппа типа А [303].

В исследовании Zharikova et al. (2005) были изолированы штаммы вируса гриппа типа А, мутантные по M2e [305]. Эти штаммы имели замены в первых 10 а.о., высококонсервативных для вируса гриппа. Мутантные по пептиду M2e штаммы оказались не патогенными, после 11-ти последовательных пассажей этими штаммами не удалось заразить иммунокомпетентных мышей. Это указывало на низкую вероятность антигенного дрейфа в белке M2. Предполагается, что использование вакцин на основе M2e не приведет к антигенному дрейфу в этом белке [306]. Консервативность пептида M2e может определяться его генетической связью с белком M1 - сегмент РНК, который кодирует первые 15 а.о. пептида M2e, кодирует в другой рамке считывания С-концевой участок белка M1. Следовательно, мутации в пептиде M2e белка M2 приведут к инактивации белка M1, важного для сборки вирусных частиц. Это, по-видимому, определяет консервативность пептида M2e. Возможно, также, что плохая доступность для антител ведёт к отсутствию антигенного дрейфа в пептиде M2e. В силу этих фактов пептид M2e сейчас считается перспективным

объектом для разработки противогриппозной вакцины широкого спектра действия.

1.9.3. Использование пептида M2e для создания противогриппозных вакцин

Впервые способность белка M2 обеспечивать защиту от гриппа была показана в 1988 г., позже было показано, что антитела к M2 могут защитить животных от прямого введения вируса [307,308]. К настоящему времени для разработки противогриппозных вакцин белок M2 не используется, используется только пептид M2e в силу его высокой консервативности [309]. Однако пептид M2e из-за малого размера плохо взаимодействует с иммунокомпетентными клетками, поэтому в крови переболевших гриппом людей антитела против M2e практически не детектируются. Пул анти-M2e антител у переболевших людей, как правило, очень низкий, часто они полностью отсутствуют [310,311].

Проблема низкой иммуногенности M2e была успешно решена путём слияния пептида M2e с различными адьювантными белками. В качестве таких белков были использованы ядерный белок вируса гепатита В [312], белок теплового шока *Mycobacterium tuberculosis* [309], флагеллин *S. typhimurium* [313], СТА1-DD (субъединица А холерного токсина, слитая с D-доменом белка А *Staphylococcus aureus*), субъединица В токсина холеры и другие. Слияние M2e с этими адьювантными белками существенно усиливали индукцию M2e - специфических антител.

При использовании пептида M2e как антигена протективный эффект иммунизации был слабым. Несмотря на индукцию специфических антител, в большинстве исследований наблюдалась только частичная защита животных при их заражении вирусом гриппа. Иммунизация M2e-содержащими вакцинами вела

к достоверному снижению смертности, но течение болезни оставалось тяжелым. В многочисленных экспериментах было показано, что индуцированные M2e-специфические антитела эффективно маркировали инфицированные клетки хозяина для фагоцитоза посредством NK-клеток или макрофагов через механизм антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (ACDD) [304]. Помимо этого, M2e-специфические антитела нарушали процесс почкования вирусных частиц, предотвращая, тем самым, их высвобождение из инфицированных клеток. Таким образом, вакцинация пептидом M2e, как правило, не предотвращала вирусную инфекцию, но эффективно подавляла репликацию вируса в организме хозяина и облегчала течение болезни [314]. В ходе исследований было предположено, что возможной причиной слабого протективного эффекта M2e-вакцин являются минорные различия в аминокислотной последовательности пептида M2e из различных штаммов вируса гриппа (Рисунок 9). Эта проблема была успешно решена путём экспрессии пептидов M2e из различных штаммов в одной экспрессионной платформе и последующей иммунизации животных различными вариантами M2e.

Другой возможной причиной слабого протективного действия M2e-вакцин является тот факт, что в вирусной частице пептид M2e представлен в виде тетрамерной структуры, а в рекомбинантных вакцинных белках - нет [315,316]. В ходе дальнейших исследований по разработке M2e-вакцин было показано, что большее значение для индукции иммунного ответа имеет скорее плотность презентирования пептидов M2e в антигенной молекуле или частице, чем наличие тетрамеро-подобных структур, включающих M2e. Это подтверждено многочисленными исследованиями по иммунизации вирусоподобными частицами, презентирующими на своей поверхности пептид M2e, (например, [317,318,319]) или разнообразными M2e – содержащими наночастицами [313,320, 321,322]. Иммунизация лабораторных животных вакцинами, разработанными на основе таких VLP или наночастиц, обеспечивала полную защиту иммунизированных животных от летальных доз вируса.

Для повышения плотности размещения молекул M2e можно использовать бактерии или фаги, локализуя пептид M2e на их поверхности. В экспериментах Layton и др. пептид M2e был слит с доменом CD154 внешнего мембранного белка LamB сальмонелл. Слитый белок M2e-CD154 экспрессировали в непатогенном штамме *Salmonella enteritidis*, пептид M2e был локализован на поверхности бактериальных клеток. Полученным штаммом была проведена оральная иммунизация цыплят. У иммунизированных цыплят наблюдалась индукция анти-M2e IgG, иммунизированные цыплята показали частичную устойчивость к летальным дозам вируса гриппа H5N1 и H7N2 [323].

Защита иммунизированных животных от летальных доз вируса H1N1 была получена в экспериментах Najam и Lee [324]. В этом исследовании экспрессировали M2e и гемагглютинин I в непатогенном штамме *S. typhimurium* JOL1800. Оральная иммунизация животных обеспечивала защиту 67% инфицированных мышей, а интрамышечная и интраперитонеальная – всех подопытных животных. В исследовании [325] пептид M2e (а.о. 2-16) был экспрессирован в слиянии с белком оболочки рVIII нитчатого бактериофага f88. В полученных рекомбинантных фагах f88-M2e2-16 пептид M2e находился на поверхности фаговых частиц. Иммунизация мышей такими фагами вела к мощной индукции анти-M2e IgG и обеспечивала защиту животных от летальных доз вирусов гриппа H1N1 и H3N2 [325].

В результате многочисленных исследований неоднократно была показана возможность использования пептида M2e для разработки противогриппозных вакцин широкого спектра действия [326,327,328]. Некоторые из них проходят различные этапы клинических испытаний (Таблица 12). Исследования в области создания M2e-вакцин в настоящее время активно ведутся во всем мире, как в научных учреждениях, так и фармацевтическими компаниями.

Таблица 12 - Некоторые примеры исследований по разработке вакцин против гриппа на основе пептида M2e.

Вакцина	Антиген, адъювант	Фаза испытаний	Ссылка
VaxInnate (USA)	Слитый белок M2e-бактериальный флагеллин (TLR5 ligand). Само-адъювантный. Для использования в составе тривалентной вакцины против гриппа (TIV).	Фаза II	[329]
SEEK (ранее PepTcell) (UK)	Flu-V: смесь из четырёх синтетических пептидов; консервативные Т-клеточные эпитопы, присутствующие в составе белков M1, NP и M2. Водно-маслянный адъювант.	Фаза II	[330]
Acambis Inc. (в настоящее время Sanofi) (France)	АСАМ-FLU-А: слитый белок M2e-коровый протеин вируса гепатита В (M2e-НВс). VLP, презентующие пептид M2e.	Фаза I	[331]
Dynavax (USA)	Слитый белок, состоящий из высококонсервативных антигенов NP и M2e, ковалентно присоединенных к патентованной иммуностимуляторной последовательности.	Фаза I	http://investors.dynavax.com
Cytos Biotechnology (Switzerland)	Белок M2, сшитый с лигандом TLR7, высокий выход антител IgG2c.	Фаза I	[332]
Research Institute of Influenza, Russian Federation	Слитый белок, включающий пептид M2e, консервативный регион субъединицы 2 гемагглютинаина и искусственный самособирающийся пептид (SAP).	Фаза I	[333]
University of Ghent (Vlaams Instituut voor Biotechnologie VIB) (Belgium)	Рекомбинантный тетрамерный белок M2e-tGCN4 (модифицированная форма лейциновой молнии дрожжевого фактора транскрипции GCN4, сшитой с M2e).	Преคลินิกеские	[331]
Merck Research Laboratories (USA)	Синтетический пептид M2e, конъюгированный с KLN или внешним мембранным комплексом <i>Neisseria meningitides</i> .	Пре Klinikеские	[334]
Wistar Institute (USA)	Слитый белок M2e и NP, экспрессируется в аденовирусном векторе.	Пре Klinikеские	[335]
Georgia State University (USA)	Пептид M2e, экспрессированный в составе VLP.	Пре Klinikеские	[336]

1.9.4. Экспрессия пептида M2e вируса гриппа в растительных системах

К настоящему времени имеется ряд исследований по экспрессии пептида M2e в растениях. В этих работах M2e экспрессировался в различных транзientных вирусных векторах, чаще всего на основе вируса X картофеля (Таблица 13). Это было обусловлено, в том числе, возможностью презентации пептида M2e (или его эпитопа) на поверхности VLP. В исследовании Mbewana и др пептид M2e экспрессировался в слиянии с N- концом пролин-богатого домена γ - зеина кукурузы (Zera) с помощью метода агроинфильтрации [337]. Накопление M2e в составе слитого белка Zera-M2e доходило до 200 мкг/г сырой массы листьев [337]. В различных экспериментах накопление рекомбинантного белка сильно варьировало: от 6 - 8 мкг слитого белка CP CMV-M2e до 3 мг AltMV-M2e в 1 г сырой массы листьев [338,339]. В целом, накопление пептида M2e в этих экспериментах было относительно низким.

Пептид M2e в составе VLP [340] или слитого белка [341] обеспечивал неполную защиту мышей от заражения вирусом гриппа. В исследованиях Meshcheryakova и др. [340] и Mbewana и др. [337] наблюдалась индукция анти-M2e антител в сыворотке иммунизированных мышей.

Равин и др. (2012) для экспрессии пептида M2e использовали вирусный вектор на основе вируса X картофеля. Пептид M2e был слит с коровым антигеном вируса гепатита В (HBc) [342]. Полученные в *N. benthamiana* VLP использовали для иммунизации лабораторных мышей. Было показано, что слитый белок M2e-HBc в составе вирусоподобных частиц обладал достаточной иммуногенностью и обеспечивал защиту мышей от летальных доз вируса.

Таблица 13 - Получение пептида M2e в растительных системах.

Экспрессионная система	Антиген	Выход антигена	Эффективность	Ссылка
Вектор на основе вируса X картофеля (PVX). <i>Nicotiana benthaminana</i> .	Пептид M2e, интегрированный во внутренний мотив 5 белка оболочки вируса мозаики огурца (CP CMV).	6-8 мкг химерного белка CP CMV-M2e/г сырой массы листьев (около 0,1% ОРБ).	Не изучалось	[338]
Вирус мозаики вигны (CPMV). Агроинфильтрация. Вигна (<i>Vigna unguiculata</i>).	Протеин S оболочки CPMV со вставкой эпитопов M2e вирусов гриппа птиц и человека.	Выход рекомбинантных вирусных частиц 15-33 µg/г зелёной массы.	Индукция анти- M2e IgG. Частичная защита мышей от низких доз вируса гриппа.	[340]
Гибридный вирусный вектор (геном PVX, белок оболочки - <i>Alternanthera mosaic virus</i> , AltMV). <i>Nicotiana benthaminana</i> , листья.	Пептид M2e, слитый с белком оболочки AltMV.	1 - 3 мг AltMV-M2 в 1 г сырой массы листьев. Образование химерных VLP.	Не изучалось	[339]
Вектор на основе вируса X картофеля (PVX). <i>Nicotiana benthaminana</i> , листья.	Пептид M2e, слитый с ядерным антигеном вируса гепатита В.	1 - 2% M2e-НВс от ОРБ в листьях.	Защита иммунизированных мышей от летальных доз вируса гриппа.	[342]
Вирус табачной мозаики (TMV). <i>Nicotiana benthaminana</i> , листья	Эпитоп пептида M2e, слитый с белком оболочки TMV.	1,5-2,2 мг TMV-M2e VLP на 1 г сырой массы листьев	Не изучалось	[343]
<i>Nicotiana benthaminana</i> . Агроинфильтрация, листья	Пептид M2e, слитый с N- концом пролин богатого домена γ- зеина кукурузы (Zera®M2e).	125–205 мг Zera®M2e/кг сырой массы листьев.	Индукция анти- M2e IgG в сыворотке иммунизированных мышей.	[337]
Самореплицирующийся вектор на основе вируса X картофеля (PVX). <i>Nicotiana benthaminana</i> , листья.	F1g-4M (четыре тандемные копии пептида M2e, слитые с флагеллином F1jB <i>Salmonella typhimurium</i>).	~ 1 мг/г сырой массы листьев	Интраназальная иммунизация. Индукция высокого титра анти-M2e IgG. Снижение титра вируса в лёгких после заражения.	[341]

Таким образом, в ранее проведенных исследованиях показана возможность экспрессии пептида M2e в растениях, подтверждена его иммуногенность и способность обеспечивать защиту животных от гриппозной инфекции. Однако возможность экспрессии M2e в стабильно трансформированных растениях пока не изучалась. С учетом того факта, что последовательность пептида M2e высококонсервативна и практически не изменилась с 1918 года, его экспрессия в стабильно трансформированных растениях представляет несомненный интерес для разработки противогриппозных вакцин широкого спектра действия. В частности, экспрессия M2e в стабильно трансформированных растениях не требует сложных и затратных в обслуживании комплексов для агроинfiltrации, необходимых для использования транзистентных систем.

1.9.5. Адьюванты для антигенов, полученных в растительных системах

Так как пептид M2e характеризуется слабой иммуногенностью, для получения достаточного иммунного ответа при разработке M2e-вакцин необходимо использование адьювантов - компонентов, усиливающих иммунный ответ. К настоящему времени известно множество различных адьювантов, исследования в области их разработки и изучения механизмов действия активно ведутся и сейчас. Более детально исследования в этой области рассматриваются в обзорах [344,345,346].

К адьювантам, предназначенным для использования вместе с оральными вакцинами, предъявляется ряд особых требований, в частности, необходима повышенная стабильность в условиях желудочно-кишечного тракта (устойчивость к действию протеолитических ферментов, pH среды и др.). Этим требованиям удовлетворяет ряд адьювантных белков бактериального и вирусного происхождения.

Наиболее часто используемыми адъювантами в исследованиях по разработке вакцин на основе растительных экспрессионных систем являются субъединицы В токсина холеры (СТВ) и термолабильного токсина *E. coli* (ЛТВ), антигены вируса гепатита В – поверхностный (НВsАg) и ядерный (НВс), СТА1-DD (химерный белок, состоящий из ADP-рибозилирующей субъединицы А1 токсина холеры, слитой с двумя тандемными копиями D-домена белка А *Staphylococcus aureus* [347]). При этом необходимо отметить, что в большинстве исследований НВsАg и НВс демонстрируют невысокий уровень экспрессии в растениях (по крайней мере, в ядерно-трансформированных). Адъюванты ЛТВ, СТВ и СТА1-DD экспрессируются в растениях, как правило, на достаточно высоком уровне и обладают мощным адъювантным эффектом, это обуславливает их широкое использование при разработке растительных вакцин.

В исследованиях по разработке вакцин на основе пептида М2е были использованы такие адъювантные белки, как бактериальный флагеллин [329], коровий протеин вируса гепатита В НВс [331], белки внешнего мембранного комплекса *Neisseria meningitides* [334], СТА1-DD [348]. Пептид М2е в растениях экспрессировался в слиянии с НВс [342] или флагеллином FljВ *Salmonella typhimurium* [341]. Экспрессия М2е в слиянии с другими адъювантными белками в растениях не изучалась.

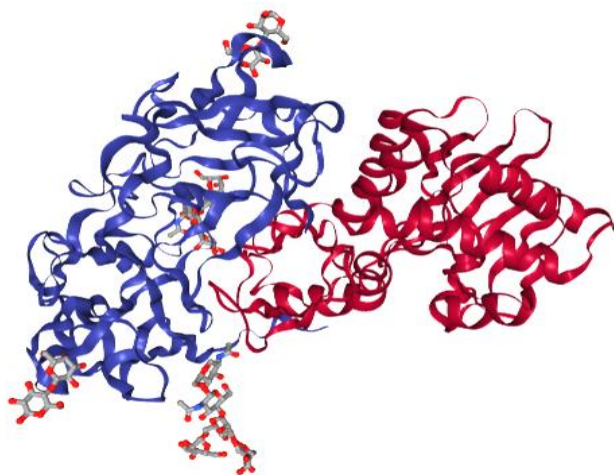


Рисунок 9 - Структура рицина из клещевины *Ricinus communis*. Субъединица А рицина показана красным, субъединица В - синим. Субъединица В (РТВ) имеет длину 262 а.о., содержит 4 дисульфидные связи и 2 сайта гликозилирования.

Перспективным адъювантом для экспрессии в растениях является субъединица В рицина. Рицин представляет собой гликопротеин, он состоит из субъединиц А и В, соединенных одним дисульфидным мостиком (Рисунок 9). Субъединица В рицина (RTB) нетоксична, она обладает способностью связываться со специфическими рецепторами клеточных мембран с образованием трансмембранного канала [349].

Адъювантный эффект RTB сходен с адъювантным эффектом субъединицы В холерного токсина. При скармливании мышам растений, накапливающих слитый белок GFP-RTB, в их крови детектировалось существенно больше анти-GFP иммуноглобулинов, чем в случае иммунизации одним GFP [350]. Адъювантные свойства RTB были неоднократно подтверждены, в частности, в экспериментах по её слиянию с белком NSP4 ротавируса [351], белками V и F1 *Y. pestis* [352], белком p24 оболочки ВИЧ [353] и др. Кроме того, RTB оказывает положительный эффект на иммуномодулирующую активность антигенов через дополнительную активацию Т-лимфоцитов и макрофагов [354].

1.10. Гирудин. Структура и свойства

Гирудин- натуральный антикоагулянт, который предотвращает свертывание крови путём ингибирования тромбина и воздействия на некоторые другие факторы свёртывания крови. Он представляет собой не гликозилированный пептид, длиной 65 а.о., стабилизированный тремя дисульфидными связями, тирозин в положении 63 сульфатирован. Впервые гирудин был выделен из слюны пиявки *Hirudo medicinalis*, в настоящее время известно не менее 20 изоформ гирудина, все они обладают антикоагулянтной активностью [355]. Гирудин является секретлируемым пептидом, который накапливается в клетках слюнных желез *H. Medicinalis* [356]. Гирудин экспрессируется в форме предшественника

длиной 85 а.о., и включает отщепляемый N- концевой сигнальный пептид. Гирудин устойчив к воздействию повышенных температур и денатурантов, характеризуется стабильностью в широком диапазоне рН (1,47-12,9) [357]. Гирудин, также, демонстрирует свойства ингибитора сериновых протеиназ [358].

Гирудин является наиболее эффективным природным ингибитором тромбина. Механизм антикоагулянтного действия гирудина к настоящему времени подробно изучен. Гирудин - один из немногочисленных препаратов, которые могут быть использованы для эффективной профилактики и лечения внутрисосудистого диссеминированного свертывания крови, вызванного избытком тромбина в крови. Препараты гирудина используются как противотромботическое средство при инфаркте миокарда, тромбозах глубоких вен нижних конечностей и др. [359]. Кроме того, гирудин является лучшим альтернативным антикоагулянтом для пациентов с гепарин-индуцированной тромбоцитопенией [360]. Практическая значимость гирудина обусловила особый интерес к разработке методов получения его рекомбинантных аналогов.

1.10.1. Экспрессионные системы для получения рекомбинантного гирудина

Большая практическая значимость гирудина для медицинской практики и ограниченность природных источников (выход гирудина из пиявок составляет около 20 мкг/пиявка [361]) обусловила интерес к разработке биотехнологических методов получения гирудина. Впервые рекомбинантный гирудин был получен в *E. coli*, в этих экспериментах была подтверждена его антитромбиновая активность [362,363]. Дальнейшие усилия были направлены на увеличение уровня экспрессии рекомбинантного гирудина и обеспечение его эффективной секреции в культуральную среду, совершенствование способов выделения и очистки. В

результате на основе *E. coli* были разработаны экспрессионные системы, обеспечивающие накопление рекомбинантного гирудина в культуральной среде [364] или в составе телец включения [365]. Кроме того, были предприняты попытки получения рекомбинантного гирудина в других бактериях-продуцентах, в частности, в *Bacillus subtilis* [366].

Основным недостатком этих систем является необходимость дополнительного этапа ренатурации рекомбинантного гирудина с образованием трёх дисульфидных связей, что усложняет его производство и очистку. В связи с этим были разработаны системы для получения гирудина на основе дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. В первых экспериментах уровень накопления рекомбинантного гирудина был невысок, но полученный белок характеризовался высокой удельной активностью [367]. Дальнейшие исследования привели к существенному увеличению уровня накопления рекомбинантного гирудина в культуральной среде - до уровня более 20 мг рекомбинантного гирудина в 1л среды. На основе полученных в этих исследованиях результатов была разработана экспрессионная система с использованием *S. cerevisiae* для производства рекомбинантного гирудина терапевтического назначения (препарат Refludan, Bayer, Германия). Экспрессионные системы для получения гирудина разрабатывались, также, на основе метилотрофных дрожжей видов *Pichia pastoris* [368] и *Hansenula polymorpha* [369]; нитчатого гриба *Acremonium chrysogenum* [370]; с использованием бакуловиральной системы экспрессии [371] и в трансгенных животных [372]. Однако заметного успеха эти исследования не имели.

Необходимо отметить, что рекомбинантный гирудин, полученный в описанных выше системах, не полностью идентичен природному. Связано это с тем, в молекуле гирудина, полученного в бактериальных и дрожжевых системах, тирозин в положении 63 не сульфатирован. Как следствие, антитромбиновая активность рекомбинантного гирудина приблизительно в 2 раза ниже активности гирудина из природных источников [373]. Хотя это не является препятствием для

использования гирудина в медицинской практике, несulfатированный гирудин необходимо применять в больших дозах, чем sulfатированный, что может вести к нежелательным побочным эффектам. В связи с этим был разработан метод энзиматической конверсии рекомбинантного гирудина в натуральную форму посредством энзиматического sulfатирования тирозина 63 *in vitro* [374]. Рекомбинантный гирудин был экспрессирован в дрожжах *S. cerevisiae*. Затем, с использованием тирозил протеин sulfотрансферазы быка или пиявки, проводилась *in vitro* реакция sulfатирования. Полученный гирудин был sulfатирован и по своим биохимическим свойствам был полностью идентичен природному. В этом исследовании ключевые ферменты - тирозил протеин sulfотрансферазы- были выделены из природных источников (слюнных желез пиявки или надпочечников быка) [374]. В похожем исследовании Muramatsu и др. (1994) тирозил протеин sulfотрансфераза была выделена из бактерии *Eubacterium* A-44, обитающей в кишечнике человека [375]. Несмотря на очевидную перспективность, исследования по конверсии рекомбинантного гирудина не получили дальнейшего развития, главным образом, в связи со сложностью получения тирозил протеин sulfотрансферазы.

Система для производства гирудина в растениях впервые была разработана Parmenter с соавторами в 1995 г. [376]. В исследовании был использован рапс масличный (*Brassica napus*), гирудин экспрессировался в слиянии с олеозином. Слитый белок гирудин-олеозин транспортировался в масляные тельца, где и накапливался. Накопление белка гирудин-олеозин достигало 1% ОРБ семян, что соответствовало 0,3% гирудина. Выделение слитого белка осуществлялось посредством процедуры флотации и последующего центрифугирования. Антитромбиновая активность гирудина детектировалась только после отщепления олеозина, с этой целью проводилось протеолитическое расщепление очищенного белка гирудин-олеозин с помощью фактора Ха или кластрипана. Далее рекомбинантный гирудин очищали с помощью анионо-обменной и обратно-фазовой хроматографии. Аналогичное исследование по экспрессии

гирудина в слиянии с олеозином было выполнено Chaudhary и др. (1998) с использованием горчицы эфиопской *Brassica carinata* [377]. Проприетарная система для получения гирудина в сафлоре (*Carthamus tinctorius*), также базирующаяся на экспрессии слитого белка гирудин-олеозин, была разработана компанией Sembiosys Genetics (Канада) [378]. Таким образом, растительные экспрессионные системы, при условии их дальнейшего совершенствования, могут составить альтернативу традиционным бактериальным и дрожжевым системам.

Как уже было отмечено выше, рекомбинантный гирудин, полученный в бактериальных и дрожжевых системах, является не сульфатированным (63-десульфатогирудин). Вместе с тем, тирозин-сульфатирование протеинов и активность тирозил протеин сульфотрансферазы были достаточно давно описаны у низших растений, включая зелёные водоросли и вольвокс *Volvox carteri* [379]. В 2009 году тирозил протеин сульфотрансфераза была идентифицирована в растениях арабидопсиса и её кДНК была клонирована [379,380]. К настоящему времени показано, что сульфатирование тирозина является довольно распространённым у растений, в частности, ряд белковых гормонов растений являются сульфатированными [381]. Активность тирозил протеин сульфотрансферазы была обнаружена в растениях многих видов, в том числе в рисе, моркови, томатах и др., что косвенно указывает на распространённость сульфатирования тирозина в царстве растений [382, 383]. Это открывает возможность получения в растениях рекомбинантных белков, в том числе гирудина, содержащих сульфатированные остатки тирозина, однако в этом направлении требуется проведение дальнейших исследований.

1.11. Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор человека

1.11.1. Структура, функции и использование гранулоцитарного колониестимулирующего фактора

Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (ГКСФ) человека является представителем обширного семейства цитокинов. Функционально ГКСФ представляет собой колониестимулирующий фактор, стимулирующий в культуре клеток формирование колоний гранулоцитов. ГКСФ стимулирует пролиферацию и дифференцировку поздних клеток-предшественников в гранулоциты. В организме человека ГКСФ стимулирует клетки костного мозга к образованию гранулоцитов и некоторых видов стволовых клеток с последующим их высвобождением в кровяной поток [384].

Природный ГКСФ является кислым гликопротеином и содержит два дисульфидных мостика. В положении Thr166 белок O- гликозилирован. ГКСФ представлен двумя формами: тип А состоит из 177 а.о., тип В, более активный и представляющий собой основную форму, - из 174 а.о. Молекулярная масса последнего составляет 19,6 кД [385]. Минорным продуктом альтернативного сплайсинга мРНК является X-форма ГКСФ, отличающаяся дополнительной вставкой последовательности из 3 а.о. (Val-Ser-Glu) между Leu35 и Cys36 [386].

ГКСФ человека был впервые выделен из опухолевых клеточных линий, продуцирующих этот фактор конститутивно [387]. В 1986 году кДНК ГКСФ человека была успешно клонирована и экспрессирована в бактериальной системе [388] и в культуре клеток карциномы человека [386]. Эти успехи позволили определить аминокислотную последовательность ГКСФ и получить рекомбинантный белок в количествах, достаточных для исследовательских целей.

К настоящему времени ГКСФ подробно изучен, детально исследованы как его физико - химические и биохимические свойства, так и роль в организме человека.

ГКСФ крайне важен для индукции пролиферации и дифференцировки общих миелоидных клеток-предшественников в зрелые гранулоциты. В норме в плазме крови человека содержится около 10 пкг/мл эндогенного ГКСФ, в случаях инфекционных процессов и нейтропении его концентрация может достигать 100 пкг/мл [389,390]. В настоящее время на основе рекомбинантного Г-КСФ человека разработан ряд эффективных терапевтических средств. Рекомбинантный ГКСФ широко применяется при целом ряде заболеваний, сопровождающихся миелосупрессией и инфекционными осложнениями, как например при химио- и радиотерапии рака, СПИДе, тяжелой хронической нейтропении, остром миелолейкозе, апластической анемии и др. [390,391].

В клинической практике сейчас используются препараты рекомбинантного ГКСФ, полученные с использованием экспрессионных систем на основе клеток *E. coli* (препарат Филграстим, одобрен в 1991г., разработан Amgen Inc., США), или в системе клеток СНО (Ленограстим, одобрен в 1991г., разработан Chugai Pharmaceutical Co., Япония). Филграстим представляет собой белок длиной 175 а.о. с молекулярной массой 18,8 кДа. Аминокислотная последовательность филграстима идентична ГКСФ человека за исключением дополнительного остатка метионина на N-конце. Рекомбинантный белок не гликозилирован, содержит 5 остатков цистеина, которые образуют 2 дисульфидных мостика, как у нативного ГКСФ. Ленограстим в большей степени идентичен ГКСФ человека, поскольку его молекула O- гликозилирована.

Результаты сравнительных исследований биологических и физико-химических свойств гликозилированного и не гликозилированного рекомбинантного ГКСФ (ленограстима и филграстима, соответственно) показали, что углеводная цепочка не влияет на связывание со специфическим рецептором и на биологические функции [389,392]. В тоже время углеводный остаток значительно повышал стабильность молекулы рекомбинантного ГКСФ, защищая

сульфгидрильную группу цистеина 17 и предотвращая полимеризацию и изменения конформации белка [393,394,395]. Активность гликозилированного препарата *in vitro* была на 25% выше, чем у не гликозилированного; по-видимому, это было обусловлено возрастанием периода полужизни ГКСФ в культуральной среде [393,396]. В настоящее время производятся, главным образом, препараты на основе негликозилированного ГКСФ, полученного в *E. coli*. Препарат с использованием гликозилированного ГКСФ, полученного в клетках СНО (Granocyte), производит только компания Chugai Pharmaceuticals (Япония) [392].

1.11.2. Экспрессия рекомбинантного ГКСФ в гетерологичных системах

Впервые рекомбинантный ГКСФ человека был получен в 1986 году - Souza и др. в *E. coli*, и Nagata и др. в культуре клеток карциномы человека [386,388]. С тех пор были проведены обширные исследования по разработке методов получения рекомбинантного ГКСФ, позволившие, в итоге, разработать технологии его индустриального производства.

Основные усилия были направлены на разработку экспрессионных систем на основе бактерий *E. coli*. Использование этих систем обеспечивает высокую экспрессию ГКСФ – более 30,0 г/л среды, при этом ГКСФ экспрессируется, в основном, в составе телец включения. Это подразумевает необходимость последующих этапов солюбилизации телец включения и рефолдинга ГКСФ. На этих этапах происходит существенное снижение выхода активного ГКСФ [397]. Экспрессия ГКСФ в растворимой форме в *E. coli* обеспечивала более низкие выходы – около 90 мг/л среды [398].

Рекомбинантный ГКСФ человека был успешно экспрессирован в дрожжах *Pichia pastoris* и нитчатом грибе *Aspergillus niger*, хотя исследования в этом направлении до сих пор немногочисленны. В дрожжах *P. pastoris* ГКСФ был

экспрессирован в слиянии сывороточным альбумином человека (HSA), аккумуляция слитого белка HSA-ГКСФ варьировала в диапазоне 110-380 мг слитого белка/л среды [399]. В системе на основе *A. niger* ГКСФ экспрессировался на уровне 5–10 мг/л ферментационной среды, при этом до 90% рекомбинантного белка были неактивны. Биологическая активность ГКСФ возрастала до 65% после дополнительных этапов денатурации/ренатурации [400]. Таким образом, судя по имеющимся данным, экспрессия ГКСФ в грибах не продемонстрировала видимых преимуществ перед бактериальными экспрессионными системами.

Несмотря на то, что впервые рекомбинантный ГКСФ был получен в культуре клеток млекопитающих еще в 1986 году, имеется очень мало литературных данных об исследованиях в этой области [401,402]. Тем не менее, препарат на основе гликозилированной формы ГКСФ, полученной в культуре клеток СНО (Ленограстим), был разрешен к применению в Европе и Японии уже в 1993г [392].

Рекомбинантный ГКСФ человека был успешно получен в молоке трансгенных коз [403]. ГКСФ накапливался в молоке на уровне до 50 мг ГКСФ/л, показано его О-гликозилирование. Специфическая активность рекомбинантного ГКСФ была равна активности препарата ГКСФ, полученного в культуре клеток СНО [403]. Однако дальнейшего развития исследования в области экспрессии ГКСФ в трансгенных животных пока не имели.

Исследования в области разработки растительных экспрессионных платформ для получения рекомбинантного ГКСФ человека стали развиваться в течение последних 9-10 лет и до сих пор носят единичный характер. В исследованиях были использованы различные подходы - получение ядерно - трансформированных растений, трансформация хлоропластов, транзистная экспрессия (Таблица 14).

Таблица 14 - Получение рекомбинантного ГКСФ в растительных экспрессионных системах.

Система экспрессии	Вектор	Уровень экспрессии ГКСФ	Биологическая активность	Особенности	Ссылка
Салат (<i>Lactuca sativa</i>)	Вектор pCL, под контролем промотора prrn16S и терминатора TpsbA	Показана экспрессия рекомбинантного ГКСФ.	Не тестировалась	Экспрессия ГКСФ в хлоропластах транспластомных растениях	[405]
<i>Nicotiana benthamiana</i>	Вектор для транзientной экспрессии на основе вируса кустистой карликовости томатов (ВККТ)	До 250 мг ГКСФ/кг сырой массы листьев.	Не тестировалась	Показана транзientная экспрессии ГКСФ.	[407]
<i>Nicotiana tabacum</i>	Вектор pBI121, промотор 35S CaMV	Не определяли	Не тестировалась	Показана экспрессии ГКСФ в ядерно - трансформированных растениях.	[406]
<i>Nicotiana tabacum</i>	Вектор pBI121, промотор 35S CaMV, N- концевой сигнальный пептид фазеолина	В листьях - 2,5 мг ГКСФ/г ОРБ; в семенах - 1.3 мг ГКСФ/г ОРБ	Показана специфическая активность, равная активности коммерческого препарата ГКСФ	Экспрессии ГКСФ в ядерно - трансформированных растениях. ГКСФ экспрессировали в слиянии с убиквитином табака, который отщеплялся в клетках растений.	[404]
<i>Nicotiana benthamiana</i>	Вектора pGWB 641 (ГКСФ слит с eYFP) и pGWB 617 (с c-Myc) под контролем промотора 35S CaMV, N- концевой сигнальный пептид ГКСФ	До 140 мг ГКСФ/кг сырой массы листьев (в слиянии с eYFP)	Не тестировалась. Показано GalNAc-O-гликозилирование, характерное для млекопитающих.	Транзientная экспрессия методом агроинfiltrации. Одновременно с целевым геном транзientно экспрессировали гены пути O- гликозилирования	[408]

35S CaMV - промотор 35S вируса мозаики цветной капусты.

В исследовании Tian and Sun (2011) ГКСФ был экспрессирован в ядерно - трансформированных растениях табака *N. tabacum* [404]. ГКСФ экспрессировали в слиянии с убиквитином табака, который отщеплялся в клетках растений. Накопление ГКСФ достигало в листьях 2,5 мг/г ОРБ, в семенах – 1,3 мг/г (0,25 и 0,13% от ОРБ, соответственно). Рекомбинантный ГКСФ секретировался в апопластное пространство в листьях; в семенах ГКСФ накапливался в запасующих вакуолях. Пролиферационная проба с использованием клеточной линии NFS-60 мышинных миелобластов продемонстрировала специфическую активность, равную активности коммерческого препарата ГКСФ. Экспрессия ГКСФ в ядерно - трансформированных растениях табака *N. tabacum* была показана также Tabar и др. [405]. В 2013г. были получены транспластомные растения салата *Lactuca sativa*, трансформированные геном ГКСФ [406]. В исследовании показана экспрессия рекомбинантного ГКСФ, однако не сообщается об уровне его накопления и биологической активности.

В исследовании Абеуова и др. (2015) была использована транзистная экспрессионная система с использованием самореплицирующегося вектора на основе вируса кустистой карликовости томатов (ВККТ) [407]. Показана экспрессии ГКСФ на уровне до 250 мг/кг сырой массы листьев табака *Nicotiana benthamiana*. Биологическая активность полученного ГКСФ не изучалась.

Метод агроинфильтрации был использован в интересном исследовании Ramírez-Alanis и др. [408]. Одновременно с целевым геном ГКСФ транзистно экспрессировали гены биохимического пути *O*- гликозилирования: UDPGlcNAc-4 эпимеразу из *Y. enterocolitica*, транспортер UDPGlcNAc/UDPGalNAc (*C. elegans*) и GalNAc трансферазу 2 человека. ГКСФ в этом исследовании экспрессировали в слиянии с белком eYFP или с последовательностью с-Мус. Аккумуляция ГКСФ, слитого с eYFP, в растениях *N. benthamiana* достигала 140 мг/кг сырой массы листьев. Активность рекомбинантного ГКСФ не изучалась, но было показано наличие в полученном ГКСФ GalNAc-*O*- гликозилирования, характерного для млекопитающих.

Заключение по обзору литературы

Проведённый нами анализ литературных источников показал актуальность исследований в области разработки методов получения рекомбинантных белков различного функционального назначения в растениях. Благодаря возможности снижения себестоимости рекомбинантных белков их производство в трансгенных растениях (биофарминг) становится все более актуальным направлением в современной биотехнологии. В эти исследования вовлекаются все больше научных подразделений и фирм, созданных как на базе научно-исследовательских учреждений, так и самостоятельных организаций.

Исходя из литературных данных, производство рекомбинантных белков в растениях сейчас особенно выгодно для небольших молодых инновационных компаний, выходящих на рынок с каким-либо новым продуктом. Видимо, поэтому, из крупных компаний на рынке биофарминга присутствуют пока только Sigma-Aldrich, Pfizer и Syngenta AG, которые работают в этой области совместно с небольшими инновационными компаниями. Главными участниками рынка в настоящее время являются многочисленные, относительно небольшие компании и стартапы, такие как, например, ProdiGene (США), Infinite Enzymes (США), Ventria Bioscience (США), Natural Bio-Materials (Южная Корея), Protalix (Израиль), Medicago (Канада) и многие другие.

Основные усилия в области биофарминга сосредоточены сейчас на разработке методов получения в растениях различных антител, терапевтических и вакцинных белков, эти исследования составляют, примерно, 3/4 от всех проводимых исследований в этой области. Важность разработки методов получения этих классов белков связана, в первую очередь, с необходимостью их постоянного и стабильного производства в значительных количествах и относительно высокой себестоимостью при использовании традиционных экспрессионных систем. Кроме того, в связи с глобальными тенденциями на

оптимизацию затрат на здравоохранение, актуальным делается максимальное снижение стоимости препаратов на основе рекомбинантных белков для обеспечения их доступности широким кругам населения.

Данные об экономической эффективности производства рекомбинантных белков в растительных экспрессионных системах весьма ограничены и носят, в подавляющем большинстве исследований, расчетный характер. Её величина зависит от многих факторов, в частности, от уровня накопления целевого белка в растениях-продуцентах и легкости его выделения и очистки. В случае антител, учитывая необходимость высокой степени очистки для фармацевтических применений, снижение их себестоимости при использовании растительных систем оценивается в 30-40% по сравнению с их себестоимостью в культуре гибридом. В случае производства индустриальных ферментов, не требующих высокой очистки, снижение их себестоимости при использовании растительных систем может быть много большим.

Существенной проблемой при производстве рекомбинантных белков в растительных системах является их очистка от белков растения-продуцента и от примесей небелковой природы. Это указывает на необходимость совершенствования растений-продуцентов как экспрессионных платформ, в частности, в направлении снижения количества метаболитов, затрудняющих очистку целевых белков, что может быть достигнуто методами метаболической инженерии.

В настоящее время получение рекомбинантных белков в растениях возможно с использованием двух подходов – на основе ядерно-трансформированных растений или на основе транзientной экспрессии. В случае использования транзientных систем нет необходимости получения стабильно трансформированных растений, поэтому производство целевого белка может быть начато быстрее, что существенно, например, при производстве вакцин. Анализ литературных данных свидетельствует, что накопление рекомбинантных белков в транзientных системах варьирует в самых широких пределах и

определяется, в основном, свойствами целевых белков, в т.ч. их стабильностью в растительных тканях. Во многих исследованиях показано, что накопление рекомбинантного белка в стабильно трансформированных растениях сравнимо с его накоплением в транзиентных системах. При этом использование стабильно трансформированных растений не требует затрат на организацию процесса вакуумной инфильтрации. Таким образом, производства на основе стабильно трансформированных растений менее капиталоемки, что делает их доступнее для небольших компаний и стартапов. В целом, использование стабильно трансформированных растений целесообразно в случае производства рекомбинантных белков, требующихся регулярно и в значительных количествах, как, например, различные ферменты, структурные белки, многие виды антител и вакцинных антигенов.

Анализ литературы показал, что в настоящее время культивирование растений-продуцентов в полевых условиях практически исключено в силу действующего экологического законодательства и настроений общественности. В силу этого при разработке растительных экспрессионных систем необходимо изначально ориентироваться на культивирование продуцентов в замкнутых системах, исключающих вынос в окружающую среду рекомбинантной ДНК, - в теплицах, биореакторах, культиваторах различной конструкции. Наиболее продвинутыми в этом смысле в настоящее время являются экспрессионные системы на основе культур клеток растений. Эти системы обеспечивают хороший выход целевых белков, однако по затратам производства с использованием таких систем приближаются к производствам на основе культуры клеток млекопитающих. В связи с этим в последнее время растёт интерес к разработке альтернативных культуре клеток экспрессионных систем с использованием, в частности, культуры «бородатых» корней, микроводорослей и водных растений.

Наиболее перспективными продуцентами для культивирования в биореакторах являются водные растения, относящиеся к семейству рясковые. Эти растения сочетают особенности белковой машинерии, характерные для высших

растений, со способностью к фотоавтотрофному росту с высокой скоростью в биореакторах различной конструкции. Такие свойства делают рясковые очень перспективными объектами для исследований по разработке экспрессионных платформ с использованием замкнутых культивационных систем. В настоящее время такие исследования находятся, в целом, на ранних этапах своего развития. В частности, требуют дальнейшего изучения такие вопросы, как повышение уровня накопления целевых белков в растениях-продуцентах, совершенствование методов их культивирования, особенности секреции рекомбинантных белков в среду культивирования и их накопления там. Необходимы исследования в области разработки методов очистки целевых белков из тканей продуцентов и культуральной среды.

Исходя из имеющихся литературных данных, можно заключить, что разработка методов получения рекомбинантных белков в растительных экспрессионных системах является актуальным направлением современной биотехнологии. Выбор типа экспрессии, стабильной в ядерно-трансформированных растениях или транзientной, должен определяться назначением экспрессионной системы, свойствами целевого белка и его функциональным назначением. При выборе вида растения-продуцента необходимо изначально ориентироваться на необходимость его культивирования в замкнутых системах - теплицах и биореакторах. Помимо повышения уровня накопления целевых белков в растениях-продуцентах, особое внимание должно уделяться разработке подходов к снижению количества различных метаболитов, затрудняющих их выделение и очистку. Это подразумевает внедрение в исследования по биофармингу современных методов метаболической инженерии растений. Современные глобальные тренды, направленные на развитие «зелёной» экономики и защиту окружающей среды, делают исследования в области биофарминга особенно актуальными.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Молекулярное клонирование ДНК. Конструирование векторов для трансформации растений

Для клонирования были использованы ферменты производства компаний ThermoFisher Scientific (США), Fermentas (Литва), СибЭнзим (Россия) и др. Ферментативные реакции проводили в буферах, поставляемых вместе с соответствующими ферментами, в условиях, рекомендованных компаниями-производителями.

Выделение плазмидной ДНК из клеток *E.coli* и *A. tumefaciens* проводили с помощью наборов для выделения плазмидной ДНК Quantum Plasmid MiniPrep Kit (BioRad», США) или GeneJET Plasmid Miniprep kit (ThermoFisher Scientific, США) согласно протоколам производителей. Амплификацию фрагментов ДНК осуществляли методом полимеразной цепной реакции. ПЦР проводили с использованием 1,0 единицы/реакция *Pfu* ДНК-полимеразы в буфере для ПЦР с 20 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 мМ MgSO_4 , 0,2 мМ каждого dNTP, 0,2 пМ/мкл каждого праймера («Синтол» или «Евроген», Москва, Россия) (Таблица 15). Объем реакционной смеси - 50 мкл. Режим амплификации: предварительная денатурация 95°C, 5 мин; денатурация 95°C, 30 сек; отжиг праймеров 30 сек при температуре, указанной в Таблице 15; элонгация - 72°C, время - исходя из расчета одна минута для 500 п.н., циклов амплификации- 30. Полученные ДНК-фрагменты очищали с помощью набора PCR Kleen™ Purification Spin Columns (BioRad, США). Элюцию фрагментов ДНК из агарозного геля проводили с помощью набора GeneJET Gel Extraction kit (ThermoFisher Scientific, США).

Таблица 15 - Праймеры, использованные в исследовании.

Праймер	Последовательность (5'→3')	Т отжига, °C	Назначение праймера
M2_for M2_rev	atagagctcttagaggatccagaggat atttctagaatgtccctcctcactgaag	64°C	Клонирование 5'-фрагмента M2 в векторе pBI121 по сайтам <i>SacI</i> и <i>XbaI</i>
M2-130for M122R	catctagaatgtccctcctcactgaag ccgggatccggaatcagagcatctgcac	62°C	Клонирование 22 а. о фрагмента M2 в трансляционном слиянии с β-глюкуронидазой в векторе pBI121 по сайтам <i>XbaI</i> и <i>BamHI</i>
M2-130for M2-130rev	catctagaatgtccctcctcactgaag gggatccgcccaccaccaaggggt	62°C	Клонирование 30 а. о фрагмента M2 в трансляционном слиянии с β-глюкуронидазой
M2-143for M2-143rev	cgctctagaatgtccctcctcactgaag atttccctggaggatccagaggatgagatg	59°C	Клонирование 43 а. о фрагмента M2 в трансляционном слиянии с β-глюкуронидазой
uidA_low	gaatcctttgccacgcaagtccgcatett	63°C	Праймер на внутреннюю последовательность гена GUS
RTB_F RTB_R	cgtctagagctgatgtttgatggatcctgag cgtgagctcctgcaagagagtaatctgtctatca	62,5°C	Клонирование субъединицы В рицина в векторе pUC18
RBin_F RBIn_R	gtcgactctagaaccggtgctgatgtttgatgga ccgttaatctagaaaataatggtaaccatattgg	62°C	Клонирование субъединицы В рицина в трансляционном слиянии с M130 в векторе pBI121
CBD_for CBD_rev	agaggatccacgacaatcctggtgtatc ttcgagctctcattgaagctgccacaaggc	59°C	Клонирование хитин-связывающего домена (CBD) в векторе pBI121
PR1_F PR1_R	atcggatcctctataaatacccttgg aatgagctctacacctacatctgcacg	58°C	Клонирование 5' фрагмента гена белка PR1 табака в векторе pUC18

Продолжение Таблицы 15.			
RBsp_F	agaaccggtatgggatttgtctcttttc	57°C	Клонирование гена сигнального пептида белка PR1 табака в слиянии с геном субъединицы В рицина в векторе pBI121
RBsp_R	agcaccggtagaattttgggcacgg		
RBC_F	gtacagaacagaagagctgctgatgtttgatggat	62°C	Клонирование субъединицы В рицина в векторе pTYB11
RBC_R	tcgaggaattcaccgagagggtaaagaagaatg		
HirXF	agctctagaatggccaagaggattgc	61°C	Клонирование гена гирудина с оптимизированным кодонным составом в вектор pBI121
HirSR	ttcgagctctcattggaggtactcttcagg		
Gfr1for	gtcctctagaatggcgaagaggatcgcc	61°C	Клонирование 5'-концевой части гена ГКСФ с оптимизированным кодонным составом
Gfr1rev	ataggtaccctcgagcgcttggaggagtc		
Gfr2for	ttggtaccctcgagggcatctctcc	61°C	Клонирование 3'-концевой части гена ГКСФ с оптимизированным кодонным составом
Gfr2rev	atgagctctcacggttgggcgagatg		
oligo(dT) ₁₂₋₁₈	ttt-ttt-ttt-ttt-ttt	37°C	Праймер для обратной транскриптазы
VirB1	ggctacatcgaagatcgtatgaatg	63°C	Праймеры на ген <i>virB1 A. tumefaciens</i> , детекция агробактериальной контаминации
VirB2	gactatagc gatggttacgatgttgac		
VirC1	gcactatctacctaccgctacgtcatc	59°C	Праймеры на ген <i>virC2 A. tumefaciens</i> , детекция агробактериальной контаминации
VirC2	gttgctgatcgggactgtaaagtgtg		
T1	ctgccgacagtggccccaaagatggacc	63°C	Праймеры для детекции гена тауматина II в трансгенных растениях табака и томата.
T2	cagtagggcagaaagtgaccctgtagttg		
5727	aagggatgacgcacaatc	56°C	Прямой праймер к 35S CaMV промотору вектора pBI121
T7UnPr	taatacgactcactatag	56°C	Праймер к T7 промотору вектора pTYB11
NPTIIF	tgattgaacaagatggattgcacgc	61°C	Праймеры для детекции гена <i>nptII</i> в трансгенных растениях.
NPTIIR	cagatcatcctgatcgacaagaccg		

2.2. Бактериальные штаммы и плазмиды

Список использованных в данной работе бактериальных штаммов и плазмид представлен в Таблице 16. Бактерии *E. coli* и *A. tumefaciens* трансформировали в соответствии с Маниатис и др. с использованием хлорида кальция [409]. При переносе плазмидной ДНК в агробактерии концентрация CaCl_2 в растворах была увеличена до 20 мМ, перед тепловым шоком (проводился при 42°C) клетки замораживали в жидком азоте. Штаммы *E. coli* и *A. tumefaciens* культивировали при температуре 37°C и 28°C, соответственно. Для выращивания трансформированных штаммов в среду добавляли ампицилин в концентрации 100 мкг/мл, канамицин - 25 мкг/мл для *E. coli* и 50 мкг/мл для *A. tumefaciens*.

Таблица 16 - Бактериальные штаммы и плазмиды использованные в исследовании для конструирования векторов.

Штаммы/плазмиды	Описание	Источник
<i>E.coli</i> DH5 α	F ⁻ <i>gyr A96 recA1 relA1 endA1thi-1 hsdR17 glnV44 deoR</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169[ϕ 80d Δ (<i>lacZ</i>)M15]	«Fermentas», Литва
BL21(DE3)	<i>fhuA2 [lon] ompT gal</i> (λ DE3) [<i>dcm</i>] Δ <i>hsdS</i> λ DE3 = λ <i>sBamHI</i> Δ <i>EcoRI-B</i> <i>int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21</i> Δ <i>nin5</i>	«New England BioLabs», Великобритания
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> CBE21	сконструирован на основе дикого штамма <i>A. tumefaciens</i> с Ti-плазмидой pTiBo542.	Центр «Биоинженерия» РАН
pUC19/18	Мультикопийные плазмиды, размером 2686 н.п., основные элементы: <i>rep bla lac</i> Δ (<i>lacZ</i>)	«Fermentas», Литва
pTYB11	Вектор размером 7412 н.п., основные элементы: <i>rop bla lacI SceCBDintein M13ori</i>	«New England BioLabs», Великобритания
pBI121	Бинарный вектор размером 15300 н.п., основные элементы: <i>Nos-pro NPTII Nos-ter CaMV 35S GUS</i>	«ClonTech», США

2.3. Генетическая трансформация растений

2.3.1. Генетическая трансформация табака и томата

В исследованиях был использован табак *Nicotiana tabacum L* cv. Petite Havana SR1. Табак культивировали на безгормональной среде Мурасиге и Скуга (MS). Трансформация осуществлялась по методу Horsch и др. [410]. После кокультивации с *A. tumefaciens* экспланты переносили на среду MS, содержащую 1 мг/л ВАР, 0,1 мг/л ИУК, 70 мг/л канамицина и 500 мг/л цефотаксима. Экспланты культивировались на этой среде в темноте при 26°C до появления адвентивных побегов. Регенеранты переносили на среду MS с 0,5 мг/л ВАР, 70 мг/л канамицина, 200 мг/л цефотаксима для пролиферации побегов. Канамициноустойчивые растения укореняли на безгормональной среде MS, содержащей 100 мг/л канамицина, после адаптации растения передавали в теплицу для дальнейшего роста.

В экспериментах по генетической трансформации был использован томат (*Lycopersicon esculentum Mill.*) селекционной линии Ялф (получена в РГАУ - МСХА им. К.А.Тимирязева и любезно предоставлена Г.Ф. Монахосом). Эта линия в настоящее время используется в качестве отцовской при получении гибридов F1 в семеноводстве томатов. После поверхностной стерилизации семена томата проращивали на безгормональной агаризованной среде Мурасиге-Скуга, содержащей 30 г/л сахарозы и 0,8% агара. Для трансформации использовались семядоли стерильных 10 дневных сеянцев, процедура агробактериальной трансформации проводилась в соответствии с протоколом McCormick и др. [174]. Трансформацию проводили с помощью *A. tumefaciens* СВЕ21. Когда регенеранты достигали высоты 1,5-2 см, их отделяли от каллуса и переносили на среду укоренения (разбавленная в 2 раза среда Мурасиге-Скуга, содержащая 2%

сахарозы, 0,8% агара, 0,1 мг/л ИУК, 50 мг/л канамицина и 500 мг/л цефотаксима), растения пассировали на свежую среду с интервалом 2 недели. После 3-х месяцев культивирования растения были проанализированы методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на присутствие гена тауматина II. Трансформанты, содержащие целевой ген и свободные от агробактерий, были размножены черенкованием побегов. Для этого побеги нарезали на фрагменты размером 1,5-3 см и переносили на среду укоренения указанного выше состава, но без антибиотиков. Когда трансформанты укоренялись и достигали размера 4-6 см, их переносили в теплицу для дальнейшего роста и изучения.

Культивирование растений *in vitro* проводилось при следующих условиях: фотопериод 16/8 часов, температура 24/22°C, освещенность 3500 люкс. Регенерацию адвентивных побегов после трансформации проводили в темноте. Растения в теплице культивировали при температуре 22-24°C и естественной освещенности с дополнительной подсветкой в ночные часы.

2.3.2. Генетическая трансформация ряски малой

В экспериментах была использована ряска малая (*L. minor* L.) из р. Ока. Стерильные растения ряски культивировали в жидкой среде MS, содержащей 2% сахарозы, без регуляторов роста. Для трансформации были использованы каллусы. Для индукции каллусогенеза растения ряски помещали на чашки Петри на поверхность среды NPM следующего состава: макроэлементы, микроэлементы и витамины по Мурасиге-Скугу, 3% сахарозы, 0,4% агара, 0,15% Gelrite (Duchefa Biochemie, Нидерланды), 1,0 мг/л тидиазулона. Каллусы размером 2–3 мм отделяли от фронд и культивировали на среде NPM, содержащей 2,0 мг/л 2,4-Д. Для трансформации использовали каллусы диаметром 4–5 мм [411].

A. tumefaciens CBE21, несущие вектора для трансформации растений, растили в течение 16 ч в жидкой среде LB с 50 мг/л Km. Бактериальные клетки промывали 2 раза жидкой безгормональной средой MS. Бактериальный осадок после промывок ресуспендировали в этой же среде, финальный ОП₆₀₀ суспензии был равен 2,0.

Для трансформации 2 г каллусов были перенесены со среды NPM в стеклянный стакан емкостью 100 мл, содержащий 20 мл суспензии агробактерий. Каллусы инкубировали с бактериями в течение 30 мин. Процедура трансформации каллуса ряски включала шесть этапов, представленных на Рисунке 10. Полученные канамицино-устойчивые линии ряски культивировали для дальнейшего роста и селекции на жидкой безгормональной среде Шенка-Хильдебрандта (SH), содержащей 10 мг/л канамицина [411].

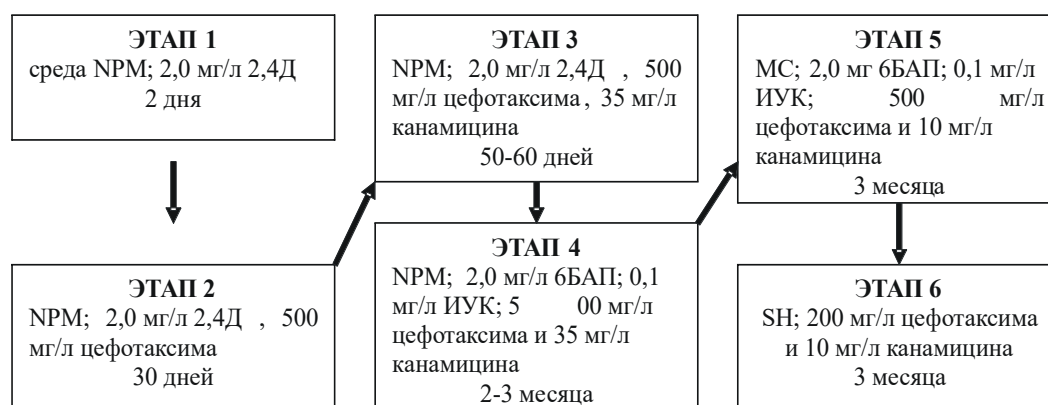


Рисунок 10 - Схема процедуры агробактериальной трансформации Ряски малой различными векторами. SH - жидкая безгормональная среда Шенка-Хильдебрандта. Указана продолжительность этапа.

Трансформация растений ряски малой (*Lemna minor*) проводилась сотрудниками лаборатории экспрессионных систем и модификации генома растений (Биотрон) под руководством с.н.с. к.б.н. Митюшкиной Т.Ю.

2.4. Оптимизация кодонного состава последовательностей для экспрессии в растениях ряски малой. Сборка синтетических генов

Обратная трансляция и оптимизация кодонного состава синтезируемых для экспрессии в ряске нуклеотидных последовательностей выполнялась с помощью программ Gene Composer или DNA2.0 Gene Designer (DNA2.0, USA) [412]. Для оптимизации кодонного состава были использованы данные о частоте использования кодонов в ряске горбатой *L. gibba* (Kazusa Codon usage database, <https://www.kazusa.or.jp/codon/>). Дизайн набора перекрывающихся олигонуклеотидов был выполнен с использованием программы Gene2Oligo [413].

2.4.1. Пептид M2e вируса гриппа птиц H5N1

Для синтеза последовательности ДНК, кодирующей N-концевой фрагмент белка M2 вируса гриппа птиц длиной 43 а.о., был использован метод лигирования перекрывающихся олигонуклеотидов. (Таблица 17). Сборка целевой последовательности велась в буфере следующего состава: 50 mM Трис-НСl, рН7,5; 500 mM NaCl; 5 mM EDTA, рН8,0; 50 pmol каждого олигонуклеотида; объём реакционной смеси - 100 мкл. После сборки синтезируемую последовательность лигировали при 23°C в течение 12 часов в буфере, содержащем 40mM Tris HCl, рН 7,8, 10mM MgCl₂, 10mM DTT, 0,5 mM АТР, 5 единиц Т4 DNA лигазы, Н₂О до 100 мкл [414].

Полученные фрагменты амплифицировали методом ПЦР как описано выше с использованием праймеров R0 и F143 (Таблица 15); в качестве матрицы использовали 2 мкл лигазной смеси. Полученные фрагменты обрабатывали

Таблица 17 - Олигонуклеотиды, использованные при клонировании последовательности ДНК, кодирующей N- концевой фрагмента белка M2 вируса гриппа птиц H5N1.

Наименование	Нуклеотидная последовательность, 5' → 3'
R0	Agggacatctgcagatcag
F0	ctgatctgcagatgtccctcctcactgaagtcgaaact
R19	actcccattcatttctagtaggagtttcgacttcagtgagg
F38	cctactagaaatgaatgggagtgagatgctctgattcca
R60	accaccaaggggtcgctggaatcagagcatctgc
F78	gcgacccttggtggggcggtccatcatc
R94	tgagatgcaggatgccgatgatggacgccgcc
F110	ggcatctgcacatctcctctggatcctcctt
R126	tgggcagaatgatcttttctaaaggaggatccagagga
F143	tagaaaagatcattctgccca

рестриктазами PstI и BamHI, и клонировали в вектор pUC19 по этим сайтам. Клоны, в которых нуклеотидная последовательность вставок полностью совпадала с заданной, были использованы для дальнейших исследований.

2.4.2. Гирудин из пиявки медицинской *Hirudo medicinalis*

Для экспрессии в ряске была использована последовательность гирудина 1 (база данных DrugBank DB00001) из пиявки медицинской *H. medicinalis*. Для транспорта рекомбинантного гирудина в апопласт, нативный N- концевой сигнальный пептид гирудина был заменён на соответствующий пептид α -амилазы риса (GenBank AAA33897.1) [411].

Нуклеотидная последовательность рекомбинантного гирудина была синтезирована методом ПЦР, использованные для синтеза олигонуклеотиды представлены в Таблице 18 [413]. Полученную последовательность гирудина амплифицировали с использованием праймеров HirXF и HirSR, в которые были

добавлены сайты XbaI и SacI, соответственно (Таблица 15). Последовательность гирудина клонировали по этим сайтам в вектор pBI121 вместо гена β -глюкуронидазы. Результирующая плаزمида pBI121-hir была использована для трансформации ряски.

Таблица 18 - Олигонуклеотиды, использованных для синтеза гена гирудина, оптимизированного для экспрессии в растениях.

Наименование	Нуклеотидная последовательность, 5' → 3'
Hir1S	atggccaagaggattgcctccatgtcttcgctcctccttatcgcg
Hir2R	ggcgagatgggaggacaagcacaacagcgcgataaggaggagcga
Hir3S	ttgtctcccacatctcgcccaggcgcttgttacaccgactgcacc
Hir4R	cagagacacagattttggccgctctcgggtgcagtcggtgtaaaca
Hir6R	tcgctgccgaggatgcacttgttccctgtccgcagacggtggat
Hir7S	gtgcatcctcggcagcgacggagaaaaagaaccagtcgctcaccgg
Hir8R	tggctctgaggctttggggttccttcgccggtgacgcactgggtc
Hir9S	cccaaagcctcagagccataatgacggagacttgaagaaatccc
Hir10R	tcattggaggtactcttcagggttcttcgaagtctcc

2.4.3. Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор человека

Для экспрессии в растениях ряски была выбрана аминокислотная последовательность ГКСФ человека DB00099 (база данных DrugBank, соответствует препарату Filgrastim). Для транспорта рекомбинантного ГКСФ в апопласт N-концевой сигнальный пептид ГКСФ был заменён на соответствующий пептид α -амилазы риса (GenBank: AAA33897.1). Для целей клонирования в нуклеотидную последовательность ГКСФ был добавлен сайт рестрикции XhoI (в позиции 351 п.н.) без изменения аминокислотной последовательности.

Синтез последовательности ДНК, кодирующей рекомбинантный ГКСФ, был выполнен методом ПЦР. Последовательность олигонуклеотидов, использованных для синтеза, представлена в Таблице 19. Нуклеотидную последовательность ГКСФ синтезировали в виде двух фрагментов- фрагмента 1 (1-357 п.н.) и фрагмента 2 (351-603 п.н.). Далее, фрагмент 1 амплифицировали с использованием пары праймеров Gfr1for (сайт XbaI) и Gfr1rev (сайт XhoI), фрагмент 2- с использованием праймеров Gfr2for (сайт XhoI) и Gfr2rev (сайт SacI). После ПЦР и последующей очистки фрагмент 1 обрабатывали рестриктазами XbaI и XhoI, фрагмент 2- рестриктазами XhoI и SacI; и клонировали в вектор pUC18 по этим же сайтам. В результате были получены

Таблица 19 - Олигонуклеотиды, использованные для получения синтетического гена ГКСФ человека, оптимизированного для экспрессии в растениях.

Наименование	Нуклеотидная последовательность, 5' → 3'
F1f	atggcgaagaggatcgctccatgtcctcgctcctcctgattgcgctgc
F2r	gtggcctgcgcgaggtgggagctgaggcacagcagcgcaatcaggaggag
F3f	ccacctgcgcaggccacgcctctgggccccgcctcctcctccccag
F4r	cctgtccagacacttcaggaggaaggactgggggagggaggagggc
F5f	cctgaagtgtctggagcaggtcaggaagatccaaggcgatggagccgcc
F6r	gctttaggtcgcgcacagcttctcctggagggcgctccatcgccttg
F7f	ctgtgcgcgacctacaagctgtgccaccccgaggaactcgtgctcctgg
F8r	ggggggcccacggaatgccgagagaatggcccaggagcacagagttcctc
F9f	gcattccgtgggccccctgtcgttctccttcgcaagccctgcagc
F10r	cccgagtgcagctgggagaggcatccggcgagctgcagggcttgcgaagg
F11f	ctcccagctgcaactcgggactctcctctaccagggactcctccaagcgc
F12r	ctcgagcgcttggaggagtccctg
F13f	ctcgagggcatctctcccgaactcggacctacgctcgacacctccaact
F14r	ccagatggtcgtggcgaatccgccacgtccagttggaggggtgtcgagcg
F15f	atttcgccacgacctatggcaacaatggaagaactcggaatggcgccc
F16r	cgggcatcggcccttgagtgggctgcagggcggggcgccattccgagttct
F17f	ctcaagggcgatgcccgcgttcgctccgcctttcagcggcgggcgggg
F18r	aaaagactggaggtgcgacgccaccagcactccccggcccggcgctgaa
F19f	cgtcgacctccagctctttctcgaagttagctatcgcgtctcaggcat
F20r	tcacggttgggagatgcctgaggacgcgatagc

плазмиды pUC18-fr1 и pUC18-fr2. Фрагмент 2 был вырезан из вектора pUC18-fr2 по сайтам XhoI и SacI, и клонирован по этим же сайтам в вектор pUC18-fr1; в результате была получена плазида pUC18-GCSF. Последовательность ДНК, кодирующая ГКСФ, была вырезана из плазмиды pUC18-GCSF с помощью рестриктаз XbaI и SacI, и клонирована по этим сайтам в вектор pBI121 вместо гена β -глюкуронидазы. Полученная плазида pBI-GCSF была использована в дальнейших исследованиях.

2.5. ПЦР и Саузерн блот анализ трансгенных растений

Геномную ДНК табака и ряски выделяли по методу Dellaporta и др. [415]. Интеграцию целевых последовательностей ДНК в геном растений изучали методом ПЦР. Реакционная смесь содержала 0,2mM dNTP, 0,5 μ M каждого праймера, 0,5 ед. Taq-полимеразы, 3 мкл препарата геномной ДНК в буфере для ПЦР с 20mM (NH₄)₂SO₄ и 2mM MgCl₂ (Fermentas, Литва). Объем реакционной смеси - 25 мкл. Режимы амплификации были аналогичны указанным в разделе 2.1., время амплификации для Taq-полимеразы рассчитывали исходя из её скорости в 1000 п.н/мин.

Предварительно растения проверяли на отсутствие агробактериальной контаминации. Проверка проводилась с помощью ПЦР, для этого использовали пары праймеров virB1и virB2, или virC1 и virC2 (Таблица 15). Условия ПЦР указаны выше, в последующих исследованиях использовались только свободные от агробактериальной контаминации линии.

Для Саузерн блота 50-70 мкг геномной ДНК гидролизовали 16 часов при 37°C со 100 единицами соответствующей рестриктазы. После электрофореза в агарозном геле фрагменты ДНК переносили на мембрану Hybond+ в соответствии с инструкцией производителя (Amersham, США). ДНК - пробы получали методом

ПЦР с использованием соответствующих плазмид как матриц. Пробы метили щелочной фосфатазой с помощью набора AlkPhos Direct Labeling Kit (Amersham Bioscience, США). Прегибридизацию, гибридизацию (в течение ночи, 60°C) и последующие промывки проводили в соответствии с протоколом набора AlkPhos Direct Labeling Kit. Детекцию сигнала проводили с помощью реагента CDP-Star, следуя инструкциям производителя (Amersham Bioscience, США).

2.6. Выделение РНК из растительных тканей и ОТ-ПЦР - анализ трансгенных растений

Выделение РНК растений проводили с использованием набора реактивов QuantumPrep AquaPure RNA Isolation Kits («Bio-Rad», США) согласно рекомендациям изготовителя. кДНК получали с помощью обратной транскриптазы M-MuLV RT и праймера oligo(dT)₁₂₋₁₈ в условиях, рекомендованных производителем (Fermentas, Литва). Препараты кДНК анализировали методом ПЦР на наличие целевых последовательностей с использованием соответствующих праймеров.

2.7. Гистохимический анализ β-глюкуронидазы в трансгенных растениях

Гистохимическое определение активности β-глюкуронидазы проводилось по протоколу Jefferson и др. с использованием X-GLUC (5-бром-4-хлор-3-индолилглюкуронид, «Fermentas») [416].

2.8. Выделение общего растворимого белка из растительных тканей

Для выделения общего растворимого белка для Вестерн блот анализа растительную ткань, растёртую в жидком азоте, переносили в экстракционный буфер следующего состава: 50мМ Tris-HCl, pH8.0; 10мМ ЭДТА; 30 мМ β-меркаптоэтанола, 1% SDS, 4 мкг/мл апротинина, 4 мкг/мл лейпептина в соотношении ткань:буфер 1:4. Общий растворимый белок для ИФА экстрагировали в буфере указанного выше состава, но без SDS. Экстракцию проводили при +4°C в течение 45 минут при постоянном перемешивании. Дебрис осаждали центрифугированием в течение 20 мин при 16000g, +4°C. Содержание белка в полученных препаратах определяли по методу Лоури с использованием набора DC Protein Assay согласно инструкции производителя (BioRad, США). Препараты белка хранили при +4°C или -70°C.

2.9. Вестерн-блот анализ препаратов общего растворимого белка трансгенных растений

Электрофоретическое разделение белков проводили в SDS-ПААГ по методу Лемли. После электрофореза белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (BioRad, США) согласно инструкции производителя. Мембраны блокировали в 4% обезжиренном молоке (BioRad, США) в буфере PBS с 0,05% Tween-20 при комнатной температуре в течение 1 часа.

Для детекции пептида M2e были использованы кроличьи поликлональные антитела (Abscam, Великобритания) разведенные в блокировочном буфере в соотношении 1:500; β-глюкуронидазы - кроличьи антитела против её C-

концевого участка 589 – 603 а.о. (Sigma, США), разведение 1:1000; субъединицы В рицина - кроличьи поликлональные антитела (Abcam, Великобритания), разведение 1:1000; ГКСФ - кроличьи поликлональные антитела (Abcam, Великобритания), разведение 1:2000; гирудина – мышинные моноклональные антитела в разведении 1:500 (AbCam, Великобритания); тауматина II - кроличьи поликлональные антитела (ИБХ, Россия), разведение 1:3000. Гибридизацию с первичными антителами проводили 18 часов при 4°C. В качестве вторичных антител использовали антикроличьи IgG, конъюгированные со щелочной фосфатазой (Pierce, США) или с пероксидазой хрена (BioRad, США), разведенные в соотношении 1:3000, или антимышинные IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена (BioRad, США) в разведении 1:2000. Гибридизацию с вторичными антителами проводили 1 час при комнатной температуре. При использовании щелочной фосфатазы мембраны визуализировали с помощью хромогенного субстрата BCIP/NBT (Fermentas, Литва); при использовании пероксидазы хрена - с помощью субстрата ТМВ (BioRad, США) согласно инструкциям производителей.

2.10. Количественный иммуоферментный анализ рекомбинантных белков в трансгенных растениях

Накопление целевых белков определяли методом твердофазного иммуоферментного анализа. В лунки полистироловой платы (Greiner Bio-One, Германия) вносили по 200 мкл белкового препарата в экстракционном буфере (раздел 2.8.) или в PBS в соответствующих разведениях. Плашки инкубировали при 37°C в течение 2-х часов. Затем плашки промывали буфером PBST (фосфатный буфер PBS с добавлением 0,05% Tween-20) 5 раз по 3 минуты при 37°C. Блокировку проводили в течение 1 часа при 37°C с использованием буфера

PBST, содержащего 2% раствора БСА. После блокировки в лунки вносили антитела (см. раздел 2.9.) и инкубировали в течение 18 часов при 4°C. Антитела, не связавшиеся с образцами, отмывали в PBST при 37°C (5 раз по 3 минуты). Далее добавляли вторичные антитела, разведённые в блокировочном буфере, и инкубировали 1 ч при 37°C. После инкубации с вторичными антителами в лунки добавляли субстрат для щелочной фосфатазы (Pierce, США) или для пероксидазы хрена (BioRad, США). После остановки реакции измеряли оптическую плотность. Для построения калибровочных графиков использовали стандарты: β -глюкуронидаза из *E. coli* (Sigma, США), рекомбинантный гирудин и ГКСФ (AbCam, Великобритания), тауматин II (Sigma, США) в концентрациях 5 - 100 нг на лунку.

2.11. Количественная оценка содержания субъединицы В рицина в растениях с помощью асиалофетуин-связывающего ИФА

Определение содержания субъединицы В рицина в трансгенных растениях проводили согласно методике, описанной Dawson и др., с модификациями [417,418]. Асиалофетуин растворяли в концентрации 4 мкг/мл в 0,1М карбонат/бикарбонатном буфере (pH 9,6) и иммобилизовали в лунках иммунологических плашек по 100 мкл/лунка. Белок из растертых в жидком азоте растительных тканей выделяли непосредственно перед нанесением в лунки. Экстракцию проводили в течение 40 минут при +4°C в буфере PBST в соотношении вес образца/объем буфера 1:1. После осаждения дебриса центрифугированием отбирали супернатант и вносили по 100 мкл/лунка в плашки с иммобилизованным асиалофетуином. Плашки инкубировали 1 час при 37°C. Не связавшиеся белки отмывали при 37°C буфером PBST (5 раз по 3 минуты). В лунки вносили антитела к субъединице В рицина или к пептиду M2e (AbCam,

Великобритания) в разведении 1:1000 и инкубировали в течение 16 часов при 4 °С. После промывки лунок буфером PBST, добавляли антикроличьи IgG, конъюгированные со щелочной фосфатазой (разведение 1:2000, Pierce, США). Инкубацию с вторичными антителами проводили в течение 2 ч при температуре 37°С. После отмывки от вторичных антител в лунки вносили субстрат для щелочной фосфатазы (Pierce, США). Реакцию проводили в термостате при 25°С в течение 15 минут, оптическую плотность препаратов измеряли с помощью спектрофотометра Biotrak II Plate Reader (Amersham Biosciences, Великобритания). Для построения калибровочных графиков использовали препарат RTB, полученный в *E.coli*.

2.12. Аффинная хроматография с иммобилизованным асиалофетуином

Изучение взаимодействия между асиалофетуином и слитым белком RTB-M130 проводили по методу Donayre-Torres [353]. Асиалофетуин (5 мг) был иммобилизован на 1,5 г BrCN-сефарозы 4В (Sigma, США) в соответствии с инструкцией производителя сефарозы. После отмывки, сефароза 4В с иммобилизованным асиалофетуином в объёме 5 мл была помещена в колонку и переведена в буфер PBS.

Листья трансгенного табака (25 г) замораживали в жидком азоте и растирали с помощью ступки и пестика. Полученный материал экстрагировали в 25 мл PBS при 4°С в течение 45 мин, центрифугировали и отбирали супернатант. Супернатант (объём 30 мл) наносили на аффинную колонку, промывку и элюцию белков с колонки проводили в соответствии с Donayre-Torres [353]. Связавшиеся с асиалофетуином белки элюировали с колонки 100 мМ глицином, рН 4,0. Фракции объёмом 1 мл собирали в пробирки, содержащие нейтрализующий буфер (100 мМ

Трис HCl, pH 9,0) и анализировали методом Вестерн блот анализа как описано в разделе 2.9.

2.13. Экспрессия субъединицы В рицина в *E.coli*

Плазмида pTYB11RBC была перенесена в штамм *E.coli* BL21(DE3) (New England BioLabs, Великобритания). *E.coli* с плазмидой pTYB11RBC, культивировали в жидкой среде LB с 100 мкг/мл ампицилина до оптической плотности ОП₆₀₀, равной 0,5 ед. Экспрессию гена RTB индуцировали добавлением в культуральную среду ИПТГ в концентрации 0,5 мМ. Индуцированные культуры растили на качалке при 28°C в течение ночи. Бактериальные клетки осаждали центрифугированием в течение 20 мин при 8000 g, +4°C. Анализ экспрессии гена RTB проводили посредством электрофореза в 10% SDS-ПААГ, гели окрашивали Кумасси G-250.

2.14. Хроматография рекомбинантных белков, полученных в трансгенных растениях

Хроматография низкого давления проводилась на комплексе оборудования для жидкостной хроматографии низкого давления Spectrum (США). Для хроматографии использовали колонки производства Pharmacia или Amersham (США). FPLC- хроматография проводилась на хроматографе ActaPure M25 (GE, США) с использованием колонок с носителем SepFast GF-HS-M (Biotoolomics, Великобритания). Лиофильная сушка белковых препаратов проводилась с использованием лиофильной сушки Labconco (США).

Растительный материал (плоды томата или растения ряски) весом 28 г разрушали в жидком азоте и переносили в соответствующий экстракционный буфер (см. раздел Результаты). Соотношение растительная ткань: экстракционный буфер было равным 1:3. Экстракцию проводили 2 часа при +4°C при постоянном перемешивании. Дебрис осаждали центрифугированием (16000g, +4°C, 40 мин) и отбирали супернатант. Полученные образцы ОРБ хранили при -70°C до проведения анализов.

Первоначальная очистка полученных препаратов от различных примесей проводилась методом осаждения сульфатом аммония, концентрация сульфата аммония- 25 или 33, 70 и 100% от насыщения. Полученные осадки осаждали центрифугированием (16000g, +4°C, 40 мин) растворяли в соответствующем буфере (см. раздел Результаты), обессоливали и лиофилизировали. Обессоливание проводили на колонке, содержащей 120 мл Сефадекса G25.

Полученные препараты были изучены методом электрофоретического анализа, электрофорез проводили в 10-25% градиентном SDS-ПААГ. Гели окрашивали Coomassie Brilliant Blue G-250 (ThermoFisher Scientific, США) и визуализировали с помощью Amersham Imager 600 RGB (GE, США). Денситометрический анализ проводили с использованием пакета ImageQuant TL ver. 8.1. (GE, США).

2.15. Органолептический анализ плодов томата, трансформированных геном тауматина II

Органолептический анализ плодов томата проводили методом «слепого теста» в соответствии с [281,419] с незначительными модификациями. Плоды томата разрезали на 2 или 4 части в зависимости от размера, членам комиссии

были переданы для оценки по две части каждого образца. Двенадцать участников комиссии (способных определить 50 нМ тауматина II в водном растворе) оценивали сладость и общий вкус трансгенных томатов по сравнению с контрольными. Сладость оценивали по 4-балльной шкале: 1 - сладость не обнаружена; 2 - слабая сладость; 3 - выраженная сладость; 4 - сильный сладкий вкус. Общие вкусовые качества томатов также оценивали по 4-балльной шкале: 1 – плохой вкус; 2 - посредственный вкус; 3 - хороший вкус; 4 - очень хороший вкус. Органолептический анализ проводили два раза. Результаты выражались как средняя оценка сладости или вкуса \pm стандартное отклонение.

2.16. Оценка иммуногенности рекомбинантного пептида M2e, полученного в растениях ряски

Для иммунизации были использованы взрослые (от 7 до 9 недель) самцы мышей линии ICR массой 32 ± 6 г. Исследование проводилось в соответствии с требованиями российского законодательства, регулирующего эксперименты на животных в лабораториях, и Надлежащей лабораторной практики, директива ЕС 2010/63/EU (сертификат GLP № G-044) [420].

Мыши были разделены на три группы:

1. иммунизация слитым белком RTB – M2e, доза 7 мкг/мышь, 10 животных;
2. иммунизация слитым белком M2e – GUS, доза 28 мкг/мышь, 10 животных;
3. контрольная группа, иммунизация препаратом ОРБ из нетрансформированных растений, доза 100 мкг/мышь, 5 животных.

Непосредственно перед иммунизацией белковые препараты ресуспендировали в стерильном PBS и гомогенизировали в течение 5 минут в ультразвуковой бане. Иммуноген (объем дозы 200 мкл) вводили орально с использованием шприца объемом 1 мл с желудочным зондом. Иммунизацию

проводили в дни 0, 7, 14 и 21. Образцы крови собирали из ретроорбитального синуса мыши на 35 день, т.е. через 14 дней после четвертой иммунизации. Для оценки базового ответа сыворотки кровь у мышей забирали, также, перед началом экспериментов по иммунизации в день 0.

Индукцию специфических антител у иммунизированных животных оценивали методом ELISA. В плашки добавляли по 2 мкг/лунку пептида M2e, конъюгированного с гемоцианином лимфы улитки (KLH), в объёме 100 мкл в PBS. Плашки инкубировали 2 часа при 4°C, промывали и блокировали PBST с 2% БСА. Сыворотку мышей разводили в 32 раза в PBS с последующим двукратным серийным разведением. Плашки инкубировали с мышьиной сывороткой (100 мкл/лунку) в течение 16 ч при 4°C. После инкубации плашки промывали 5 раз по 3 мин в PBS с 0,1% Tween 20 и добавляли антимышиные IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена (разведение 1: 5000, BioRad, США). Инкубацию с антимышиными IgG проводили 2 часа при 4°C. После промывки в лунки вносили субстрат для пероксидазы хрена (BioRad, США). Реакцию вели 45 минут в термостате при 25°C, оптическую плотность измеряли на длине 450 нм. Конечные титры антител определяли как последнее разведение сыворотки, при котором поглощение на 450 нм была достоверно выше, чем у мышей контрольной группы, иммунизированных препаратом ОРБ из нетрансформированных растений. Результаты выражали как среднее значение оптической плотности (OD) ± стандартное отклонение для групп мышей [420].

2.17. Статистический анализ

Все анализы проводили в трёх повторностях. Достоверность различий между вариантами анализировали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием программы Statistica 6.1 (StatSoft Inc, США).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Экспрессия рекомбинантного тауматина в трансгенных растениях томата

3.1.1. Влияние компартментализации на накопление рекомбинантного тауматина в трансгенных растениях табака

3.1.1.1. Конструирование векторов для экспрессии рекомбинантного тауматина II и получение трансгенных растений табака

Первым этапом наших исследований было изучение влияния внутриклеточной локализации на накопление рекомбинантного тауматина в трансгенных растениях. В качестве объекта исследований на этом этапе были использованы растения табака. В экспериментах были использованы варианты гена тауматина II, которые обеспечивали накопление рекомбинантного белка в различных компартментах клетки в зависимости от структуры экспрессируемой последовательности (Таблица 20) [421,422].

Таблица 20 - Варианты тауматина II, использованные в исследованиях по изучению влияния компартментализации на накопление рекомбинантного тауматина в трансгенных растениях табака.

Вариант тауматина II	Структура тауматина II	Предполагаемая локализация в клетке
th35	препроформа, нативная (с N и C- концевыми пептидами)	вакуолярная
mt	зрелая форма (без N и C- концевых пептидов)	цитоплазматическая
mtc	удален N-концевой сигнальный пептид	неизвестная
ubnt	удалена C-концевая последовательность	апопластная
ter	замена C-концевого пептида LELEDE на сигнал локализации в ЭПР HDEL	ЭПР

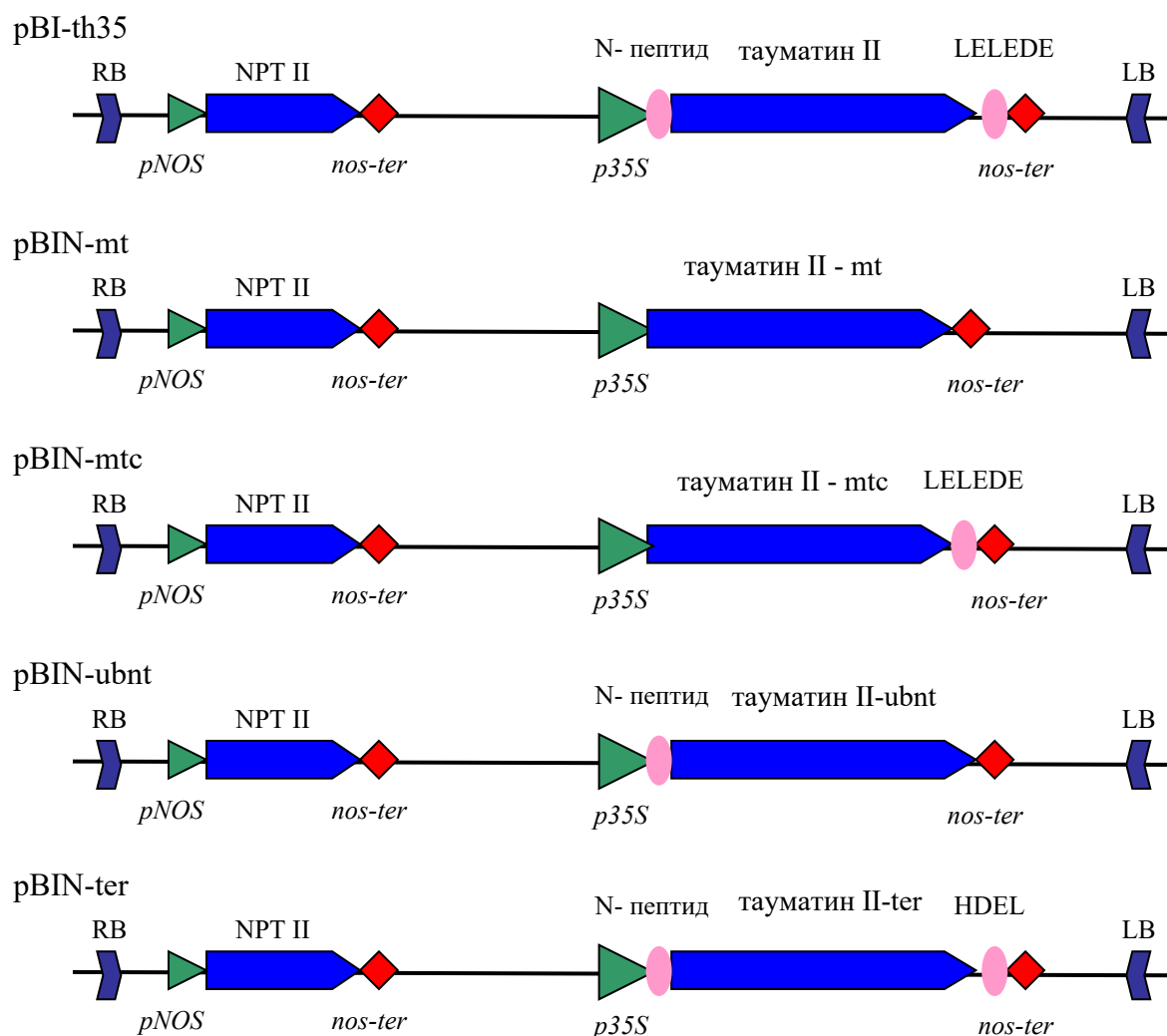


Рисунок 11 - Структура векторов, использованных в исследованиях по изучению влияния компартиментализации на накопление рекомбинантного тауматина в трансгенных растениях табака.

тауматин II (- mt, -mtc, -ubnt, -ter)- различные варианты тауматина II; N-пептид – N- концевой сигнальный пептид тауматина II, LELEDE- C-концевой пептид тауматина II, HDEL- сигнал локализации в ЭПР. *p35S* - 35S промотор вируса мозаики цветной капусты; *pNOS* - промотор гена нопалин-синтазы *A. tumefaciens*; *nos-ter*- терминатор гена нопалин-синтазы *A. tumefaciens*; LB и RB- левый и правый граничные повторы T-DNA.

Нуклеотидные последовательности, кодирующие различные варианты тауматина II, были клонированы в вектор pBI121 под контроль 35S промотора CaMV. Полученные векторы (Рисунок 11) были перенесены в *A. tumefaciens* CBE21 и использованы для трансформации табака. Результаты агробактериальной трансформации табака представлены в Таблице 21.

Таблица 21 - Результаты трансформации табака различными вариантами тауматина II.

Вектор	Количество экз-плантов	Количество во Км ^r линий	Количество проанализированных методом ПЦР линий	Тауматин II-позитивных линий
pBI-th35	25	16	12	11
pBIN-mt	25	17	12	11
pBIN-mtc	25	21	12	10
pBIN-ubnt	25	18	12	12
pBIN-ter	25	16	12	11

В результате проведенных экспериментов было получено от 16 (вектора pBI-th35, pBIN-ter) до 21 (вектор pBIN-mtc) канамициноустойчивой линии, трансформированной использованными векторами. После подтверждения методом ПЦР отсутствия агробактериальной контаминации, 12 линий, полученных после трансформации каждым вектором, были проанализированы на присутствие нуклеотидной последовательности тауматина II.

В результате проведенного анализа ДНК канамициноустойчивых линий, было получено 11 (трансформация векторами pBI-th35, pBIN-ter и pBIN-ubnt) или 12 (вектора pBIN-mt и pBIN-mtc) трансгенных линий табака со вставкой целевой нуклеотидной последовательности (Таблица 21, Рисунок 12). После укоренения

трансгенные растения табака были высажены в теплицу, где они культивировались до проведения последующих экспериментов.

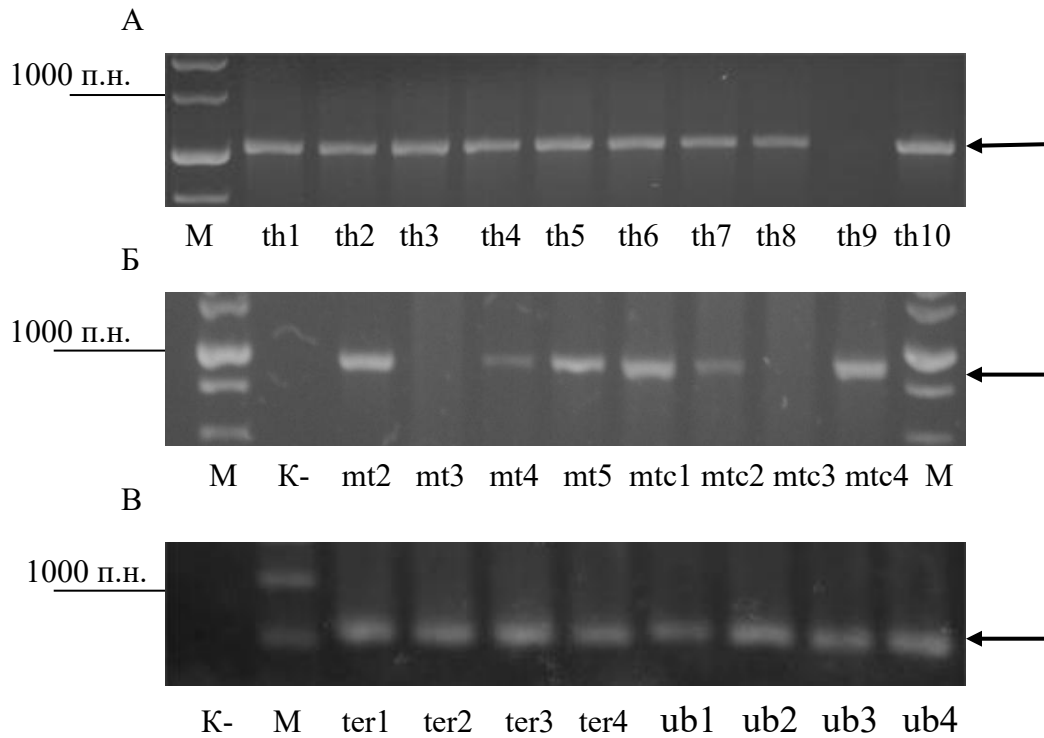


Рисунок 12 – ПЦР - анализ некоторых линий табака, полученных после трансформации векторами pVI-th35 (А); pVIN-mt и pVIN-mtc (Б); pVIN-ter и pVIN-ubnt (В).

Цифрами обозначены различные линии трансгенных растений, К- - геномная ДНК нетрансгенных растений, М- маркеры молекулярной массы ДНК. Стрелкой показан ПЦР- фрагмент, соответствующий нуклеотидной последовательности тауматина II, расчетная длина амплифицируемого фрагмента- 878 п.н.

3.1.1.2. Анализ экспрессии тауматина II в трансгенных растениях табака

Анализ экспрессии тауматина II в трансгенных растениях проводили методом Вестерн блот- анализа. В растениях табака, трансформированных вектором pBIN-*mt*, тауматин не детектировался. Это показывает, что накопления рекомбинантного тауматина в цитоплазме не происходило. В трансгенных растениях, трансформированных вектором pBIN-*mtc* (сохранён С- концевой пептид LELEDE) тауматин также не детектировался. По-видимому, пептид LELEDE сам по себе был не способен обеспечить транспорт тауматина в компартменты, где он мог бы накапливаться на детектируемом уровне [421].

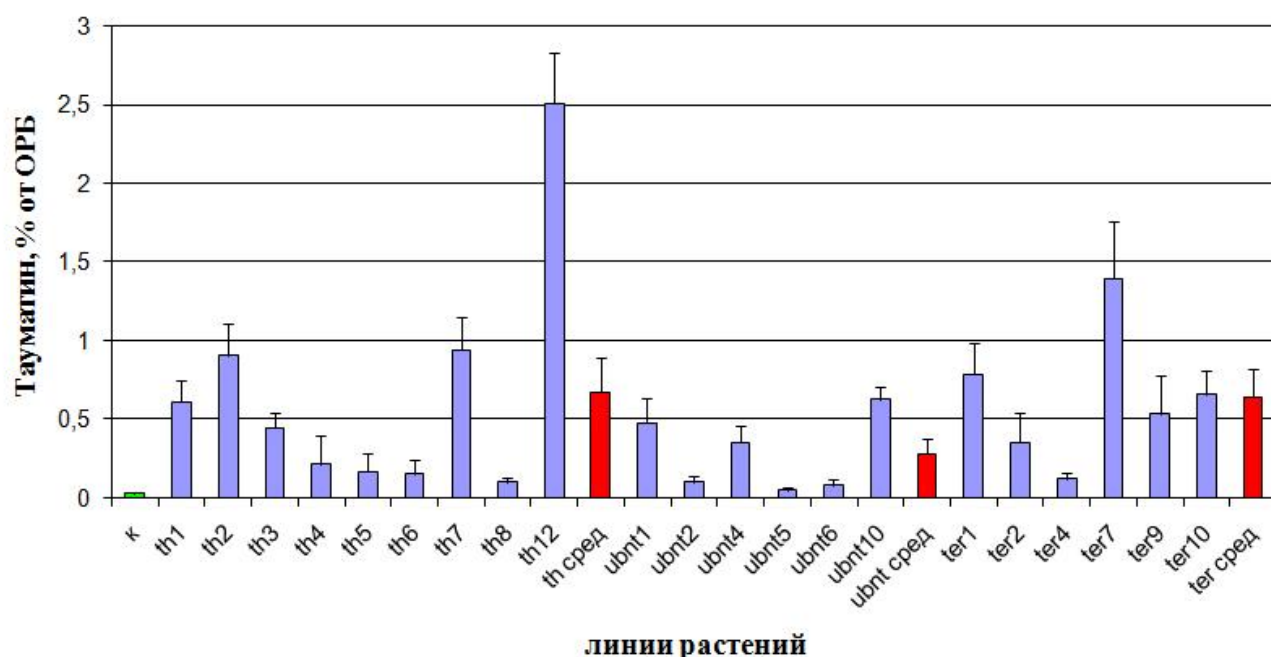


Рисунок 13 - Накопление рекомбинантного тауматина в трансгенных растениях табака, трансформированных векторами pBI-th35, pBIN-ubnt и pBIN-ter.

Цифрами обозначены различные линии трансгенных растений, К-нетрансгенное растение.

В растениях, трансформированных векторами pBI-th35, pBIN-ter, pBIN-ubnt рекомбинантный тауматин накапливался в большинстве изученных линий (Рисунок 13). Тауматин детектировался на уровне около 22 кДа и мигрировал на одном уровне со зрелым тауматином (22,4 кДа, Рисунок 14), что указывало на отщепление N- терминального сигнального пептида. Листья трансгенных растений характеризовались отчётливо выраженным сладким вкусом с характерным для тауматина послевкусием, что также подтверждает корректный процессинг тауматина в трансгенных растениях.

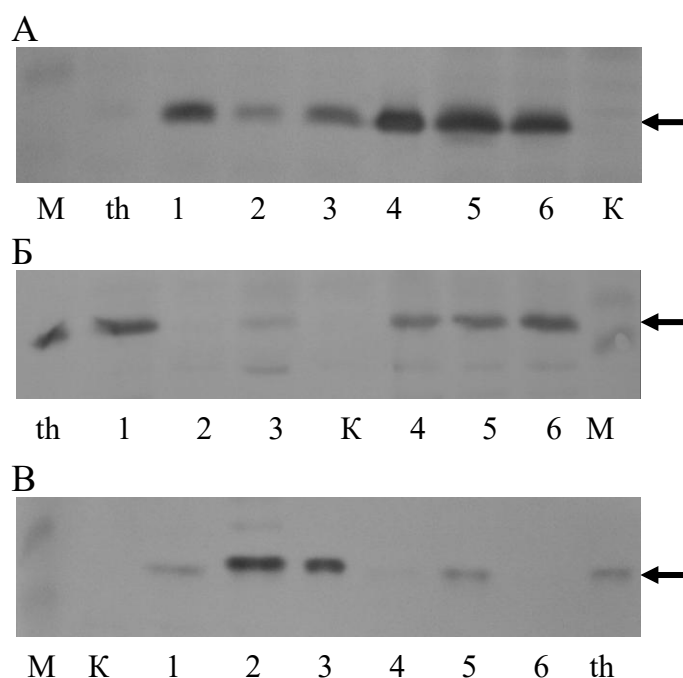


Рисунок 14 - Вестерн блот анализ экспрессии тауматина II в некоторых трансгенных линиях табака.

А. Линии, трансформированные вектором pBI-th35. Б. Линии, трансформированные вектором pBIN-ter. В. Линии, трансформированные вектором pBIN-ubnt. Цифрами обозначены линии трансгенных растений. М-маркер молекулярной массы, th- тауматин (25 нг, «Sigma», США), К-нетрансгенное растение. Стрелкой показана полоса, соответствующая тауматину.

Результаты количественного анализа экспрессии тауматина II в листьях представлены на Рисунке 13. В среднем, накопление тауматина в линиях

трансформированных вектором pBI-th35 составило 0,61% от ОРБ, вектором pBIN-ter- 0,64%, pBIN-ubnt- 0,28%. Различия между вариантами pBI-th35 и pBIN-ter не были статистически достоверными. В тоже время удаление С- концевой пептида тауматина LELEDE с сохранением его N- концевой последовательности (вариант ubnt) привело к снижению накопления тауматина почти в два раза- до 0,28%. Необходимо отметить, что среди линий, полученных после трансформации векторами pBI-th35 и pBIN-ter, выявлены линии th12 и ter7 с высоким содержанием рекомбинантного тауматина в листьях (2,5% и 1,4% от ОРБ, соответственно), что может быть связано с эффектом положения трансгена [421].

Для подтверждения апопластной локализации тауматина в растениях, трансформированных вектором pBIN-ubnt, была проведена экстракция апопластной жидкости из межклеточного пространства трансгенных растений. В качестве контрольных были использованы трансгенные растения, полученные после трансформации векторами pBI-th35 и pBIN-ter, которые экспрессируют формы тауматина с нативной (предположительно вакуолярной) локализацией или с локализацией в ЭПР.

Методом Вестерн блот анализа было показано, что рекомбинантный тауматин в растениях линий ubnt накапливался, главным образом, в апопластном пространстве (Рисунок 15). В тоже время, тауматин в апопластном пространстве контрольных растений линий th35 и ter ожидаемо не детектировался. В ткани, оставшейся после экстракции апопластной жидкости, тауматин детектировался во всех изученных линиях. Необходимо отметить, что в трансгенных линиях ubnt транспорт рекомбинантного тауматина в межклеточное пространство происходил с высокой эффективностью, накопление рекомбинантного тауматина происходило, преимущественно, в межклеточной жидкости [421].

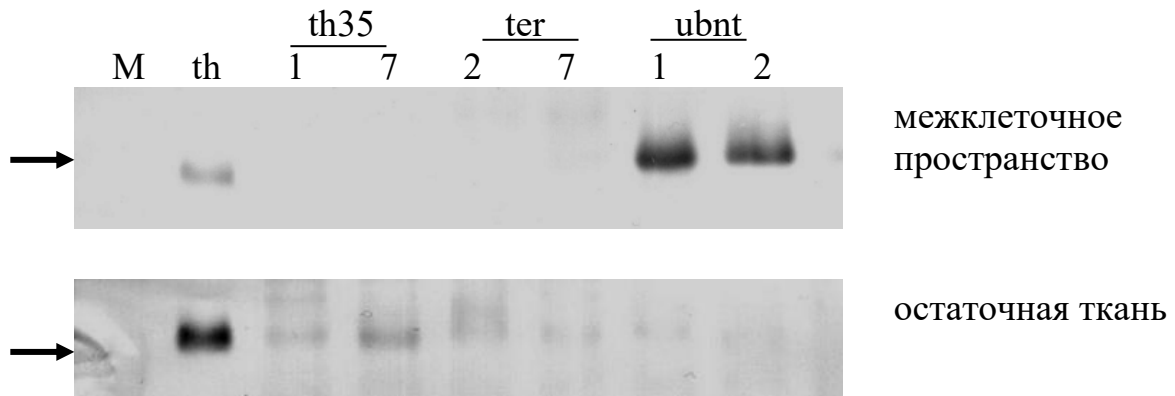


Рисунок 15 - Анализ апопластной локализации рекомбинантного тауматина II в трансгенных растениях. th35- растения, трансформированные вектором pVI-th35, ter- вектором pVIN-ter, ubnt- вектором pVIN-ubnt. Цифрами обозначены номера линий.

Межклеточное пространство- препараты апопластной жидкости, остаточная ткань- препараты, полученные из листовой ткани после экстракции апопластной жидкости. М- маркер молекулярной массы, th- тауматин (25 нг, «Sigma», США. Стрелкой показана полоса, соответствующая тауматину.

Исходя из данных денситометрического анализа, более 90% рекомбинантного тауматина детектировалось в апопласте листовой ткани (Рисунок 16): 94,7% в линии ubnt1 и 92,6% - в линии ubnt2. Таким образом, N-концевой сигнальный пептид тауматина эффективно функционировал в растениях табака. Важно отметить, что нами не было детектировано признаков деградации рекомбинантного тауматина при его локализации в апопластном пространстве.

Точная компартиментализация тауматина в клетках *T. daniellii* неизвестна. Еще в работе Edens с соавторами (1982) было показано, что тауматин синтезируется в виде препроформы, содержащей N- и C- концевые пептиды, которые отсутствуют в зрелом тауматине, выделенном из присемянников катемфе [244]. Аминотерминальная последовательность препротауматина (а.о. 1-22) является сигнальной последовательностью для транслокации белков в ЭПР и, следовательно, играет важную роль во внутриклеточном транспорте тауматина.

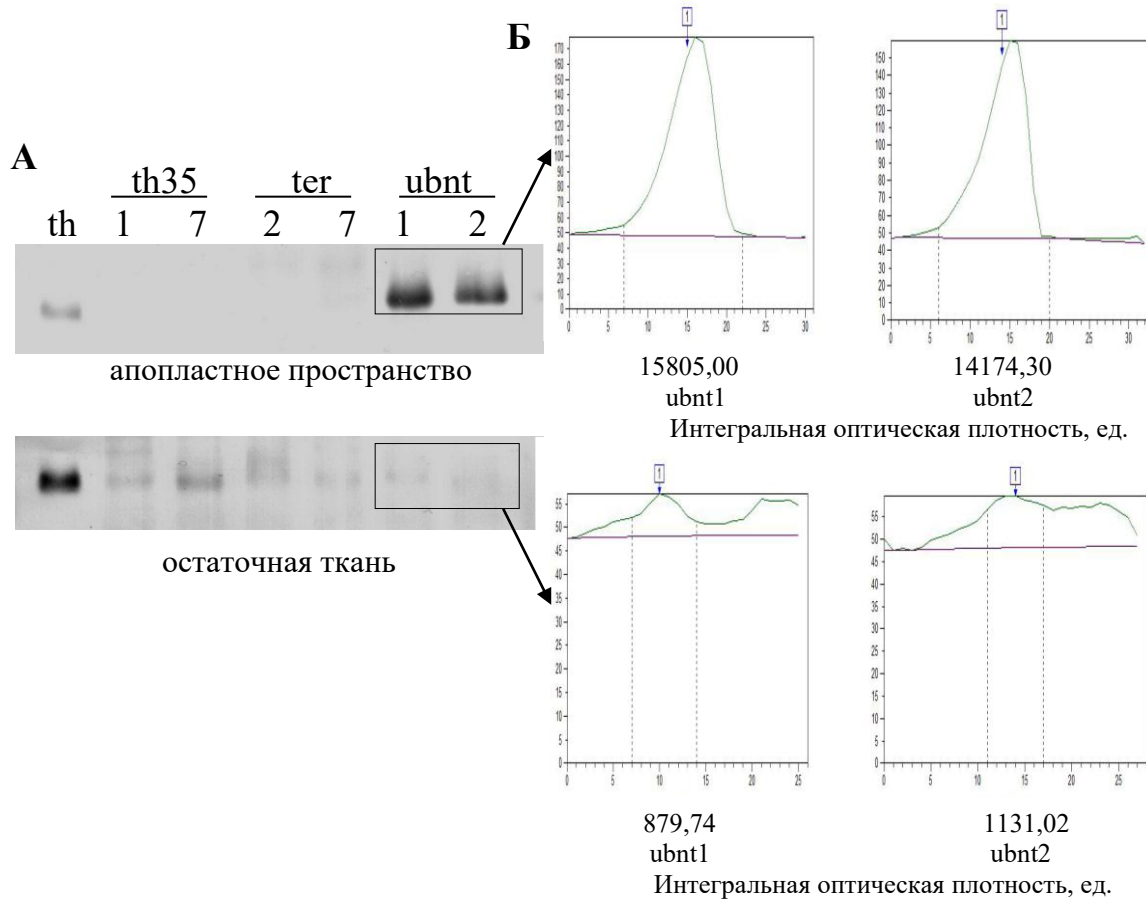


Рисунок 16 - Анализ распределения рекомбинантного тауматина II в листовой ткани трансгенных растений. А. Вестерн блот анализ трансгенных растений табака. Б. Денситометрический анализ иммунореактивных полос тауматина II (в рамке) в апопластном пространстве и остаточной ткани растений табака линий ubnt1 и ubnt2.

В ходе процессинга препратауматина происходит, также, отщепление С-концевого пептида LELEDE (а.о. 230-235), функция которого до сих пор не ясна. Исходя из того, что (а) зрелая форма тауматина не накапливается в цитоплазме или апопласте и (б) удаление пептида LELEDE при сохранении аминотерминального сигнального пептида ведёт к накоплению тауматина в апопласте, мы предполагаем, что последовательность LELEDE является сигналом внутриклеточного транспорта. Необходимо отметить, что аминокислотная

последовательность LELEDE не демонстрирует гомологии с известными сигналами удержания белков в ЭПР или вакуолярного сортирования, следовательно, для выяснения функций С-концевого пептида LELEDE требуется проведение дальнейших исследований.

Таким образом, максимальное накопление тауматина было получено в растениях табака, трансформированных геном тауматина в препроформе с собственными N- и С- концевыми пептидами [421]. Исходя из этих данных, для разработки экспрессионной системы в дальнейших экспериментах был использован вектор pVI-th35.

3.1.2. Агробактериальная трансформация растений томата геном тауматина II

В экспериментах по получению трансгенных растений томата, для агробактериальной трансформации было использовано 300 эксплантов. Индукция каллусов наблюдалась после 3-х недель культивирования на селективной среде, содержащей канамицин. Когда каллусы достигали размера 2-3 мм, их отделяли от эксплантов и переносили на свежую среду. В течение двух месяцев культивирования 70% каллусов отмирали, оставшиеся каллусы активно росли на среде с Km. Регенерация побегов начиналась после 4 месяцев роста каллусов на селективной среде, в среднем на одном регенерирующем каллусе образовывалось по 2 адвентивных побега. На этапе укоренения на среде с канамицином погибало 30% регенерантов, остальные укоренялись и росли без признаков токсического действия селективного антибиотика (Рисунок 17). Всего было получено 23 устойчивых к канамицину растения, каждое результат независимого трансформационного события.

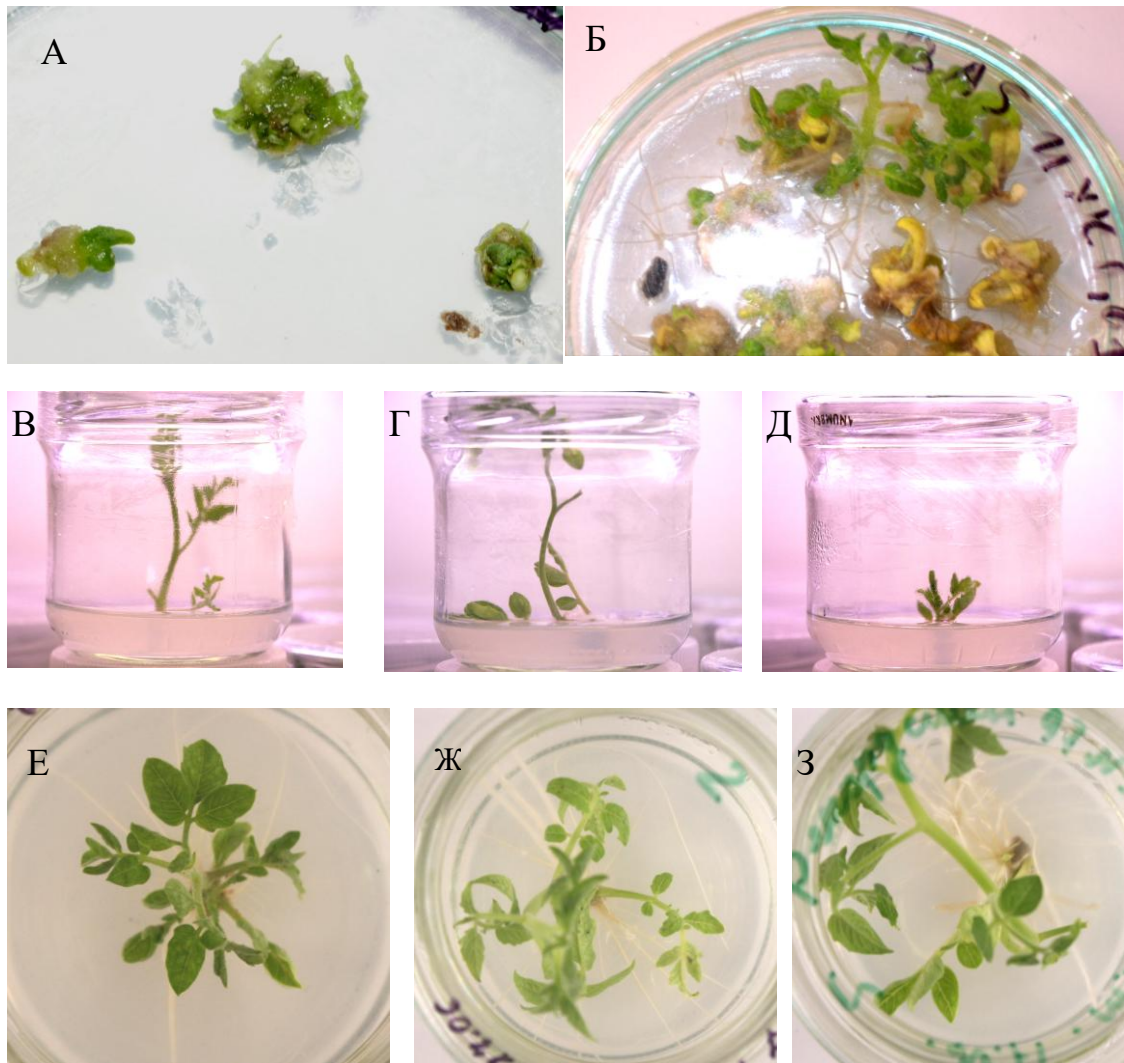


Рисунок 17 - Агробактериальная трансформация томата линии Ялф. А. Индукция адвентивных побегов после трансформации на среде, содержащей канамицин. Б. Селекция канамициноустойчивых побегов после 4 месяцев культивирования эксплантов на среде с канамицином. В, Г, Д. Трансформанты томата, на среде укоренения, содержащей канамицин. Е, Ж, З. Различные линии трансгенных томатов, укоренившиеся на среде с канамицином.

Отсутствие агробактериальной контаминации в канамициноустойчивых линиях растений подтверждали методом ПЦР- амплификации гена *virB1 A. tumefaciens*. Интеграция гена NPT II в геном всех 23 проанализированных канамициноустойчивых линий была подтверждена методом ПЦР (Рисунок 18, А).

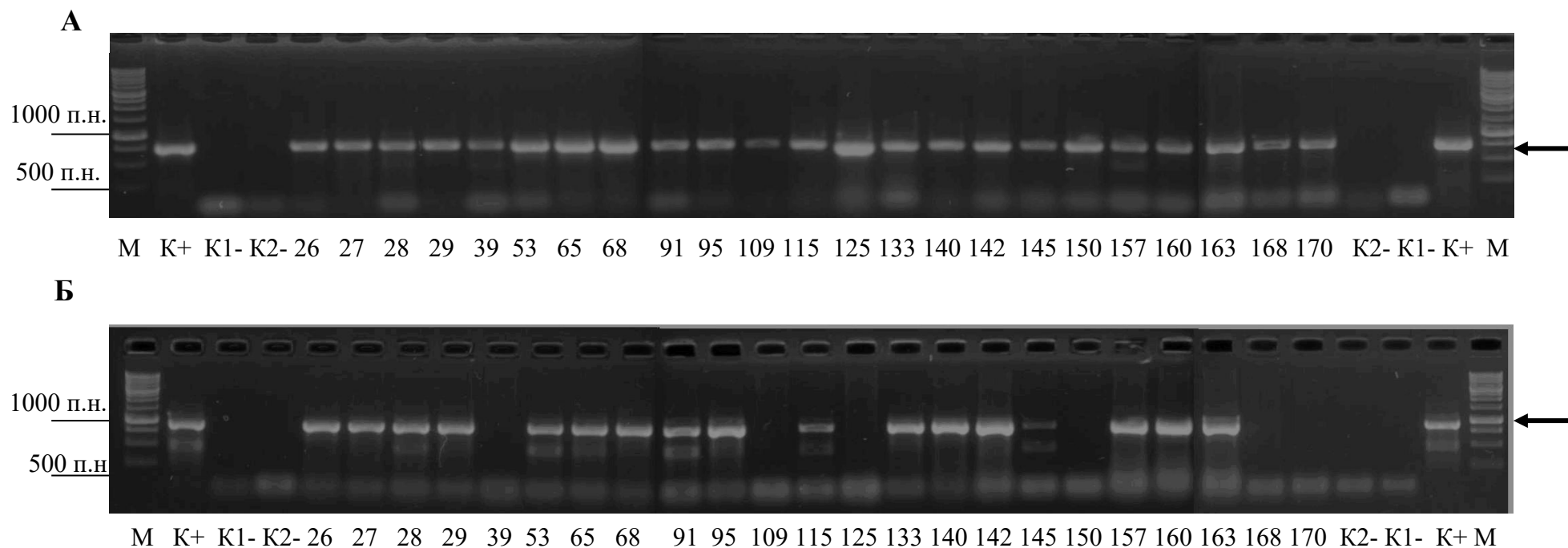


Рисунок 18 - ПЦР анализ трансгенных растений томата на присутствие последовательности гена *nptII* (А) и гена тауматина II (Б).

М- маркер молекулярной массы; стрелками показаны фрагменты, соответствующие амплифицируемым последовательностям генов *nptII* (ожидаемая длина фрагмента- 742 п.о.) и тауматина II (ожидаемая длина фрагмента- 878 п.о.). К⁺- ДНК плазмиды pVI-th35; К1- в качестве матрицы была добавлена вода; К2- ДНК нетрансгенного растения томата сорта ЯЛФ. Цифрами обозначены различные трансгенные линии.

Фрагмент гена тауматина II ожидаемой длины (878 п.н.) амплифицировался в 17 растениях из 23 (Рисунок 18, Б). Интеграция целевого гена тауматина не детектировалась в линиях 39, 109, 125, 150, 168 и 170. Это может быть обусловлено тем фактом, что гетерологичные гены, переносимые в составе одной Т-ДНК, в процессе агробактериальной трансформации могут подвергаться реорганизации, в частности делециям, разрывам и различным перестройкам нуклеотидной последовательности [423].

В результате проведённой агробактериальной трансформации нами было получено 17 линий томатов, трансформированных геном тауматина II, каждая результат независимого трансформационного события. Результаты экспериментов по генетической трансформации томатов представлены в Таблице 22.

Таблица 22 - Результаты трансформации растений томата линии Ялф вектором pVI-th35.

Количество экс-плантов	Количество Км ^r линий	Количество проанализированных методом ПЦР линий	НРТII-положительных линий	Тауматин II-положительных линий
300	23	23	23	17

После подтверждения трансгенного статуса, трансформанты линий T26, T27, T28, T29, T53, T68, T91, T95, T115, T140, T145 и T157 были размножены и высажены в теплицу для дальнейшего роста и изучения. Также, для использования в качестве отрицательного контроля, были размножена и высажена в теплицу трансгенная линия T168 (присутствует нуклеотидная последовательность гена НРТII, нуклеотидная последовательность гена тауматина II не детектировалась). В процессе культивирования трансгенных растений томата в теплице между ними и контрольными нетрансформированными растениями не

наблюдалось каких-либо различий, трансгенные растения нормально росли и развивались, регулярно цвели и плодоносили.

3.1.3. Анализ экспрессии тауматина II в трансгенных растениях томата

3.1.3.1. Анализ экспрессии тауматина II в листьях трансгенных растений томата

Органолептический анализ листьев трансгенных линий томата выявил присутствие сладкого вкуса, характерного для тауматина, в некоторых из проанализированных линий, в других линиях сладкий вкус детектировался на слабом уровне или не детектировался вовсе. Нами была проведена оценка содержания рекомбинантного тауматина II в листьях трансгенных растений методом ИФА, полученные результаты представлены в Таблице 23.

В результате проведенных исследований показано, что в 10 из 13 изученных линий наблюдалась экспрессия гена тауматина II и накопление рекомбинантного белка. В трех линиях - T27, T145 и T168 тауматин II не детектировался, либо вследствие отсутствия его экспрессии, либо по причине низкого уровня накопления. Отсутствие экспрессии тауматина II в этих линиях может быть обусловлено рядом причин, в том числе эффектами положения или «замолкания» трансгена, или мутациями в последовательности ДНК, кодирующей тауматин II, возникающими в процессе агробактериального переноса T-ДНК в растительную клетку или её интеграции в геном растений. Возможно, что такие мутации не детектируются методом ПЦР-анализа (при изучении интеграции гена тауматина II в геном растения), приводят к сдвигу рамки считывания в нуклеотидной

последовательности гена тауматина и, как следствие, к отсутствию его экспрессии.

Таблица 23 - Количественная оценка накопления рекомбинантного тауматина II в линиях трансгенных растениях томата Ялф.

Линия трансгенных растений	Содержание тауматина II в листовых тканях, % от общего белка	Оценка сладкого вкуса в листьях трансгенных растений
T26	0,06±0,02	хорошо выраженный
T27	н.д.	не детектировался
T28	0,02±0,01	слабо выраженный
T29	0,02±0,008	слабо выраженный
T53	0,02±0,007	слабо выраженный
T68	0,03±0,012	слабо выраженный
T91	0.06±0,018	хорошо выраженный
T95	0,13±0,021	хорошо выраженный
T115	0,03±0,006	слабо выраженный
T140	0,007±0,002	не детектировался
T145	н.д.	не детектировался
T157	0,17±0,03	хорошо выраженный
T163	0,01±0,007	не детектировался
T168	н.д.	не детектировался
Ялф	н.д.	не детектировался

н.д.- тауматин II не детектировался

В остальных линиях наблюдались различные уровни экспрессии тауматина (Таблица 23). Наивысшее накопление рекомбинантного тауматина наблюдалось в

листьях трансгенных линий T26, T91, T95 и T157. Содержание тауматина в листьях растений этих линий варьировало в диапазоне от 0,06% (линии T26 и T91) до 0,17% (линия T157) от ОРБ. В остальных изученных линиях накопление тауматина было ниже и варьировало в диапазоне 0,007-0,02% от ОРБ [424].

Результаты органолептического анализа листьев хорошо коррелировали с накоплением рекомбинантного тауматина. В линиях, не экспрессирующих тауматин (T27, T145 и T168), а также в линиях с низким уровнем его накопления (T140 и T163, 0,007% и 0,01% рекомбинантного тауматина от ОРБ), сладкий вкус не детектировался. В линиях T28, T68 и T53 (накопление рекомбинантного тауматина 0,02-0,03% от ОРБ) в листьях детектировался несильный, но четко выраженный сладкий вкус.

В листьях линий с высоким уровнем аккумуляции рекомбинантного тауматина (T26, T91, T95 и T157) детектировался хорошо заметный сладкий вкус, с несильным, но отчетливо выраженным послевкусием, характерным для тауматина. Наличие такого вкуса дополнительно подтверждает экспрессию и корректный процессинг тауматина в трансгенных томатах. Листья нетрансгенных растений линии Ялф характеризовались типичным для листьев томата вкусом, без признаков сладкого вкуса или послевкусия.

Исходя из результатов количественной оценки накопления рекомбинантного тауматина II в листьях и их органолептического анализа, из дальнейших экспериментов были исключены линии трансгенных растений, не экспрессирующие тауматин (линии T27, T145 и T168) или с низким уровнем его накопления (линии T140 и T163).

Дополнительно экспрессия тауматина в листьях трансгенных растений была подтверждена методом Вестерн блот анализа (Рисунок 19). Рекомбинантный тауматин в трансгенных растениях детектировался в виде единичной полосы молекулярной массой около 22 кДа, мигрирующей на одном уровне со зрелым тауматином (22,4 кДа). Это свидетельствует об отщеплении N-концевого сигнального пептида и, следовательно, подтверждает корректный процессинг

препротауматина в растениях томата. Необходимо отметить отсутствие признаков деградации рекомбинантного тауматина в листьях томата, что указывает на его стабильность в этой экспрессионной системе.

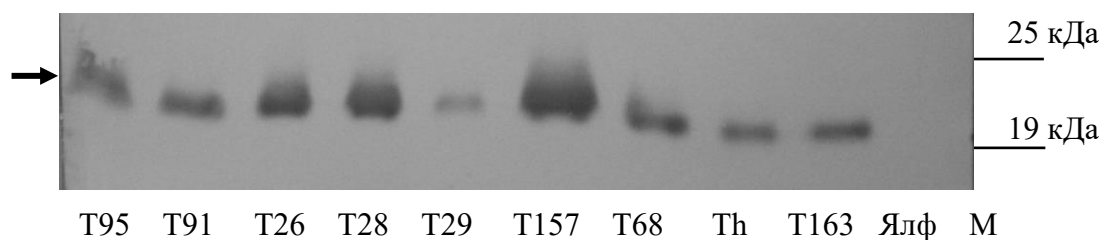


Рисунок 19 - Вестерн блот анализ экспрессии тауматина в листьях некоторых трансгенных растений томата. М- маркер молекулярной массы; Th - положительный контроль, тауматин II, 50 нг; Ялф - негативный контроль, нетрансформированные растения томата. Стрелкой показана полоса, соответствующая рекомбинантному тауматину.

3.1.3.2. Анализ экспрессии тауматина II в плодах трансгенных растений томата

3.1.3.2.1. Органолептический анализ плодов трансгенных растений

томата

Для органолептического анализа были использованы плоды трансгенных линий томата, продемонстрировавших сладкий вкус листьев. В качестве контрольных были использованы плоды нетрансгенных растения томата линии Ялф. Для анализа были использованы плоды разной степени зрелости- зелёные, технической зрелости и биологической зрелости. Сбор плодов, выращенных в теплице, и их органолептический анализ проводили в июне в течение 3 лет, с

участием группы из 10-12 экспертов. Результаты органолептического анализа плодов трансгенных томатов представлены в Таблице 24.

Из полученных результатов следует, что плоды линий, трансформированных геном тауматина II, обладали заметно более сладким вкусом, чем плоды нетрансгенных растений томата. Выраженность вкуса тауматина зависела от степени зрелости плодов. В зелёных плодах, диаметром 4-5 см, сладкий вкус не детектировался испытателями, или детектировался как очень слабый, на грани чувствительности. В то же время, в плодах технической степени зрелости, сладкий вкус ощущался очень отчетливо (за исключением линий T68 и T115). В плодах линий T26, T91, T95 и T157 детектировалось, также, характерное для тауматина послевкусие, продолжительностью 5-10 мин.

В плодах, достигших биологической зрелости, вкус тауматина ощущался очень заметно. Плоды линий T26, T91, T95 и T157 характеризовались сильным сладким вкусом с длительным, до 30 мин, послевкусием. В линиях T53, T115 и T68 сладость плодов была меньше, но, тем не менее, отчетливо выраженной, незначительно варьируя по годам. Плоды линий T28 и T29 занимали промежуточное положение, их сладкий вкус был хорошо выражен, с типичным для тауматина послевкусием, длительностью 10-15 мин.

В пределах одной линии степень сладости плодов незначительно варьировала по годам, оставаясь весьма стабильной. Различия между линиями за период исследований также оставались постоянными. Это указывает на стабильность экспрессии гена тауматина II в трансгенных растениях. Степень сладости плодов определялась, главным образом, их зрелостью. Так, полностью зрелые плоды характеризовались гораздо более выраженным сладким вкусом, чем плоды в состоянии технической зрелости. Это позволяет предполагать возможность накопления рекомбинантного тауматина в плодах по мере их созревания и его высокую стабильность в тканях плодов томата.

Таблица 24 - Результаты органолептического анализа сладости плодов трансгенных линий томата, трансформированных геном тауматина II.

Линия	Зрелость плодов									Примечания
	зелёные			техническая			биологическая			
	2009	2010	2011	2009	2010	2011	2009	2010	2011	
	Степень сладости плодов, баллов									
T26	2,1±0,31	2,1±0,27	1,0±0,21	3,2±0,19	3,2±0,27	3,3±0,11	5,0±0,27	4,9±0,41	5,0±0,33	Сильное послевкусие
T28	2,2±0,25	1,2±0,18	2,3±0,33	3,3±0,37	2,3±0,33	3,0±0,14	4,2±0,73	3,9±0,61	4,1±0,37	
T29	2,2±0,17	2,3±0,29	1,0±0,11	3,1±0,25	3,1±0,22	2,2±0,33	4,0±0,64	4,3±0,66	4,1±0,54	
T53	1,0±0,09	1,2±0,11	1,2±0,24	2,2±0,27	3,0±0,21	2,1±0,23	3,1±0,30	3,0±0,41	4,2±0,52	
T68	1,3±0,10	1,2±0,19	2,2±0,22	2,2±0,18	1,2±0,19	2,4±0,22	3,0±0,28	2,9±0,37	3,2±0,18	
T91	2,2±0,28	2,2±0,37	2,2±0,26	3,3±0,11	3,3±0,21	3,0±0,17	4,8±0,81	4,9±0,75	5,0±0,92	Сильное послевкусие
T95	2,2±0,18	2,3±0,21	2,0±0,26	3,4±0,33	3,0±0,17	3,0±0,23	4,8±0,90	4,4±0,88	5,0±0,73	Сильное послевкусие
T115	1,2±0,11	1,1±0,06	1,3±0,19	2,2±0,22	1,1±0,25	1,1±0,18	3,3±0,26	3,0±0,31	3,1±0,38	
T157	1,3±0,19	2,2±0,21	2,1±0,37	2,0±0,12	3,1±0,11	3,2±0,27	4,1±0,47	4,2±0,39	4,9±0,73	Сильное послевкусие
Ялф	1,1±0,12	1,0±0,18	1,0±0,16	3,1±0,17	3,0±0,12	3,2±0,20	4,0±0,51	4,0±0,39	4,2±0,41	

1- не ощущается сладкий вкус; 2- сладкий вкус ощущается очень слабо; 3- сладкий вкус ощущается отчетливо; 4- хорошо выраженных сладкий вкус; 5- сильный сладкий вкус

Вкус зрелых плодов томата, особенно линий T26, T91, T95 и T157, отличался от вкуса плодов нетрансгенных контрольных растений (Рисунок 20). Он оценивался испытателями как излишне сладкий, ненатуральный («химический»), не характерный для томата. Это дополнительно подтверждает вкус тауматина как недостаточно «сахароподобный». Длительное послевкусие (в среднем 20-30 мин, у некоторых испытателей и более), возникающее после употребления плодов, оценивалось всеми испытателями негативно. В целом, вкус зрелых томатов линий T26, T28, T29, T91, T95 и T157 оценивался испытателями ниже, чем вкус контрольных нетрансгенных растений.

В то же время, общий вкус зрелых плодов линий T68 и T115 оценивался испытателями выше, чем вкус нетрансгенных растений линии Ялф. Особенно эти различия были заметны на стадии технической зрелости. На стадии биологической зрелости плоды этих линий оценивались как более сладкие, чем плоды исходной линии Ялф, при этом характерное для тауматина послевкусие было выражено незначительно.

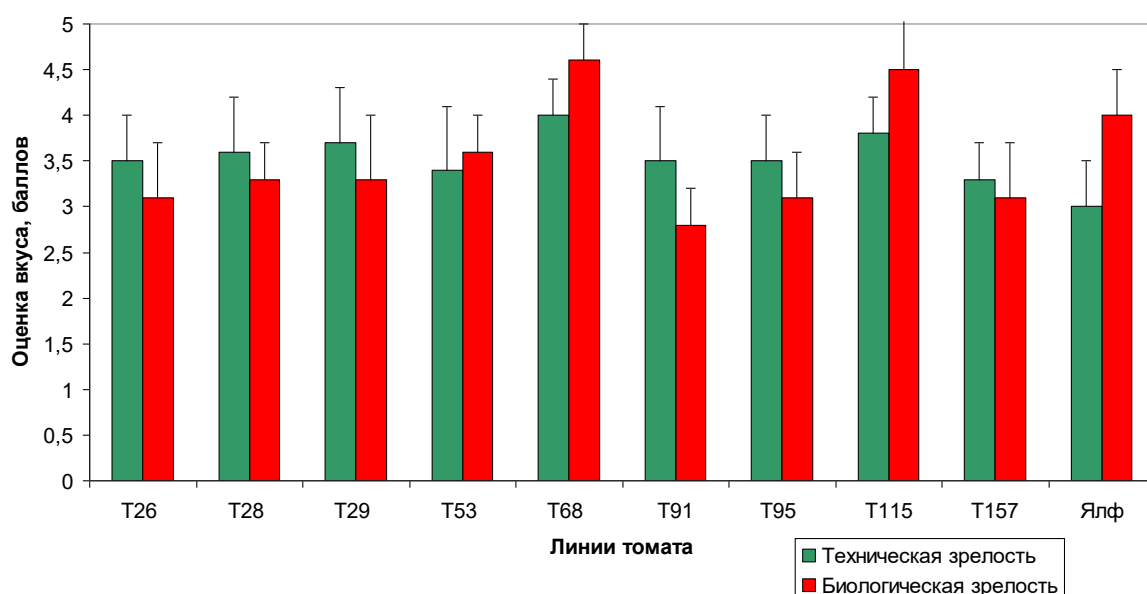


Рисунок 20 - Результаты оценки общего вкуса плодов трансгенных линий томата и нетрансформированных растений томата Ялф. Представлены усреднённые данные за 2009-2011 гг.

Важно отметить, что вкус плодов томатов трансгенных линий на стадии технической зрелости оценивался выше, чем вкус контрольных плодов линии Ялф, хотя усиление сладости плодов на этой фазе их созревания было выражено незначительно. Это может быть связано со свойством тауматина выступать усилителем вкуса [265]. Это свойство тауматина обуславливает, по-видимому, более выраженный собственный вкус плодов трансгенных линий на стадии технической зрелости. В результате их общий вкус стабильно оценивался как более высокий по сравнению со вкусом плодов контрольных растений. Этот факт представляет интерес для целей прикладной селекции, так как сбор плодов томата для потребления или переработки производится именно на стадии технической зрелости.

3.1.3.2.2. Количественный анализ накопления рекомбинантного тауматина II в плодах трансгенных растений томата

Экспрессия рекомбинантного тауматина II в зрелых плодах трансгенных растений томата была дополнительно подтверждена методом Вестерн блот анализа (Рисунок 21). Рекомбинантный тауматин в трансгенных плодах детектировался в виде единичной полосы молекулярной массой около 22 кДа, мигрирующей на одном уровне со зрелым тауматином (22,4 кДа). Это подтверждает отщепление N-концевого сигнального пептида и, следовательно, корректный процессинг препротауматина в плодах. Необходимо отметить отсутствие признаков деградации рекомбинантного тауматина, что подтверждает его стабильность в плодах томата [424].

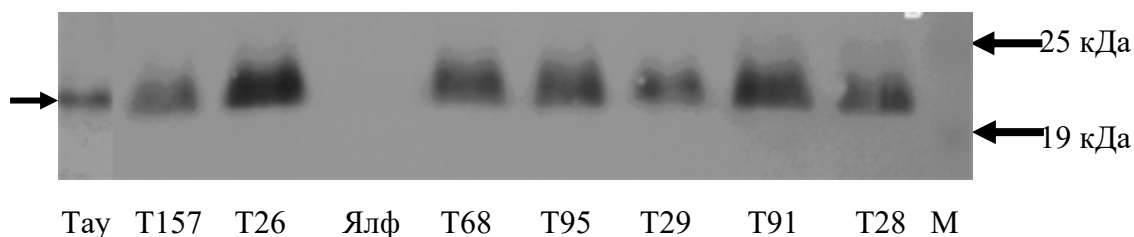


Рисунок 21 - Вестерн блот анализ экспрессии тауматина в плодах некоторых трансгенных растений томата. М- маркер молекулярной массы; Тау- положительный контроль, тауматин II, 50 нг; Ялф- негативный контроль, нетрансформированные растения томата. Стрелкой показана полоса, соответствующая рекомбинантному тауматину.

Анализ содержания тауматина в зрелых плодах томата был выполнен методом ИФА (Рисунок 22). Для анализа были использованы линии, плоды которых характеризовались наиболее выраженным сладким вкусом. Максимальное накопление тауматина наблюдалось в линиях 91 и 26- $46,4 \pm 10,5$ и $41,3 \pm 12,3$ мкг тауматина/мг общего растворимого белка (4,6% и 4,1% ОРБ соответственно, среднее за период исследований). Наименьшая экспрессия тауматина наблюдалось в трансгенной линии 29- $17,6 \pm 6,1$ мкг/мг (1,8% ОРБ). В остальных изученных линиях накопление тауматина варьировало в диапазоне от 24,1 до 32,1 мкг/мг общего белка (2,4-3,2% от ОРБ).

Накопление рекомбинантного тауматина в пределах одной линии по годам варьировало незначительно. Различия между линиями по уровню аккумуляции тауматина за период проведения анализов, также, были постоянными и не варьировали (Рисунок 22). Полученные данные (а также данные органолептического анализа плодов) указывают на стабильный характер экспрессии гена тауматина II в трансгенных растениях томата [424].

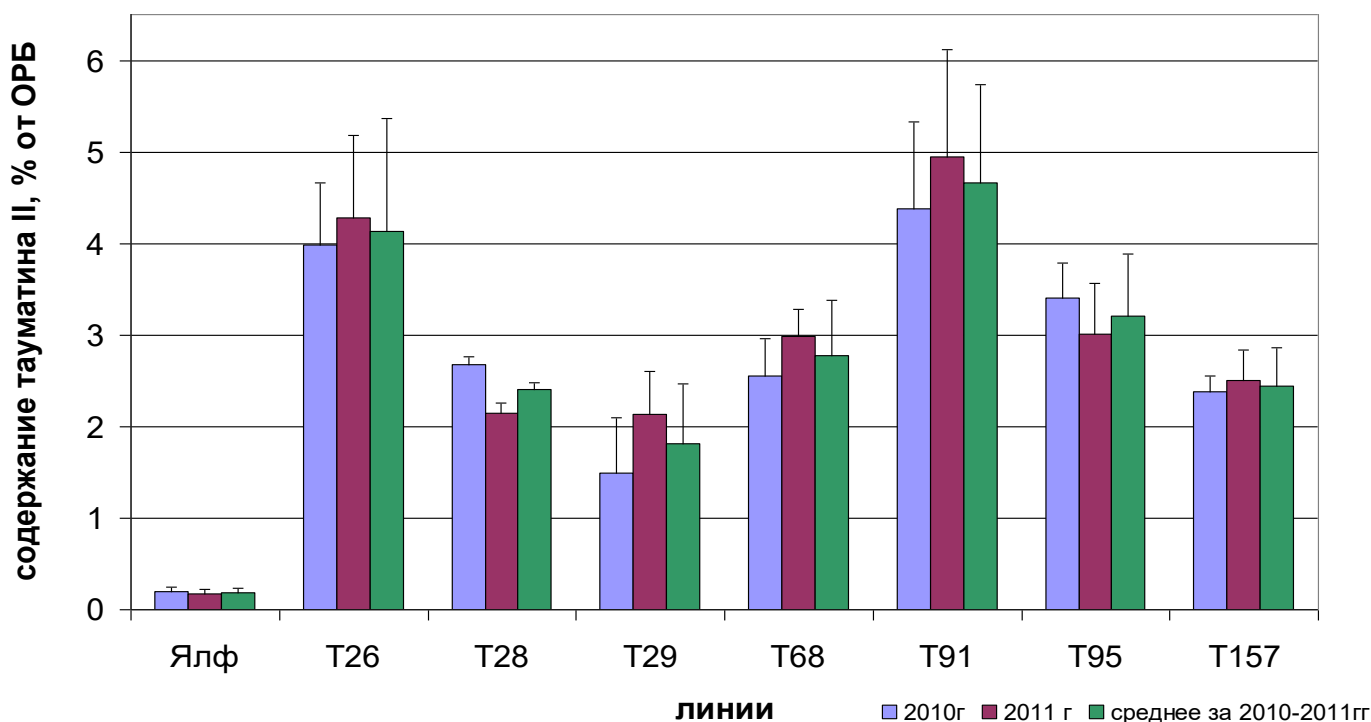


Рисунок 22 - Анализ содержания рекомбинантного тауматина II в плодах трансгенных линий томата методом ИФА. Ялф- нетрансформированные растения томата; T26-T157 - различные трансгенные линии. Представлены результаты измерений 2010 и 2011гг, а также среднее за эти годы.

Наблюдающиеся уровни экспрессии рекомбинантного тауматина являются весьма высокими. В случае ядерной трансформации, накопление целевых белков в большинстве исследований находится на уровне десятых долей процента и существенно реже - около 1%. Так, накопление рекомбинантных антигенов в количестве более 2% от ОРБ растений было получено только в 6 исследованиях из 37 [425]. То же относится и к другим рекомбинантным белкам. Важно подчеркнуть, что высокие уровни экспрессии гетерологичных белков в растениях наблюдались только в случае использования генов с оптимизированным кодонным составом и накопления целевого белка в определённых компартментах клетки- эндоплазматическом ретикулуме, вакуолях или апопласте.

Как уже было отмечено в разделе «Обзор литературы», экспрессия тауматина II была получена в ряде сельскохозяйственных растений, в том числе и в томате. Однако в этих исследованиях не были представлены данные о количественном содержании тауматина. Нами была проведена оценка накопления тауматина на единицу сырого веса плодов томата для линии 91. В зависимости от эксперимента, содержание ОРБ в 1 г сырой массы плодов варьировало от 1,7 до 2,7 мг. Это соответствовало $2,3 \pm 0,5$ г экстрагируемого белка на 1 кг плодов. Исходя из концентрации тауматина II в образцах линии 91 ($46,4 \pm 10,5$ мкг тауматина/мг ОРБ), содержание тауматина составляло 61-154 мг в 1 кг зрелых плодов. Варьирование количества ОРБ, доли тауматина в общем белке и, как следствие, накопления тауматина на 1 кг сырого веса плодов, может быть обусловлено различной степенью зрелости плодов, различиями в состоянии растений и в условиях их культивирования. Подобное варьирование является обычным [425] и должно учитываться при разработке соответствующих технологий.

В нашем исследовании показан высокий уровень (до 4,6% от ОРБ) накопления тауматина в зрелых плодах томата. Для трансформации томата был использован экспрессионный вектор pVI-th35, где ген, кодирующий препроформу тауматина, находился под контролем промотора 35S CaMV, который сам по себе достаточно редко обеспечивает такие высокие уровни экспрессии. Необходимо отметить, что томаты были трансформированы геном растительного происхождения, адаптированным к особенностям белоксинтезирующего механизма растений. Наиболее вероятно, что высокий уровень экспрессии тауматина связан с его оптимальной локализацией внутри клетки.

Как отмечалось выше, точная локализация тауматина в плодах катемфе до сих пор неизвестна. Судя по наличию отщепляемых N- и C- концевых сигнальных пептидов, зрелый тауматин локализуется в определённом компартменте клетки, вероятнее всего в запасящих вакуолях. Растения томата были трансформированы геном препротауматина, включающим N- и C- концевые

сигнальные пептиды, которые, по видимому, и обеспечивали его оптимальную внутриклеточную компартиментализацию.

Тауматин является весьма стабильным белком, в частности, он устойчив к деградации протеиназами [279], и сам демонстрирует свойства ингибитора протеиназ [278]. Кроме того, тауматин более устойчив к деградации при кислых значениях pH, то есть в условиях, характерных для большинства клеточных компартиментов [276]. Таким образом, стабильность тауматина в условиях, характерных для растительных клеток, способствует его накоплению на высоком уровне в оптимальных для этого компартаментах.

Тауматин приблизительно в 3000 раз слаще сахарозы по весовому соотношению [266]. Таким образом, 1 кг плодов трансгенных томатов эквивалентен по сладости 180-460г сахара. Необходимо отметить, что при переработке томата, например при изготовлении томатной пасты, возможно обойтись без экстракции белков и сопутствующих потерь, т.е. эта величина будет выше.

Дальнейшее повышение выхода тауматина II возможно, в частности, через получение гомозиготных линий с последующим их скрещиванием между собой [232]. Таким образом, линии T91 и T26 трансгенных томатов, накапливающие более 40 мкг рекомбинантного белка /мг ОРБ, могут являться перспективными продуцентами этого сверхсладкого белка для нужд пищевой и фармацевтической отраслей промышленности.

Важно отметить, что все линии томата, трансформированные вектором pVI-th35 и накапливающие тауматин на высоком уровне, по показателям роста и морфологическим характеристикам не отличались от нетрансформированных растений томата Ялф. Они нормально росли и развивались, цвели и плодоносили. По количеству плодов на растении и их среднему весу трансформанты и нетрансгенные растения, также, не различались.

3.1.3.3. Саузерн блот анализ геномной ДНК трансгенных растений томата

Для дополнительного подтверждения интеграции гена тауматина II в геном трансгенных растений томата, был выполнен Саузерн блот анализ геномной ДНК линий T26, T28, T29, T68, T91, T95 и T157. Геномная ДНК томата была обработана рестриктазой XbaI, которая разрезает T-ДНК по одному сайту между 35S промотором и кодирующей частью гена тауматина. Ожидаемая длина детектируемого фрагмента при этом должна быть не менее 1676 п.н. Полученные результаты подтвердили интеграцию последовательности гена тауматина II в геном томата (Рисунок 23).

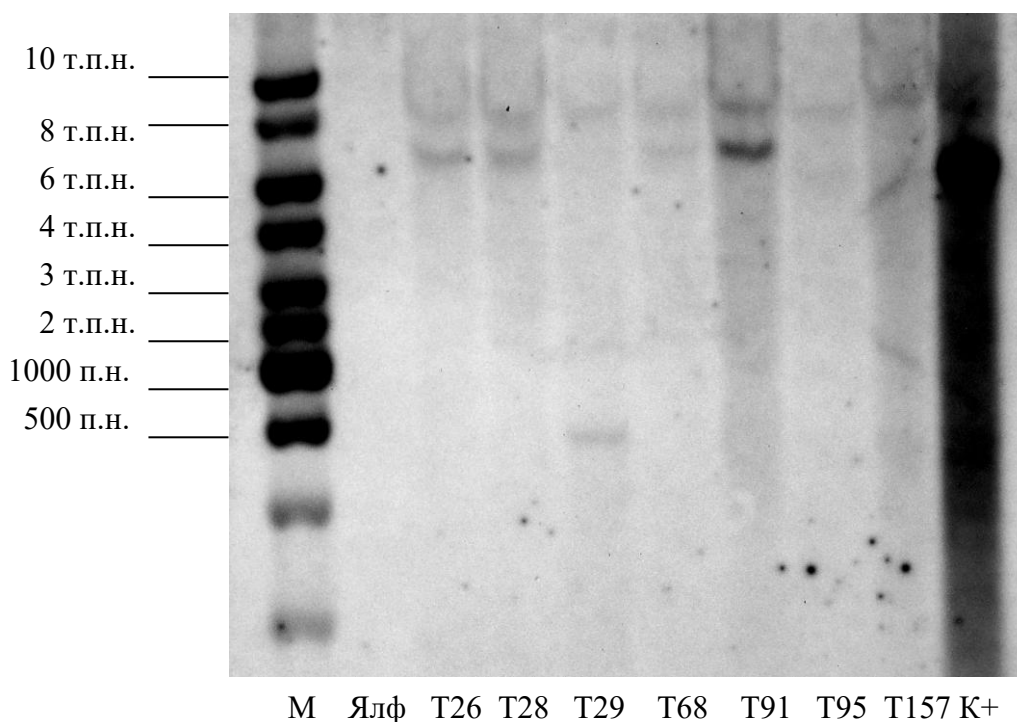


Рисунок 23 - Саузерн блот анализ геномной ДНК трансгенных линий томата, трансформированных геном тауматина II.

М- маркер молекулярной массы; K⁺ - плазмидная ДНК вектора pVI-th35, обработанная рестриктазой PstI; Ялф- ДНК нетрансгенных растений томата сорта Ялф. Минимальная длина детектируемого фрагмента - не менее 1676 п.н.

Исходя из полученного профиля гибридизации, только в одной линии (Т157) наблюдалась однокопийная вставка нуклеотидной последовательности целевого гена, в остальных изученных линиях интеграция гена тауматина произошла в двух копиях. В тоже время ДНК нетрансгенных растений линии Ялф была неспособна гибридизоваться с зондом. В линии томата Т29 помимо высокомолекулярного фрагмента был детектирован, также, фрагмент ДНК размером около 500 п.н., что меньше минимальной ожидаемой длины. Эти данные указывают на неполный перенос одной из двух копий тауматина в геном линии Т29.

Полученные результаты являются типичными для агробактериальной трансформации растений. Необходимо отметить, что в наших исследованиях не наблюдалось видимой корреляции между числом вставок трансгена и уровнем накопления рекомбинантного тауматина. Так, в линии с Т91 с максимальным накоплением тауматина были детектированы две копии целевого гена. В то же время линия Т29 с минимальным накоплением тауматина характеризовалась присутствием одной полноразмерной копии трансгена. Линия Т157 с одной копией гена тауматина продемонстрировала средний уровень накопления целевого белка. Мы предполагаем, что экспрессия рекомбинантных белков определяется не числом копий трансгена, а, скорее, его положением в геноме растения-хозяина, а также способностью рекомбинантного белка к накоплению в растительной клетке.

3.1.3.4. Некоторые агрономические характеристики трансгенных растений томата, трансформированных вектором pVI-th35

Как уже было указано выше, все линии томата, трансформированные вектором pVI-th35, по скорости роста и развития, и по своим морфологическим характеристикам не отличались от нетрансформированных растений линии Ялф. Они нормально росли и развивались, цвели и плодоносили в теплице (Рисунок 24). Габитус трансгенных растений, независимо от линии, не отличался от габитуса нетрансформированных растений линии Ялф. Морфологические особенности листовых пластинок трансгенных и контрольных растений, также, были идентичными (Рисунок 25). По срокам цветения, завязывания плодов и их созревания трансгенные и контрольные растения не отличались друг от друга.

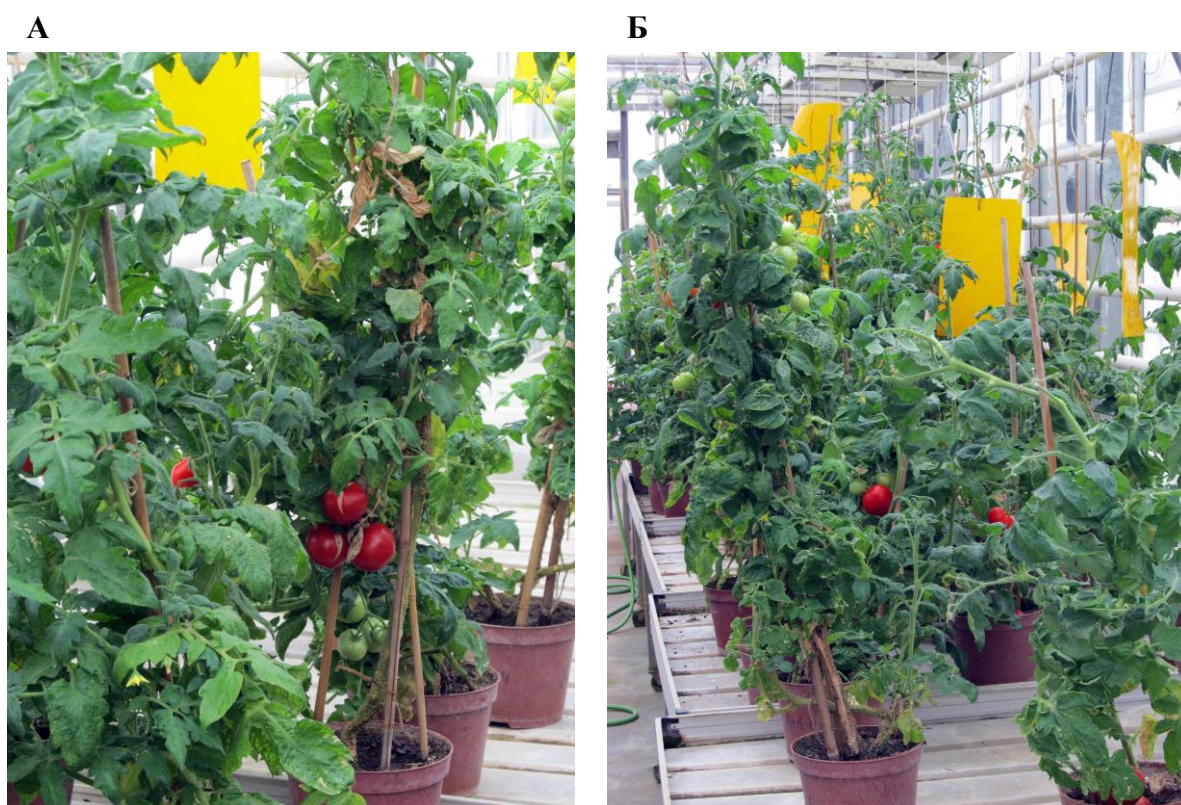


Рисунок 24 - Рост и плодоношение томатов в теплице. А. Трансгенные растения томатов линии T91. Б. Нетрансформированные томаты Ялф.

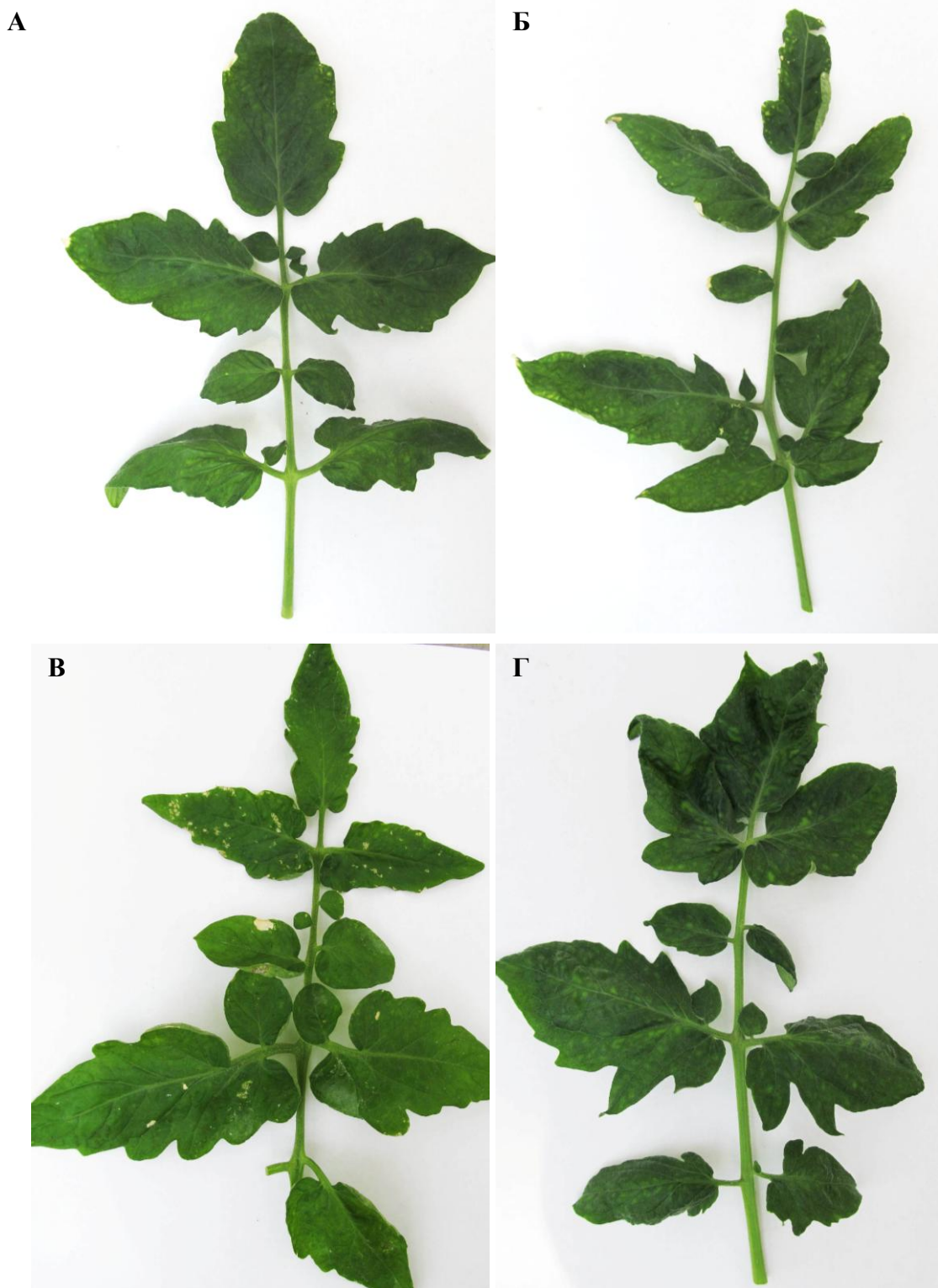


Рисунок 25 - Листья трансгенных растений томата (А- линия Т28, Б- линия Т91; В- линия Т157) и нетрансформированных растений томата Ялф (Г).

Трансгенные растения нормально цвели и завязывали плоды (Рисунок 26). По количеству плодов на растении и их среднему весу трансформанты и нетрансгенные растения статистически достоверно не различались (Рисунок 27). Плоды трансгенных линий нормально росли и развивались, образуя по 20-30 нормальных всхожих семян (Рисунок 28). По срокам созревания плоды трансгенных линий и нетрансформированных растений также не различались.



Рисунок 26 - Плодоношение томатов в теплице. А. Плоды нетрансформированных растений линии Ялф. Б, В, Г. Трансгенные растения томатов линии Т91, Т95 и Т157, соответственно. Плоды различной степени зрелости.



Рисунок 27 - Плоды различных линий томата на стадии биологической зрелости, трансформированных вектором pBI-th35.

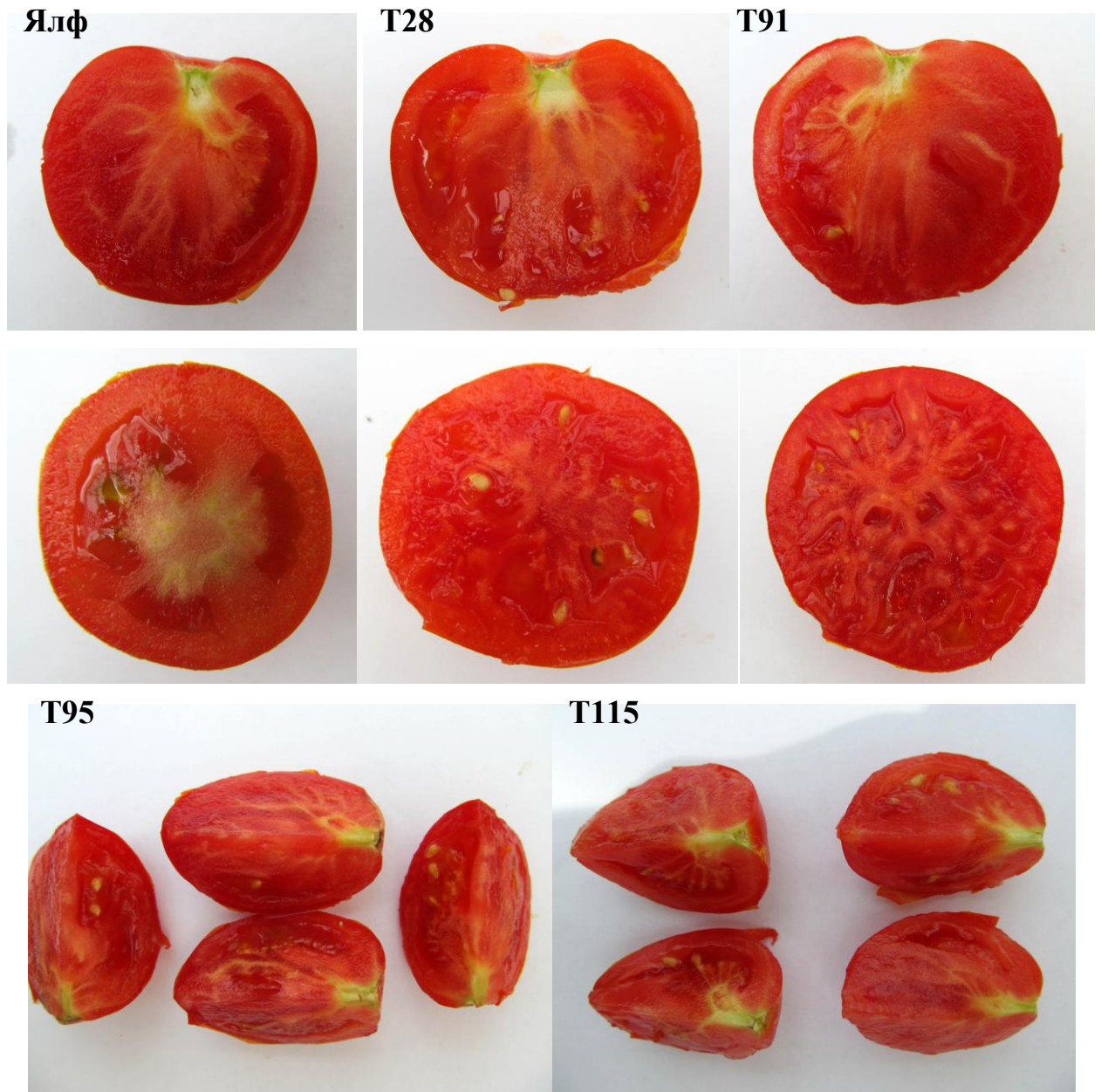


Рисунок 28 - Плоды контрольных и различных различных линий томата, трансформированных вектором pVI-th35 (в разрезе).

Урожайность и средний вес плодов не различались статистически достоверно у нетрансформированных растений и трансгенов (Таблица 25). Различия по урожайности между трансгенными линиями, также, не наблюдались. Урожайность плодов была стабильной и незначительно варьировала за период исследований. Важно отметить, что трансгенные растения не отличались от

контрольных по степени поражения фитопатогенными грибами и тепличными насекомыми-вредителями [426,427].

Таблица 25 - Урожайность и средний вес плодов растений томата линии Ялф, трансформированных вектором рVI-th35 за период 2009-2011гг.

Линия	Урожайность плодов, г/растение				Средний вес плодов, г			
	2009г.	2010г.	2011г.	Средняя за 2009-2011гг.	2009г.	2010г.	2011г.	Среднее за 2009-2011гг.
T26	1277± 278	1329± 341	1209± 308	1271±305	68±13	74±21	77±18	73±17
T28	1192± 211	1301± 178	1275± 309	1256±226	68±17	81±19	84±13	78±19
T29	1298± 256	1141± 199	1325± 236	1255±241	77±21	86±22	82±19	82±21
T53	1097± 116	1300± 218	1275± 221	1224±194	89±25	77±23	84±18	83±22
T68	1265± 283	1197± 267	1232± 233	1231±251	70±16	83±20	84±24	79±23
T91	1371± 307	1295± 154	1280± 263	1315±276	89±24	73±25	75±14	79±23
T95	1089± 117	1295± 127	1317± 289	1233±194	78±16	89±18	83±17	83±17
T115	1196± 199	1301± 276	1197± 234	1231±266	69±15	85±17	83±22	79±19
T157	1301± 201	1194± 167	1264± 174	1253±183	70±24	88±23	92±17	83±22
Ялф	1341± 296	1111± 193	1385± 233	1248±247	78±14	86±16	87±26	84±24

Как следует из полученных данных, растения томата, трансформированные геном тауматина II, не отличались по основным агрономическим характеристикам от исходной линии. Это позволяет использовать полученные линии не только для проведения различных исследований, но и для целей практической селекции по улучшению сортов томата.

3.1.4. Агробактериальная трансформация растений томата геном тауматина II с апопластной локализацией рекомбинантного белка

Как отмечалось выше, ген тауматина II был успешно использован для получения трансгенных растений с повышенной устойчивостью к фитопатогенным грибам. В этих экспериментах был использован ген, кодирующий препроформу тауматина II. Компартиментализация рекомбинантного тауматина в этих экспериментах не была определена, исходя из полученных нами результатов можно предполагать, что он локализуется внутриклеточно. Мы предположили, что накопление тауматина в межклеточном пространстве может обеспечить его лучший контакт с гифами гриба на ранних стадиях инфекционного процесса и, тем самым, повысить его защитный эффект. Как было показано в экспериментах с табаком, использование вектора pGD-ubnt (локализация рекомбинантного тауматина II в апопластном пространстве) вело к существенному снижению накопления тауматина по сравнению с вариантами pVI-th35 и pGD-ter. Для увеличения уровня накопления рекомбинантного тауматина мы попытались оптимизировать структуру целевого гена путём замены N-концевого сигнального пептида тауматина на соответствующий пептид дефензина редьки *rs-afp2* [428]. Кроме того, в последовательность химерного гена тауматина II была включена нуклеотидная последовательность первого интрона гена *rs-afp2*. Нуклеотидная последовательность, кодирующая C-концевой

пропептид тауматина LELEDE была удалена. Таким образом, тауматин II в растениях, трансформированных сконструированным нами химерным геном, предположительно должен локализоваться в апопластном пространстве. Полученная конструкция pGD-lt (Рисунок 29) была использована для трансформации томата Ялф.

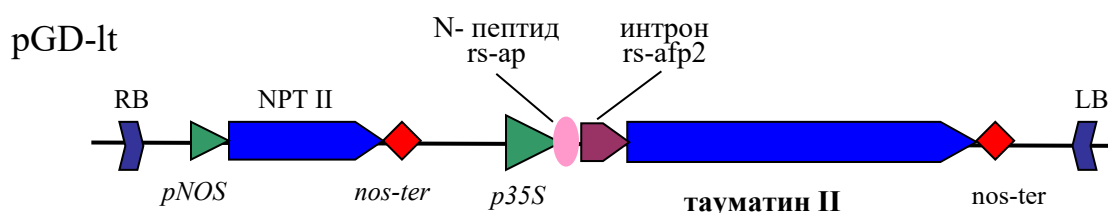


Рисунок 29 - Структура вектора pGD-lt для накопления тауматина II в апопласте. N- пептид - N-концевой сигнальный пептид дефензина редьки *rs-afp2*; интрон *rs-afp2*- нуклеотидная последовательность первого интрона гена *rs-afp2*.

Для агробактериальной трансформации было использовано 150 листовых эксплантов томата. Индукция канамициноустойчивых каллусов наблюдалась после 3-х недель культивирования на селективной среде. Когда каллусы достигали размера 3-4 мм, их отделяли от эксплантов и переносили на свежую среду. В течение 2-х последующих месяцев культивирования часть каллусов отмирала, оставшиеся каллусы активно росли на канамицин - содержащей среде. Регенерация первых побегов начиналась после 4-х месяцев культивирования каллусов на селективной среде, в среднем на одном каллусе образовывалось по одному адвентивному побегу. Около 50% регенерантов погибало на среде укоренения с канамицином, остальные укоренялись и росли без признаков токсического действия селективного антибиотика. Всего было получено 7 устойчивых к канамицину линий, каждая результат независимого трансформационного события.

Отсутствие агробактериальной контаминации в канамициноустойчивых линиях было подтверждено методом ПЦР- амплификации гена *virB1* *A. tumefaciens*. Ген *virB1* не детектировался ни в одной из изученных линий, что указывало на отсутствие агробактериальной контаминации.

Фрагмент гена тауматина II ожидаемой длины (878 п.н.) амплифицировался в 6 растениях из 7 (Рисунок 30). Интеграция целевого гена тауматина не была подтверждена только в одной линии- lt25. Возможно, это связано с дефектным переносом последовательности гена тауматина при агробактериальной трансформации, так как эта последовательность расположена в векторе pGD-lt около левой границы T-ДНК, где вероятность её обрыва наиболее высока. Кроме того, это может быть обусловлено тем фактом, что гетерологичные гены, переносимые в составе одной T-ДНК, в процессе агробактериальной трансформации могут подвергаться реорганизации, в частности делециям, разрывам и различным перестройкам нуклеотидной последовательности [417]. В результате сайты отжига праймеров, используемых для детекции целевых последовательностей, могут потеряться и амплификации целевой последовательности не происходит.

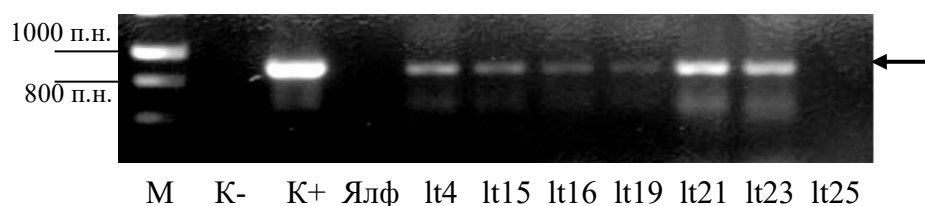


Рисунок 30 - ПЦР анализ трансгенных растений томата, трансформированных вектором pGD-lt, на присутствие гена тауматина II.

lt - трансгенные растения; K⁺ - ДНК плазмиды pGD-lt; K⁻ - вода; Ялф- ДНК нетрансгенного растения; M- маркер молекулярной массы. Стрелкой показана полоса, соответствующая амплифицируемому фрагменту гена тауматину II (ожидаемый размер- 878 п.н.).

В результате проведённой агробактериальной трансформации было получено 6 линий томатов, трансформированных вектором pGD-lt, каждая результат независимого трансформационного события. После подтверждения трансгенного статуса, трансформанты линий lt4, lt15, lt16, lt19, lt21 и lt23 были размножены и высажены в теплицу для дальнейшего роста и изучения.

3.1.4.1. Анализ экспрессии тауматина II в трансгенных растениях томата, трансформированных вектором pGD-lt

В линиях, трансформированных вектором pGD-lt, тауматин детектировался в 4 линиях из 6 изученных, хотя присутствие гена тауматина было подтверждено во всех трансгенных линиях. Рекомбинантный тауматин детектировался как в листьях, так и в плодах трансгенных растений (Рисунок 31). Накопление рекомбинантного тауматина было выявлено в линиях lt4, lt15, lt19 и lt21. В линиях lt16 и lt23 тауматин II не детектировался. Исходя из результатов Вестерн блот-анализа, максимальное накопление тауматина наблюдалось в линии lt21. Наблюдалась хорошая корреляция между экспрессией тауматина в листьях и плодах трансгенных растений. При этом в линии lt21 тауматин накапливался преимущественно в плодах.

Отсутствие экспрессии тауматина II в линиях lt16 и lt23, также как и при трансформации растений томата вектором pVI-th35, может быть обусловлено несколькими причинами, в том числе эффектом положения, «замолканием» трансгена или мутациями в последовательности ДНК, кодирующей тауматин II, возникающими в процессе агробактериального переноса T-ДНК в растительную клетку или в ходе её интеграции в геном растений. Такие мутации не детектируются методом ПЦР при анализе интеграции гетерологичного гена в геном растения, могут приводить к сдвигу рамки считывания в нуклеотидной

последовательности гена тауматина и, как следствие, к отсутствию его экспрессии.

Рекомбинантный тауматин в растениях, трансформированных вектором pGD-lt, детектировался в виде единичной полосы, мигрирующей на одном уровне со зрелым тауматином (22,4 кДа; Рисунок 31). Это указывает на корректное отщепление N-концевого сигнального пептида дефензина редьки *rs-afp2* в составе химерного белка тауматина II в растениях томата и, следовательно, на корректный процессинг препротауматина в трансгенных растениях. Кроме того, необходимо отметить отсутствие признаков деградации рекомбинантного тауматина в листьях и плодах томата, что указывает на его стабильность в этой экспрессионной системе.

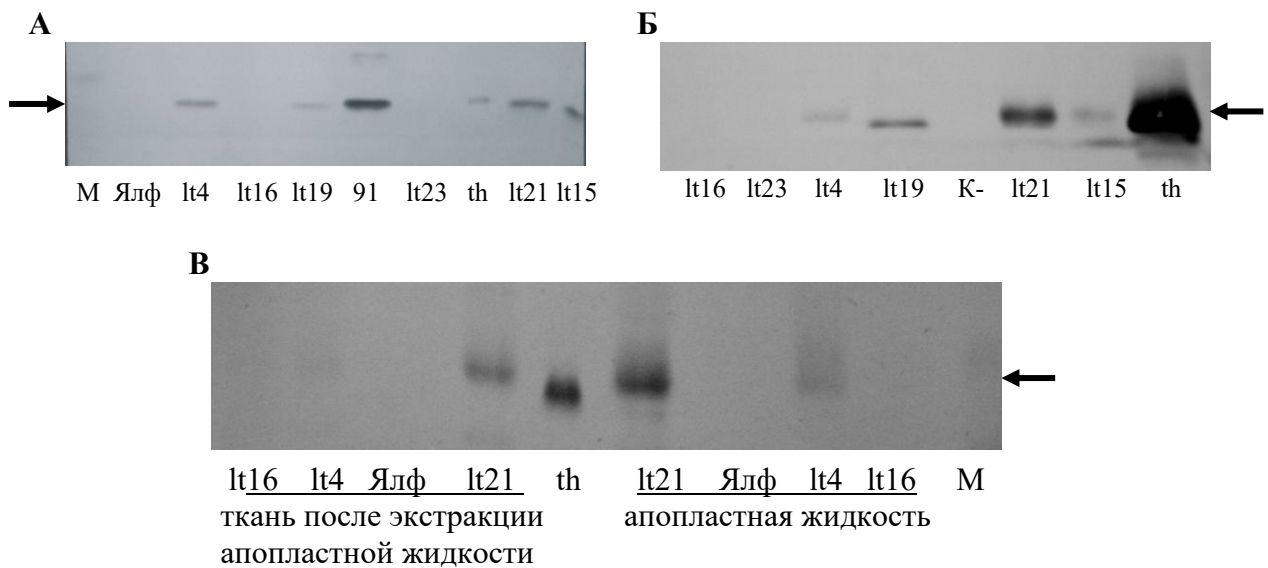


Рисунок 31 - Экспрессия тауматина в трансгенных растениях томата. А. Экспрессия тауматина в листьях растений томата, трансформированных вектором pGD-lt. Б. Экспрессия тауматина в плодах растений томата, трансформированных вектором pGD-lt. В. Внутриклеточная локализация тауматина в листьях растений, трансформированных вектором pGD-lt.

Lt - трансгенные растения; К- - контрольное нетрансформированное растение, М- маркер молекулярной массы; th- тауматин (100 нг, «Sigma», США). 91- линия томата T91, трансформированная вектором pBI-th35. Стрелкой показана полоса, соответствующая тауматину.

Для изучения компартментализации рекомбинантного тауматина, нами была определена его локализация в тканях листа растений, трансформированных вектором pGD-lt. Рекомбинантный тауматин, как и в растениях табака, трансформированных вектором pVIN-ubnt, детектировался, большей частью в апопластной жидкости (Рисунок 31, В). В ткани, оставшейся после экстракции апопластной

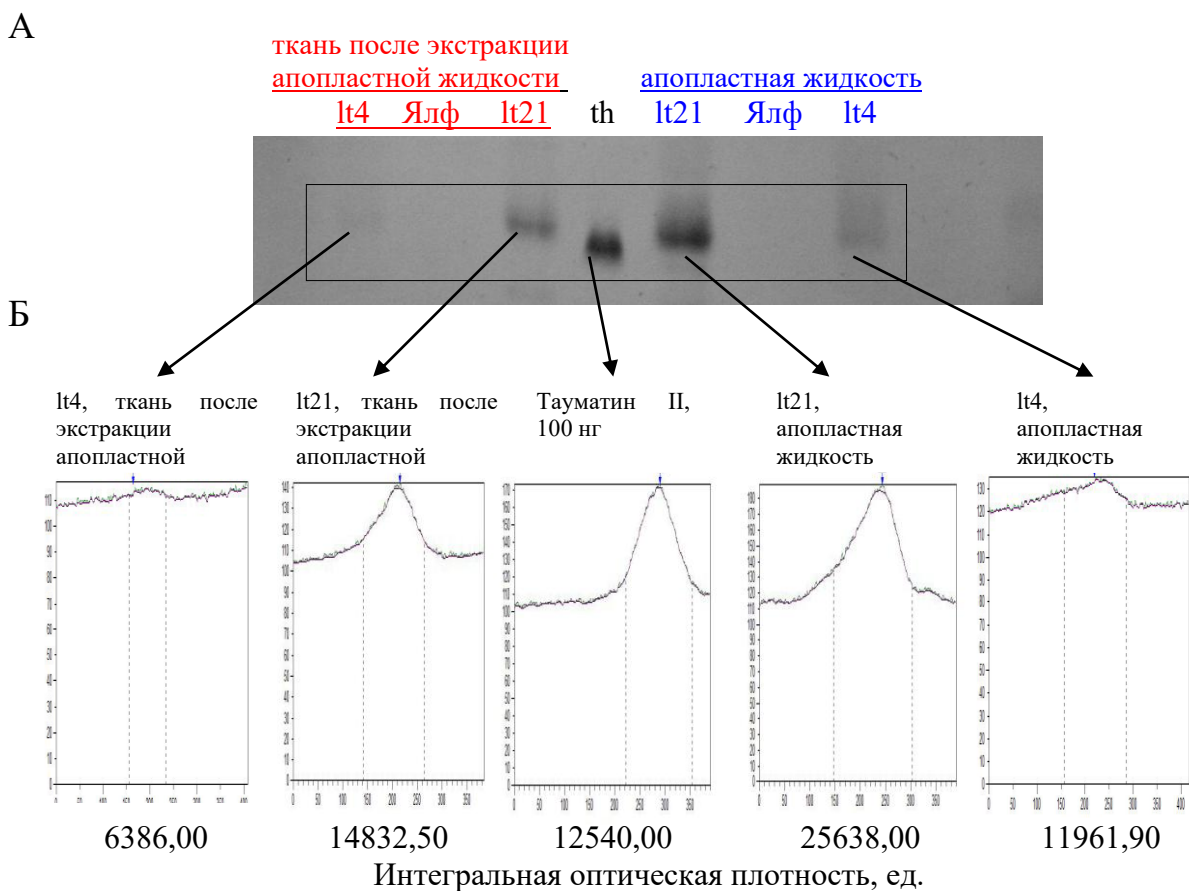


Рисунок 32 - Анализ распределения рекомбинантного тауматина II в листовой ткани трансгенных растений томата. А. Вестерн блот анализ трансгенных растений томата. Б. Денситометрический анализ иммунореактивных полос тауматина II (в рамке) в апопластном пространстве и остаточной ткани растений томата линий lt4 и lt21.

жидкости, детектировалась меньшая часть тауматина. Исходя из данных денситометрического анализа (Рисунок 32), в апопластное пространство листа

транспортировалось 65,2% (линия lt4) и 63,4% (линия lt21) рекомбинантного тауматина. Эффективность его транспорта в случае замены нативного N-концевого сигнального пептида тауматина на соответствующий пептид дефензина редьки *rs-afp2* оказалась несколько ниже, чем это наблюдалось в табаке в случае трансформации растений вектором pBIN-ubnt. Тем не менее, транспорт рекомбинантного тауматина в апопластное пространство осуществлялся достаточно эффективно. Таким образом, использование химерного гена тауматина II с одновременным удалением C-концевого сигнального пептида LELEDE и заменой N-концевого сигнального пептида тауматина на соответствующий пептид дефензина редьки, обеспечивало экспрессию рекомбинантного тауматина и его транспорт в апопластное пространство в растениях томата.

3.1.4.2. Количественный анализ экспрессии гена тауматина II в трансгенных растениях томата, трансформированных вектором pGD-lt

Органолептический анализ плодов томата

Количественная оценка содержания тауматина в плодах томата (на этапе биологической зрелости), трансформированных вектором pGD-lt, была выполнена методом иммуноферментного анализа. Для анализа были использованы линии, в плодах которых методом Вестерн блот анализа была показана экспрессия гена тауматина II- lt4, lt15, lt19 и lt21. В качестве отрицательного контроля были использованы плоды нетрансгенных растений линии Ялф. Также, в качестве отрицательного контроля, была изучена линия lt16, в которой экспрессия тауматина не была показана, несмотря на вставку целевого гена. Одновременно с анализом накопления рекомбинантного тауматина проводилась оценка сладости и общего вкуса плодов. Полученные результаты представлены в Таблице 26.

Таблица 26 - Накопление тауматина II и результаты органолептического анализа плодов линий томата, трансформированных вектором pGD-lt (2011-2012 гг).

Линия	Накопление тауматина II, % от ОРБ			Сладость плодов*		
	2011 год	2012 год	Среднее за 2011-2012 гг.	(Общая оценка вкуса, баллы**)		
	2011 год	2012 год	Среднее за 2011-2012 гг.	2011 год	2012 год	Среднее за 2011-2012 гг.
lt4	0,15±0,04	0,17±0,03	0,16±0,05	+	+	+
				(4,3±0,61)	(4,1±0,68)	(4,2±0,42)
lt15	0,16±0,06	0,18±0,5	0,17±0,4	+	+	+
				(3,7±0,48)	(4,1±0,73)	(3,9±0,39)
lt19	0,27±0,06	0,21±0,04	0,24±0,08	++	++	++
				(3,5±0,52)	(4,2±0,66)	(3,9±0,27)
lt21	0,42±0,11	0,47±0,09	0,45±0,12	++	++	++
				(4,1±0,47)	(4,0±0,43)	(4,1±0,31)
lt16	>0,001	>0,001	>0,001	-	-	-
				(3,6±0,51)	(3,7±0,38)	(3,7±0,29)
Ялф	н.д	н.д	н.д.	-	-	-
				(3,8±0,71)	(3,6±0,21)	(3,7±0,22)

* Оценка сладости проводилась по 4-х балльной шкале: - сладкий вкус не ощущается; + - сладкий вкус ощущается слабо; ++ - сладкий вкус хорошо выражен; +++ - сильный сладкий вкус.

** Общая оценка вкуса плодов проводилась по 4-х балльной шкале: 2 балла- плохой вкус, 3 балла- удовлетворительный, 4 балла- хороший, 5- отличный.

Максимальное накопление тауматина наблюдалось в линии lt21- 0,45±0,12% ОРБ (среднее за период исследований), что соответствует 4,5±0,8 мкг тауматина/мг общего растворимого белка. Наименьшая экспрессия тауматина наблюдалась в трансгенных линиях lt4 и lt15- 0,16±0,05 и 0,17±0,4% ОРБ, соответственно. Линия lt19 характеризовалась промежуточным уровнем накопления рекомбинантного тауматина- 0,24±0,08%.

Как и при трансформации томата нативной формой гена тауматина (вектор pVI-th35), накопление рекомбинантного тауматина в пределах одной линии по годам варьировало незначительно. Различия между линиями по уровню аккумуляции тауматина за период проведения анализов, также, были постоянными и существенно не варьировали (Таблица 26). Полученные данные указывают на стабильный характер экспрессии химерного гена тауматина II в трансгенных растениях. Присутствие N- концевое сигнального пептида и интрона гена дефензина редьки *rs-afp2*, таким образом, не оказало влияния на стабильность экспрессии гена тауматина в растениях томата.

Растения, трансформированные вектором pGD-lt, продемонстрировали более низкий уровень накопления рекомбинантного тауматина по сравнению с растениями, трансформированными вектором pVI-th35. Как и в экспериментах с табаком, апопластная локализация тауматина вела к снижению его аккумуляции в трансгенных растениях. Максимальное накопление тауматина наблюдалось в линии lt21- $0,45 \pm 0,12\%$ общего растворимого белка, тогда как, например, в линии T91 накопление тауматина составило 4,6%, т.е. в 10 раз выше. Таким образом, апопластное пространство, по-видимому, является неоптимальным компартментом для накопления рекомбинантного тауматина. Тем не менее, полученные величины накопления тауматина являются весьма высокими.

Сладость плодов растений, трансформированных вектором pGD-lt, определялась уровнем накопления рекомбинантного тауматина и варьировала от слабого (линии lt4 и lt15) до хорошо выраженного (линии lt19 и lt21). Характерное для тауматина послевкусие было детектировано только в линии lt21, его длительность составляла 5-7 мин, в зависимости от индивидуальной чувствительности испытателя. В плодах остальных линий послевкусие достоверно не детектировалось.

Вкус плодов трансгенных линий в целом оценивался испытателями более высоко, чем вкус плодов нетрансгенных растений линии Ялф или растений неэкспрессирующей тауматин линии lt16. Выше всего, как наиболее

сбалансированный и гармоничный, был оценен вкус плодов линии It4 - 4,2 балла, которая характеризовалась наименьшим накоплением тауматина среди изученных линий. Вкус плодов растений линии It21 с высоким уровнем накопления тауматина оценивался в 4,1 балла, плоды этой линии были охарактеризованы как отчетливо более сладкие, чем плоды нетрансгенных растений, и с приемлемым уровнем послевкуся. Вкус плодов не экспрессирующей тауматин линии It16 оценивались на одном уровне со вкусом плодов нетрансгенных растений - 3,7 балла. Более высокая оценка вкуса плодов низкоэкспрессирующей линии It4 связана, по-видимому, с более выраженным собственным вкусом плодов этой линии, что обусловлено способностью тауматина действовать как усилитель вкуса.

3.1.4.3. Некоторые агрономические характеристики трансгенных растений томата, трансформированных вектором pGD-It

Как уже было отмечено выше, все линии томата, трансформированные вектором pVI-th35, по своим характеристикам не отличались от нетрансформированных растений. Они нормально росли и развивались, цвели и плодоносили. По количеству плодов на растении и их среднему весу трансформанты и нетрансгенные растения, также не различались. В то же время, растения томата, трансформированные вектором pGD-It, существенно отличались от нетрансформированных растений или трансформированных вектором pVI-th35. Эти различия заключались в резко сниженной урожайности, обусловленной уменьшением количества и веса плодов на растении (Таблица 27, Рисунок 33).

Таблица 27 - Урожайность и средний вес плодов растений томата линии Ялф, трансформированных вектором pGD-lt за период 2011-2012гг.

Линия	Урожайность плодов, г/растение			Средний вес плодов, г		
	2011 год	2012 год	Среднее	2011 год	2012 год	Среднее
lt4	105±27	133±37	119±24	21±7	33±7	27,0±11
lt15	211±41	189±24	200±39	34±11	29±13	31,5±14
lt19	98±34	115±47	106,5±43	36±21	20±19	28,0±19
lt21	109±29	185±28	147±31	39±11	32±14	35,5±14
lt16	1321±283	1212±179	1316,5±193	64±21	77±28	70,5±22
Ялф	1111±179	1385±211	1248±217	69±14	70±22	69,5±19

В среднем, вес плодов растений, трансформированных вектором pGD-lt, составил 28,5г, незначительно варьируя в диапазоне от 27г (линия lt4) до 35,5г (линия lt21). В то же время, вес плодов нетрансформированных растений составлял, в среднем, 69,5г; а линии lt16, трансформированной вектором pGD-lt, но не экспрессирующей тауматина- 70,5г (т.е. на одном уровне с нетрансгенным контролем).

Линии, трансформированные вектором pGD-lt, характеризовались небольшим количеством плодов на одном растении (3-4 плода), в то время как количество плодов на нетрансгенных растениях и растениях линии lt16 составляло 15-20 шт. В результате растения трансгенных линий lt характеризовались резко сниженной урожайностью по сравнению с линией Ялф. Так, средняя урожайность линии lt15 за период наблюдений составила 200±39 г, урожайность других линий варьировала в диапазоне 106,5-147г. В тоже время урожайность контрольных растений составила, в среднем, 1248±217г.

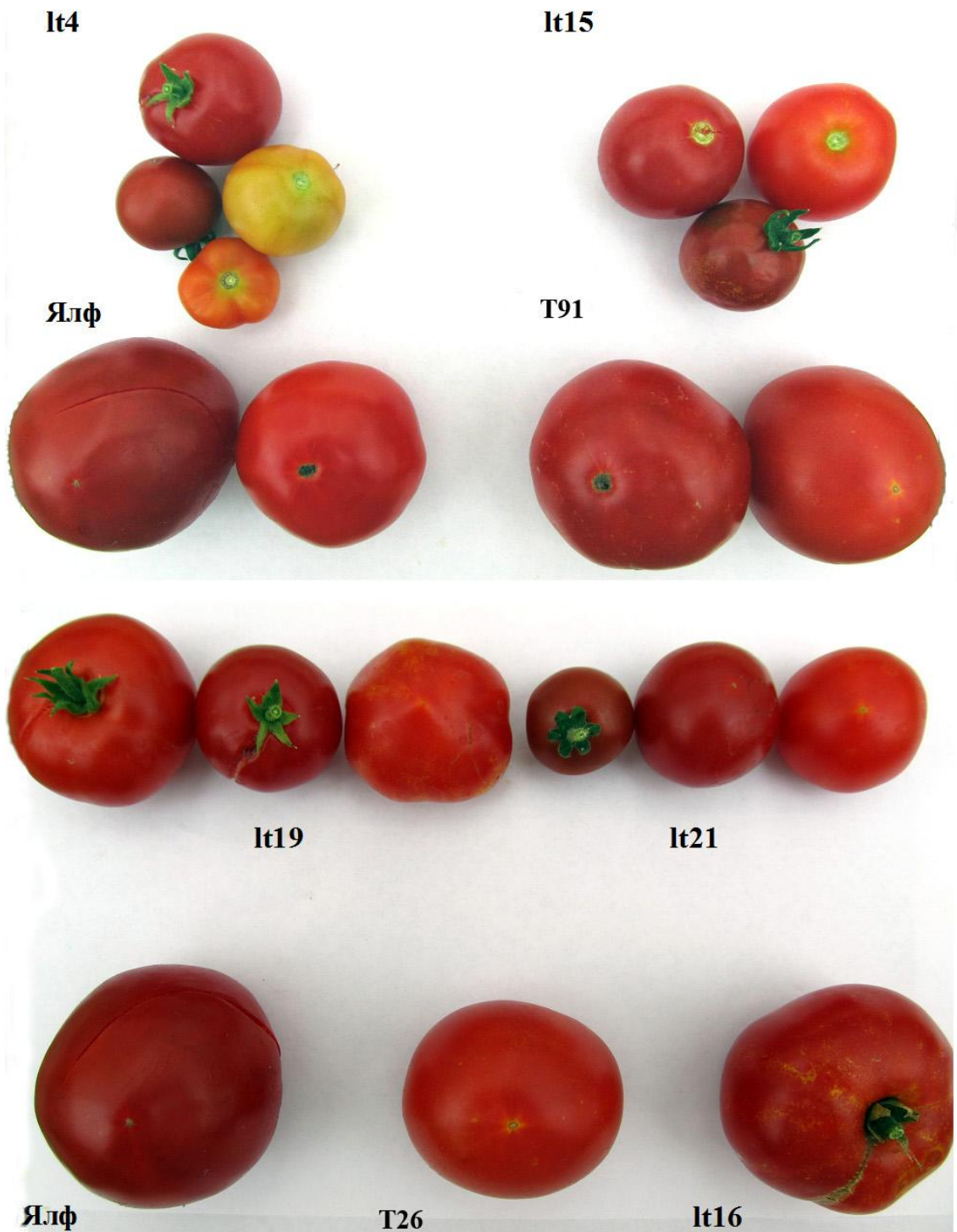


Рисунок 33 - Плоды линий It4, It15, It19 и It21 томата, трансформированных вектором pGD-lt. Ялф- нетрансформированные контрольные растения; T91 и T26- линии, трансформированные вектором pBI-th35; It16- линия томата, трансформированная вектором pGD-lt, и не экспрессирующая тауматин.

Кроме того, важно отметить, что плоды томатов линий *It* практически не образовывали семян (Рисунок 34). В плодах трансгенных растений образовывалось, как правило, по 1-4 семени, во многих плодах семена не образовывались вообще. Большая часть этих семян были невыполненными и невсхожими. В тоже время, в плодах нетрансгенных растений образовывалось по 15-30 семян, которые характеризовались нормальной всхожестью.



Рисунок 34 - Плоды трансгенных растений томата линий *It4*, *It15* и *It19* в разрезе. Ялф- нетрансформированное контрольное растение.

Листовые пластинки растений, трансформированных вектором *pGD-It*, по своей морфологии не отличались от пластинок растений линии Ялф (Рисунок 35). В то же время, высота растений серии *It* была существенно ниже, чем нетрансгенных растений. Так, растения линии Ялф достигали в первой декаде июля (после их обрезки во второй декаде марта) высоты 110 ± 21 см, а растения серии *It* - 89 ± 24 см. Таким образом, растения, трансформированные вектором *pGD-*

It, по своим морфологическим и агрономическим характеристикам существенно, и не в лучшую сторону, отличались от исходной линии.



Рисунок 35 - Листья трансгенных растений томата линий It4 и It21. Ялф- нетрансформированное контрольное растение.

Причины таких особенностей растений, трансформированных вектором pGD-It с апопластной локализацией рекомбинантного тауматина, пока не ясны. Ни в одном из исследований по экспрессии тауматина в гетерологичных системах не описывается какого-либо влияния тауматина на морфологию или физиологию растений-хозяев, в том числе томатов (см. «Обзор литературы»). Однако необходимо отметить, что в этих исследованиях растения трансформировали геном, кодирующим препроформу тауматина, которая нормально процессируется в растениях и, далее, компартментализуется внутри клетки. При этом точная компартментализация тауматина как в клетках *T. daniellii*, так и в клетках полученных различными авторами трансгенных растений до сих пор неизвестна. Растения томата с апопластной локализацией рекомбинантного тауматина были изучены нами впервые. В наших экспериментах не наблюдалось каких-либо отличий растений, трансформированных вектором pBI-th35, от растений

исходной линии Ялф. Различия наблюдались только в случае трансформации томата вектором pGD-lt. Мы предполагаем, что это связано с локализацией и накоплением тауматина в апопластном пространстве.

Точный механизм антигрибного действия тауматина окончательно не ясен. Предполагается, что антигрибная активность PR5 белков, в том числе и тауматина, связана со способностью нарушать регуляцию синтеза клеточных стенок патогенных грибов или вызывать их повреждения. При этом первым этапом антигрибного действия TLR является связывание TLR с компонентами клеточной стенки гриба, это подтверждается тем фактом, что изменение состава клеточной стенки может усиливать или ослаблять антигрибную активность TLR [253]. Известно, что некоторые тауматин-подобные протеины обладают способностью к связыванию с водонерастворимыми β -1,3-глюканами, обычными компонентами клеточных стенок грибов, или обладают β -1,3-глюканазной активностью [429,430,431]. В растениях обычным компонентом клеточных стенок является каллоза, β -1,3-глюкановый полисахарид. Каллоза представляет собой молекулярный маркер плазмодесм, которая откладывается в клеточных стенках вблизи шейки плазмодесм и контролирует их проницаемость. Во время дифференцировки клеток и развития растений, а также в ответ на различные стрессы уровень каллозы в плазмодесмах строго регулируется двумя ферментами-антагонистами: каллозо-синтазой и β -1,3-глюканазой. Каллоза играет критически важную роль в регуляции проницаемости плазмодесм и в нормальном функционировании симпластного пути у растений [432].

Другим возможным механизмом может являться активность тауматин - подобных белков как ингибитора ксиланаз, которая обнаружена у ряда TLR [424]. Ксиланазы играют важную роль в процессе инфицирования растений патогенными грибами, например *Botrytis cinerea*. Ингибирование ксиланазной активности ведёт к ослаблению инфекционного процесса и, следовательно, к повышению устойчивости к грибным патогенам [433]. Ксиланы относятся к главным компонентам клеточных стенок растений, в частности, входят в состав

гемицеллюлоз Ксиланазы (класс ферментов, деградирующих ксиланы до ксилозы) являются частью путей метаболизма ксиланов в растениях, в частности, у растений ксиланазы представлены в семенах [434].

Способность тауматина и тауматин-подобных белков к связыванию с β -1,3-глюканами, их β -1,3-глюканазная и ксиланазная активность до настоящего времени детально не изучена. Мы предполагаем, что при накоплении рекомбинантного тауматина в апопластном пространстве происходит или связывание тауматина с компонентами клеточных стенок растения, или ингибирование эндогенной ксиланазной активности. Необходимо учитывать, что высокий уровень накопления тауматина в апопласте трансгенных растений может вести к неспецифическому взаимодействию тауматина с различными компонентами клеточных стенок, в частности, с каллозой. Как следствие, возможно нарушение нормального развития и/или функционирования клеточных стенок, выполняющих жизненно-важные для растений функции- регуляцию транспорта метаболитов, поддержание тургора, регуляцию роста клетки в процессе жизненного цикла [432,435]. Таким образом, наблюдавшиеся нами нарушения в развитии плодов и снижение урожайности могут быть следствием ненормального биогенеза и/или функционирования клеточных стенок, вызванного накоплением рекомбинантного тауматина в апопластном пространстве. Необходимо отметить, что мы не наблюдали каких-либо изменений в морфологии листовых пластинок или стеблей растений, трансформированных вектором pGD-It. Накопление тауматина в апопластном пространстве не влияло на эти органы. Мы предполагаем, что такая избирательность действия тауматина может быть связана с различиями в структуре или составе клеточных стенок в плодах и вегетативных органах.

Таким образом, линии томата, трансформированные вектором pGD-It, не соответствовали характеристикам исходного сорта. Поэтому они оказались непригодными для разработки на их основе экспрессионной системы для

получения рекомбинантного тауматина и были исключены из дальнейших экспериментов.

3.1.5. Выделение и очистка рекомбинантного тауматина из плодов томата

Для экстракции белков из плодов томата линии T91 были использованы буферы следующего состава: буфер I - 50 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, 5 мМ EDTA, 5 мМ 2-меркаптоэтанола, pH 7,6; буфер II - 100 мМ Na-цитратный буфер, pH 3,4; буфер III - бидистиллированная вода, pH 5,6 [436].

Экстракция протеинов из плодов томата наблюдалась во всех трёх использованных буферах. В буферах II и III экстрагировался, главным образом, неидентифицированный протеин молекулярной массой около 20 кДа (Рисунок 36, А), белки с более высокой молекулярной массой экстрагировались с низкой эффективностью. В буфере I экстракция белков проходила значительно более полно, наблюдалась экстракция белков с высокой молекулярной массой. Кроме того, наблюдалась полоса, соответствующая белку с молекулярной массой около 25 кДа, что примерно соответствует молекулярной массе рекомбинантного тауматина.

Методом Вестерн блотт анализа во всех белковых препаратах, полученных из плодов трансгенных растений, выявлена единичная полоса, соответствующая тауматину II (Рисунок 36, Б). Рекомбинантный тауматин имел молекулярную массу около 22 кДа, что точно соответствовало молекулярной массе тауматина из *T. daniellii*. Иммунореактивные полосы соответствующего веса не наблюдались в препаратах, полученных из плодов нетрансгенных контрольных растений. Рекомбинантный тауматин II детектировался в препаратах в виде единичной полосы, без видимых признаков деградации, независимо от использованного для

экстракции буфера. Исходя из результатов электрофоретического и Вестерн блот анализов, максимальный выход рекомбинантного тауматина был получен при использовании буфера I, поэтому во всех дальнейших экспериментах для экстракции тауматина был использован буфер этого состава [436].

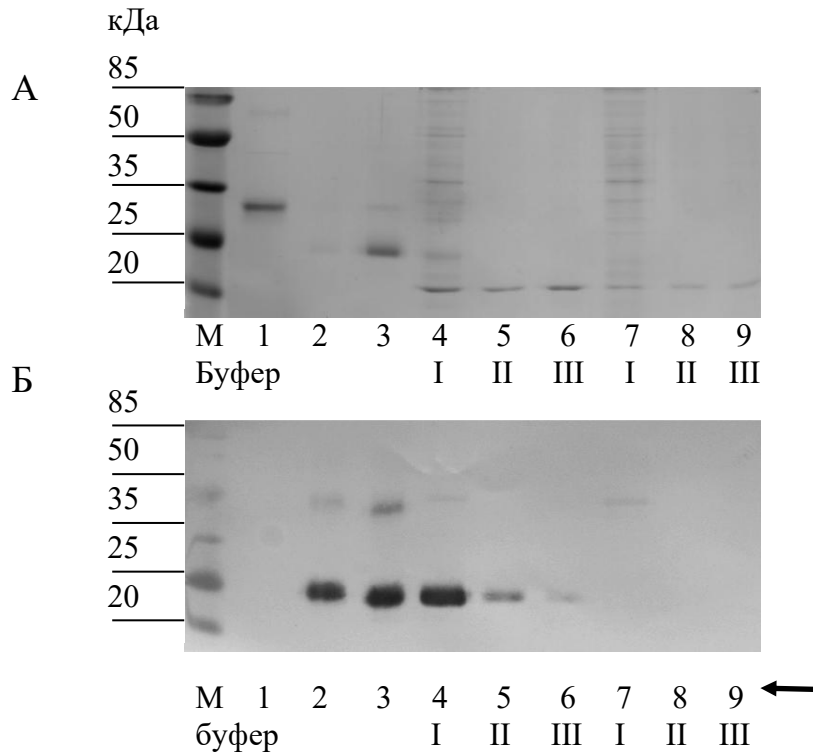


Рисунок 36 - Анализ общего растворимого белка, экстрагированного из трансгенных и нетрансформированных плодов томата методом электрофореза в 10-25% СДС-ПААГ (А) и методом Вестерн блот анализа (Б).

Дорожки: 1 - eGFP, 100 нг; 2 - тауматин II, 25 нг; 3 - тауматин II, 100 нг; 4, 5, 6 - плоды томата линии 91, экстракция в буферах I, II и III, соответственно; 7, 8, 9 - плоды нетрансгенных растений томата, экстракция в буферах I, II и III, соответственно; М - маркер молекулярной массы. На дорожку наносили 20 μ l препарата, что эквивалентно 20 мг сырого веса плодов. Стрелкой показана иммунореактивная полоса, соответствующая тауматину II.

Рекомбинантный тауматин очищали методом ионно-обменной хроматографии. Исходя из результатов предварительных экспериментов, нами была разработана следующая схема очистки тауматина II.

В качестве хроматографического носителя был использован SP-Сефакрил. Общий белок был экстрагирован в буфере I из плодов томата, хранящихся при -70°C . Плоды (100г) были гомогенизированы при помощи ступки и пестика, полученный материал был ресуспендирован в 100 мл буфера. Экстракцию проводили в течение 30 мин на качалке при 4°C . Полученную суспензию центрифугировали 30 мин при $12000g$ (4°C) и отбирали супернатант. Экстракцию повторяли дважды, супернатанты объединяли. Препараты общего белка, полученные из плодов томата, обессоливали на колонке с Сефадексом G25, уравновешенным 20 мМ аммоний-бикарбонатным буфером (pH 8,2). Затем полученные препараты лиофилизировали и хранили при -70°C .

Перед нанесением на колонку, препараты растворяли в 20 мМ Na-фосфатном буфере, pH 6,8 и центрифугировали ($14000g$, 20 мин, 4°C) для удаления нерастворимых остатков. Полученные препараты наносили на колонку с SP-Сефакрилом, уравновешенным 20 мМ Na-фосфатным буфером, pH 6,8. Белки, связавшиеся с SP-Сефакрилом, элюировали градиентом NaCl (0-200 мМ) в этом же буфере. Фракции, содержащие элюированные белки, несвязавшиеся белки и промывочный буфер были собраны и проанализированы методами электрофореза в СДС-ПААГ и Вестерн блотта. Фракции, содержащие рекомбинантный тауматин, были объединены, обессолены на колонке с Сефадексом G25, уравновешенным 20 мМ аммоний-бикарбонатным буфером (pH 8,2) и лиофилизированы [436].

Рекомбинантный тауматин элюировался с SP-Сефакрила в виде отчетливо выраженного пика (Рисунок 37, А) во фракциях 12-16. Во фракциях 14 и 15 наблюдалась единичная белковая полоса с молекулярной массой, соответствующей тауматину (Рисунок 37, Б). Полосы, соответствующие другим белкам, в этих фракциях не детектировались.

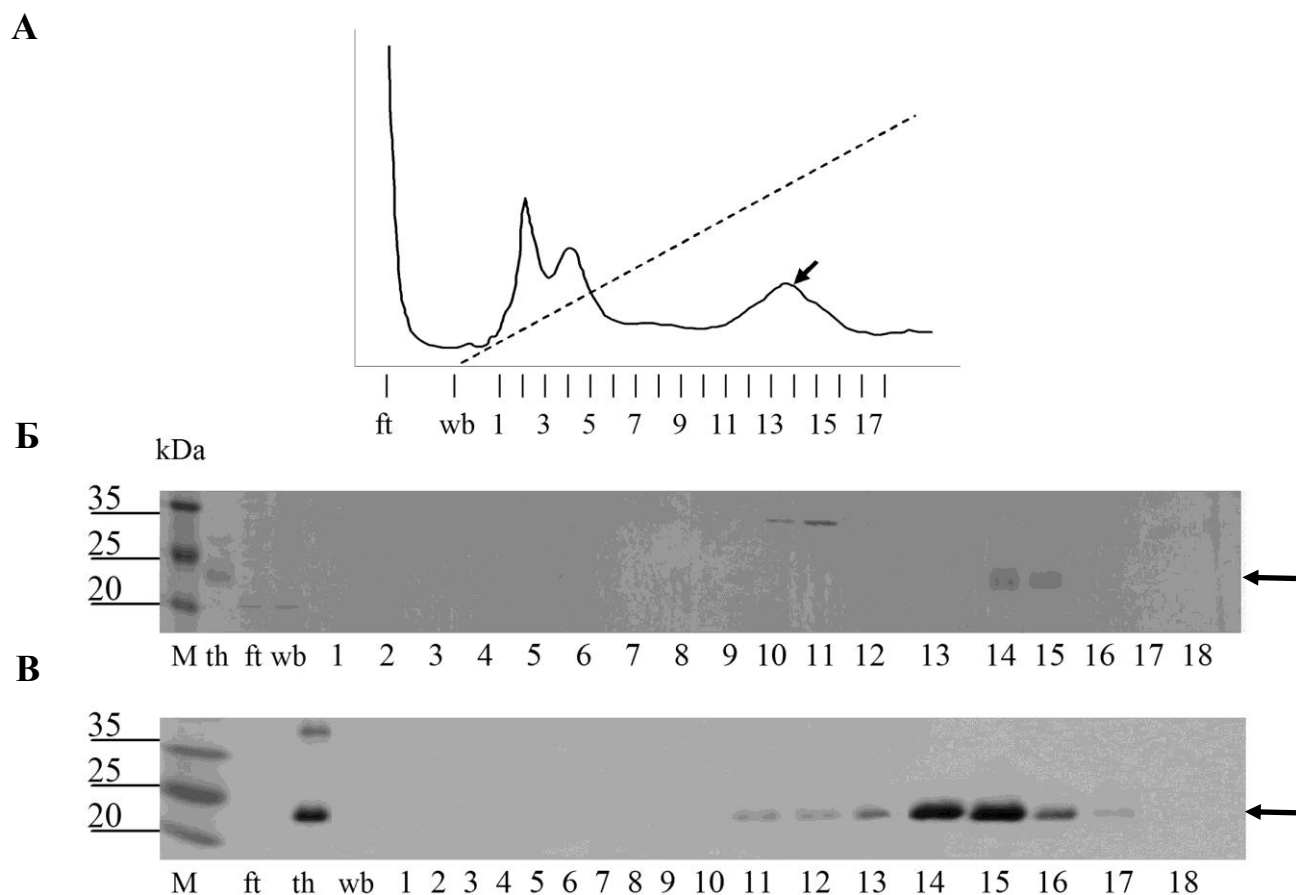


Рисунок 37 - Очистка рекомбинантного тауматина II при помощи ионно-обменной хроматографии на SP-Сефакриле. А. Профиль элюции тауматина II; элюцию проводили при помощи линейного градиента NaCl (0-200 мМ, штриховая линия). Стрелкой показан пик, соответствующий тауматину. Б и В. Анализ полученных фракций методом электрофореза в СДС-ПААГ (Б) и Вестерн блотта (В).

М - маркер молекулярной массы, ft- несвязавшиеся с SP-Сефакрилом протеины, wb- промывочный буфер, th- тауматин II (50 нг). Цифрами обозначены номера хроматографических фракций. Стрелками показаны полосы, соответствующие тауматину II.

Вестерн блотт анализ показал присутствие иммунореактивной полосы, соответствующей тауматину II во фракциях 11-17, максимальным содержанием тауматина было во фракциях 14 и 15 (Рисунок 37, В). Количественная оценка

содержания тауматина в полученных фракция была проведена методом ELISA. Финальный выход рекомбинантного тауматина во фракциях 13-16 составил 5,4 мг/100г сырого веса плодов. Количественные данные о выходе тауматина на различных этапах очистки представлены в Таблице 28.

Таблица 28 - Очистка рекомбинантного тауматина II из плодов трансгенных растений томата*.

Этап очистки	Общего растворимого белка (мг)	Количество тауматина II (мг)	Выход (%)	Чистота (%)
Экстракт, буфер I	304,2	7,3	100	2,4
Экстракт после обессоливания	270,7	7,3	100	2,7
Хроматография на SP-Сефакриле	5,8	5,4	73,7	93,1

* Для выделения и очистки рекомбинантного тауматина было использовано 100г плодов томата.

Для точного определения молекулярной массы, полученные препараты рекомбинантного тауматина II, были проанализированы методом MALDI-MS. Для этого были использованы объединённые фракции 13-16, очищенные и лиофилизированные. Предварительно этот препарат был проанализирован методом электрофореза в СДС-ПААГ на чистоту и гомогенность. Электрофоретический анализ показал отсутствие видимых примесей в очищенном рекомбинантном тауматине (Рисунок 38, А). Определённая методом MALDI-MS анализа молекулярная масса тауматина, выделенного из плодов томата, составила 22145 Да. Расчетная масса тауматина, с учетом отщепления N-

и С- концевых пептидов, и образования 8 дисульфидных связей, составляет 22142 Да. Полученные данные подтверждают корректный процессинг препротауматина в растениях табака, включая отщепление N- концевого сигнального пептида и С- концевого пропептида LELEDE, и образование всех восьми дисульфидных связей. Помимо зрелого тауматина, MALDI-MS выявил присутствие в препарате минорных примесей с молекулярной массой 22250, 22344, 22550 Да (Рисунок 38, Б). Наиболее вероятно, что эти примеси представляют собой различные недопроцессированные формы тауматина. Таким образом, данные MALDI-MS дополнительно подтвердили идентичность тауматина II, полученного в растениях томата, натуральному [436].

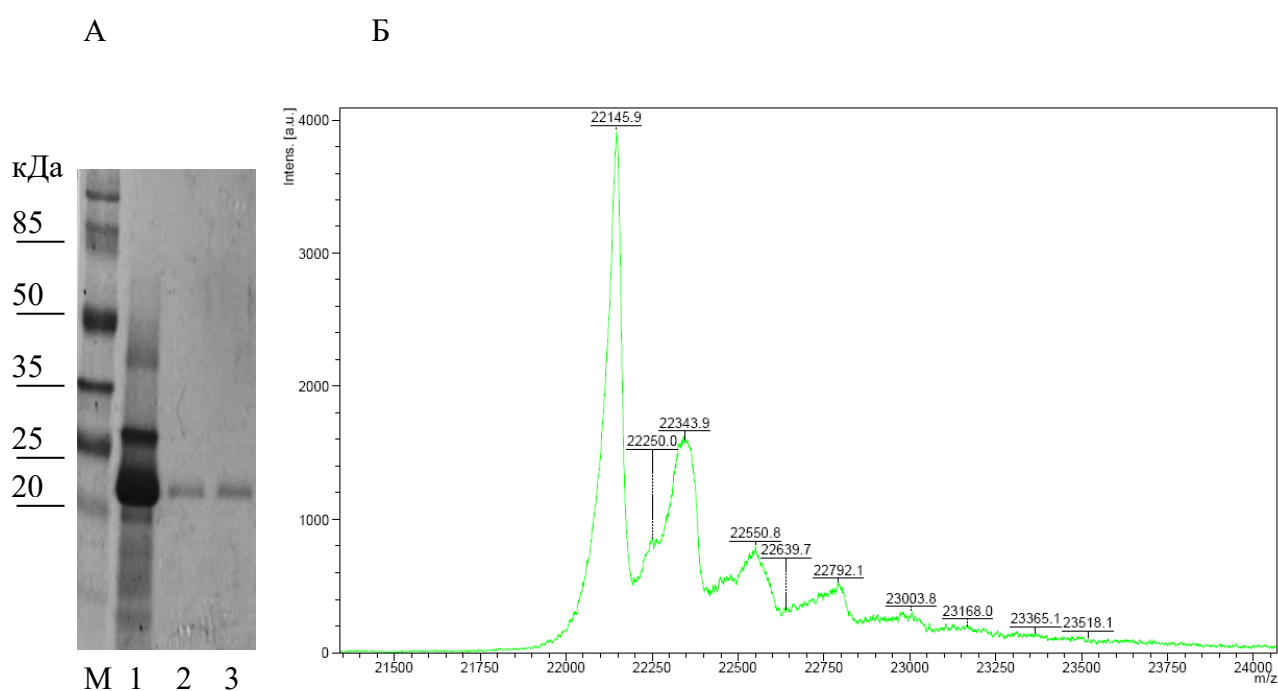


Рисунок 38 - MALDI-MS анализ рекомбинантного тауматина II. А. Электрофоретический анализ лиофилизированных объединённых фракций 13-16 рекомбинантного тауматина II в СДС-ПААГ. Б. Масс-спектр рекомбинантного тауматина II из плодов томата. М- маркер молекулярной массы, 1- тауматин II из *T. daniellii*, 2 и 3 - препараты рекомбинантного тауматина II, использованные для MALDI-MS. Расчетная масса зрелого тауматина II- 22142 Да

3.1.5.1. Органолептический анализ рекомбинантного тауматина II из плодов томата

Перед проведением органолептического анализа тауматина II, выделенного из плодов томата, была проведена оценка вкусового восприятия натурального тауматина II *T. daniellii*. Вкус 25 нМ раствора натурального тауматина II был оценен как сладкий (слабый, но тем не менее хорошо различимый) тремя испытателями из 12; 50 нМ раствор тауматина II был оценен как сладкий 10 испытателями, оценка выраженности сладкого вкуса варьировала от слабовыраженного (испытатели 1 и 10) до сильного (испытатель 9). Концентрация раствора тауматина, равная 100 нМ, была оценена как характеризующаяся сильным сладким вкусом 7 испытателями, 4 испытателями- как обладающая хорошо выраженным сладким вкусом и одним испытателем- как обладающая слабым сладким вкусом. Раствор тауматина с концентрацией 200 нМ по оценке всех 12 испытателей обладал сильным сладким вкусом с выраженным послевкусием.

Результаты органолептического анализа рекомбинантного тауматина II из плодов томата и из *T. daniellii* представлены в Таблице 29. Полученные результаты были идентичны результатам анализа тауматина II из *T. daniellii*. Раствор рекомбинантного тауматина II с концентрацией, равной 50 нМ, оценивалась как сладкий 10 испытателями. Концентрация тауматина, равная 100 нМ, была оценена как характеризующаяся сильным сладким вкусом 7 испытателями, 4 испытателями- как обладающая выраженным сладким вкусом и одним испытателем- как обладающая слабым вкусом. Раствор тауматина с концентрацией 200 нМ по оценке всех испытателей обладал сильным сладким вкусом с выраженным послевкусием.

Таблица 29 - Результаты органолептического анализа рекомбинантного тауматина II, выделенного из плодов томата.

Испытатель, №	Тауматин II из <i>T. daniellii</i> , нМ				Послевкусие 100 нМ раствора тауматина II из <i>T. daniellii</i> , средняя продолжительность, мин	Тауматин II из плодов томата, нМ				Послевкусие 100 нМ раствора тауматина II из плодов томата, средняя продолжительность, мин
	25	50	100	200		25	50	100	200	
1	-	+	++	+++	12±3	-	+	++	+++	15±2
2	-	++	+++	+++	19±4	-	++	+++	+++	22±7
3	+	++	+++	+++	18±4	+	++	+++	+++	15±6
4	-	-	+	+++	8±3	-	-	+	+++	7±2
5	-	++	+++	+++	15±5	-	++	+++	+++	18±5
6	+	++	++	+++	20±7	+	++	++	+++	23±6
7	-	++	+++	+++	21±6	-	++	+++	+++	20±5
8	+	++	+++	+++	18±5	+	++	+++	+++	16±5
9	-	+++	+++	+++	17±6	-	+++	+++	+++	15±6
10	-	+	++	+++	15±5	-	+	++	+++	13±4
11	-	-	++	+++	16±4	-	-	++	+++	20±6
12	-	++	+++	+++	20±6	-	++	+++	+++	21±6

- не ощущается сладкий вкус; + - сладкий вкус ощущается слабо, но отчетливо; ++ - хорошо выраженный сладкий вкус; +++ - сильный сладкий вкус

По характеристикам послевкусия тауматин II из *T. daniellii* и из растений томата также не различались между собой. У большинства испытуемых продолжительность послевкусия составляла, в среднем, 15-20 мин. У одного испытуемого (№4) она составляла 7-8 мин, что, очевидно, связано с индивидуальными различиями в перцепции сладкого вкуса.

Таким образом, результаты органолептического анализа ясно продемонстрировали, что тауматин II из *T. daniellii* и рекомбинантный тауматин II, выделенный из плодов томата, по своим вкусовым характеристикам не отличаются друг от друга.

Проведённые нами исследования показали возможность создания экспрессионной системы для получения рекомбинантного тауматина II на основе растений томата. Показано, что оптимальной для экспрессии в растении - продуценте является препроформа тауматина с нативными N- и C- концевыми сигнальными пептидами. Другие варианты внутриклеточной локализации тауматина - в цитоплазме, апопласте или в эндоплазматическом ретикулуме - обеспечивали более низкий уровень накопления целевого белка. Кроме того, апопластная локализация тауматина оказывала неблагоприятное влияние на биологические характеристики растений томата. При использовании нативной формы тауматина II физиологические и агрономические характеристики трансгенных растений не отличались от соответствующих характеристик нетрансформированных растений исходного сорта [421,422].

Плоды и листья трансгенных растений томата характеризовались сладким вкусом, типичным для тауматина, с выраженным послевкусием. Это подтверждает нормальный процессинг рекомбинантного тауматина в гетерологичном растении-продуценте. Данные Вестерн блот анализа и MALDI-

MS также подтверждают его нормальный процессинг, молекулярная масса рекомбинантного тауматина соответствовала массе тауматина из *T. daniellii*. Рекомбинантный тауматин характеризовался высокой стабильностью в растениях - продуцентах, как в табаке, так и в томате. В наших экспериментах не была показана сколько ни будь значительная деградация рекомбинантного тауматина в гетерологичных растениях. Такая устойчивость тауматина обусловила его способность к накоплению в растениях до высоких уровней – более 4% от ОРБ в высокоэкспрессирующих линиях T26 и T91. Это соответствовало накоплению, в среднем, более 100 мг рекомбинантного тауматина в 1 кг сырой массы зрелых плодов. Существенно, что накопление тауматина зависит от степени зрелости плодов – в состоянии биологической зрелости плоды аккумулируют существенно больше тауматина, чем на стадии технической зрелости [424].

Вкус плодов трансгенных линий томата на стадии технической зрелости оценивался, в среднем, выше, чем вкус плодов исходной линии Ялф. В тоже время, на стадии биологической зрелости, оценка вкуса плодов линий с высоким уровнем накопления тауматина была хуже, чем у исходной нетрансформированной линии Ялф. При этом вкус плодов линий с низким уровнем накопления тауматина оценивался существенно выше, чем контрольных или линий с его высоким содержанием. Такие различия обусловлены недостаточным «сахароподобием» вкуса тауматина и его длительным послевкусием. В линиях с низким уровнем накопления тауматина эти недостатки его вкуса выражены слабее - послевкусие в большинстве случаев не ощущается, сладость не выражена явно, но при этом достаточна для улучшения общего вкуса плодов. Кроме того, тауматин как усилитель вкуса может усиливать собственный вкус плодов, что ведет к повышению оценки вкуса линий с его низкой экспрессией. Таким образом, при использовании тауматина для улучшения вкуса плодов необходимо исходить в первую очередь, из данных органолептической оценки их вкуса.

Разработанный нами простой одностадийный хроматографический протокол обеспечивал хороший выход тауматина и его высокую чистоту. Идентичность тауматина, выделенного из плодов томата, натуральному была подтверждена с помощью MALDI-MS [436]. Органолептический анализ подтвердил, также, полную идентичность вкусовых характеристик рекомбинантного тауматина вкусовым характеристикам тауматина из *T. daniellii*. Таким образом, полученные нами линии томата T26 и T91 могут быть использованы как источники сырья для получения рекомбинантного тауматина.

Свойство тауматина II улучшать собственный вкус плодов может быть использовано в селекции плодовых и овощных растений для повышения качества урожая. Это направление особенно перспективно при получении цисгенных растений [437]. Важно отметить, что полученный нами вектор pBI-th35 был успешно использован для улучшения агрономических характеристик других культур, частности, гиацинта. Нами было показано, что трансформация гиацинта геном тауматина II в составе этого вектора привела к существенному возрастанию его устойчивости к патогенным грибам *F. culmorum* и *B. cinerea* [292].

Как было отмечено выше, тауматин II разрешен к применению как пищевая добавка E957. В наших экспериментах было показано, что тауматин II сохранял сладкий вкус при технической переработке плодов томата – их засолке и мариновании. Полученные нами результаты впервые показали возможность использования тауматина для улучшения вкусовых характеристик не только свежих плодов, но и продуктов их переработки [438]. В настоящее время тауматин II разрешён, также, для использования в фармацевтической промышленности как натуральный подсластитель (Handbook of Pharmaceutical Excipients 2009, USA). Особенно перспективным представляется использование тауматина для маскировки горького вкуса активных фармацевтических ингредиентов, но это направление требует проведения дополнительных исследований [439].

3.2. Экспрессия пептида M2e вируса гриппа птиц в трансгенных растениях табака

3.2.1. Оптимизация кодонного состава 5'-концевой последовательности гена M2 вируса гриппа птиц H5N1. Синтез и сборка синтетической нуклеотидной последовательности для экспрессии в растениях

Данные о частотах использования кодонов в ряске малой получены на основе анализа всего четырех CDS и являются не репрезентативными (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>). Геном ряски горбатой *Lemna gibba*, другого вида ряски, близкого к *L. minor*, изучен существенно подробнее, данные о частотах использования кодонов в ряске горбатой более полные. Поэтому для оптимизации кодонного состава экспрессируемых в ряске малой последовательностей нами были использованы данные о частотах встречаемости кодонов в геноме *L. gibba*.

Для экспрессии в растениях был выбран аминотерминальный участок белка M2 вируса гриппа птиц H5N1 A/Chicken/Kurgan/5/2005 (GenBank DQ449633.1), включающий пептид M2e (с 1 по 22 а.о.), и общей длиной 43 а.о. (фрагмент обозначен как M143). После обратной трансляции в экспрессируемую последовательность были введены сайты *Pst*I и *Bam*HI, и стартовый метионин. В результате была получена нуклеотидная последовательность, представленная на Рисунке 39 [414]. Последовательность M143 была клонирована по сайтам *Pst*I и *Bam*HI в вектор pUC19, полученный вектор обозначен как pUC19M143.

А.

MSLLTEVETPTRNEWECRCS DSSDPLVVAASIIGILHLILWIL

Б.

**CTGATCTGCAGATGTCCTCCTCACTGAAGTCGAAACTCCTA
CTAGA**AATGAATGGGAGTGCAGATGCTCTGATTCCAGCGAC
CCCTTGGTGGTGGCGGCGTCCATCATCGGCATCCTGCATCT
CATCCTCTGGATCCTC

Рисунок 39 - Аминокислотная (А) и нуклеотидная (Б) последовательности фрагмента М143 с оптимизированным для экспрессии в ряске кодонным составом. Подчеркнуты сайты рестрикции *Pst*I и *Bam*HI, красным шрифтом показан антигенный эпитоп пептида М2е, синим – фрагмент трансмембранного домена.

Для проверки работоспособности последовательности М143, она была клонирована в вектор рВ1121. В нуклеотидную последовательность М143 с помощью ПЦР были добавлены сайты рестрикции *Xba*I и *Sac*I, и стоп - кодон ТАА. Последовательность М143 была клонирована в вектор рВ1121 по этим сайтам вместо гена GUS под контроль промотор 35S CaMV. Полученная плаزمиды рВ1М2 (Рисунок 40) была перенесена в *A. tumefaciens* СВЕ21 и использована в дальнейших исследованиях.

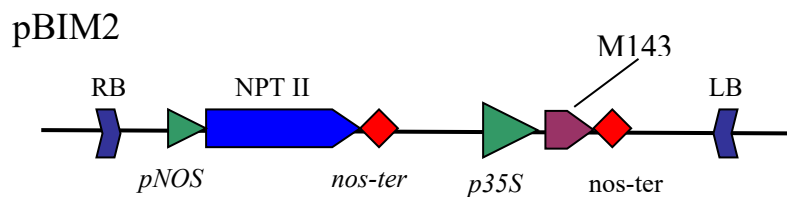


Рисунок 40 - Структура вектора рВ1М2. М143 - последовательность аминокислотного фрагмента белка М2 вируса гриппа птиц H5N1 длиной 43 а.о., включающий пептид М2е; NPT II - ген неомисцинофосфотрансферазы II; pNOS - промотор гена нопалинсинтазы *A. tumefaciens*; nos ter – терминатор гена нопалинсинтазы *A. tumefaciens*; p35S – промотор 35S вируса мозаики цветной капусты.

3.2.2. Трансформация табака *N. tabacum* вектором pВIM2. ОТ-ПЦР анализ транскрипции последовательности M143 в трансгенных растениях

Генетическая трансформация ряски является длительным процессом и занимает около года. Поэтому целесообразным является предварительное изучение особенностей экспрессии целевых последовательностей в модельных растениях табака. Появление первых регенерантов наблюдалось после 2-3 недель культивирования листовых эксплантов табака на среде регенерации с 50 мг/л канамицина. Дальнейшую селекцию и размножение регенерантов проводили на среде, содержащей ВАР и канамицин [414]. Всего было получено 35 независимых линий канамицинустойчивых растений табака (Рисунок 41, А). Для укоренения полученные регенеранты пересаживали на безгормональную среду, содержащую 100 мг/л К_m. В течение 2 недель укоренились растения 26 линий.

ДНК укоренившихся линий была проанализирована методом ПЦР на наличие вставки последовательности M143 (Рисунок 41, Б). Фрагмент M143 был детектирован в 15 линиях из 20 изученных. Трансгенные растения, содержащие вставку целевого фрагмента M143, адаптировали и переносили в теплицу, где они культивировались до проведения дальнейших экспериментов (Рисунок 41, В).

Методом ОТ-ПЦР была проанализирована РНК, выделенная из листьев линий 3, 6 и 8. Растений этих линий культивировались в теплице в течение 2 месяцев. Амплификация фрагментов ожидаемого размера наблюдалась во всех трех изученных линиях (Рисунок 42). Таким образом, была подтверждена транскрипция синтетической нуклеотидной последовательности M143 в трансгенных растениях табака.

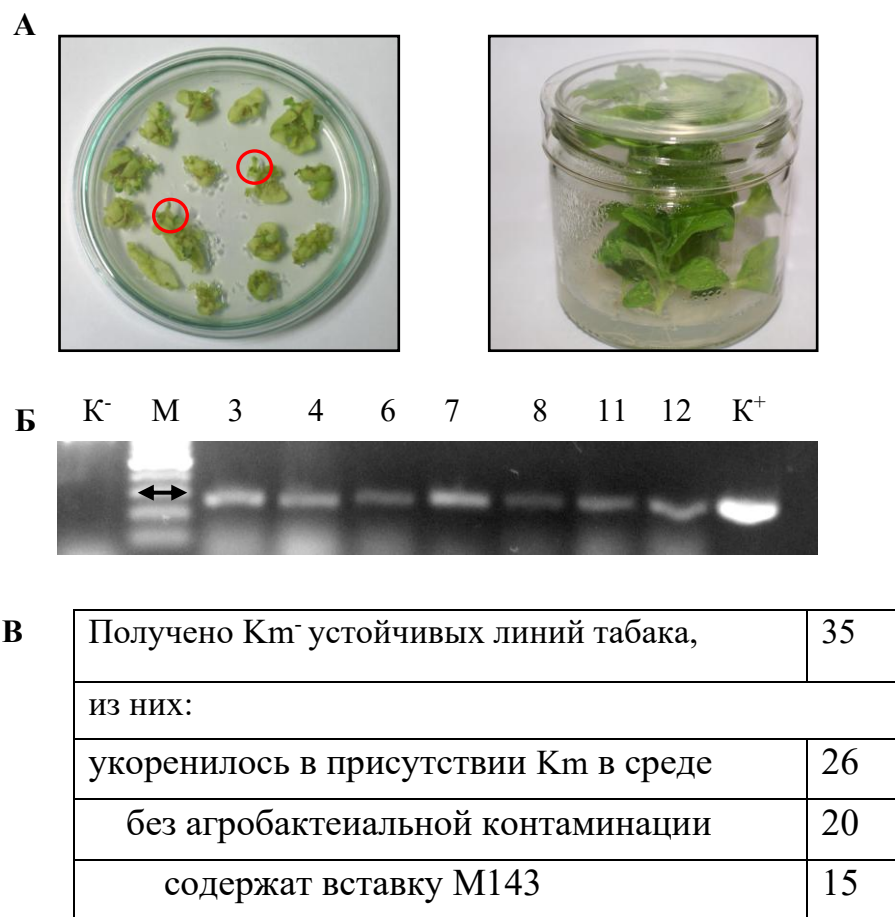


Рисунок 41 – Трансформация табака вектором pVIM2. А. Регенерация адвентивных побегов на листовых эксплантах на среде с 50 мг/л Km (слева) и укоренившиеся канамициноустойчивые растения (справа). Б. ПЦР- анализ некоторых канамициноустойчивых линий. В. Результаты агробактериальной трансформации табака вектором pVIM2.

Цифрами обозначены линии трансгенных растений; К⁺ - ДНК вектора pVIM2; К⁻ -ДНК табака, трансформированного вектором pV1121; М- ДНК маркеры молекулярной массы, стрелкой указан маркер 150 п.н. Используются праймеры M2_for и M2_rev, ожидаемая длина амплифицируемого фрагмента- 129 п.н.

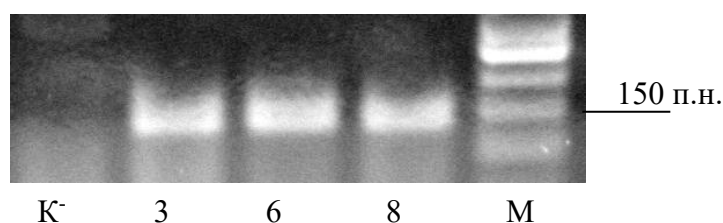


Рисунок 42 - ОТ-ПЦР анализ некоторых линий табака. Цифрами обозначены линии трансгенных растений. К⁻- табак, трансформированный вектором pV1121; М- маркеры молекулярной массы ДНК. Используются праймеры к фрагменту M143 M2_for и M2_rev. Ожидаемая длина фрагмента 129 п.н.

3.2.3. Клонирование гена M143 в слиянии с геном β -глюкуронидазы. Анализ экспрессии слитой последовательности M143- β -глюкуронидаза в трансгенных растения табака

Основным методом повышения накопления рекомбинантных пептидов в растениях является их экспрессия в слиянии с белком - носителем. К числу таких белков относится и β -глюкуронидаза. Ген β -глюкуронидазы кодирует гидролазу, катализирующую расщепление разнообразных β -глюкуронидов. β -глюкуронидаза широко используется в генетической инженерии растений, так как отличается высокой стабильностью, способностью накапливаться в растительных клетках, не оказывает токсического эффекта на растения и легко детектируется [416].

Фрагмент M143 был слит с 5'- концом гена β -глюкуронидазы, для этого фрагмент был амплифицирован с использованием праймеров M2-143for и M2-143rev, плазмида pUC19M143 была использована как матрица (Таблица 15). В последовательность M143 с помощью праймеров были добавлены сайты *Xba*I (на 5'-конце M143) и *Bam*HI (на 3'-конце фрагмента), затем она была клонирована по этим сайтам в вектор pBI121. Полученная плазмида pBIM143 была перенесена в *A. tumefaciens* CBE21 и использована для агробактериальной трансформации табака (Рисунок 43).

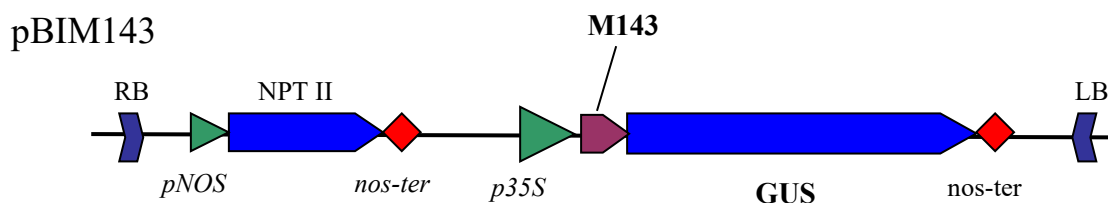


Рисунок 43 - Структура вектора pBIM143. npt II - ген неомифосфотрансферазы II; pNOS - промотор гена нопалинсинтазы *A. tumefaciens*; nos ter - терминатор гена нопалинсинтазы *A. tumefaciens*; p35S - промотор 35S вируса мозаики цветной капусты. GUS - последовательность гена β -глюкуронидазы.

В результате трансформации было получено 15 независимых канамициноустойчивых линий регенерантов, у которых наблюдалось образование корней в присутствии селективного антибиотика. Двенадцать трансгенных линий было проанализировано на наличие вставки последовательности M143, наличие целевой вставки было показано в 11 линиях (Рисунок 44). Растения этих линий *in vitro* были проанализированы методом гистохимического окрашивания.

А

Получено Km ^r устойчивых линий табака, всего	25
из них:	
укоренилось в присутствии Km в среде	15
без агробактериальной контаминации	14
содержат вставку последовательности M143	11
гистохимическая детекция β-глюкуронидазы	11

Б

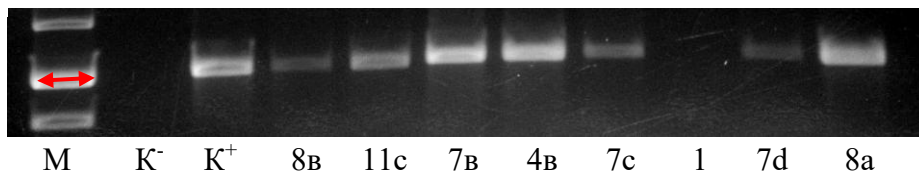


Рисунок 44 - Трансформация табака вектором pVIM143. А. Результаты трансформации табака вектором pVIM143. Б. ПЦР-анализ геномной ДНК некоторых канамициноустойчивых линий. Цифрами обозначены различные линии табака; K⁻ - нетрансформированное растение, K⁺ - ДНК плазмиды pVIM143, M- маркеры молекулярной массы ДНК. Использованы праймеры M2-143for и uidA_{low}, ожидаемая длина амплифицируемого фрагмента - 1024 п.н.

Интенсивность окраски линий табака варьировала от интенсивной до очень слабой, что отражало различия в активности β -глюкуронидазы в трансгенных линиях (Рисунок 45).

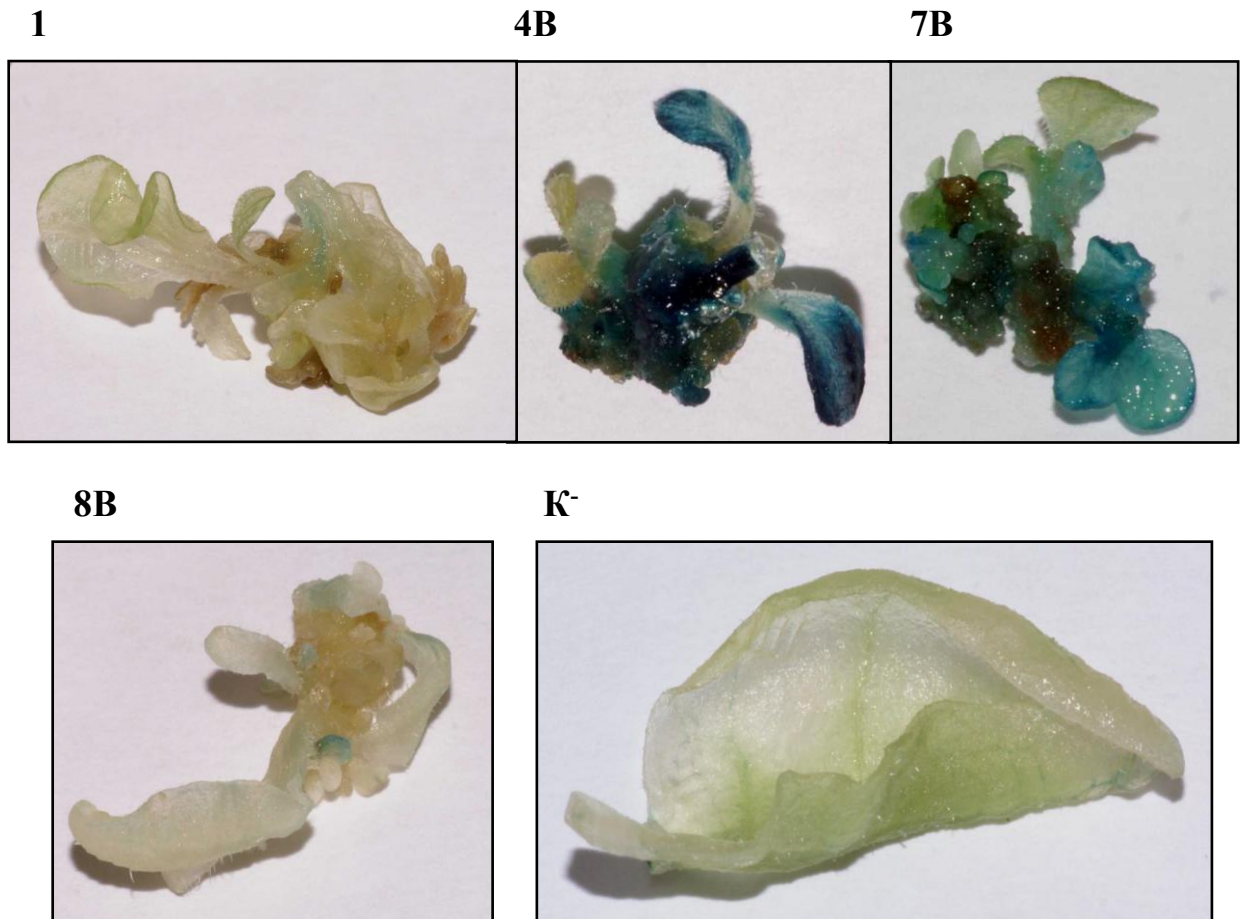


Рисунок 45 - Гистохимический анализ экспрессии β -глюкуронидазы в некоторых линиях трансгенного табака *in vitro*. Линии были получены после трансформации вектором pVIM143. Цифрами обозначены линии табака, K- нетрансгенное растение.

Трансгенные линии табака, накапливающие слитый белок M143- β -глюкуронидаза, культивировались в теплице. Трансгенные растения по скорости роста, срокам цветения, габитусу надземной части, высоте и другим характеристикам не отличались от нетрансгенных растений.

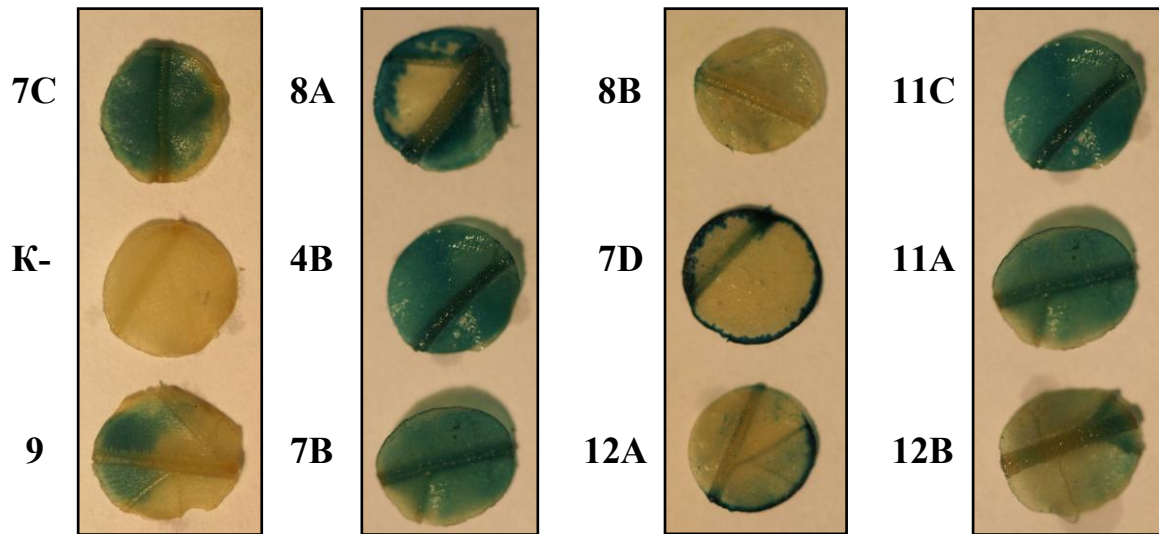


Рисунок 46 – Гистохимическое окрашивание высечек из листовых пластинок растений табака, трансформированных вектором pВІМ143. Цифрами обозначены различные трансгенные линии, К⁻ - нетрансгенное растение табака. Растения выращивали в теплице 3 недели.

Активность β -глюкуронидазы была изучена методом гистохимического окрашивания высечек из листовых пластинок трансгенных растений; трансгенные растения культивировались в теплице в течение 3 недель. Интенсивность окрашивания высечек была существенно ниже, чем при гистохимическом анализе тех же линий *in vitro* (Рисунок 46). После 6 месяцев роста в теплице активность β -глюкуронидазы методом гистохимического окрашивания во всех изученных линиях не детектировалась [414]. Результаты анализа активности β -глюкуронидазы в трансгенных растениях табака различного возраста показаны в Таблице 30. Вестерн-блот анализ образцов белка, выделенного из листьев трансгенных растений, подтвердил отсутствие этого белка в изученных линиях (Рисунок 47).

Таблица 30 - Гистохимический анализ трансгенных растений табака различного возраста, трансформированных вектором pВІМ143.

Возраст растений	Линия										
	4в	7в	7с	7d	8а	8в	9	11а	11с	12а	12в
<i>in vitro</i>	+++	+++	++	+	++	+	+	+	+++	+	+
3 недели	++	++	+	+/-	+	-	+/-	+	++	+/-	+/-
6 месяцев	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Интенсивность окрашивания растительных тканей: - отсутствие окрашивания, +/- очень слабое окрашивание (на грани различимости), + слабое окрашивание, ++ сильное окрашивание, +++ очень сильное окрашивание.

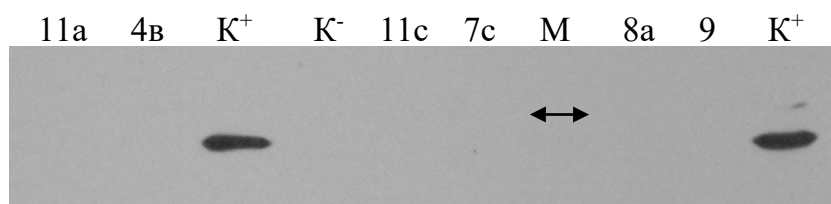


Рисунок 47 - Вестерн-блот анализ линий табака, трансформированных вектором pВІМ143. Цифрами обозначены линии трансгенных растений, K⁻ - нетрансгенное растение табака, K⁺ - растения табака, трансформированные вектором pВІ121, M - маркер молекулярной массы, стрелкой обозначен маркер 85 кДа. Использованы антитела к β-глюкуронидазе. Ожидаемый размер слитого белка M143- β-глюкуронидаза - 75,5 кДа.

Мы предполагаем, что на экспрессию слитого белка M143-β-глюкуронидаза в трансгенных растениях негативно повлияло присутствие в пептиде M143 гидрофобного трансмембранного домена белка M2 (Рисунок 7). Имеются данные, что трансмембранный домен белка M2 (25-43 а.о.), может собираться в тетрамерную структуру, даже если он представлен в виде пептида [301,440]. Функционально активная молекула β-глюкуронидазы является гомотетрамером. Возможно, присутствие трансмембранного домена в молекулах M143-β-

глюкуронидаза ведёт к их некорректной сборке в тетрамерную структуру [441]. Образующиеся в результате агрегаты определяются растительной клеткой как дефектные и подвергаются протеолизу. Таким образом, было показано, что после 6 месяцев роста в теплице трансгенных линий табака, трансформированных вектором pВІМ143, происходило затухание экспрессии белка М143-β-глюкуронидаза в растениях.

3.2.4. Клонирование последовательностей М130 и М122 в слиянии с геном β-глюкуронидазы. Анализ экспрессии слитых генов в трансгенных растения табака

Нами были клонированы варианты, кодирующие пептиды с частично или полностью удаленным трансмембранным доменом. Нуклеотидные последовательности вариантов М130 (длина 30 а.о.) и М122 (длина 22 а.о.) были амплифицированы с использованием плазмиды pВІМ143 как матрицы, и праймеров M2-130for/M2-130rev и M2-130for/M122R (Таблица 15). Так же как и М143, последовательности М122 и М130, были клонированы в вектор pВІ121 в рамке с 5'-концом гена β-глюкуронидазы. В результате были получены векторы pВІМ130 и pВІМ122 (Рисунок 48) [414].

Растения табака были трансформированы векторами pВІМ122 и pВІМ130, в результате было получено 22 и 24 независимые канамицинустойчивые линии. Растения *in vitro* канамицинустойчивых линий были проанализированы с помощью гистохимического окрашивания. Во всех линиях была показана активность β-глюкуронидазы, интенсивность окраски различных линий варьировала от слабой до очень сильной. Среди линий, полученных после трансформации векторами pВІМ130 и pВІМ122, было отобрано по 15 линий с наибольшей интенсивностью окрашивания тканей.

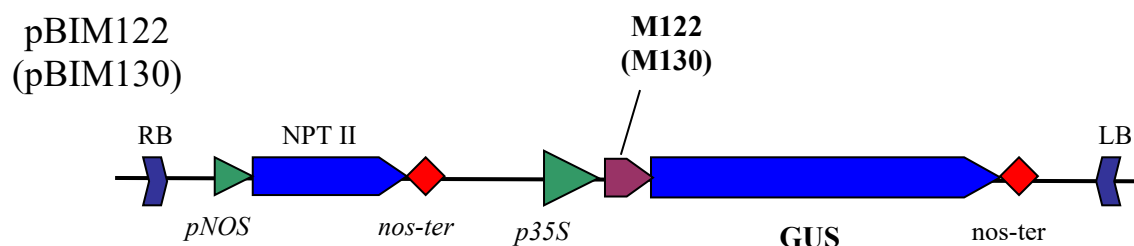


Рисунок 48 - Структура векторов pBIM122 и pBIM130. M122 и M130 - варианты аминокотонального фрагмента белка M2, длиной 22 а.о. и 30 а.о., соответственно.

npt II - ген неомицинофосфотрансферазы II; pNOS - промотор гена нопалинсинтазы *A. tumefaciens*; nos ter - терминатор гена нопалинсинтазы *A. tumefaciens*; p35S - промотор 35S вируса мозаики цветной капусты. GUS - последовательность гена β -глюкуронидазы.

ПЦР-анализ подтвердил интеграцию целевых последовательностей в геном исследованных линий (Рисунок 49, Таблица 31). Линии, содержащие последовательности M130- β -глюкуронидаза или M122- β -глюкуронидаза, и продемонстрировавшие активность β -глюкуронидазы, были адаптированы к условиям теплицы, где культивировались до проведения дальнейших исследований.

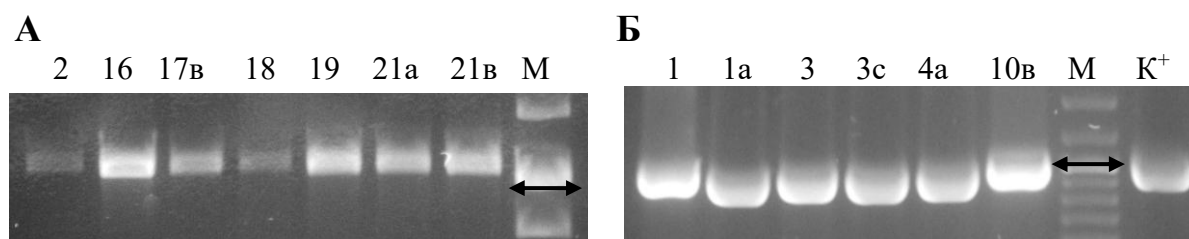


Рисунок 49 - ПЦР- анализ некоторых линий табака, трансформированных векторами pBIM130 (А) и pBIM122 (Б). Цифрами обозначены различные трансгенные линии; K⁺- вектор pBIM122; М- маркер молекулярной массы ДНК; стрелкой \leftrightarrow указана полоса 1000 п.н. Для ПЦР использованы праймеры M2-130for и uidA_{low}, ожидаемая длина амплифицируемых фрагментов- 1000 п.н. (pBIM130) и 976 п.н. (pBIM122).

Таблица 31 - Результаты трансформации табака векторами pVIM130 и pVIM122.

Получено Km- устойчивых линий табака:	
Вектор pVIM130	22
Вектор pVIM122	24
из них:	
укоренилось в присутствии Km в среде:	
Вектор pVIM130	21
Вектор pVIM122	22
Показана активность β -глюкуронидазы <i>in vitro</i> :	
Вектор pVIM130	20
Вектор pVIM122	21
Отобрано для проведения дальнейших анализов:	
Вектор pVIM130	15
Вектор pVIM122	15
Из них:	
Линий без агробактериальной контаминации:	
Вектор pVIM130	14
Вектор pVIM122	15
Содержат вставку последовательности M143	
Вектор pVIM130	14
Вектор pVIM122	13

После 6 месяцев роста в теплице активность β -глюкуронидазы детектировалась во всех трансгенных линиях, полученных после трансформации векторами pVIM122 и pVIM130. При этом интенсивность окрашивания листовых высечек соответствовала интенсивности окрашивания тканей *in vitro* (Рисунок 50, Таблица 32) [414].

Дальнейшие исследования проводили с использованием линий, которые продемонстрировали наиболее быстрое и интенсивное окрашивание. Были использованы линии 2, 16 и 17в, полученные после трансформации вектором pVIM130, и линии 1, 1а и 3- трансформация вектором pVIM122.

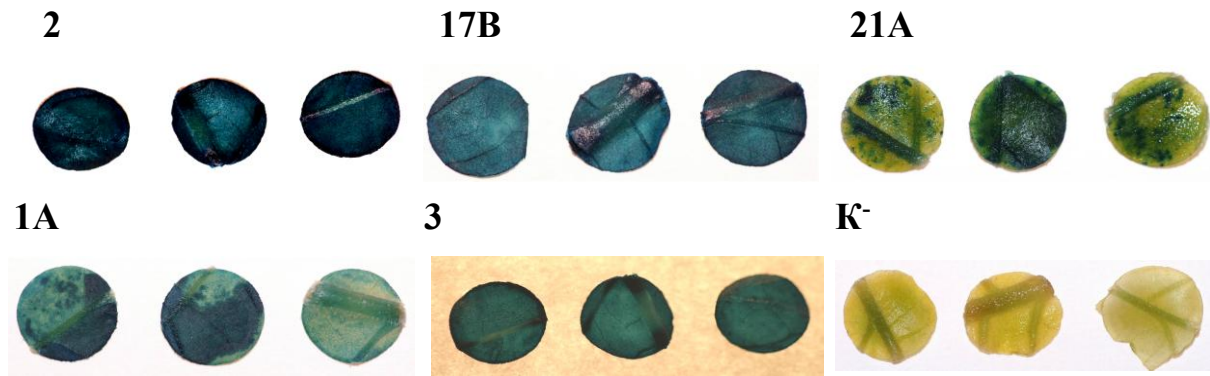


Рисунок 50 - Гистохимический анализ активности β -глюкуронидазы в линиях табака, трансформированных векторами pVIM122 и pVIM130. Цифрами обозначены различные линии трансгенных растений; K⁻ - нетрансгенное растение. Растения культивировались в теплице в течение 6 месяцев.

Таблица 32 - Анализ активности β -глюкуронидазы методом гистохимического окрашивания высечек из листовых пластинок трансгенных растений табака разного возраста.

Возраст растений	Вектор										
	pVIM130					pVIM122					
	Линия										
	2	16	17в	19	21а	1	1а	3	3с	4а	10в
<i>in vitro</i>	+++	+++	+++	+	++	+++	+++	+++	+	+	++
3 нед.	+++	+++	+++	+	+	+++	+++	+++	+	+	+
6 мес.	+++	++	+++	+	+	++	+++	+++	+	+	+

Интенсивность окрашивания растительных тканей: + - слабая, ++ - сильная, +++ - очень сильная.

Вестерн блот анализ образцов белка из листьев трансгенных растений, выявил во всех образцах полосы с молекулярной массой около 74кДа, которые соответствовали слитым белкам М130-β-глюкуронидаза (74кДа) и М122-β-глюкуронидаза (73,1кДа). В образцах из растений, трансформированных вектором рВ1121, детектировались более лёгкие полосы, имеющие размер около 72 кДа и соответствующие β-глюкуронидазе (Рисунок 51).

Вестерн-блот образцов с использованием антител к пептиду М2е подтвердил его присутствие в составе слитых белков в трансгенных растениях. При гибридизации с анти-М2е антителами, пептид М2е детектировался во всех изученных линиях трансгенных растений (Рисунок 51). Масса узнаваемых анти-М2е антителами белков соответствовала полосам, детектируемым с помощью антител к β-глюкуронидазе. В образцах белка из растений, трансформированных вектором рВ1121 и экспрессирующих только β-глюкуронидазу, соответствующий сигнал отсутствовал [414].

Результаты Вестерн-блот анализа подтвердили экспрессию пептида М2е в слиянии с β-глюкуронидазой в растениях табака. Пептид М2е стабильно экспрессировался в слитом белке как в составе N- концевой участка гена М2 длиной 30 а.о. (вариант М130), так и в варианте М122, включающего только последовательность целевого пептида. Варианты М122 и М130 не различались между собой по уровню накопления М2е. Белки М122-β-глюкуронидаза и М130-β-глюкуронидаза детектировались в виде одной полосы без заметных признаков деградации [414]. Таким образом, фрагмент трансмембранного домена PLVVAA, присутствующий в варианте М130 не оказывал видимого влияния на уровень экспрессии и стабильность белка М130-β-глюкуронидаза.

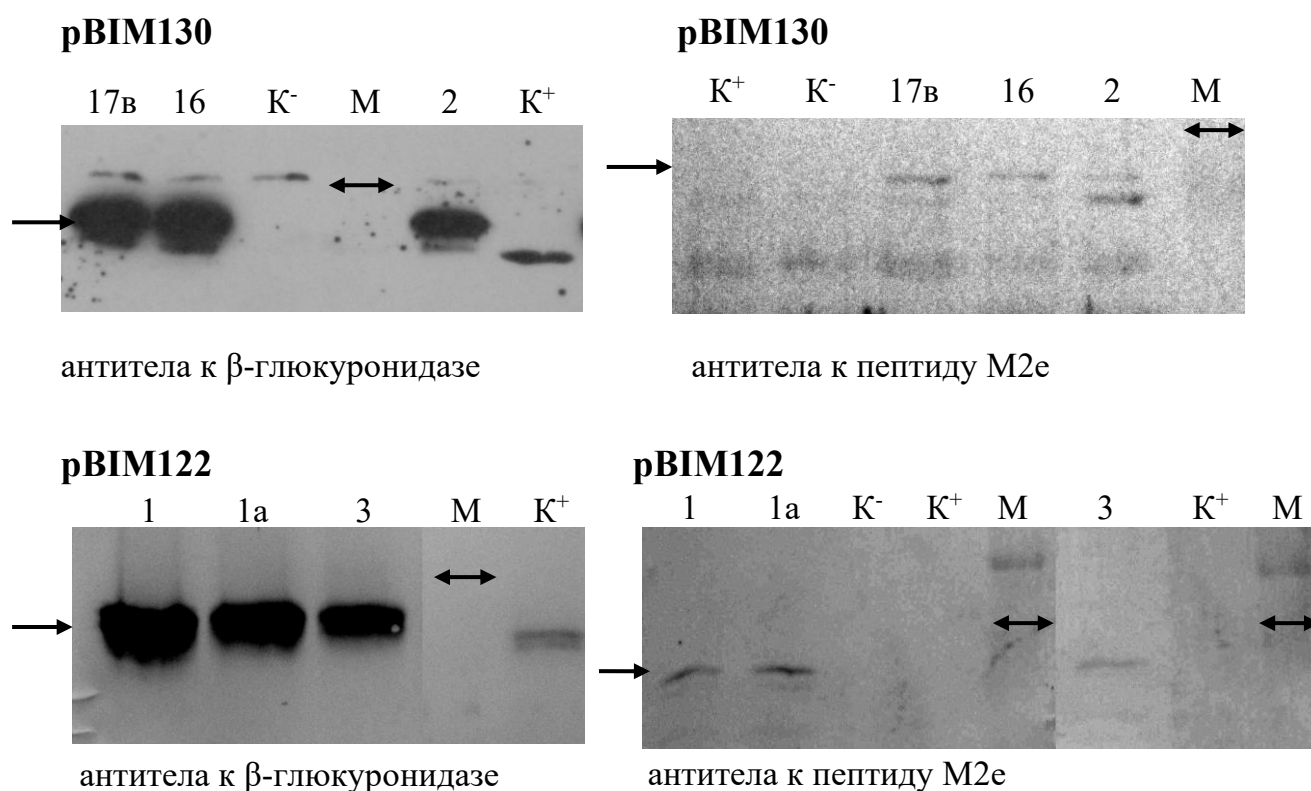


Рисунок 51 - Вестерн-блот анализ линий табака, трансформированных векторами pVIM130 и pVIM122.

Цифрами обозначены линии трансгенных растений, K⁻ - нетрансформированное растение табака, K⁺ - растения табака, трансформированные вектором pVIM121, M- маркер молекулярной массы белков. Стрелкой ↔ обозначена полоса маркера, соответствующая 85 кДа. Стрелкой → указаны слитые белки M130- β-глюкуронидаза (размер 74 кДа) и M122- β-глюкуронидаза (размер 73,1 кДа).

В трансгенных растениях серии M143 белок M143-β-глюкуронидаза детектировался только *in vitro*, в ходе культивирования растений в теплице экспрессия целевого белка затухала. Мы предполагаем, что это связано с тем, что пептид M143 включает гидрофобный трансмембранный домен PLVVAASIIIGILHLILWIL белка M2. По-видимому, присутствие этого домена ведёт к некорректному фолдингу M143-β-глюкуронидазы, в результате чего этот белок определяется растительной клеткой как дефектный и подвергается протеолизу. При этом растения линий, трансформированных вектором pVIM143,

также как и векторами pVIM122 и pVIM130, по своим морфологическим и ростовым характеристикам были полностью идентичны нетрансформированным растениям.

Такаим образом, оптимальным вариантом для экспрессии в растениях является фрагмент гена M2, включающий только пептид M2e (вариант M122) или пептид M2e плюс короткий фрагмент трансмембранного домена (вариант M130). Линии, трансформированные нуклеотидными последовательностями, кодирующими белки M122- β -глюкуронидаза или M130- β -глюкуронидаза, продемонстрировали стабильную экспрессию и накопление целевого пептида M2e в составе слитого белка [414]. Для дальнейших исследований нами был выбран вариант M130 - N- концевой участок белка M2 длиной 30 а.о.

3.2.5. Клонирование нуклеотидной последовательности субъединицы В рицина из геномной ДНК клещевины *Ricinus communis*

Стандартным способом усиления иммуногенных свойств антигенных детерминант субъединичных вакцин является использование адъювантов. Для использования в качестве адъюванта мы выбрали субъединицу В рицина. Рядом исследователей было показано, что по своим иммуногенным свойствам субъединица В рицина не уступает такому распространенному адъюванту, как субъединица В токсина холеры [350,352,354].

Нуклеотидная последовательность, кодирующая субъединицу В рицина (RTV) была клонирована в векторе pUC18. Амплификацию последовательности RTV проводили с использованием праймеров RTV_F и RTV_R (Таблица 15), в которые были добавлены сайты рестрикции *Xba*I и *Sac*I, соответственно. В качестве матрицы была использована геномная ДНК, выделенная из листьев местного сорта клещевины. Фрагмент, содержащий последовательность RTV был

клонирован в вектор pUC18. Полученная плазмида, содержащая вставку нуклеотидной последовательности RTB (pUC18RTB), была использована в дальнейших исследованиях [418].

Нуклеотидная и аминокислотная последовательности клонированной нами RTB совпадали с большинством соответствующих последовательностей из базы данных GenBank (Рисунок 52 и 53). Клонированный нами вариант RTB отличался на 15 нуклеотидных остатков (10 аминокислотных замен) только от последовательности GenBank ID GU073248, что может быть связано с генетическими различиями использованных для исследований сортов клещевины. Таким образом, клонированная нами последовательность RTB соответствовала нуклеотидным последовательностям RTB, представленным в GenBank, и была использована для проведения дальнейших исследований .

X03179 GCTGATGTTTGTATGGATCCTGAGCCCATAGTGCGTATCGTAGGTCGAAATGGTCTATGTGTTGATGTTAGGGATGGAAGATTCCACAACGGAAACGCAA
X52908 GCTGATGTTTGTATGGATCCTGAGCCCATAGTGCGTATCGTAGGTCGAAATGGTCTATGTGTTGATGTTAGGGATGGAAGATTCCACAACGGAAACGCAA
GQ916908 GCTGATGTTTGTATGGATCCTGAGCCCATAGTGCGTATCGTAGGTCGAAATGGTCTATGTGTTGATGTTAGGGATGGAAGATTCCACAACGGAAACGCAA
AASG0205 GCTGATGTTTGTATGGATCCTGAGCCCATAGTGCGTATCGTAGGTCGAAATGGTCTATGTGTTGATGTTAGGGATGGAAGATTCCACAACGGAAACGCAA
JQ617861 GCTGATGTTTGTATGGATCCTGAGCCCATAGTGCGTATCGTAGGTCGAAATGGTCTATGTGTTGATGTTAGGGATGGAAGATTCCACAACGGAAACGCAA
GU073248 GTTGATGTTTGTATGGATCCTGAGCCCATAGTGCGTATCGTAGGTCGAAATGGTCTATGTGTTGATGTTAGGGATGGAAGATTCCACAACGGAAACGCAA
contigRTB GCTGATGTTTGTATGGATCCTGAGCCCATAGTGCGTATCGTAGGTCGAAATGGTCTATGTGTTGATGTTAGGGATGGAAGATTCCACAACGGAAACGCAA

X03179 TACAGTTGTGGCCATGCAAGTCTAATACAGATGCAAATCAGCTCTGGACTTTGAAAAGAGACAATACTATTTCGATCTAATGGAAAAGTGTTTAACTACTTA
X52908 TACAGTTGTGGCCATGCAAGTCTAATACAGATGCAAATCAGCTCTGGACTTTGAAAAGAGACAATACTATTTCGATCTAATGGAAAAGTGTTTAACTACTTA
GQ916908 TACAGTTGTGGCCATGCAAGTCTAATACAGATGCAAATCAGCTCTGGACTTTGAAAAGAGACAATACTATTTCGATCTAATGGAAAAGTGTTTAACTACTTA
AASG0205 TACAGTTGTGGCCATGCAAGTCTAATACAGATGCAAATCAGCTCTGGACTTTGAAAAGAGACAATACTATTTCGATCTAATGGAAAAGTGTTTAACTACTTA
JQ617861 TACAGTTGTGGCCATGCAAGTCTAATACAGATGCAAATCAGCTCTGGACTTTGAAAAGAGACAATACTATTTCGATCTAATGGAAAAGTGTTTAACTACTTA
GU073248 TACAGTTGTGGCCATGCAAGTCTAATACAGATGCAAATCAGCTCTGGACTTTGAAAAGAGACAATACTATTTCGATCTAATGGAAAAGTGTTTAACTACTTA
contigRTB TACAGTTGTGGCCATGCAAGTCTAATACAGATGCAAATCAGCTCTGGACTTTGAAAAGAGACAATACTATTTCGATCTAATGGAAAAGTGTTTAACTACTTA

X03179 CGGGTACAGTCCGGGAGTCTATGTGATGATCTATGATTGCAATACTGCTGCAACTGATGCCACCCGCTGGCAAATATGGGATAATGGAACCATCATAAAAT
X52908 CGGGTACAGTCCGGGAGTCTATGTGATGATCTATGATTGCAATACTGCTGCAACTGATGCCACCCGCTGGCAAATATGGGATAATGGAACCATCATAAAAT
GQ916908 CGGGTACAGTCCGGGAGTCTATGTGATGATCTATGATTGCAATACTGCTGCAACTGATGCCACCCGCTGGCAAATATGGGATAATGGAACCATCATAAAAT
AASG0205 CGGGTACAGTCCGGGAGTCTATGTGATGATCTATGATTGCAATACTGCTGCAACTGATGCCACCCGCTGGCAAATATGGGATAATGGAACCATCATAAAAT
JQ617861 CGGGTACAGTCCGGGAGTCTATGTGATGATCTATGATTGCAATACTGCTGCAACTGATGCCACCCGCTGGCAAATATGGGATAATGGAACCATCATAAAAT
GU073248 CGGGTACAGTCCGGGAGTCTATGTGATGATCTATGATTGCAATACTGCTGCAACTGATGCCACCCGCTGGCAAATATGGGATAATGGAACCATCATAAAAT
contigRTB CGGGTACAGTCCGGGAGTCTATGTGATGATCTATGATTGCAATACTGCTGCAACTGATGCCACCCGCTGGCAAATATGGGATAATGGAACCATCATAAAAT

X03179 CCCAGATCTAGTCTAGTTTTAGCAGCGACATCAGGGAACAGTGGTACCACACTTACAGTGCAAACCAACATTTATGCCGTTAGTCAAGGTTGGCTTCCTA
X52908 CCCAGATCTAGTCTAGTTTTAGCAGCGACATCAGGGAACAGTGGTACCACACTTACAGTGCAAACCAACATTTATGCCGTTAGTCAAGGTTGGCTTCCTA
GQ916908 CCCAGATCTAGTCTAGTTTTAGCAGCGACATCAGGGAACAGTGGTACCACACTTACAGTGCAAACCAACATTTATGCCGTTAGTCAAGGTTGGCTTCCTA
AASG0205 CCCAGATCTAGTCTAGTTTTAGCAGCGACATCAGGGAACAGTGGTACCACACTTACAGTGCAAACCAACATTTATGCCGTTAGTCAAGGTTGGCTTCCTA
JQ617861 CCCAGATCTAGTCTAGTTTTAGCAGCGACATCAGGGAACAGTGGTACCACACTTACAGTGCAAACCAACATTTATGCCGTTAGTCAAGGTTGGCTTCCTA
GU073248 CCCAGATCTAGTCTAGTTTTAGCAGCGACATCAGGGAACAGTGGTACCACACTTACAGTGCAAACCAACATTTATGCCGTTAGTCAAGGTTGGCTTCCTA
contigRTB CCCAGATCTAGTCTAGTTTTAGCAGCGACATCAGGGAACAGTGGTACCACACTTACAGTGCAAACCAACATTTATGCCGTTAGTCAAGGTTGGCTTCCTA

X03179 CTAATAATACACAACCTTTTGTGACAACCATTTGTTGGGCTATATGGTCTGTGCTTGCAAGCAAATAGTGGACAAGTATGGATAGAGGACTGTAGCAGTGA
X52908 CTAATAATACACAACCTTTTGTGACAACCATTTGTTGGGCTATATGGTCTGTGCTTGCAAGCAAATAGTGGACAAGTATGGATAGAGGACTGTAGCAGTGA
GQ916908 CTAATAATACACAACCTTTTGTGACAACCATTTGTTGGGCTATATGGTCTGTGCTTGCAAGCAAATAGTGGACAAGTATGGATAGAGGACTGTAGCAGTGA
AASG0205 CTAATAATACACAACCTTTTGTGACAACCATTTGTTGGGCTATATGGTCTGTGCTTGCAAGCAAATAGTGGACAAGTATGGATAGAGGACTGTAGCAGTGA
JQ617861 CTAATAATACACAACCTTTTGTGACAACCATTTGTTGGGCTATATGGTCTGTGCTTGCAAGCAAATAGTGGACAAGTATGGATAGAGGACTGTAGCAGTGA

GU073248 CTAATAATACACAACCTTTTGTGACAACCATTTGTTGGGCTATATGGTCTGTGCTTGCAAGCAAATAGTGGACAAGTATGGTTAGAGGACTGTAC CAGTGA
contigRTB CTAATAATACACAACCTTTTGTGACAACCATTTGTTGGGCTATATGGTCTGTGCTTGCAAGCAAATAGTGGACAAGTATGGTTAGAGGACTGTAC CAGTGA

X03179 AAAGGCTGAACAACAGTGGGCTCTTTATGCAGATGGTTCAATACGTCCTCAGCAAAACCGAGATAAATTGCCTTACAAGTGATTCTAATATACGGGAACA
X52908 AAAGGCTGAACAACAGTGGGCTCTTTATGCAGATGGTTCAATACGTCCTCAGCAAAACCGAGATAAATTGCCTTACAAGTGATTCTAATATACGGGAACA
GQ916908 AAAGGCTGAACAACAGTGGGCTCTTTATGCAGATGGTTCAATACGTCCTCAGCAAAACCGAGATAAATTGCCTTACAAGTGATTCTAATATACGGGAACA
AASG0205 AAAGGCTGAACAACAGTGGGCTCTTTATGCAGATGGTTCAATACGTCCTCAGCAAAACCGAGATAAATTGCCTTACAAGTGATTCTAATATACGGGAACA
JQ617861 AAAGGCTGAACAACAGTGGGCTCTTTATGCAGATGGTTCAATACGTCCTCAGCAAAACCGAGATAAATTGCCTTACAAGTGATTCTAATATACGGGAACA
GU073248 AAAGGCTGAACAACAATGGGCTCTTTATGCAGATGGTTCAATACGTCCTCAGCAAAACCGAGATAAATTGCCTTACAAGTGATTCTAATATACAGGGGAACA
contigRTB AAAGGCTGAACAACAGTGGGCTCTTTATGCAGATGGTTCAATACGTCCTCAGCAAAACCGAGATAAATTGCCTTACAAGTGATTCTAATATACGGGAACA

X03179 GTTGTCAAGATCCTCTCTTGTGGCCCTGCATCCTCTGGCCAACGATGGATGTTCAAGAATGATGGAACCATTTTAAATTTGTATAGTGGCTTGGTGTTAG
X52908 GTTGTCAAGATCCTCTCTTGTGGCCCTGCATCCTCTGGCCAACGATGGATGTTCAAGAATGATGGAACCATTTTAAATTTGTATAGTGGCTTGGTGTTAG
GQ916908 GTTGTCAAGATCCTCTCTTGTGGCCCTGCATCCTCTGGCCAACGATGGATGTTCAAGAATGATGGAACCATTTTAAATTTGTATAGTGGCTTGGTGTTAG
AASG0205 GTTGTCAAGATCCTCTCTTGTGGCCCTGCATCCTCTGGCCAACGATGGATGTTCAAGAATGATGGAACCATTTTAAATTTGTATAGTGGCTTGGTGTTAG
JQ617861 GTTGTCAAGATCCTCTCTTGTGGCCCTGCATCCTCTGGCCAACGATGGATGTTCAAGAATGATGGAACCATTTTAAATTTGTATAGTGGCTTGGTGTTAG
GU073248 GTTGTCAAGATCCTCTCTTGTGGCCCTGCATCCTCTGGCCAACGATGGATGTTCAAGAATGATGGAACCATTTTAAATTTGTATAGTGGCTTGGTGTTAG
contigRTB GTTGTCAAGATCCTCTCTTGTGGCCCTGCATCCTCTGGCCAACGATGGATGTTCAAGAATGATGGAACCATTTTAAATTTGTATAGTGGCTTGGTGTTAG

X03179 ATGTGAGG GCATCGGATCCG
X52908 ATGTGAGG GCATCGGATCCG
GQ916908 ATGTGAGG -----
AASG0205 ATGTGAGG GCATCGGATCCG
JQ617861 ATGTGAGG GCATCGGATCCG
GU073248 ATGTGAGG GCATCGGATCCG
contigRTB ATGTGAGG GCATCGGATCCG

Рисунок 52 – Сравнение нуклеотидной последовательности субъединицы В рицина, полученной в данной работе (contigRTB), с нуклеотидными последовательностями из базы данных GenBank. AASG0205- *R. communis* cv. Hale; GQ916908 - *R. communis*, препрорицин; GU073248- *R. communis*, ген В цепи рицина; JQ617861- *R. communis* cv. RB816, ген рицина В; X03179- *R. communis*, препрорицин; X52908 - *R. communis*, препрорицин.

```

ACY38598  VDGCMDPEPIVRIVGRNGLCVDVDRGRFHNGNAIQLWPCKSNSTDANQLWTLKRDNTIRSNGKCLTTYGYSPGVYVMIYDCNTAATDATRWQIWDNGTIIN
ADG29117  ADVCMDPEPIVRIVGRNGLCVDVDRGRFHNGNAIQLWPCKSNSTDANQLWTLKRDNTIRSNGKCLTTYGYSPGVYVMIYDCNTAATDATRWQIWDNGTIIN
CAA26939  ADVCMDPEPIVRIVGRNGLCVDVDRGRFHNGNAIQLWPCKSNSTDANQLWTLKRDNTIRSNGKCLTTYGYSPGVYVMIYDCNTAATDATRWQIWDNGTIIN
CAA37095  ADVCMDPEPIVRIVGRNGLCVDVDRGRFHNGNAIQLWPCKSNSTDANQLWTLKRDNTIRSNGKCLTTYGYSPGVYVMIYDCNTAATDATRWQIWDNGTIIN
EEF27734  ADVCMDPEPIVRIVGRNGLCVDVDRGRFHNGNAIQLWPCKSNSTDANQLWTLKRDNTIRSNGKCLTTYGYSPGVYVMIYDCNTAATDATRWQIWDNGTIIN
AFH96941  ADVCMDPEPIVRIVGRNGLCVDVDRGRFHNGNAIQLWPCKSNSTDANQLWTLKRDNTIRSNGKCLTTYGYSPGVYVMIYDCNTAATDATRWQIWDNGTIIN
contigRTB ADVCMDPEPIVRIVGRNGLCVDVDRGRFHNGNAIQLWPCKSNSTDANQLWTLKRDNTIRSNGKCLTTYGYSPGVYVMIYDCNTAATDATRWQIWDNGTIIN

ACY38598  PRSSLVLAATSGNSGSLTLTVQTNIIYVLSQGWLPNTNNTQPFVTTIVGLYGLCLQANSQVWIEDCSSEKAEQQWALYADGSIRPQQNRDNCLTSDSNIQGT
ADG29117  PRSSLVLAATSGNSGSLTLTVQTNIIYAVSQGWLPNTNNTQPFVTTIVGLYGLCLQANSQVWIEDCSSEKAEQQWALYADGSIRPQQNRDNCLTSDSNIRET
CAA26939  PRSSLVLAATSGNSGSLTLTVQTNIIYAVSQGWLPNTNNTQPFVTTIVGLYGLCLQANSQVWIEDCSSEKAEQQWALYADGSIRPQQNRDNCLTSDSNIRET
CAA37095  PRSSLVLAATSGNSGSLTLTVQTNIIYAVSQGWLPNTNNTQPFVTTIVGLYGLCLQANSQVWIEDCSSEKAEQQWALYADGSIRPQQNRDNCLTSDSNIRET
EEF27734  PRSSLVLAATSGNSGSLTLTVQTNIIYAVSQGWLPNTNNTQPFVTTIVGLYGLCLQANSQVWIEDCSSEKAEQQWALYADGSIRPQQNRDNCLTSDSNIRET
AFH96941  PRSSLVLAATSGNSGSLTLTVQTNIIYAVSQGWLPNTNNTQPFVTTIVGLYGLCLQANSQVWIEDCSSEKAEQQWALYADGSIRPQQNRDNCLTSDSNIRET
contigRTB PRSSLVLAATSGNSGSLTLTVQTNIIYAVSQGWLPNTNNTQPFVTTIVGLYGLCLQANSQVWIEDCSSEKAEQQWALYADGSIRPQQNRDNCLTSDSNIRET

ACY38598  VVKILSCGPASSQRWWMFKNDGTILNLYSGLVLDVRSADPSLKQIILYPLHGDPNQIWLPLF
ADG29117  VVKILSCGPASSQRWWMFKNDGTILNLYSGLVLDVRSADPSLKQIILYPLHGDPNQIWLPLF
CAA26939  VVKILSCGPASSQRWWMFKNDGTILNLYSGLVLDVRSADPSLKQIILYPLHGDPNQIWLPLF
CAA37095  VVKILSCGPASSQRWWMFKNDGTILNLYSGLVLDVRSADPSLKQIILYPLHGDPNQIWLPLF
EEF27734  VVKILSCGPASSQRWWMFKNDGTILNLYSGLVLDVRSADPSLKQIILYPLHGDPNQIWLPLF
AFH96941  VVKILSCGPASSQRWWMFKNDGTILNLYSGLVLDVRSADPSLKQIILYPLHGDPNQIWLPLF
contigRTB VVKILSCGPASSQRWWMFKNDGTILNLYSGLVLDVRSADPSLKQIILYPLHGDPNQIWLPLF

```

Рисунок 53 - Сравнение аминокислотной последовательности субъединицы В рицина, полученной в данной работе (contigRTB), с аминокислотными последовательностями из базы данных GenBank. ACY38598- цепь В рицина, *R. communis*; ADG29117- препрорицин; CAA26939- предшественник рицина из *R. communis*; CAA37095- препроформа рицина; EEF27734- предшественник рицина; AFH96941- *R. communis* cv. RB816, цепь В рицина.

3.2.6. Клонирование и экспрессия гена субъединицы В рицина в бактериальной системе

Для получения субъединицы В рицина в *E. coli* нуклеотидная последовательность RTB была клонирована в вектор pTYB11 (С-терминальный вариант клонирования целевой последовательности относительно интеина). Нуклеотидная последовательность RTB была амплифицирована с вектора pUC18RTB с использованием праймеров RBC_F и RBC_R. Полученный фрагмент был клонирован в вектор pTYB11 по сайтам рестрикции *PsiSI* и *EcoRI*. В результате для дальнейшей работы была получена плаزمида pTYB11RBC (Рисунок 54).

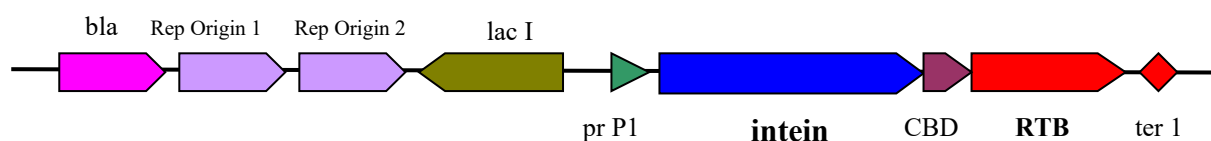


Рисунок 54 - Структура вектора pTYB11RBC.

Pr P1- промотор T7; intein – интеин *Sc VMA* из *S. cerevisiae*; CBD – хитин-связывающий домен из *B. circulans*; ter 1 – терминатор *rrnB T1*. RTB – субъединица В рицина.

Плазмида pTYB11RBC была перенесена в штамм *E.coli* BL21(DE3), в экспериментах были использованы четыре полученных клона. Пробы бактериальных культур отбирали через 2, 4 и 20 часов после начала индукции IPTG. В клонах 4, 10 и 12 *E. coli* BL21(DE3):pTYB11RBC через 20 часов было детектировано накопление белка массой 84 кДа, соответствующей слитому белку интеин-RTB (интеин - 56 кДа, RTB - 28 кДа) (Рисунок 55, А).

Образцы белка из клонов 4, 10 и 12 были проанализированы методом Вестерн блот анализа. Было показано, что антитела к хитинсвязывающему домену

СВД специфически связывались с белком размером 84 кДа. В образцах из *E. coli*, трансформированных пустым вектором рТУВ11, размер белка, детектируемого анти-СВД антителами, составлял 56 кДа, что соответствовало интеину (Рисунок 55, Б). Антитела к RTB также специфически связывались с белком размером 84 кДа (Рисунок 55, В).

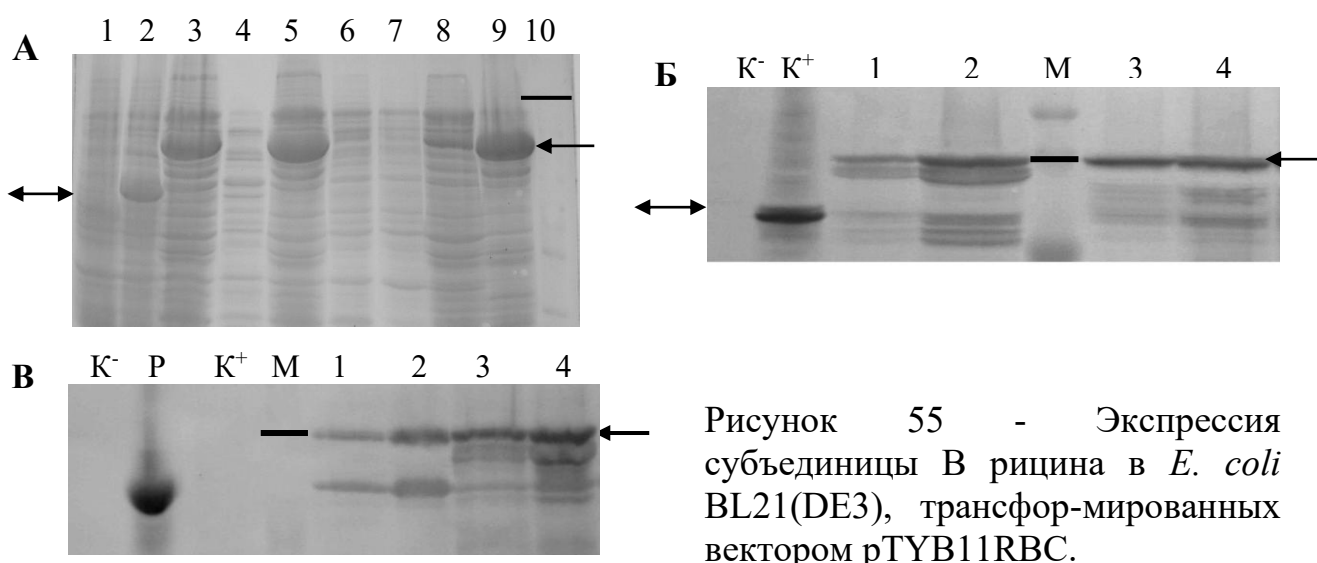


Рисунок 55 - Экспрессия субъединицы В рицина в *E. coli* BL21(DE3), трансформированных вектором рТУВ11RBC.

А. Электрофоретический анализ образцов общего белка *E. coli* BL21(DE3). Дорожка 1- BL21(DE3):рТУВ11RBC до добавления ИПТГ; 2- BL21(DE3):рТУВ11, 20 часов; 3- BL21(DE3):рТУВ11RBC/клон4, 20 ч; 4, 5- BL21(DE3):рТУВ11RBC/клон12, 2 и 20 ч; 6, 7- BL21(DE3):рТУВ11RBC/клон5, 2 и 20 ч; 8, 9- BL21(DE3):рТУВ11RBC/клон10, 2 и 20 ч. Указано время после начала индукции.

Б и В. Вестерн-блот анализ накопления белка интеин-RTB в *E. coli* BL21(DE3) с использованием антител к СВД (Б) и к RTB (В). К⁻ - BL21(DE3); К⁺ - индуцированные клетки BL21(DE3)::рТУВ11; 1, 2 - BL21(DE3)::рТУВ1RBC/клон12 после 4-х и 20-ти часов индукции, соответственно; 3, 4 - BL21(DE3)::рТУВ1RBC/клон10 после 4-х и 20-ти часов индукции.

М- маркеры молекулярной массы, Р – рицин из семян клещевины. Линией – обозначена полоса, соответствующая молекулярной массе 85 кДа, стрелкой → указан интеин-RTB (масса 84 кДа), стрелкой ↔ - интеин (масса 56 кДа).

Максимальное накопление RTB в *E. coli* BL21(DE3):рТУВ11RBC наблюдалось в клоне 12 после 20 часов индукции, этот клон был отобран для

дальнейших экспериментов. Полученный рекомбинантный RTB был использован в ходе исследований по изучению особенностей экспрессии RTB в растениях.

3.2.7. Конструирование вектора для экспрессии в растениях пептида M2e в слиянии с субъединицей В рицина

Следующим этапом исследований стало конструирование вектора для трансформации растений с элементами, позволяющими оптимизировать количество антигена M2e в белковых препаратах для иммунизации, полученных из трансгенных растений. Необходимость такой оптимизации обусловлена тем, что в зависимости от условий культивирования растения-продуцента содержание рекомбинантного антигена в его тканях может существенно варьировать. Нами предполагалось использование аффинной хроматографии на хитинсодержащих носителях для частичной очистки и концентрирования целевого белка из растительного экстракта. Кроме того, предполагалось изучить возможность оральной иммунизации лабораторных животных путём скармливания им хитинсодержащего носителя вместе с иммобилизованным на нём антигеном. Выбор хитинсодержащих носителей был обусловлен их низкой стоимостью и хорошей доступностью.

В качестве аффинной метки был выбран хитинсвязывающий домен (CBD) хитиназы A1 *Bacillus circulans*. Амплификацию CBD проводили с использованием вектора pTYB11 в качестве матрицы и праймеров CBD_for и CBD_rev (Таблица 15). Амплифицированная последовательность CBD была клонирована в вектор pVIM130 вместо последовательности гена β -глюкуронидазы по сайтам *Bam*HI и *Sac*I, в результате был получен вектор pVIM130CBD.

Нуклеотидная последовательность RTB была амплифицирована с использованием pUC18RTB в качестве матрицы и праймеров RBin_F и RBin_R (Таблица 15). Праймеры содержали сайт рестрикции *Xba*I, в последовательность праймера RBin_F был дополнительно добавлен сайт *Asi*A. ПЦР-фрагмент, содержащий ген RTB, и вектор pBIM130CBD были лигированы друг с другом по сайту *Xba*I. Ориентация RTB в полученных плазидах была определена методом ПЦР с использованием праймеров 5727 и RBin_R. Результирующий вектор pBIRBinM130CBD, содержащий субъединицу В рицина, слитую с M130 и CBD, был использован для дальнейшей работы [418].

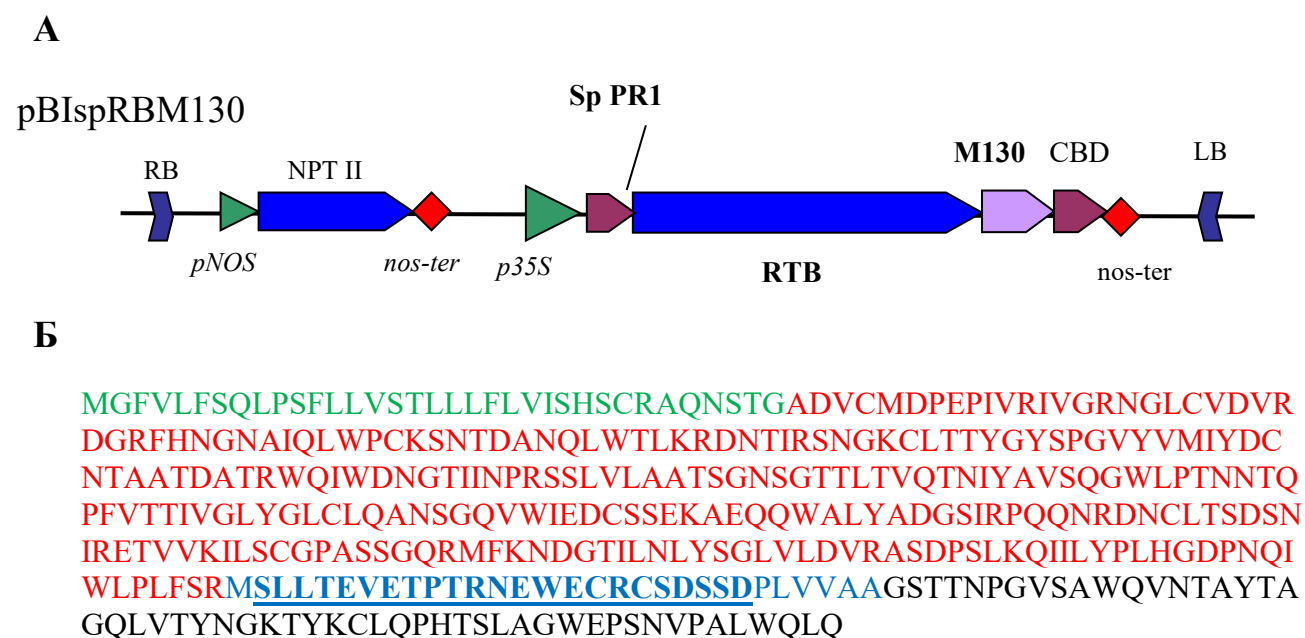


Рисунок 56 - Вектор pBISpRBM130 (А) и аминокислотная последовательность химерного белка spPR1a-RTB-M130-CBD (Б).

Цветом показаны: зеленым - сигнальный пептид PR1a (spPR1); красным - субъединица В рицина (RTB); синим - последовательность M130; черным - хитинсвязывающий домен (CBD). Подчеркнут пептид M2e.

NPT II - ген неомицинофосфотрансферазы II; pNOS - промотор гена нопалинсинтазы *A. tumefaciens*; nos-ter – терминатор гена нопалинсинтазы *A. tumefaciens*; p35S – промотор 35S вируса мозаики цветной капусты; nos-ter - терминатор гена нопалинсинтазы *A. tumefaciens*.

Для транспорта белков в ЭПР и, далее, в апопласт, был выбран N- концевой сигнальный пептид белка PR1а табака (обозначен как spPR1) [442]. Нуклеотидную последовательность PR1а амплифицировали с использованием праймеров RBsp_F и RBsp_R (Таблица 15), в качестве матрицы использовалась геномная ДНК табака *N. tabacum*. Праймеры RBsp_F и RBsp_R содержали сайт *AsiAI*, амплифицированный фрагмент spPR1 клонировали по этому сайту в плазмиду pBIRBinM130CBD.

В результате был получен вектор pBIsprRBM130, содержащий химерную последовательность, включающую N- концевой сигнальный пептид PR1а из табака - субъединицу В рицина (RTB) - 5'- концевой фрагмент гена M2 вируса гриппа (M130) - хитинсвязывающий домен *B. circulans* (CBD) (Рисунок 56) [418]. Вектор pBIsprRBM130 был использован в дальнейших экспериментах для трансформации табака и ряски.

3.2.8. Получение и анализ трансгенных растений табака, содержащих последовательность слитого гена RTB-M130

В результате трансформации табака вектором pBIsprRBM130 было получено 8 линий трансгенных растений, содержащих вставку последовательности spPR1а-RTB-M130-CBD (далее - RTB-M130) (Рисунок 57, Таблица 33). Растения трансгенных линий культивировались в теплице, по своим характеристикам, включая скорость роста, сроки цветения, высоту, особенности фенотипа и др. они не отличались от нетрансгенных растений.

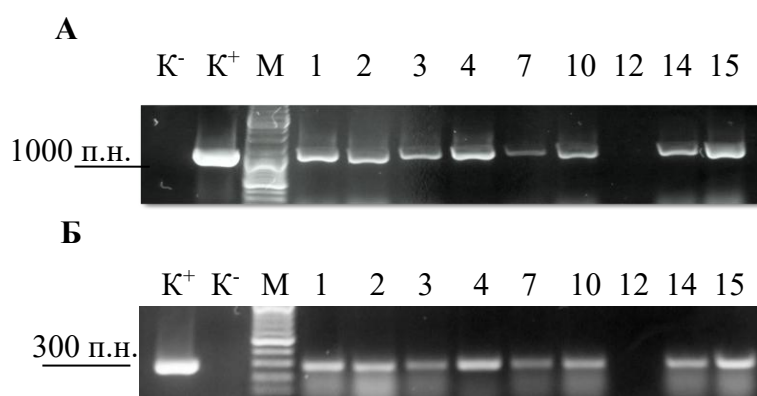


Рисунок 57 – ПЦР- анализ линий табака, трансформированных вектором pBIspRBM130.

А. Праймеры 5727 и M2-130rev. Амплифицируется последовательность spPR1-RTB-M130, ожидаемая длина фрагмента 1091 н.п. Б. Праймеры M2-130for и CBD_rev. Амплифицируется последовательность M130-CBD, ожидаемая длина фрагмента 268 н.п. Цифрами обозначены линии трансгенных растений табака; K⁻ - ДНК нетрансгенных растений; K⁺ - плазида pBIspRBM130; M- маркер молекулярной массы ДНК.

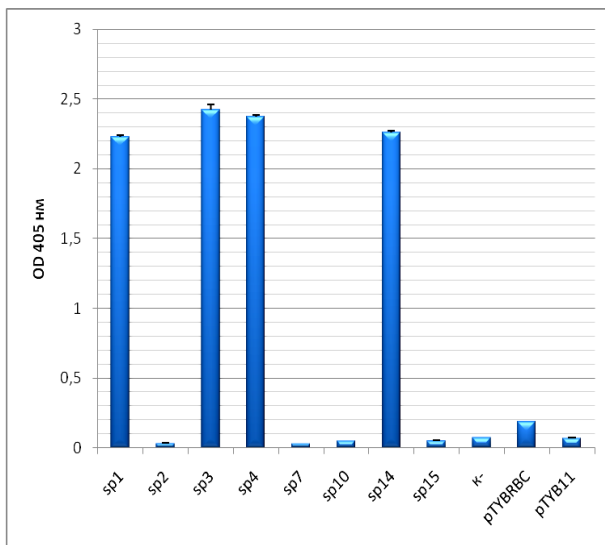
Таблица 33 - Результаты агробактериальной трансформации табака вектором pBIspRBM130.

Получено Km ^r устойчивых линий табака,	15
из них:	
укоренилось в присутствии Km в среде	15
без агробактериальной контаминации	14
содержат вставку последовательности RTB-M130	8

Анализ экспрессии последовательности RTB-M130 в растениях табака был проведен после трех месяцев их роста в теплице. Для анализа была использована асиалофетуин-связывающая ELISA – чувствительный и специфичный метод

детекции RTB, основанный на её высоком сродстве к асиалофетуину [417,443,444]. Кроме того, он позволяет судить об активности RTB, поскольку к взаимодействию с асиалофетуином способен только правильно процессированный белок [417,445].

А



Б

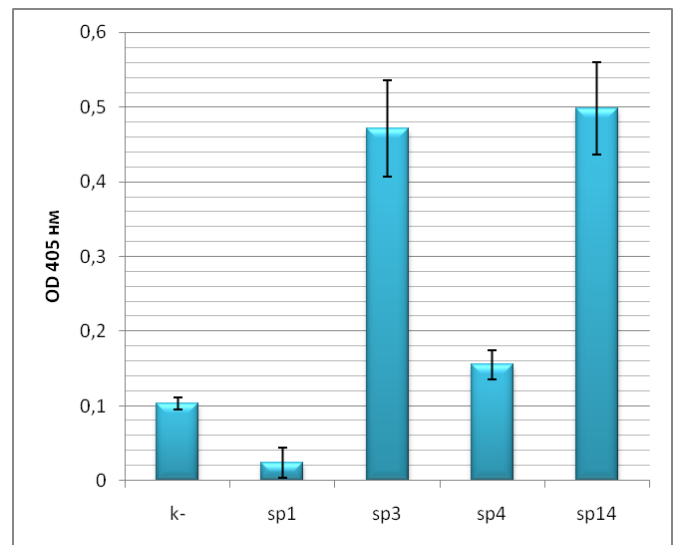


Рисунок 58 - Анализ экспрессии последовательности RTB-M130 в линиях табака с помощью асиалофетуин-связывающей ELISA. Используются антитела к субъединице В рицина (А) или к пептиду M2e (Б).

sp1-sp15 – линии табака, трансформированные вектором pBIspRBM130; K⁻ - препарат нетрансгенного растения табака; pTYB11- лизат *E.coli* BL21(DE3), синтезирующих интеин; pTYBR11RBC- лизат *E.coli* BL21(DE3), синтезирующих слитый белок интеин- RTB.

Результаты анализа белковых препаратов трансгенных растений табака представлены на Рисунке 58. В линиях табака sp1, sp3, sp4 и sp14 при использовании антител к субъединице В рицина была показана экспрессия RTB. При этом в образцах белка из *E.coli* BL21(DE3):pTYB11RBC, накапливающих слитый белок интеин-RTB, значение ОП 405 нм находилось на уровне

отрицательных контролей – образцов белка из *E.coli* BL21(DE3):pTYB11 и препаратов белка из нетрансгенных растений (Рисунок 58, А). Полученные результаты свидетельствовали о экспрессии целевой последовательности и подтверждали корректный процессинг рекомбинантной субъединицы В рицина в составе целевого белка в этих линиях трансгенных растениях [418].

При использовании антител к пептиду M2e, его присутствие в составе слитого белка было показано в двух линиях трансгенных растений, sp3 и sp14 (Рисунок 58, Б). Пептид M2e не детектировался в линиях sp1 и sp4, это могло быть обусловлено как невысоким уровнем экспрессии целевого белка в этих линиях, так и недостаточной чувствительностью антител к пептиду M2e, находящемуся в составе слитого белка RTB-M130, связанного с асиалофетуином.

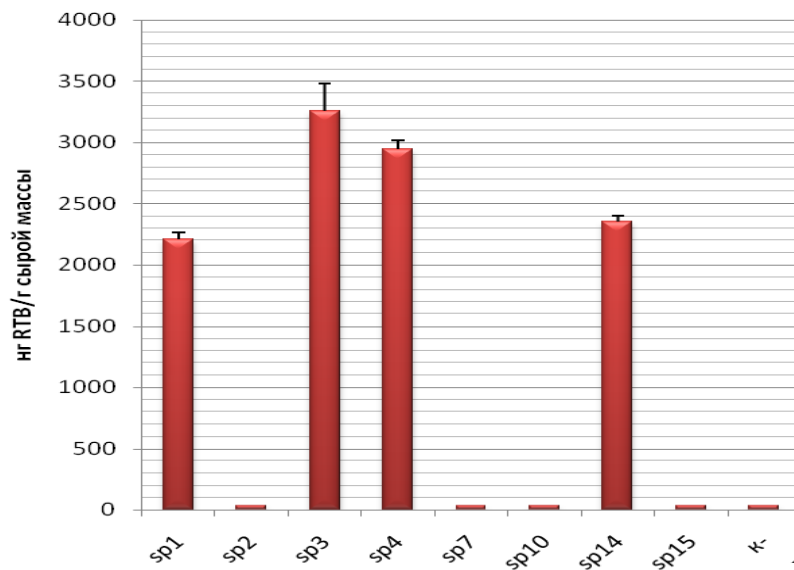


Рисунок 59 – Накопление белка RTB-M130 в листьях растений табака, трансформированных вектором pBIsprBVM130. Анализ проводили с помощью асиалофетуин-связанной ELISA, использованы антитела к RTB. sp1-sp15- линии трансгенных растений; K- препарат нетрансгенного растения табака.

Количественная оценка содержания RTB в составе целевого белка в трансгенных растениях табака проводилась с использованием антител к RTB

(Рисунок 59) [418]. В линиях sp3 и sp14 накопление RTB составило 3,3 и 2,4 мкг/г сырой массы листьев, что соответствовало 0,01 и 0,02% от ОРБ (Таблица 34).

Таблица 34 - Накопление слитого белка RTB-M130 в линиях табака, трансформированного вектором pVIsprBVM130.

Линия	Содержание RTB в 1г сырой массы листьев, мкг	Содержание общего экстрагируемого белка в 1г сырой массы листьев, мг	Доля RTB в общем экстрагируемом белке, %
sp1	2,13±0,11	19,1±3,4	0,012±0,002
sp2	0,03±0,01	18,4±3,7	0,0002±0,0001
sp3	3,29±0,23	20,1±4,2	0,02±0,002
sp4	2,94±0,12	16,8±3,3	0,019±0,003
sp7	0,03±0,01	19,3±4,0	0,0001±0,0001
sp10	0,04±0,02	19,9±3,8	0,0001±0,0001
sp14	2,42±0,08	20,5±3,9	0,011±0,002
sp15	0,03±0,01	16,4±3,6	0,0002±0,0001
К-	0,00	18,5±3,7	0,00

Полученные результаты сопоставимы с данными, полученными в похожих исследованиях. Например, по данным Reed и др. накопление субъединицы В ригина в трансгенных растениях табака составило в среднем 0,007% от общего растворимого белка (около 0,4 мкг функционального эквивалента RTB на 1 сырого веса листьев) [446]. По данным Woffenden и др., при экспрессии RTB, слитой с F1- и V- антигенами *Yersinia pestis* в культуре клеток табака, содержание RTB, определенное с помощью асиалофетуина, составляло 0,015-0,025% от общего растворимого белка [352]. Синтезированный в растительных клетках слитый белок F1-RTB-V был использован для интраназальной иммунизации мышей, приведшей к успешной индукции мукозального иммунитета у животных. Полученные данные дополнительно подтверждали адъювантную активность рекомбинантного RTB, полученного в растениях табака [352].

Несколько более высокий уровень накопления RTB наблюдался в исследовании Choi и др. - до 0,03% функционального эквивалента RTB от общего растворимого белка в клубнях картофеля. В этой работе субъединица В рицина была слита с С- концом капсидного гликопротеина VP7 ротавируса обезьян SA11 [351].

Во всех упомянутых исследованиях субъединица В рицина, как следует из результатов асиалофетуин-связывающей ELISA, была функционально активна, что указывает на правильный характер её процессинга и гликозилирования в гетерологичных растительных системах. В тоже время, при трансформации табака кДНК, кодирующей полноразмерный препро-рицин, накопление рицина в листовых тканях табака составило до 0,25% от общего растворимого белка [447]. Аккумуляция рицина в этом случае происходила в вакуолях. В экспериментах Reed и др. [446] и Woffenden и др. [352] рекомбинантный RTB транспортировался в апопластное пространство, Choi и др. - удерживался в эндоплазматическом ретикулуме [351]. Возможно, что эти компартменты не являются оптимальными для накопления рекомбинантного RTB. Учитывая, что накопление рицина в клещевине происходит в запасующих вакуолях эндосперма семян, соответствующая компартиментализация рекомбинантного RTB, возможно, может вести к повышению уровня его накопления в гетерологичных экспрессионных системах.

Для изучения особенностей экспрессии и накопления RTB-M130 в растениях табака, препараты общего белка были проанализированы методом Вестерн-блота с использованием антител к RTB и M2e. При использовании антител к пептиду M2e было показано, что в линиях sp3 и sp14 детектируется белок размером около 80-82 кДа (Рисунок 60, А). В линиях sp1, sp2, sp4, sp5 и sp7, так же как и в нетрансгенном контроле, соответствующий белок не детектировался. При использовании антител к RTB, полосы, соответствующие белку массой около 80 кДа, были детектированы, также, только в линиях sp3 и sp14 (Рисунок 60, Б). В остальных линиях белок RTB-M130 не был выявлен. В

образцах, полученных из нетрансгенных растений, соответствующие полосы, также, не детектировались [418].

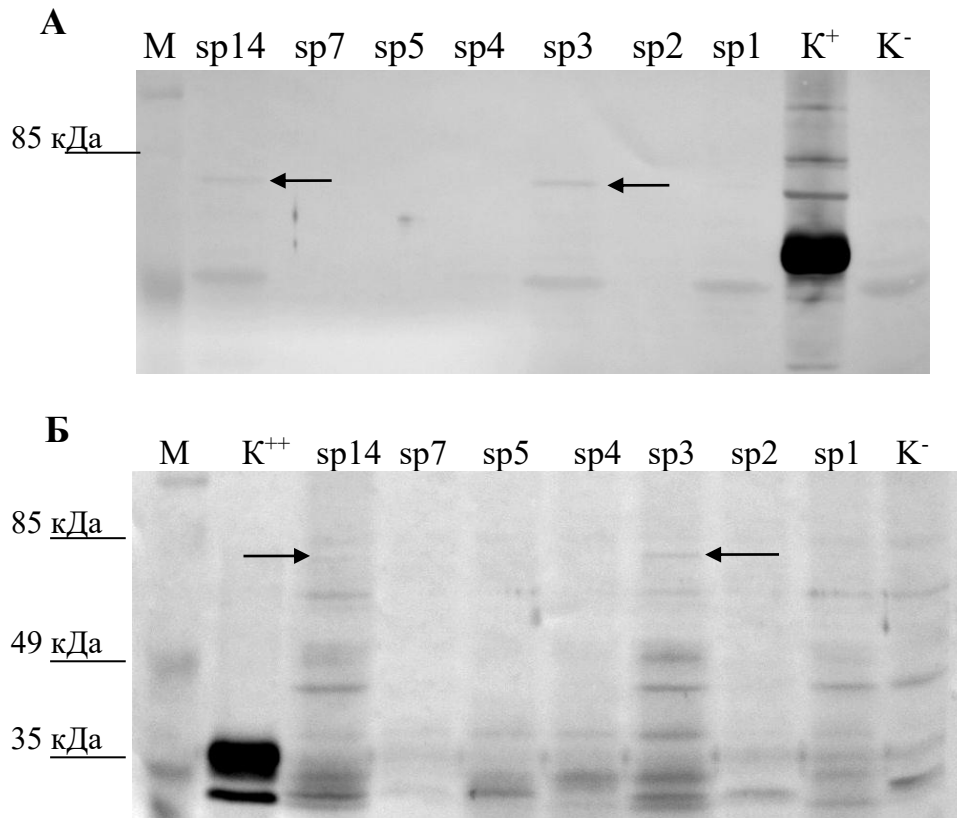


Рисунок 60 - Анализ экспрессии слитого белка RTB-M130 в растениях табака. А. Используются антитела к пептиду M2e. Б. Используются антитела к RTB. sp1-sp14- линии трансгенных растений; K⁻ - препарат общего белка нетрансгенных растений; K⁺- пептид M130, синтезированный в *E. coli* в слиянии с интеином; K⁺⁺- рицин, выделенный из семян клещевины; М- маркер молекулярной массы. Стрелками указан белок RTB-M130 (предполагаемый димер, размер около 80 кДа).

Ожидаемый размер белка RTB-M130 с учетом возможных вариантов гликозилирования составляет 39-42 кДа, но в образцах из трансгенных растений белки такого размера не были выявлены. Мы предположили, что слитый белок RTB-M130 экспрессировался в трансгенных растениях в виде димера.

Для более детального изучения экспрессии слитого белка RTB-M130 в трансгенных растениях была проведена частичная очистка препарата общего белка табака линии *sp3* методом аффинной хроматографии с использованием асиалофетуина, иммобилизованного на BrCN-сефарозе 4В. Вестерн блот анализ полученных фракций с использованием антител к пептиду M2e и к RTB показал присутствие во фракции 3 иммунореактивной полосы массой 80-85 кДа, в остальных фракциях целевой белок не детектировался (Рисунок 61). Слитый белок детектировался как единичная полоса, без видимых признаков деградации [418].

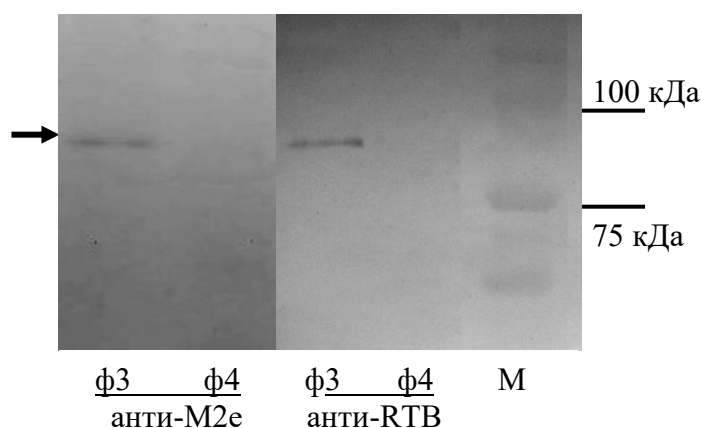


Рисунок 61 - Вестерн блот фракций 3 и 4, полученных после частичной очистки препарата общего белка табака линии *sp3* методом аффинной хроматографии с использованием антител к пептиду M2e и к RTB. М-маркер молекулярной массы, стрелкой показан слитый белок RTB-M130. ф – номера хроматографических фракций

В наших экспериментах слитый белок RTB-M130 детектировался в виде полосы массой около 85 кДа, т.е., предположительно, в виде димера. Похожий характер экспрессии RTB в составе слитого белка наблюдался в исследовании Carter и др. [448]. В этом исследовании субъединица В рицина была слита с С-концом проинсулина (Ins) и экспрессирована в клубнях картофеля. Авторы показали, что слитый белок Ins-RTB агрегирует в большие молекулярные комплексы и детектируется в виде полос массой более 200 кДа (расчетная масса

Ins-RTB вместе с N- концевым пептидом β -фазеолина- 40,8 кДа). Попытки диссоциировать эти агрегаты до белка расчетной массы были неудачны. По мнению Carter и др., агрегация белка Ins-RTB происходит за счет образования большого количества хаотичных межмолекулярных дисульфидных связей. При этом белок Ins-RTB сохранял способность связываться с асиалофетуином [448]. В наших экспериментах слитый белок RTB-M130, исходя из результатов асиалофетуин-иммобилизованной ELISA, также сохранял способность связываться с асиалофетуином [418]. Таким образом, димеризация (агрегирование) субъединицы В рицина не влияла на её способность связываться с галактозой в составе асиалофетуина и, по-видимому, на способность связываться с соответствующими клеточными рецепторами.

Необходимо отметить, что агрегация наблюдалась только в случаях, когда с RTB сливали с небольшими белками - пептидом M130 (3,3кДа) или проинсулином (9,4 кДа, [448]). В случаях, когда партнёром RTB в слитом белке выступал более крупный белок - VP7 (молекулярная масса 34 кДа, [351]), белки F1 и V (15 и 37 кДа, соответственно, [352]), GFP (26 кДа, [350]) или экспрессировался только RTB [446], агрегации слитого белка не наблюдали. В этих экспериментах он детектировался в виде одной полосы ожидаемой молекулярной массы. Возможно, что оптимизация размера и последовательности партнёра RTB в слитом белке позволит избежать или существенно уменьшить степень его агрегации при экспрессии в гетерологичных системах.

Полученные нами результаты свидетельствуют о накоплении субъединицы В рицина в составе слитого белка RTB-M130 в двух линиях трансгенного табака. Исходя из предположения, что димеризация целевого протеина не ведёт к потере его активности, мы использовали вектор pVIsprBVM130 и линии табака sp3 и sp14 в дальнейших исследованиях.

3.2.9. Влияние внутриклеточной локализации рекомбинантной субъединицы В рицина на её экспрессию в трансгенных растениях табака

3.2.9.1. Получение трансгенных растений с различной локализацией рекомбинантной субъединицы В рицина

В результате проведённых экспериментов нами была показана экспрессия субъединицы В рицина в составе слитого белка RTB-M130 в растениях табака. Накопление RTB-M130 в лучших линиях составила около 0,02% общего растворимого белка, что соответствует уровню в 2,9-3,3 мкг RTB-M130 в 1 грамме сырой массы листьев. Эти значения являются типичными при экспрессии RTB в гетерологичных системах. Однако для разработки вакцин с использованием субъединицы В рицина как адьюванта желательно обеспечить более высокий уровень её экспрессии.

Одним из путей повышения экспрессии гетерологичных белков является их транспорт в компартменты клетки, оптимальные для накопления. Нами было изучено влияние внутриклеточной компартиментализации на уровень экспрессии субъединицы В рицина в составе ряда слитых белков в растениях табака. С этой целью нами были сконструированы вектора, обеспечивающие их локализацию в различных компартментах клетки. Для этого нуклеотидная последовательность RTB-M130, фланкированная различными N- и C- концевыми сигнальными последовательностями, была клонирована в вектор pGD121 под контроль двойного энхансированного 35S промотора CaMV (Рисунок 62).

В векторе pGDRTBvar RTB-M130 был слит с N- концевым сигнальным пептидом белка PR1a табака, C- концевой сигнал отсутствовал. Локализация целевого белка RTB-M130 – в апопластном пространстве клетки.

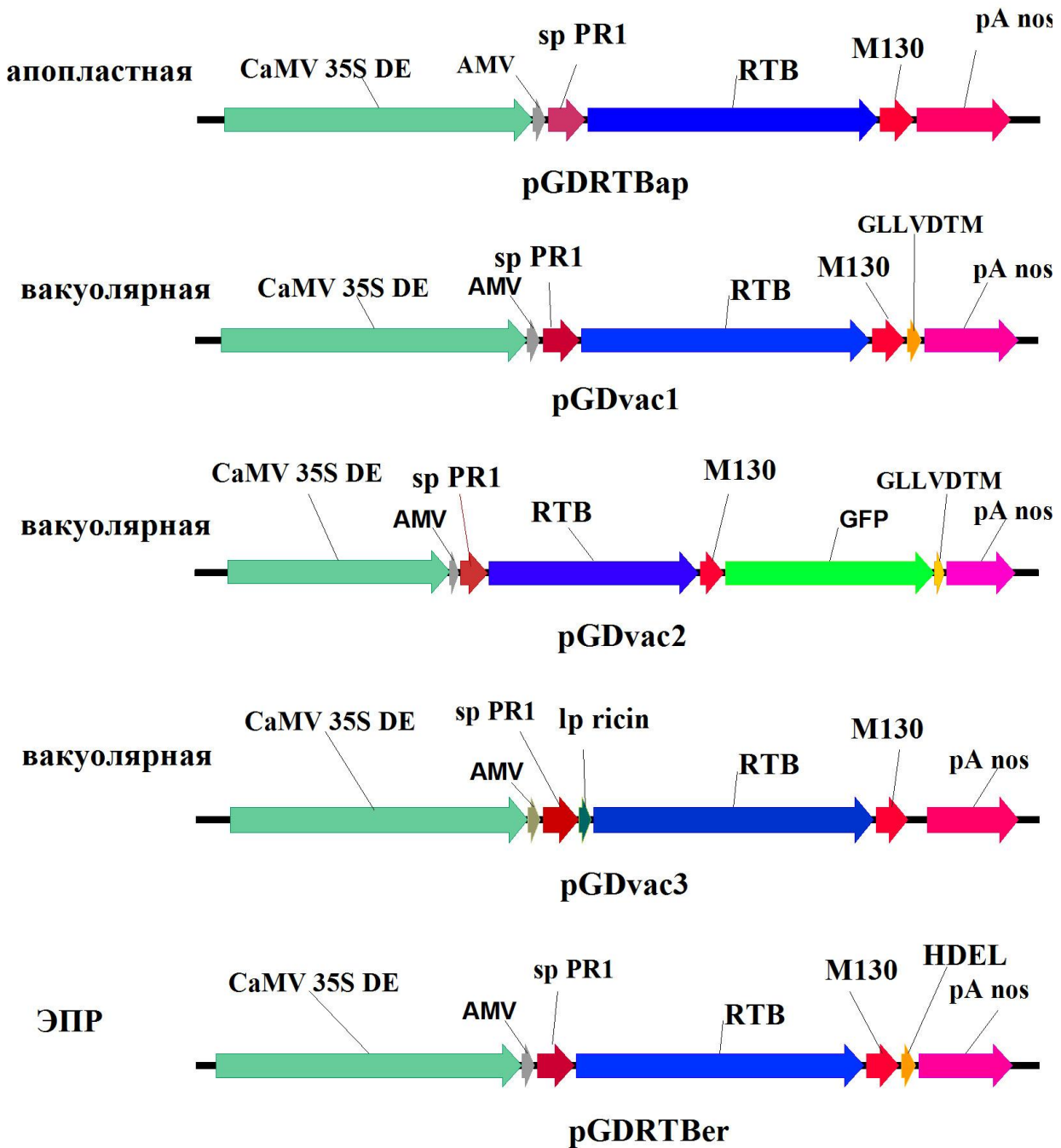


Рисунок 62 - Структура гена слитого белка RTB-M130 с различной внутриклеточной локализацией в векторах pGDRTBar, pGDRTBvac1, pGDRTBvac2, pGDRTBvac3 и pGDRTBer, использованных для трансформации табака.

CaMV 35S DE - двойной энхансированный 35S промотор вируса мозаики цветной капусты CaMV; AMV – энхансер AMV RNA4 вируса мозаики люцерны; pA nos – терминатор гена нопалин-синтазы *A. tumefaciens*, lp ricin – линкерный пептид рицина, GLLVDTM - C-концевой сигнал вакуолярного сортирования хитиназы A табака.

В векторе pGDRTBvac1 последовательность RTB-M130 была слита с последовательностью N-концевого сигнального пептида белка PR1a табака и C-концевым сигналом вакуолярного сортинга GLLVDTM из хитиназы A табака. Локализация целевого белка RTB-M130 в этом варианте – в вакуолях клетки.

В векторе pGDRTBvac2 между последовательностями RTB-M130 и C-концевого сигнала вакуолярного сортинга хитиназы A табака была клонирована последовательность белка GFP (Рисунок 62). Наличие GFP позволяло бы визуализировать экспрессию целевого белка, и кроме того, изучить влияние относительно крупного белка – партнёра на экспрессию субъединицы В рицина в гетерологичных растениях.

В векторе pGDRTBvac3 после последовательности N-концевого сигнального пептида белка PR1a, был клонирован линкерный пептид рицина. Линкерный пептид длиной 12 а.о. (SLLIRPVVPNFN) локализован в молекуле прорицина между субъединицами А и В, и обеспечивает транспорт молекулы рицина из люмена ЭПР в запасующие вакуоли клеток семян клещевины [449]. Показано, также, что этого пептида достаточно для транслокации GFP в вакуоли клеток [449]. Получение растений, трансформированных вектором pGDRTBvac3 имело целью изучение влияния линкерного пептида рицина на накопление его субъединицы В в трансгенных растениях, как в листьях, так и в семенах. Вектор pGDRTBer был сконструирован путём введения C-концевого сигнала удержания в ЭПР HDEL. В этом варианте предполагалось накопление целевого белка RTB-M130 в ЭПР клетки.

Полученные вектора были перенесены в *A. tumefaciens* CBE21 и использованы для трансформации растений. Полученными векторами были трансформированы листовые экспланты табака и успешно получены трансгенные растения (Таблица 35). Интеграция целевых последовательностей в геном табака была подтверждена методом ПЦР. Полученные растения морфологически, а также по характеристикам роста и развития, не отличались от

нетрансформированных контрольных растений. Растения нормально росли в теплице, цвели и образовывали семена.

Таблица 35 - Агробактериальная трансформация табака векторами для экспрессии слитого белка RTB-M130 с различной внутриклеточной локализацией.

Вектор	Трансформировано эксплантов	Получено канамициноустойчивых растений	Получено трансгенных растений	Проанализировано на экспрессию RTB-M130, линий
pGDRTBar	25	18	17	14
pGDvac1	20	17	17	16
pGDvac2	20	19	19	14
pGDvac3	25	20	18	11
pGDRTBer	22	20	20	18

3.2.9.2. Анализ экспрессии слитого белка RTB-M130 с различной внутриклеточной локализацией в трансгенных растениях табака

Экспрессия слитого белка RTB-M130 с различной внутриклеточной локализацией изучалась с помощью количественной асиалофетуин-связывающей ELISA. Полученные результаты представлены на Рисунке 63.

В тканях листа растений, трансформированных векторами pGDRTBar, pGDRTBvac1, pGDRTBvac3 и pGDRTBer наблюдалась экспрессия RTB в составе слитого белка RTB-M130. В некоторых линиях накопление целевого белка не детектировалось. После трансформации вектором pGDRTBar субъединица В рицина не детектировалась в 3 линиях; в растениях, трансформированных pGDRTBvac1, RTB не детектировался в 4 линиях из 16 изученных, вектором pGDRTBvac3 - в 3 из 11; вектором pGDRTBer – в 2 из 18.

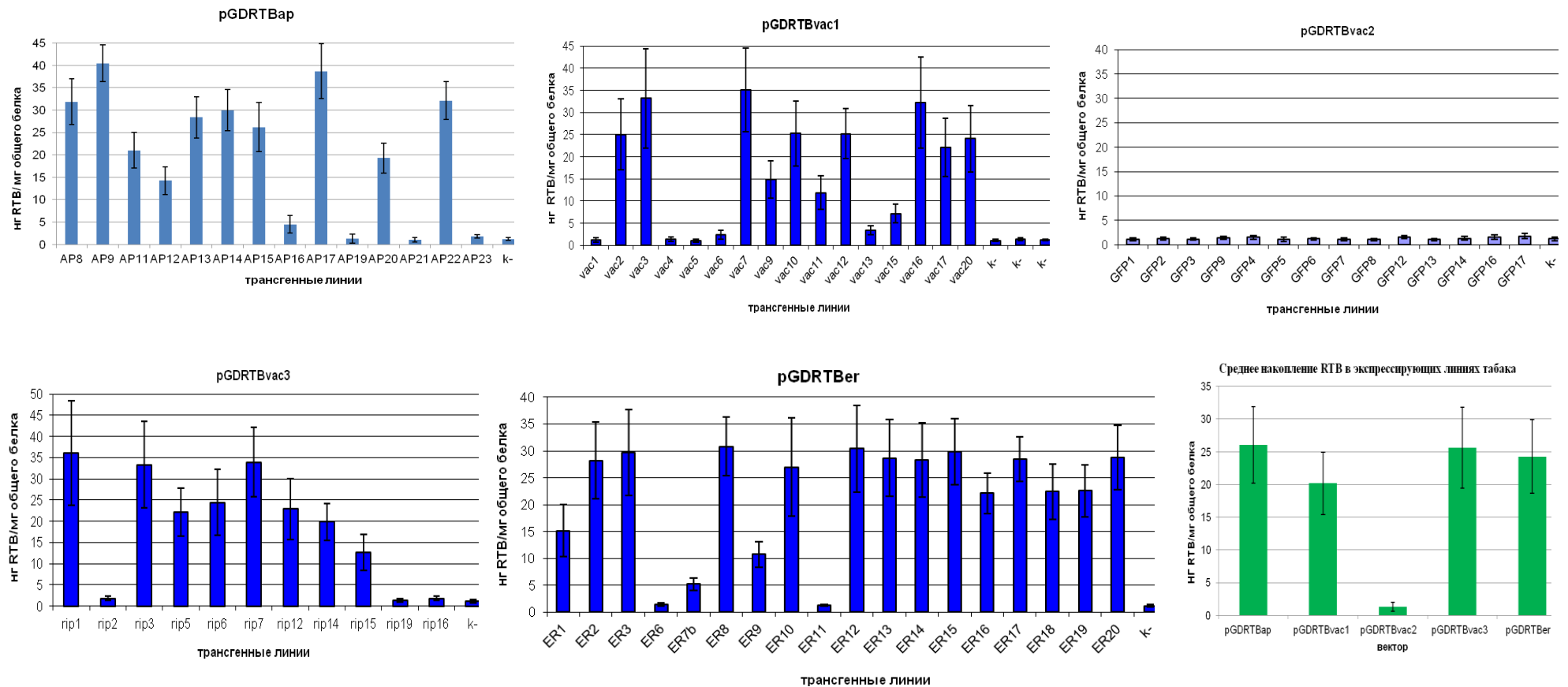


Рисунок 63 - Накопление субъединицы В рицина в трансгенных растениях табака при его различной внутриклеточной локализации. pGDRTBap – локализация RTB в апопластном пространстве; pGDvac1 – вакуолярная локализация, сигнал вакуолярного сортинга хитиназы А табака; pGDvac2 - вакуолярная локализация, сигнал вакуолярного сортинга хитиназы А табака, RTB-M130 слит с GFP; pGDvac3 – запасующие вакуоли, линкерный пептид рицина; pGDRTBer – локализация в ЭПР клетки. К- - нетрансформированные растения, отрицательный контроль.

По содержанию RTB эти линии статистически достоверно не отличались от нетрансформированных контрольных растений и были исключены из дальнейших исследований.

Среднее содержание функционально активного RTB в листовых тканях трансгенных линий, экспрессирующих RTB, по данным асиалофетуин-связывающей ELISA составило: для линий, полученных после трансформации вектором pGDRTVар - $26,1 \pm 5,8$ нг/мг общего белка; вектором pGDRTVvac1 - $20,2 \pm 4,8$ нг/мг; pGDRTVvac3 - $25,7 \pm 6,2$ нг/мг и вектором pGDRTVер - $24,3 \pm 5,6$ нг/мг общего белка (Рисунок 64). Это соответствовало 0,020-0,026% субъединицы В рицина в общем растворимом белке. Различия по среднему содержанию RTB между вариантами были статистически не достоверны. Таким образом, содержание RTB в тканях листа не зависело от его внутриклеточной компартментализации.

Растения, трансформированные вектором pGDRTVvac3, культивировались в теплице до образования семян. Полученные семена были собраны и проанализированы методом количественной асиалофетуин-связывающей ELISA и Вестерн блота. Усиления экспрессии RTB не было показано на статистически достоверном уровне ни в одной из изученных линий. Следовательно, добавление в слитый белок линкерного пептида рицина не привело к возрастанию его экспрессии ни в тканях листа, ни в семенах.

Субъединица В рицина после трансформации растений вектором pGDRTVvac2 в тканях листа не детектировалась, полученные для различных линий значения (в среднем $1,3 \pm 0,7$ нг RTB/мг общего белка по всем линиям) достоверно не отличались от соответствующих значений для нетрансгенных контрольных растений (Рисунок 63). Методом Вестерн блот анализа не был, также, детектирован GFP - партнёр RTB в слитом белке. Таким образом, целевой белок RTB в слиянии с GFP не экспрессировался на детектируемом уровне. Причина этого пока не ясна.

Транспорт RTB в составе изученных слитых белков в различные компартменты клетки не привёл к существенному возрастанию его накопления в тканях листа трансгенных растений. Причина этого может быть связана с особенностями внутриклеточного транспорта субъединицы В рицина. К настоящему времени внутриклеточный транспорт рицина (прорицина) подробно изучен [450,451,452]. Также подробно изучены механизмы внутриклеточного транспорта субъединицы А рицина, его токсичного компонента [453,454]. В то же время особенности внутриклеточного транспорта и метаболизма нетоксичной субъединицы В рицина изучены до настоящего времени слабо.

В клещевине рицин синтезируется в семенах и депонируется в запасующих вакуолях. Рицин синтезируется как препрорицин – полипептидная цепь, включающий субъединицы А и В. Первые 35 а.о. препрорицина включают 26 а.о. N-концевого сигнального пептида и 9 а.о. пропептида. N-концевой сигнальный пептид направляет транспорт прорицина через мембрану ЭПР в люмен ЭПР, 9 а.о. пропептида удаляются после транслокации прорицина в вакуоль [452].

Субъединицы А и В рицина соединены линкерным пептидом длиной 12 а.о. Линкерный пептид несёт последовательность сигнала вакуолярного сортирования. Когда прорицин достигает вакуоли, происходит удаление девяти N-концевых аминокислотных остатков пропептида и линкерного пептида между RTA и RTB. В результате происходит образование зрелого гетеродимерного токсина [455,456]. Линкерный пептид обеспечивает вакуолярный транспорт RTA, когда слит с его C-концом, и RTB, при его слиянии с N-концом RTB [449]. Линкерный пептид также обеспечивал транспорт GFP и RFP в вакуоль, при его слиянии с N-концом репортёрных белков [449,457].

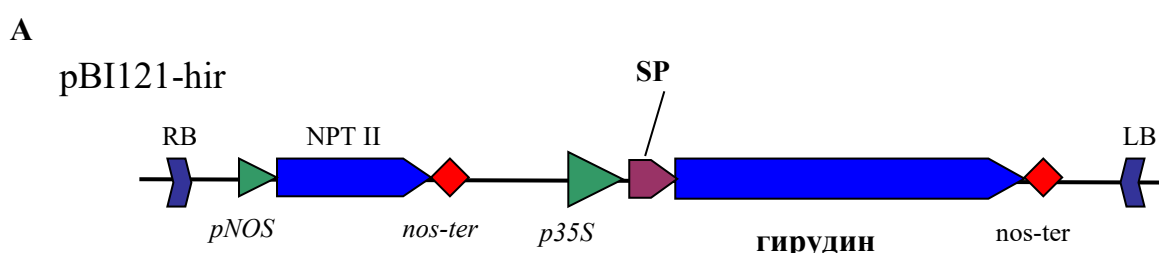
Chamberlain и др. подробно исследовали особенности синтеза рекомбинантного RTB в протопластах табака [458]. Было показано, что большая часть вновь синтезированного RTB деградировала, при этом деградация RTB не была связана с вакуолями или с процессом секреции. Рекомбинантный RTB, в отличие от RTA, не транслоцировался в цитоплазму клетки из ЭПР. Авторы

отмечают также деградацию RTB при его удержании в ЭПР и делают вывод о деградации RTB на ранних этапах его секреторного пути.

Полученные нами данные также указывают на значительную деградацию RTB в ЭПР клетки, даже в слиянии с пептидом M130 или GFP. Необходимо отметить, что слияние RTB с белками – партнёрами не всегда ведёт к заметному увеличению уровня его экспрессии. Так, при слиянии α -L- идуронидазы человека (IDUA) с RTB, накопление в листьях табака слитого белка IDUA- RTB было в 5-20 раз ниже, чем при экспрессии одного IDUA [459]. В исследовании Singh и др. протеин G вируса бешенства был экспрессирован в слиянии с RTB в культуре бородатых корней томата, накопление слитого белка RTB-протеин G вируса варьировало в диапазоне от 1,4 до 8 мкг/г сырой массы корней в зависимости от линии [35]. Эти значения близки к полученным нами в экспериментах с табаком. Исходя из того, уровень экспрессии RTB не зависел от его внутриклеточной локализации, для дальнейших экспериментов нами был выбран вектор с апопластной локализацией целевого белка.

3.3. Экспрессия рекомбинантного гирудина в трансгенных растениях ряски

Нуклеотидная последовательность, кодирующая гирудин, с оптимизированным для экспрессии в ряске кодонным составом была клонирована в вектор pBI121 под контроль 35S промотора вируса мозаики цветной капусты и



Б. makriasmssliliallclsshlaqaLVYTDCTESGQNLCLCEGSNVCGQGKNCILGSDGEKNQCV
TGEGTPKPQSHNDGDFEEIPEEYLQ*

В. tctagaatggccaagaggattgcctccatgtcttcgetcctccttatcgcgctgtgtgcttgcctcccatctcgcccaggcgttgttac
accgactgcaccgagagcggccaaaatctgtgtctctgcgaaggatccaacgtctcggacaagggaacaagtgcacacctcggcagcgac
ggagaaaagaaccagtgcgtcaccggcgaaggaaccccaaacctcagagccataatgacggagacttcgaagaaatccctgaagagta
ctccaatgagagctc

Рисунок 64 - Вектор pBI121-hir. А. Структура экспрессионной кассеты. Б. Аминокислотная последовательность гирудина; подчеркнут сигнальный пептид α -амилазы риса. В. Нуклеотидная последовательность гирудина после оптимизации кодонного состава.

SP - N-концевой сигнальный пептид α -амилазы риса; RB и LB – правый и левый граничные повторы Т-ДНК; pNOS и nos-ter – промотор и терминатор гена нопаинсинтазы, соответственно; NPTII – ген неомицинофосфотрансферазы II; p35S – 35S промотор вируса мозаики цветной капусты. Жирным выделены сайты клонирования XbaI и SacI.

N- концевое сигнального пептида α -амилазы риса; предполагаемая локализация рекомбинантного гирудина – апопластное пространство фронда (Рисунок 64). После трансформации ряски вектором pBI121-hir были получены канамицин-устойчивые линии, нормально растущие и пролиферирующие на среде с

селективным антибиотиком канамицином [411]. Результаты экспериментов по трансформации ряски вектором pV121 представлены в Таблице 36.

Таблица 36 - Трансформация ряски малой вектором pV121-hir.

Эксперимент, номер	Каллусы, шт (этап 3)*	Адвентивные фронды, шт (этап 4)*	Линии, устойчивые к канамицину, шт (этап 6)*
1	63	35	2
2	75	41	4
3	70	38	2
Всего	205	114	8

* Этапы трансформации ряски, см. Рисунок 10 раздела «2.3.2. Генетическая трансформация ряски малой».

Фрагмент, соответствующий нуклеотидной последовательности гирудина, амплифицировался в образцах ДНК всех 8 изученных линий (Рисунок 65). Таким образом, присутствие целевой последовательности было подтверждено во всех полученных линиях.

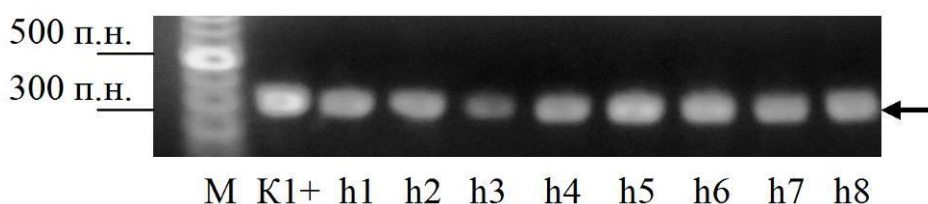


Рисунок 65 - ПЦР-анализ ДНК линий ряски, трансформированных вектором pV121-hir. h1–h8 – различные трансгенные линии. М – маркер молекулярной массы ДНК; K1+ – ДНК вектора pV121-hir. Стрелками показан амплифицируемый фрагмент гена гирудина (294 п.н.).

ОТ-ПЦР анализ трансгенных растений ряски продемонстрировал амплификацию фрагментов кДНК гирудина ожидаемой длины (Рисунок 66).

Таким образом, ген гирудина транскрибировался в трансгенных растениях всех линий.

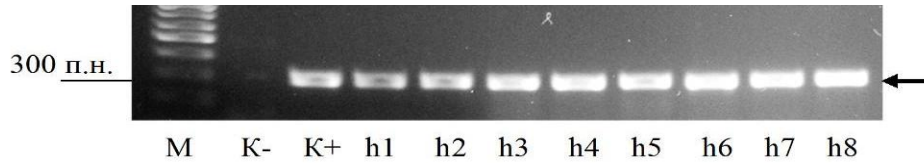


Рисунок 66 - ОТ-ПЦР анализ транскрипции гена гирудина в линиях ряски, полученных после трансформации вектором pBI121-hir. h1–h8 – трансгенные линии. М – маркер молекулярной массы ДНК, К– - РНК нетрансформированного растения, К+ - ДНК вектора pBI121-hir. Стрелкой показан амплифицируемый фрагмент нуклеотидной последовательности гирудина (длина фрагмента - 294 пн).

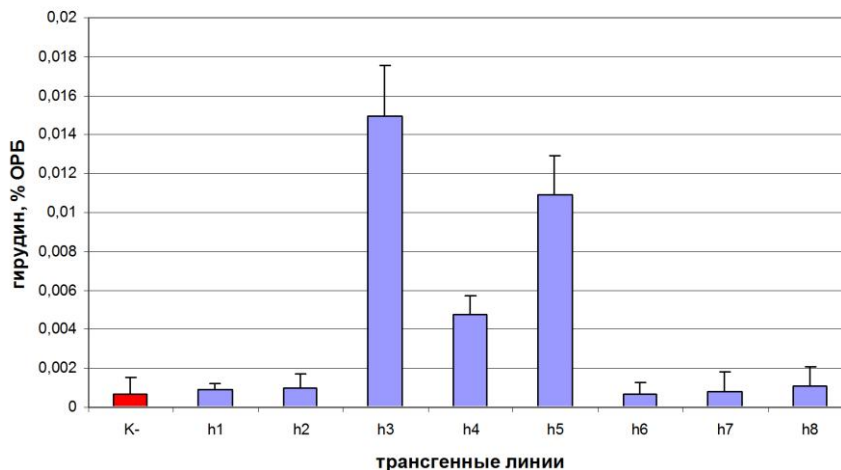


Рисунок 67 - Накопление рекомбинантного гирудина в растениях ряски. h1–h8 – различные трансгенные линии; К– - нетрансформированные растения ряски.

Рекомбинантный гирудин был детектирован с использованием ИФА в линиях h3, h4 и h5, в остальных линиях гирудин не детектировался (Рисунок 67). Максимальным накопление гирудина было в линиях h3 и h5 ($0,015 \pm 0,003$ и $0,011 \pm 0,002\%$ ОРБ, соответственно). В линии h4 гирудина накапливалось меньше – $0,005 \pm 0,001\%$ ОРБ. В линии h3 накопление рекомбинантного гирудина составило 2,1 мкг/г сырой массы, а в линии h5 – 1,3 мкг/г. Содержание ОРБ в

трансгенной ряске составляло, в среднем, 12,4 мг/г сырой массы растений. Трансгенные растения не отличались от контрольных нетрансформированных, трансформация вектором pBI121-hir не оказала влияния ни на скорость роста растений, ни на содержание общего растворимого белка в них [411].

Большинство исследований в области экспрессии гетерологичных пептидов в растениях были направлены на разработку методов получения пептидных антибиотиков, в первую очередь для защиты растений от бактериальных патогенов. Накопление целевых пептидов в большинстве исследований находилось в диапазоне 0,5–10 мкг/г сырой массы растения-продуцента, это соответствовало тысячным долям процента от ОРБ [460,461]. Кроме того, рядом авторов отмечена нестабильность экспрессии рекомбинантных пептидов в растениях. В наших экспериментах максимальное накопление гирудина составило 2 мкг/г сырой массы ряски (0,02% ОРБ), что является типичным для экспрессии в растениях рекомбинантных пептидов [461]. Мы предполагаем, что накопление гирудина может быть повышено посредством его локализации в других компартментах клетки или путём экспрессии в составе слитого белка.

В полученном нами векторе pBI121-hir нуклеотидная последовательность целевого гена гирудина и его структура были оптимизированы для экспрессии в растениях семейства рясковые. В частности, вектор pBI121-hir был успешно использован для трансформации другого представителя рясковых – вольфии бескорневой (*Wolffia arrhiza* (L.) Horkel ex Wimm.). Его использование обеспечило высокую эффективность трансформации этой культуры и стабильную экспрессию целевого гена [462].

В результате проведенных исследований нами были получены растения ряски малой, трансформированные геном гирудина, и показана возможность его экспрессии в трансгенных растениях. Полученные результаты будут использованы в последующих исследованиях по разработке экспрессионных систем на основе этого вида растений для получения рекомбинантного гирудина и других пептидов [411].

3.4. β -глюкуронидаза как партнёр для экспрессии слитых белков в ряске

Генетическая трансформация растений ряски (*Lemna minor*) проводилась сотрудниками лаборатории экспрессионных систем и модификации генома растений (Биотрон) под руководством с.н.с., к.б.н. Митюшкиной Т.Ю. по описанному в разделе «Материалы и методы» протоколу.

3.4.1. Агробактериальная трансформация геном β -глюкуронидазы

Ряска малая была трансформирована вектором pBI121. Индукция каллуса начиналась на 5–6-й неделе культивирования фрондов на среде NPM, содержащей 1,0 мг/л тидиазурона (Рисунок 10). На одном фронде индуцировалось по 2–3 каллуса; индукция каллусов происходила, главным образом, на участках фрондов, соседствующих с корневой или меристиматической зонами (Рисунок 68, 1). Каллусы размером 2–3 мм отделяли от фрондов и переносили для дальнейшего роста в чашки Петри на среду NPM с 2,0 мг/л 2,4-Д (Рисунок 68, 2). Для трансформации использовали каллусы диаметром 4–5мм [411].

После трансформации каллусы культивировали на среде NPM, содержащей 2,4-Д и цефотаксим (Рисунок 68, 3). На этом этапе (этап 2) происходила пролиферация каллусной ткани и очистка трансформированных тканей от агробактерий. В предварительных экспериментах было показано, что в случае отсутствия этого этапа элиминация агробактерий была затруднена, каллусы зарастали агробактериями и гибли [411].

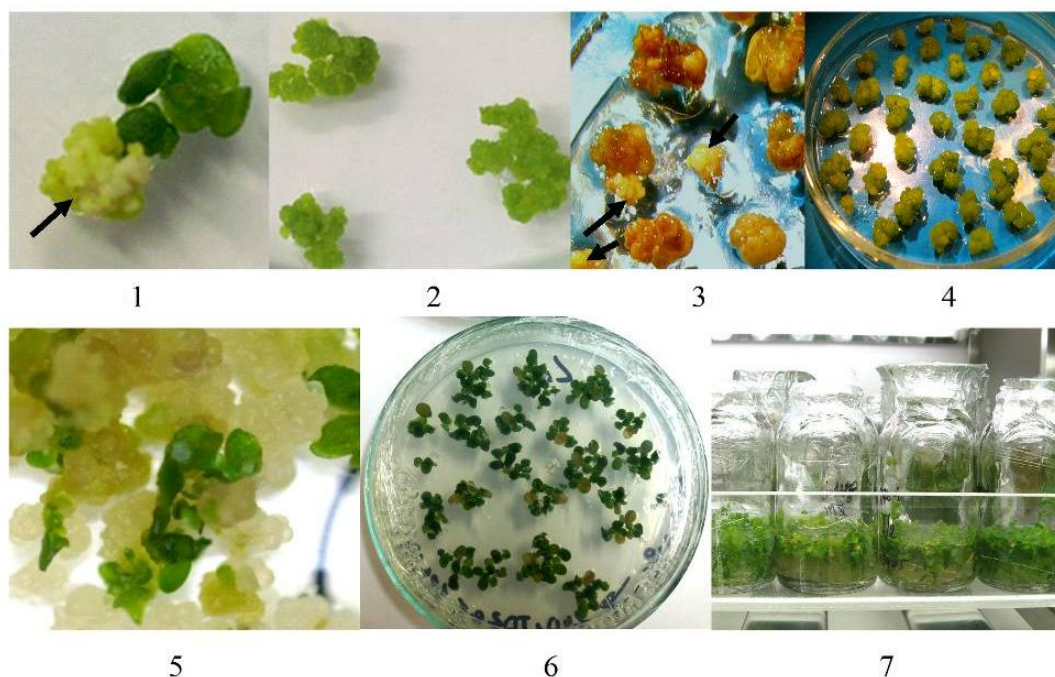


Рисунок 68 - Трансформация ряски малой вектором pVI121. 1. Индукция органогенного каллуса (показан стрелкой). 2. Рост органогенного каллуса на среде NPM с 2,0 мг/л 2,4-Д (этап 1). 3. Начало роста трансгенного каллуса, участки трансгенного каллуса (более светлые) показаны стрелками (этап 2). 4. Пролиферация канамициноустойчивых каллусов на среде с канамицином (этап 3). 5. Регенерация фрондов из канамициноустойчивого каллуса (этап 4). 6. Селекция канамициноустойчивых фрондов на агаризованной среде (этап 5). 7. Канамициноустойчивые растения ряски в жидкой среде (этап 6).

Канамициноустойчивые участки на трансформированном каллусе появлялись после 4–5 недель культивирования на среде NPM, содержащей 2,4-Д, цефотаксим и канамицин. В течение 10–12 дней канамициноустойчивые каллусы достигали размера 3–4 мм, на этом этапе их отделяли от исходного каллуса и переносили на свежую среду того же состава для дальнейшего роста (этап 3, Рисунок 68, 4). Устойчивые к канамицину каллусы размером 5–6 мм переносили на среду регенерации трансформантов. Первые адвентивные фронды появлялись спустя 8–10 нед культивирования (этап 4, Рисунок 68, 5). Регенерировавшие фронды по мере их появления отделяли от каллуса и переносили на чашки Петри со средой МС, содержащей цефотаксим и канамицин для дальнейшего роста

трансформантов (этап 5, Рисунок 68, 6). На этом этапе регенеранты культивировали в течение 2–3 мес. Активно пролиферирующие фронды без признаков токсического действия канамицина переносили на безгормональную жидкую среду SH, каждый фронд в отдельный культуральный сосуд (этап 6, Рисунок 68, 7). Активно растущие и пролиферирующие фронды без признаков действия канамицина, далее культивировали на среде того же состава как независимые трансгенные линии [411]. Результаты экспериментов по трансформации ряски вектором pBI121 представлены в Таблице 37.

Таблица 37 - Трансформация ряски малой вектором pBI121.

Эксперимент, номер	Каллусы, шт (этап 3)*	Адвентивные фронды, шт (этап 4)	Линии, устойчивые к канамицину, шт (этап 6)
1	50	23	3
2	50	18	4
Всего	100	41	7

*Количество каллусов размером 5–6 мм (этап 3), перенесенных на среду NPM для регенерации адвентивных фрондов (этап 4)

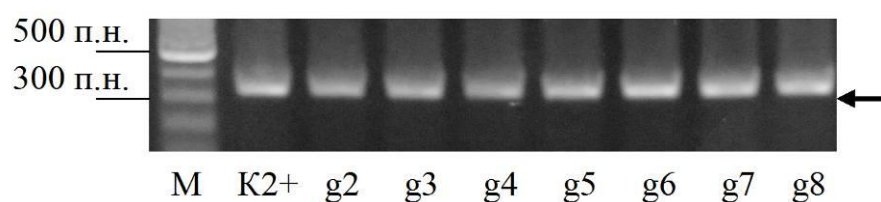


Рисунок 69 - ПЦР-анализ ДНК трансгенных линий ряски на присутствие нуклеотидной последовательности β -глюкуронидазы. g2–g8 – различные трансгенные линии, полученные после трансформации вектором pBI121. М – маркер молекулярной массы ДНК; K2+ – ДНК вектора pBI121. Стрелками показан амплифицируемый фрагмент (длина 298 п.н.).

ПЦР-анализ показал, что фрагмент, соответствующий нуклеотидной последовательности β -глюкуронидазы, амплифицировался в образцах ДНК всех

канамициноустойчивых линий (Рисунок 69). Таким образом, присутствие гена β -глюкуронидазы было подтверждено во всех полученных линиях.

3.4.2. Анализ экспрессии β -глюкуронидазы в растениях ряски, трансформированных вектором pVI121

Трансгенные растения ряски культивировали 2 месяца на жидкой безгормональной среде SH, содержащей 200 мг/л цефотаксима и 10 мг/л канамицина, затем они были проанализированы методом гистохимического окрашивания на наличие активности β -глюкуронидазы. Все трансгенные линии продемонстрировали окрашивание тканей (Рисунок 70, А). Интенсивность окрашивания варьировала от слабой бледно-голубой (линии g1 и g5), до темно-синей, почти черной (линии g2, g3 и g4). Трансгенные фронды были окрашены по всей поверхности, наиболее интенсивно окрашивались жилки и кармашек [411]. Это согласуется с фактом, что 35S промотор CaMV работает наиболее интенсивно в метаболически активных частях растения [463,464]. Линии ряски g1 и g5 со слабой экспрессией β -глюкуронидазы были исключены из дальнейших исследований.

В образцах белка из изученных линий методом Вестерн блот анализа было показано присутствие иммунореактивной белковой полосы с массой около 70 кДа. Масса этой полосы соответствовала β -глюкуронидазе *E. coli* (Рисунок 70, Б). В контрольных нетрансгенных растениях иммунореактивные полосы, соответствующие β -глюкуронидазе, не детектировались. Таким образом, Вестерн блот анализ подтвердил экспрессию β -глюкуронидазы во всех изученных линиях [411].

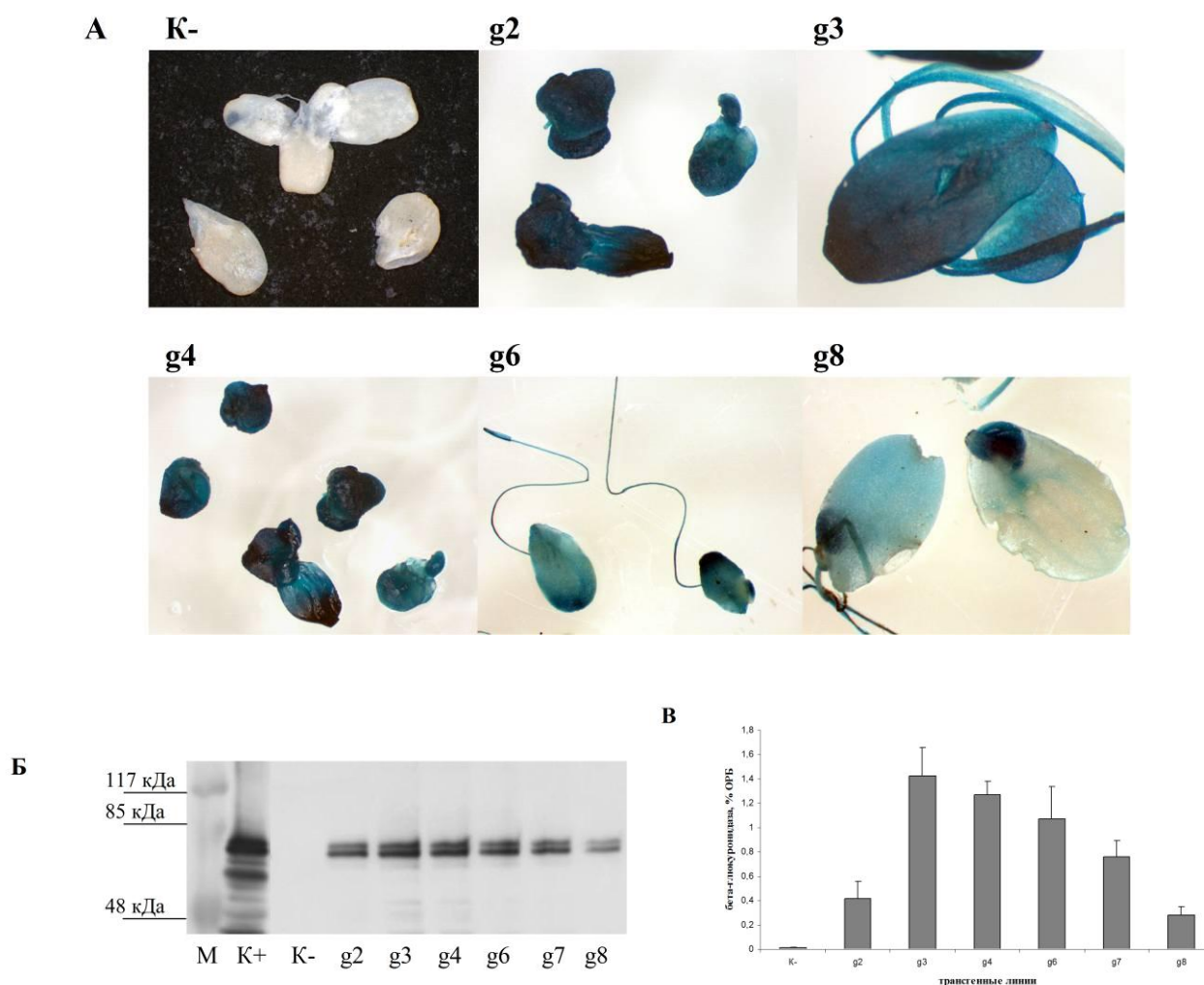


Рисунок 70 - Экспрессия β -глюкуронидазы в трансгенных линиях ряски. А. Гистохимическое окрашивание растений. Б. Вестерн блот анализ экспрессии β -глюкуронидазы. В. Накопление β -глюкуронидазы в трансгенных линиях ряски. g2–g8 – различные трансгенные линии; K- – нетрансформированные растения ряски; K+ – β -глюкуронидаза, 40 нг; М – маркер молекулярной массы белков.

Анализ накопления рекомбинантной β -глюкуронидазы была выполнен с использованием ИФА (Рисунок 70, В). Накопление β -глюкуронидазы варьировало от 0,28% до 1,43% ОРБ. Максимальное накопление β -глюкуронидазы наблюдалось в линиях g3 и g4 ($1,43 \pm 0,23\%$ и $1,27 \pm 0,11\%$ ОРБ, соответственно), минимальное – в линии g8 ($0,28 \pm 0,07\%$ ОРБ). Линии g2, g6 и g7 занимали

промежуточное положение ($0,42 \pm 0,14\%$; $1,07 \pm 0,27\%$ и $0,76 \pm 0,13\%$ ОРБ, соответственно) [411].

Протокол агробактериальной трансформации ряски малой был впервые разработан в 2001г. и затем адаптирован к особенностям различных изолятов этого вида [155,156,157,158]. Протокол включает индукцию органогенного каллуса, его трансформацию агробактериями и последующую регенерацию трансформантов на средах в присутствии селективных антибиотиков. Эта схема оказалась эффективной и в наших исследованиях. Всего было получено 7 независимых трансгенных линий ряски. Экспрессия рекомбинантной β -глюкуронидазы не оказала влияния ни на морфологию и скорость роста растений, ни на содержание белка в них.

В линиях, полученных после трансформации вектором рВ1121, наблюдался высокий уровень накопления рекомбинантной β -глюкуронидазы – 1,4% ОРБ в линии g3, что соответствует 120 мкг рекомбинантного белка/г сырой массы. Высокое накопление β -глюкуронидазы в трансгенных растениях является обычным даже при ее накоплении в цитоплазме клетки. Например, при экспрессии пептида 2L21 парвовируса собак в слиянии с β -глюкуронидазой накопление белка 2L21- β -глюкуронидаза в трансгенных растениях арабидопсиса превышало 3% ОРБ [465]. В случае экспрессии высокоиммуногенного эпитопа белка VP1 вируса ящура накопление слитого белка VP1- β -глюкуронидаза в растениях люцерны достигало 1,0 мг/г сырой массы [466]. В исследованиях Dugdale и др. накопление β -глюкуронидазы в стабильно трансформированных растениях табака доходило до 10% ОРБ [467]. По-видимому, способность β -глюкуронидазы накапливаться в больших количествах связана с ее высокой стабильностью (период полужизни в цитоплазме протопластов мезофилла листа – около 50 ч [416]).

Таким образом, потенциальный уровень накопления рекомбинантных белков в растениях ряски является весьма высоким. При условии устойчивости целевого белка к различным клеточным факторам он может достигать величин,

существенно превышающих 100 мг рекомбинантного белка в 1кг сырой массы растения-продуцента. Полученные в данных экспериментах результаты показывают высокий уровень экспрессии β -глюкуронидазы в растениях ряски и подтверждают, тем самым, возможность её использования в исследованиях по разработке экспрессионных систем для получения различных рекомбинантных белков [411].

3.5. Экспрессия пептида M2e в трансгенных растениях ряски

3.5.1. Анализ экспрессии слитого гена M130- β -глюкуронидаза в трансгенных растениях ряски

Трансгенные растения ряски, трансформированные вектором pVIM130, энергично росли и пролиферировали в жидкой среде с канамицином. Гистохимический анализ активности β -глюкуронидазы позволил отобрать для дальнейшего исследования 35 линий, окрашивающихся наиболее интенсивно (Рисунок 71, А). Интеграция фрагмента M130 в геном трансформантов была подтверждена методом ПЦР. Присутствие нуклеотидной последовательности M130- β -глюкуронидаза было показано в образцах ДНК всех 22 изученных линий (Рисунок 71, Б) [468]. Результаты агробактериальной трансформации ряски вектором pVIM130 представлены в Таблице 38.

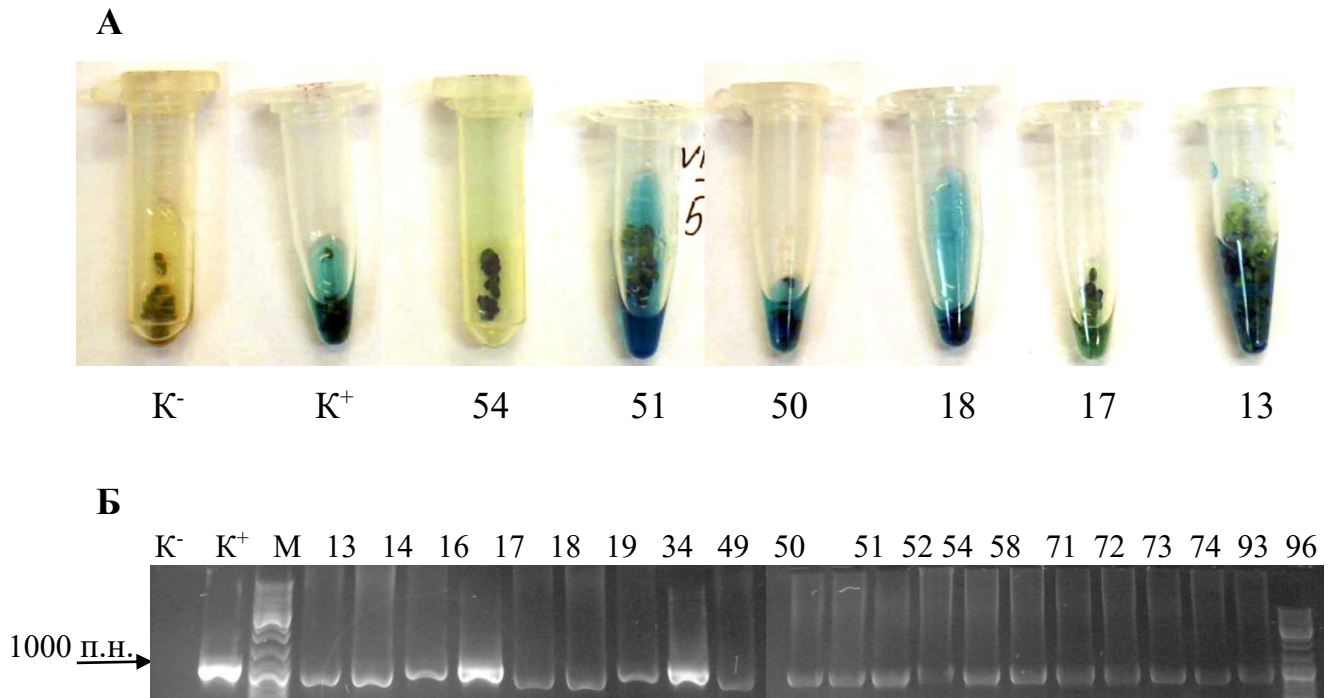


Рисунок 71 - Молекулярно-биологический анализ ряски, трансформированной вектором pVIM130.

А. Гистохимический анализ β -глюкуронидазы в некоторых канамициностойчивых линиях ряски. K^- - нетрансгенные растения; K^+ - линия ряски, трансформированная вектором pVI121.

Б. ПЦР-анализ геномной ДНК некоторых канамициностойчивых линий ряски. Используются праймеры M2-130for и uidA_low. K^- - ДНК нетрансгенных растений; K^+ - плазмида pVIM130; М- маркер молекулярной массы ДНК. Ожидаемая длина амплифицируемого фрагмента - 1024 п.н. Цифрами обозначены различные линии.

Анализ экспрессии белка М130- β -глюкуронидаза проводили в 20-ти трансгенных линиях ряски. Методом Вестерн блот анализа с использованием антител к β -глюкуронидазе присутствие целевого белка было выявлено в 12-ти линиях. В образцах из этих линий было показано присутствие белка с молекулярной массой около 74кДа, что соответствовало ожидаемому размеру целевого белка М130- β -глюкуронидаза [468].

Таблица 38 - Результаты агробактериальной трансформации ряски вектором pВМ130.

Получено Km ⁻¹ устойчивых линий ряски,	115
из них:	
проанализировано	100
гистохимическая детекция β-глюкуронидазы	98
отобрано линий для исследований	35
отобрано линий для ПЦР анализа	22
содержат вставку последовательности M130-β-глюкуронидаза	22

Детектируемые антителами иммунореактивные полосы в трансгенных линиях визуализировались на мембране несколько выше полос, соответствующих β-глюкуронидазе (Рисунок 72, А). Это косвенно подтверждало присутствие в слитом белке аминокислотной последовательности пептида M130. При использовании анти-M2e антител, присутствие пептида M2e было показано в 8-ми линиях ряски. Масса узнаваемого анти-M2e антителами белка соответствовала массе белка, детектируемому с помощью антител к β-глюкуронидазе (Рисунок 72, Б) [468]. Необходимо отметить, что размер детектируемого в трансгенных растениях ряски малой белка M130-β-глюкуронидаза совпадал с размером этого белка в трансгенных линиях табака.

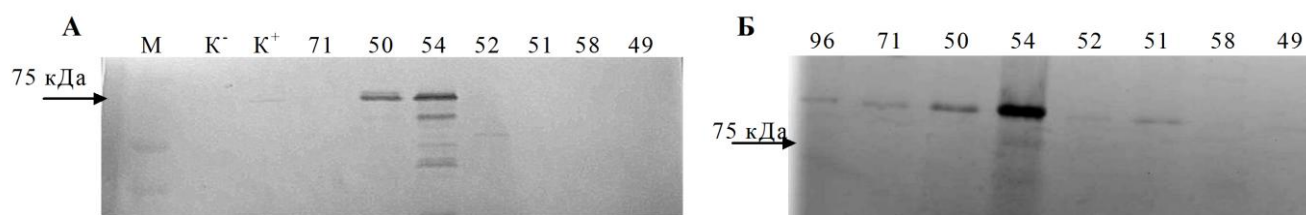


Рисунок 72 – Вестерн блот анализ ряски, трансформированной вектором pVIM130. Используются антитела к β-глюкуронидазе (А) и пептиду M2e (Б). Цифрами обозначены трансгенные линии ряски, K⁻ - растение табака, трансформированное вектором pVI121, K⁺ - нетрансгенное растение, M - маркеры молекулярной массы белков. Ожидаемый размер белка M130-β-глюкуронидаза - 74 кДа.

Анализ содержания слитого белка M130-β-глюкуронидаза в трансгенных линиях ряски проводился методом ИФА с использованием антител к β-глюкуронидазе (Таблица 39). Содержание белка M130-β-глюкуронидаза в трансгенной ряске находилось на уровне 0,1-0,9 мг/г сырого веса, что соответствовало 0,1% (линия 19) - 2,0% (линии 51 и 54) ОРБ. С учетом массы пептида M2e (3,5 кДа), его накопление в составе белка M130-β-глюкуронидаза в линиях 51 и 54 превышало 40 мкг/г сырого веса [468].

Полученные значения являются высокими. Так, в исследовании Wigdorovitz и др. накопление β-глюкуронидазы в слиянии с пептидом eBRV4a белка оболочки VP4 бычьего ротавируса составляло в растениях трансгенной люцерны 0,4-0,9 мг на 1 грамм общего белка [469]. В работе Sun и др. накопление эндоглюконазы E1 из *Acidothermus cellulolyticus* в ряске малой составляло 0,24% от общего растворимого белка [165].

Таблица 39 - Накопление слитого белка М130-β-глюкуронидаза в различных линиях ряски, трансформированной вектором рВIM130.

Линия	Содержание М130-β-глюкуронидазы в 1г сырой массы фрондов, мг	Содержание ОРБ в 1г сырой массы фрондов, мг	Доля М130-β-глюкуронидазы в ОРБ, %
13	0,819±0,123	44,4±4,0	1,84±0,26
14	0,606±0,179	48,6±5,6	1,25±0,31
16	0,939±0,211	48,3±5,7	1,94±0,27
17	0,3±0,098	46,5±3,8	0,65±0,14
18	0,585±0,145	51±6,5	1,15±0,18
19	0,068±0,011	50,7±4,4	0,11±0,03
34	0,125±0,068	50,4±3,8	0,43±0,11
49	0,24±0,09	36±4,1	0,67±0,13
50	0,782±0,231	41,4±3,8	1,9±0,24
51	0,773±0,216	38,7±2,9	2,0±0,25
52	0,204±0,068	42,2±3,7	0,48±0,13
54	0,873±0,276	45,7±2,1	2,0±0,37
58	0,084±0,007	49,2±3,8	0,3±0,1
71	0,408±0,096	48,9±4,1	0,83±0,11
72	0,489±0,95	43,6±3,6	1,12±0,17
73	0,438±1,09	46,2±3,9	0,95±0,23
74	0,453±0,145	36±3,7	1,26±0,25
93	0,096±0,032	35,7±3,4	0,27±0,09
96	0,912±0,201	49,2±4,2	1,85±0,33
99	0,531±0,184	37,5±2,9	1,42±0,29
112	0,396±0,076	33,6±3,5	1,18±0,16
*К ⁻	0,0	31,6±3,4	0,0

*К⁻ - нетрансгенная ряска

В результате проведённых исследований нами был достигнут высокий уровень экспрессии последовательности М130 - β-глюкуронидаза в трансгенных растениях ряски. Это позволило перейти к следующим этапам исследований.

3.5.2. Анализ экспрессии пептида M2e, слитого с субъединицей В рицина

В результате трансформации ряски вектором pVIsprRBM130 было получено 24 независимые линии растений. Для подтверждения трансгенной природы этих линий был проведен их ПЦР-анализ. Во всех изученных линиях была показана амплификация фрагмента ДНК ожидаемого размера (Рисунок 73) [420]. Результаты трансформации ряски вектором pVIsprRBM130 представлены в Таблице 40.

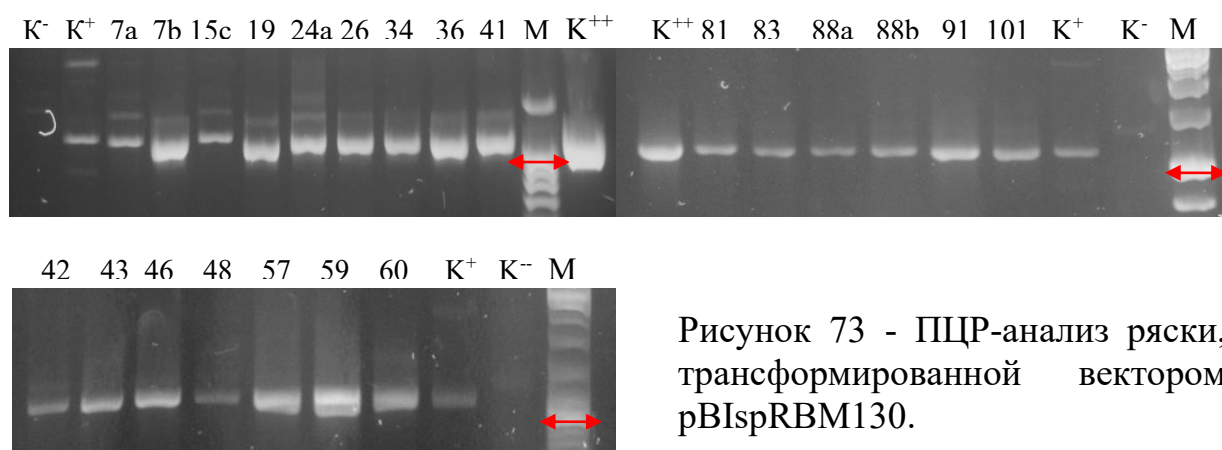


Рисунок 73 - ПЦР-анализ ряски, трансформированной вектором pVIsprRBM130.

Цифрами обозначены трансгенные линии ряски; K⁻ - ДНК нетрансгенной ряски; K⁺ - ДНК трансгенного табака линии sp3; K⁺⁺ - ДНК плазмиды pVIsprRBM130; M- маркеры молекулярной массы. Стрелкой ↔ показан маркер 1000 п.н. Используются праймеры 5727 и M130rev. Амплифицируется последовательность, кодирующая участок PR1a-RTB-M130 целевого белка. Длина амплифицируемого фрагмента- 1091 п.н.

Таблица 40 - Результаты трансформации ряски вектором pBIsprBVM130.

Получено Km ^r устойчивых линий ряски,	24
из них:	
проанализировано, всего	24
без агробактериальной контаминации	23
содержат вставку целевой последовательности	23

Анализ накопления химерного белка sp-RTB-M130-CBD (далее обозначен RTB-M130) в линиях трансгенной ряски был проведен с помощью асиалофетуин-связывающей ELISA с использованием анти-RTB антител. Образцы ОРБ трансгенных линий были получены из растений, культивировавшихся 1 месяц на среде с канамицином. Присутствие белка RTB-M130 было показано в 20-ти линиях трансгенной ряски (Рисунок 74). Содержание целевого белка варьировало в диапазоне от 0,5 мкг/г сырого веса в линиях 34 и 36 до 2,0 - 2,5 мкг/г в линиях 81 и 91, что соответствовало 0,004% - 0,01% ОРБ. Необходимо отметить, что количество RTB-M130 в растениях табака линии sp14 примерно соответствовало количеству целевого белка в линиях ряски 81 и 91, и составляло около 2,0 мкг/г сырого веса [420].

Полученные данные показали существенно меньшее накопление слитого белка RTB-M130 по сравнению с M130-β-глюкуронидаза - 0,01% и 2,0% от ОРБ, соответственно. Наблюдаемые различия в экспрессии этих белков могут иметь несколько причин. Во-первых, при использовании асиалофетуина в ИФА учитывается только правильно процессированные молекулы RTB [443], при этом общее количество синтезированной RTB может быть существенно выше, чем это следует из результатов теста. Во-вторых, субъединица В рицина может быть

менее стабильна, чем β -глюкуронидаза, вследствие чего она накапливается в растительных клетках в меньших количествах [458].

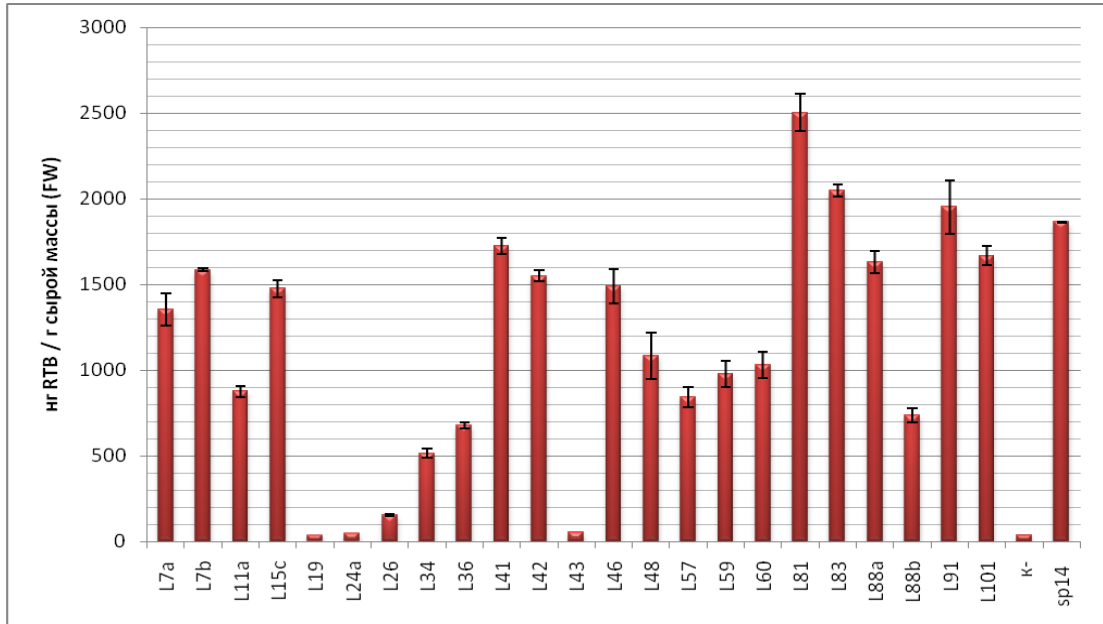


Рисунок 74 - Накопление белка RTB-M130 в различных линиях ряски. L7a - L101 - трансгенные линии ряски; sp14- линия табака, трансформированная вектором pBIsprRBM130; K⁻ - нетрансгенная ряска. Накопление целевого белка выражено в нг/г сырой массы фрондов.

Для дополнительного подтверждения присутствия пептида M2e в белке RTB-M130 был выполнен Вестерн блот анализ линий трансгенной ряски с использованием антител к M2e. Как показано на Рисунке 75, в 13 линиях трансгенных растений был детектирован белок размером около 80-85 кДа, отсутствующий в контрольных растениях (размер целевого белка sp-RTB-M130-CBD 42,2 кДа без учета гликозилирования).

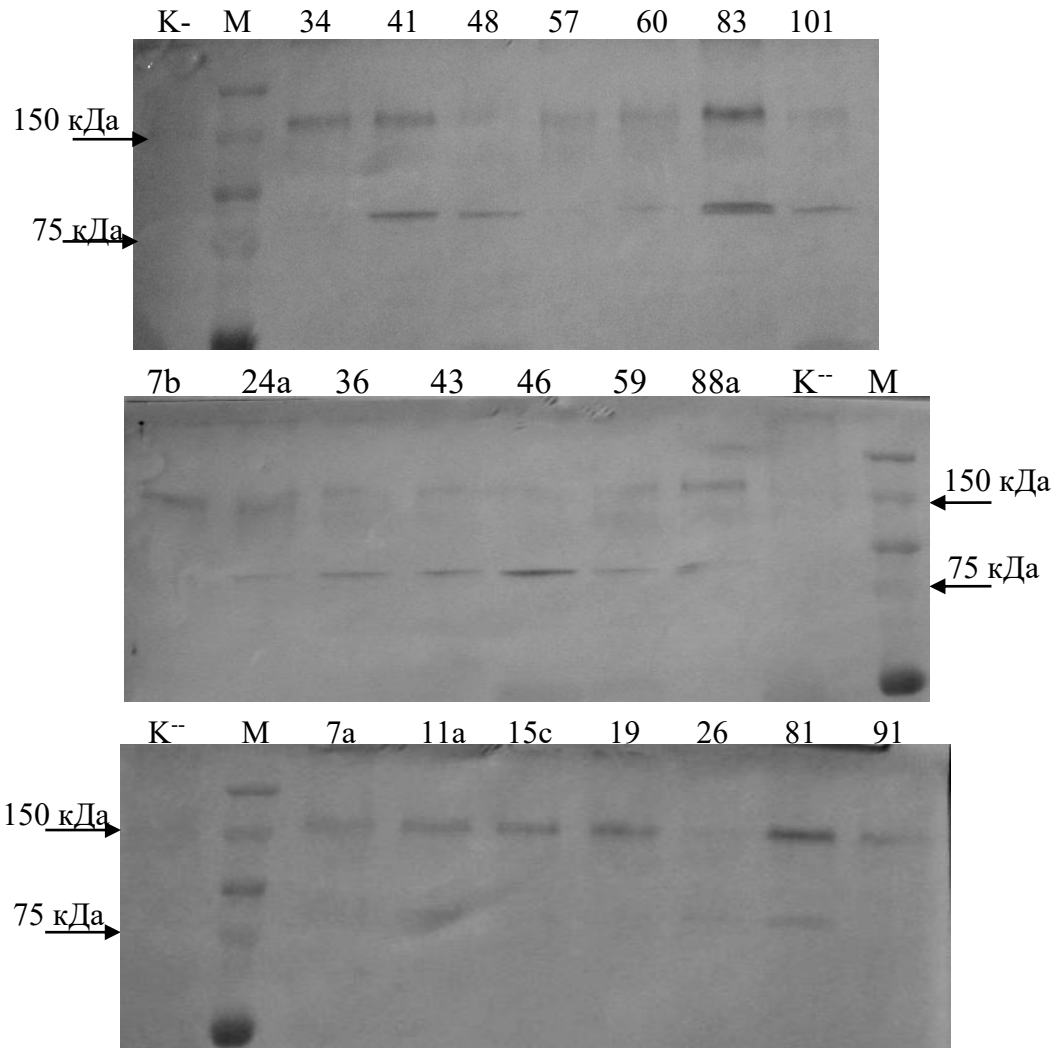


Рисунок 75 - Вестерн-блот анализ линий ряски, трансформированной вектором pBIspRBM130. Использованы антитела к пептиду M2e. Цифрами обозначены линии трансгенной ряски, K⁻ - нетрансгенная ряска, M- маркеры молекулярной массы. Размер белка RTB-M130 - 42,2 кДа. K⁻ - растение, трансформированное вектором pBI121, негативный контроль.

Размер белка, детектируемого в растениях ряски линий 11a, 24a, 26, 36, 41, 43, 46, 48, 59, 83, 88a и 101 соответствовал предполагаемому димерному варианту белка RTB-M130, как это наблюдалось в образцах табака линий sp3 и sp14 (Рисунок 60). В линиях 7a, 7b, 34, 41, 15c и 81 ряски анти-M2e антитела связывались с белком размером около 160 кДа, что позволяет предполагать наличие тетрамерных вариантов RTB-M130. По-видимому, мультимеризация

является процессом, характерным для экспрессии слитых белков, имеющих в своём составе РТВ. Так, например, слитый белок инсулин-РТВ накапливался в трансгенном картофеле в виде тетрамеров и ещё более высокомолекулярных структур, его экспрессия в виде мономеров не наблюдалась [448].

Таблица 41 - Накопление слитого белка РТВ-М130 в трансгенных линиях ряски.

Линия	Содержание РТВ-М130 в 1г сырой массы фрондов, мкг	Содержание ОРБ в 1г сырой массы фрондов, мг	Доля РТВ-М130 в ОРБ, %
7a	1,3±0,3	32,5±3,1	0,004±0,001
7b	1,6±0,3	22,9±3,6	0,007±0,002
11a	0,8±0,2	20,0±1,6	0,004±0,001
15c	1,4±0,4	20,0±2,4	0,007±0,001
19	0,050±0,01	25,0±2,7	0,0002±0,0001
24a	0,060±0,01	30±3,3	0,0002±0,0001
26	0,2±0,05	33,3±3,2	0,0006±0,0002
34	0,5±0,1	16,7±1,6	0,003±0,001
36	0,7±0,2	12,7±1,8	0,006±0,001
41	1,7±0,3	17,0±2,1	0,01±0,003
42	1,6±0,4	32,0±3,3	0,005±0,001
43	0,05±0,02	16,7±2,2	0,0003±0,0002
46	1,5±0,3	15,0±2,0	0,01±0,003
48	1,1±0,2	18,3±2,3	0,006±0,002
57	0,8±0,2	20,0±2,2	0,004±0,001
59	1,0±0,3	12,5±1,9	0,008±0,002
60	1,0±0,2	20,2±2,0	0,005±0,002
81	2,5±0,4	25,1±2,9	0,01±0,003
83	2,1±0,4	21,0±2,5	0,01±0,004
88a	1,6±0,3	16,2±1,5	0,01±0,004
88b	0,7±0,2	23,3±2,7	0,003±0,002
91	1,9±0,4	27,1±3,0	0,007±0,003
101	1,6±0,3	17,1±1,7	0,01±0,004

Поскольку результаты асиалофетуин-связанной ELISA в трансгенных линиях свидетельствовали о сохранении способности рекомбинантного РТВ к связыванию с рецепторами, мы предположили, что мультимеризация РТВ-М130

не ведёт к потере его адьювантной активности. Необходимо отметить, что по данным Carter и др. агрегация белка инсулин-RTВ не стала препятствием для выработки специфических антител при иммунизации животных [448].

В ходе проведённых исследований показан синтез слитого белка RTВ-М130 в 20 трансгенных линиях ряски и проведён анализ его накопления (Таблица 41). Для проведения исследований по изучению выработки специфических к пептиду М2е антител при иммунизации лабораторных животных были выбраны трансгенные линии 41, 46, 81, 83 и 101. Эти линии характеризовались наибольшим накоплением целевого белка как на 1 грамм сырой массы ряски, так и относительно содержания ОРБ [420].

3.5.3. Иммунизация мышей пептидом М2е, экспрессированным в трансгенных растениях ряски малой

В результате предварительных экспериментов было показано, что лабораторные мыши не едят ряску - как в свежем виде, так и лиофилизированную в смеси с сухим кормом. Это вело к невозможности иммунизации мышей равными количествами антигена. В связи с этим для иммунизации был использован частично очищенный препарат общего белка ряски, иммунизации проводили с помощью зонда.

3.5.3.1. Подготовка препарата общего белка ряски для иммунизации

Белки ряски осаждали сульфатом аммония, концентрация сульфата аммония- 25, 70 и 100% от насыщения. После обессоливания полученные

препараты растворяли в аммоний-бикарбонатном буфере (20 мМ, рН 8,2), лиофилизировали и растворяли в буфере PBS (рН 7,4). В образцах определяли содержание общего белка и слитого белка RTB-M130 (методом асиалофетуин-связанной ELISA).

Большая часть белка RTB-M130 - около 80% - находилась во фракции, полученной при осаждении сульфатом аммония в концентрации 25 - 70% от насыщенного. В двух других фракциях (0-25 и 70-100% от насыщения) содержалось 12 и 6% RTB-M130 от его суммарного содержания в исходном образце. В этих фракциях содержалось, также, много нерастворимого материала темного, почти черного цвета, при попытках его растворения наблюдалось образование раствора желеобразной консистенции. Мы предполагаем, что они представляют собой вещества полифенольной природы и водорастворимые полисахариды, необратимо преципитированные сульфатом аммония.

Аналогичные результаты были получены в экспериментах с образцами общего белка, полученными из растений ряски, экспрессирующих слитый белок M130- β -глюкуронидаза. Основная активность β -глюкуронидазы (78% от суммарной) наблюдалась во фракции, полученной при использовании сульфата аммония концентрации 25-70% от насыщенного. В двух других фракциях, значения активности β -глюкуронидазы составили в сумме 22%. Эти фракции, также, характеризовались плохой растворимостью.

В составе слитого белка RTB-M130 был включен хитин-связывающий домен. Предполагалось, что это позволит проводить частичную очистку RTB-M130 из грубых препаратов растительного белка на колонках с хитиновым носителем. Проведённые эксперименты показали большие потери целевого белка при использовании этого подхода. На хитиновом носителе связывались, преимущественно, хитин-связывающие белки растительного происхождения, которые были обильно представлены как в растениях табака, так и в растениях ряски. Основное количество RTB-M130 детектировалось в проскоке, среди несвязавшихся с носителем белков. Концентрирования целевого белка RTB-

M130, таким образом, не наблюдалось. Учитывая относительно невысокий уровень экспрессии слитого белка RTB-M130 в полученных линиях и его потери при очистке на хитиновом носителе, данный подход был признан нецелесообразным и далее не изучался.

Исходя из полученных результатов, в экспериментах по иммунизации мышей были использованы препараты белка ряски, полученные при осаждении 25-70% сульфата аммония. Схема эксперимента по иммунизации и дозы антигенов представлены на Рисунке 76 [420].

Группа 1. 10 животных, 7 μg /доза RTB-M130, всего 28 мкг антигена/мышь

Группа 2. 10 животных, 28 μg /доза M130- β -глюкуронидаза, всего 112 мкг антигена/мышь

Группа 3. 5 животных, 100 μg /доза ОРБ нетрансгенных растений, всего 400 мкг антигена/мышь

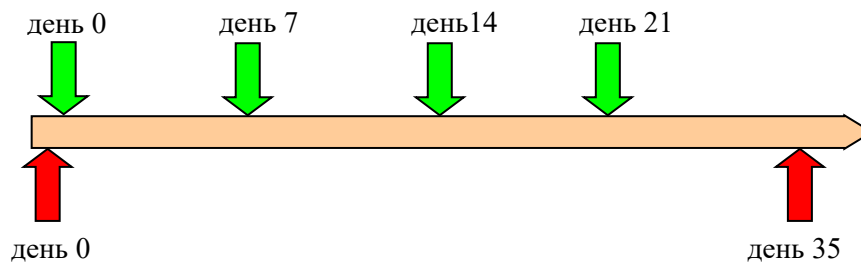


Рисунок 76 - Схема эксперимента по иммунизации мышей пептидом M2e. Зелёными стрелками показаны даты оральной иммунизации, красными стрелками – даты забора образцов крови.

3.5.3.2. Иммунизация лабораторных мышей пептидом M2e в составе слитых белков RTB-M130 и M130-β-глюкуронидаза

Для изучения способности белков RTB-M130 и M130-β-глюкуронидаза индуцировать образование антител к пептиду M2e, мыши линии ICR были орально иммунизированы частично очищенными препаратами ОРБ, полученными из трансгенных растений ряски. Результаты иммунизации представлены на Рисунке 77.

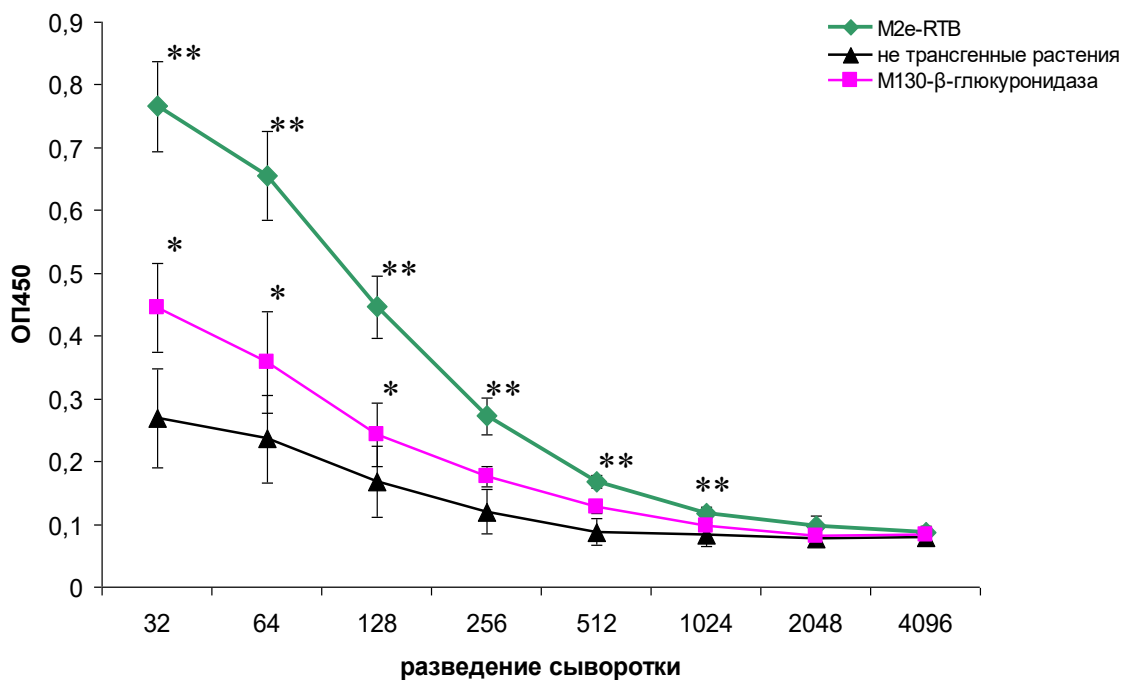


Рисунок 77 - Индукция антител к пептиду M2e при иммунизации мышей слитыми белками RTB-M130 и M130-β-глюкуронидаза. Представлены значения ОП450 по результатам ELISA и их стандартные отклонения. *-наблюдаются достоверные различия относительно варианта иммунизации препаратами белка из нетрансгенных растений ($p < 0,05$).

Все мыши, иммунизированные слитым белком RTB-M130, продемонстрировали присутствие в сыворотке специфических к пептиду M2e антител. Различия значений ОП450 между группами, иммунизированными слитым белком RTB-M130 или белком из нетрансгенных растений, были статистически достоверными вплоть до разведения 1:1024 [420].

В тоже время, при иммунизации слитым белком M130- β -глюкуронидаза, антитела к пептиду M2e в сыворотке подопытных животных детектировались на существенно более низком уровне. Различия между значениями ОП450 для групп, иммунизированных слитым белком M130- β -глюкуронидаза или препаратом белка из нетрансгенных растений, были статистически достоверными только до разведения 1:128. Таким образом, титр антител к пептиду M2e при иммунизации мышей слитым белком M130- β -глюкуронидаза был существенно ниже, чем при иммунизации RTB-M130 [420].

Наблюдавшиеся различия в эффективности иммунизации были связаны с адьювантным действием RTB. Как уже указывалось выше, пептид M2e является слабым иммуногеном, поэтому для индукции антител к нему требуется использование адьювантов. В большинстве случаев, при иммунизации рекомбинантным пептидом M2e его получают в гетерологичных системах в слиянии с каким-либо адьювантным белком. В качестве адьювантов для получения мукозального иммунного ответа были использованы субъединица А токсина холеры, слитая с D-доменом белка A *S. aureus* [312], субъединица В токсина холеры [470], коровый антиген вируса гепатита В [342], С- домен белка теплового шока HSP70 *Mycobacterium tuberculosis* [309], и другие.

В наших экспериментах в качестве адьюванта была использована субъединица В рицина. Функциональная активность рекомбинантного RTB и её адьювантный эффект были подтверждены результатами проведённых исследований. При иммунизации мышей слитым белком RTB-M130 наблюдался существенно более высокий титр антител к M2e (1:1024), чем при иммунизации M130- β -глюкуронидаза (1:128). При этом в экспериментах по иммунизации

суммарная доза антигена M130- β -глюкуронидаза составила 112 мкг/мышь, а RTB-M130 существенно меньше - 28 мкг/мышь. Это подтверждает, также, отсутствие заметного адъювантного действия β -глюкуронидазы. Таким образом, при оральной иммунизации мышей препаратами общего белка трансгенных растений ряски показана индукция антител к пептиду M2e у подопытных животных и подтверждена иммуногенность слитого белка RTB-M130, полученного в гетерологичной экспрессионной системе [420].

В результате проведённых исследований нами подтверждена возможность получения пептида M2e вируса гриппа птиц в стабильно трансформированных растениях табака и ряски малой. Накопление пептида M2e в составе слитого белка M130 - β -глюкуронидаза с его локализацией в цитоплазме клетки превышало 40 мкг/г сырого веса растений ряски трансгенных линий 51 и 54. Эта величина сопоставима с уровнем экспрессии пептидов в транзиентных экспрессионных системах.

В качестве белка-партнера на этом этапе исследования нами была использована β -глюкуронидаза. Это белок характеризовался стабильно высоким уровнем экспрессии в ряске - до 120 мкг/г сырого веса. Однако β -глюкуронидаза не обладает заметными адъювантными свойствами. Учитывая низкую иммуногенность пептида M2e, для использования в качестве белка – партнёра нами была клонирована субъединица В рицина из клещевины *R. communis*, обладающая мощным адъювантным действием.

Растения ряски табака и были успешно трансформированы вектором, несущим ген химерного белка, состоящего из аминокотерминального фрагмента белка M2 вируса гриппа птиц длиной 30 а.о., включающего пептид M2e, и

субъединицы В рицина. В полученных растениях была показана экспрессия целевого белка RTВ-M130. Накопление RTВ-M130 в трансгенных линиях составляло, в среднем, 2,5 - 3,0 мкг/г сырого веса растения. По уровню аккумуляции RTВ-M130 трансгенные линии табака и ряски не отличались друг от друга. При этом рекомбинантный RTВ сохранял способность связываться с асиалофетуином, что указывало на сохранение его функциональной активности. Необходимо отметить, что накопление рекомбинантного RTВ не зависело от его внутриклеточной компарментализации. Локализация RTВ в апопласте, ЭПР или вакуолях клеток табака не вела к существенному увеличению его накопления в трансгенных растениях.

Оральная иммунизация мышей частично очищенными препаратами общего растворимого белка ряски, экспрессирующей пептид M2e в составе слитого белка RTВ-M130, вела к индукции специфических антител к M2e. Иммунизация слитым белком M130 - β -глюкуронидаза также вела к индукции антител, но на уровне существенно более низком, чем при иммунизации животных RTВ-M130. Тем самым была подтверждена возможность индукции специфических антител у животных при их оральной иммунизации пептидом M2e, слитым с субъединицей В рицина. Необходимо отметить, что иммунный ответ у мышей наблюдался при иммунизации относительно низкими дозами антигена, что подтверждает высокую эффективность субъединицы В рицина как адьюванта. Таким образом, нами была подтверждена возможность создания экспрессионных систем на основе растений ряски для получения рекомбинантных антигенов для последующей разработки съедобных вакцин различного назначения.

3.6. Агробактериальная трансформация ряски геном гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека (ГКСФ)

3.6.1. Конструирование вектора pBI-GCSF и трансформация ряски геном ГКСФ

Нуклеотидная последовательность, кодирующая ГКСФ, с оптимизированным для экспрессии в ряске кодонным составом, была клонирована в вектор pBI121 вместо гена β -глюкуронидазы. Для транспорта рекомбинантного ГКСФ в апопластное пространство к нему был добавлен N-концевой сигнальный пептид α -амилазы риса. Структура экспрессионной кассеты вектора pBI-GCSF, аминокислотная и нуклеотидная последовательности ГКСФ представлены на Рисунке 78.

Трансформация растений ряски (*Lemna minor*) вектором pBI-GCSF проводилась по описанной в разделе 2.3.2. «Генетическая трансформация ряски малой» методике. Процесс трансформации ряски вектором pBI-GCSF не отличался от трансформации ряски другими векторами и не имел каких-либо специфических особенностей. В результате экспериментов были получены канамицин-устойчивые линии ряски, нормально растущие и пролиферирующие на среде с канамицином. Результаты экспериментов по трансформации ряски вектором pBI-GCSF представлены в Таблице 42.

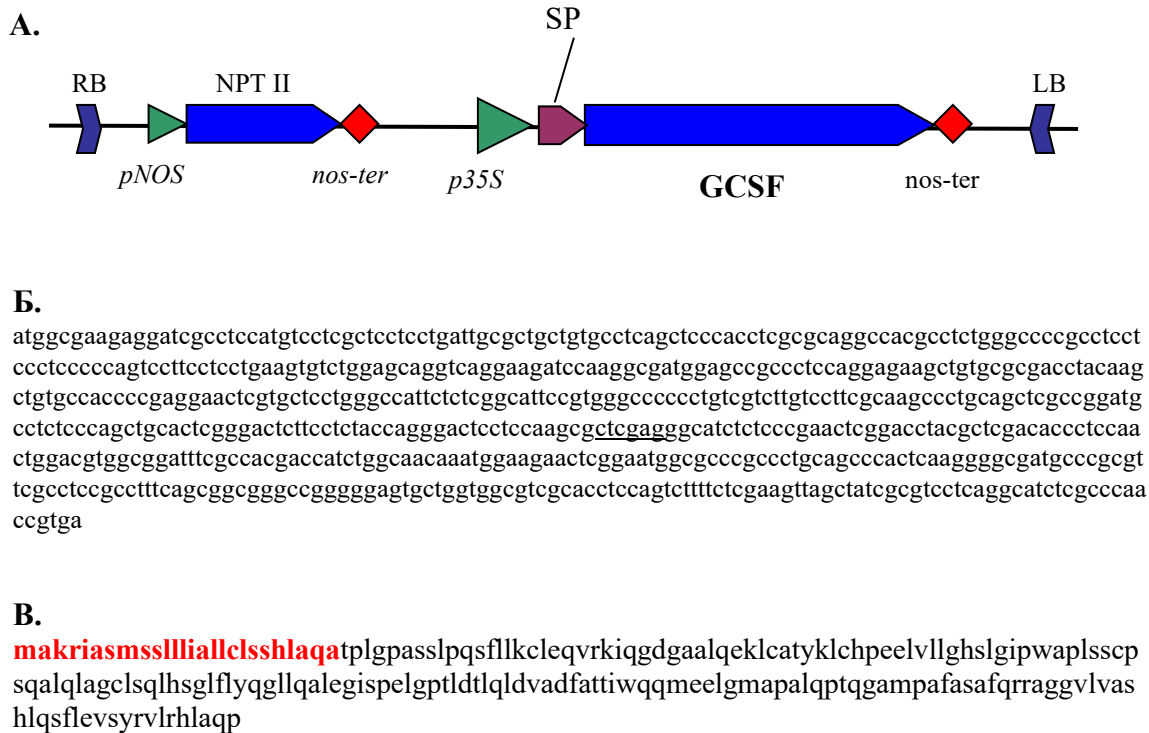


Рисунок 78 - Структура вектора pBI-GCSF. А. Экспрессионная кассета вектора pBI-GCSF. Б. Нуклеотидная последовательность ГКСФ после оптимизации кодонного состава для экспрессии в ряске. В. Аминокислотная последовательность ГКСФ.

GCSF - нуклеотидная последовательность синтетического гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека; RB и LB - правый и левый граничные повторы Т-ДНК; pNOS и nos-ter - промотор и терминатор гена нопалинсинтазы, соответственно; NPTII - ген неомицинофосфо-трансферазы II; p35S - 35S промотор вируса мозаики цветной капусты; SP - сигнальный пептид α -амилазы риса. Красным показана последовательность N-концевого сигнального пептида α -амилазы риса.

Таблица 42 - Агробактериальная трансформация ряски малой вектором pBI-GCSF.

Эксперимент, №	Канамициноустойчивые каллусы, всего (среда селекции и регенерации трансформантов, этап 3)*	Канамициноустойчивые фронды, всего (среда селекции и регенерации трансформантов, этап 4)*	Линий, устойчивых к канамицину (этап 6)*
1	188	93	28
2	213	101	22
Всего	401	194	50

* См. Рисунок 12 раздела «2.3.2. Генетическая трансформация ряски малой».

Канамицинустойчивые растения активно росли и пролиферировали в жидкой среде без признаков токсического действия канамицина. Трансформация не оказала влияния на морфологию, скорость роста и содержание ОРБ в канамицинустойчивых растениях. Всего было получено 50 независимых линий ряски, трансформированных вектором pBI-GCSF [471].

3.6.2. Скрининг канамицинустойчивых линий ряски на экспрессию ГКСФ. ПЦР- анализ полученных линий

В связи со значительным количеством полученных канамицинустойчивых линий ряски, нами было признано целесообразным провести предварительный скрининг полученных линий на присутствие ГКСФ. Это позволило бы провести отбор для дальнейших исследований линий с максимальным накоплением целевого белка. Скрининг был проведён с использованием иммуноферментного анализа, результаты которого представлены на Рисунке 79.

Экспрессия ГКСФ была детектирована в большинстве полученных линий, значения ОП₄₅₀ образцов достоверно превышали значения, полученные для контрольных растений. Максимальные значения ОП₄₅₀ наблюдались в линиях 13, 19 и 88, что указывает на относительно высокую экспрессию ГКСФ в этих линиях. В линиях 7, 9, 38, 66, 68, 72 наблюдались более низкие значения ОП₄₅₀. Все эти линии были отобраны для дальнейших исследований.



Рисунок 79 - Скрининг канамициноустойчивых линий ряски на экспрессию рекомбинантного ГКСФ. Цифрами обозначены канамициноустойчивые линии, К- - контрольные нетрансформированные растения. Скрининг проводился методом ИФА с использованием антител к ГКСФ. Показаны средние значения ОП450 образцов, n=4.

В исследования были, также, включены шесть линий с потенциально низкой экспрессией - 10, 34, 49, 59, 60 и 92. Изучение этих линий позволило бы нам получить более ясное представление об особенностях экспрессии рекомбинантного ГКСФ в растениях ряски. Отобранные линии были проанализированы методом ПЦР на присутствие целевой нуклеотидной последовательности. Фрагмент, соответствующий последовательности ГКСФ, амплифицировался в образцах ДНК всех проанализированных линий (Рисунок 80). Таким образом, присутствие нуклеотидной последовательности ГКСФ было подтверждено во всех 15 выбранных для изучения линиях.

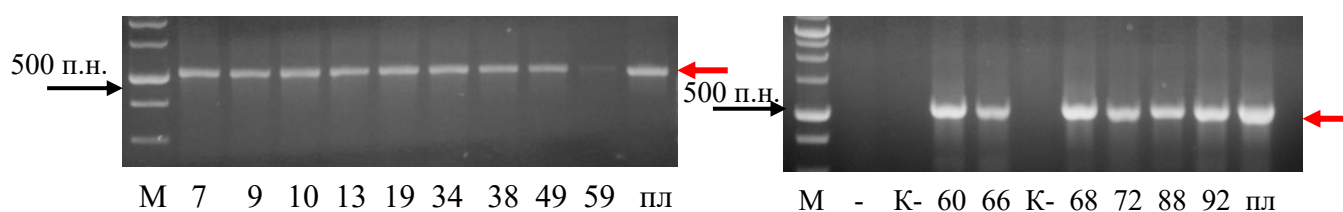


Рисунок 80 - ПЦР-анализ линий ряски, трансформированных вектором pVI-GCSF.

Цифрами обозначены различные трансгенные линии. М – маркер молекулярной массы ДНК; К- – ДНК нетрансгенного растения, пл- ДНК вектора pVI-GCSF. Стрелками показан амплифицируемый фрагмент (601 п.н.).

3.6.3. Анализ экспрессии ГКСФ в трансгенных линиях ряски

Количественная оценка содержания ГКСФ в растениях ряски, трансформированных вектором pVI-GCSF, была выполнена методом иммуноферментного анализа (Рисунок 81). Накопление рекомбинантного ГКСФ в трансгенных линиях варьировало в широком диапазоне – от 0,69 (линия 68) до 70,5 (линия 19) мкг на 1 грамм сырой массы ряски [471].

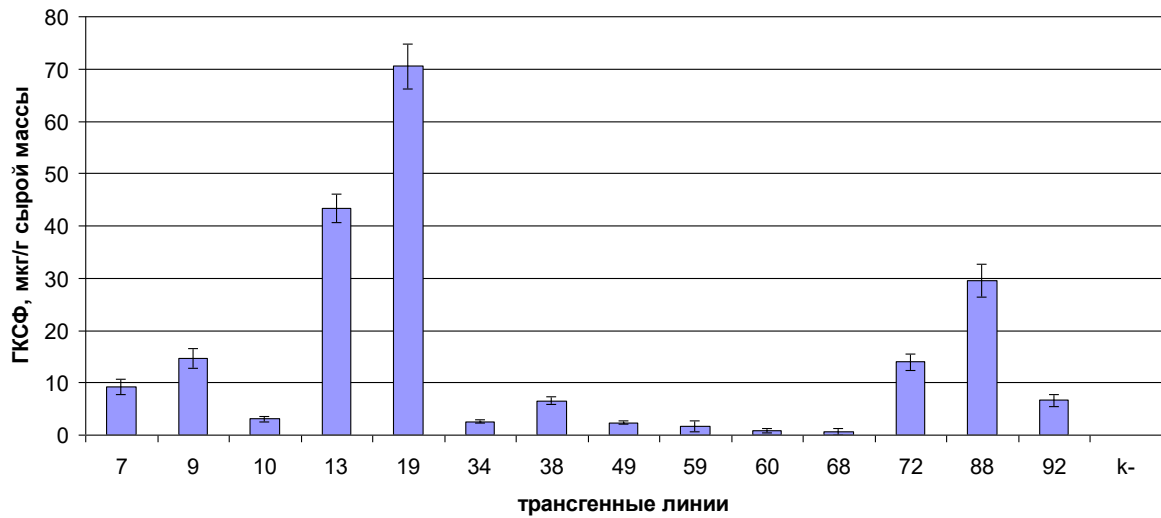


Рисунок 81 - Накопление рекомбинантного ГКСФ в различных линиях трансгенной ряски. Цифрами обозначены трансгенные линии; К- - нетрансгенная ряска.

Таблица 43 - Накопление рекомбинантного ГКСФ в линиях ряски, трансформированной вектором рVI-GCSF.

Трансгенные линии	Накопление ГКСФ, мкг/г сырой массы ряски	Накопление ГКСФ, доля от общего растворимого белка ряски, %
7	9,28±1,74	0,12±0,02
9	14,6±2,34	0,11±0,01
10	3,05±0,41	0,14±0,02
13	43,33±5,83	0,28±0,01
19	70,48±8,39	0,36±0,04
34	2,60±0,21	0,10±0,002
38	6,56±1,84	0,12±0,01
49	2,33±0,48	0,08±0,01
59	1,64±0,93	0,10±0,008
60	0,77±0,37	0,11±0,02
68	0,69±0,48	0,14±0,03
72	13,93±2,38	0,13±0,02
88	29,55±4,14	0,24±0,04
92	6,61±1,82	0,10±0,01

Максимальный уровень экспрессии ГКСФ наблюдался в линии 19 - 70,5 мкг/г сырой массы; в линиях 13 и 88 накопление ГКСФ было ниже и составило 43,3 и 29,6 мкг/г, соответственно. Средний уровень аккумуляции ГКСФ был детектирован в линиях 7, 9 и 72 – соответственно 9,3; 14,7 и 13,9 мкг/г сырой массы. В остальных изученных линиях накопление ГКСФ было существенно ниже и находилось в диапазоне 0,69 - 6,56 мкг/г (Таблица 43).

Полученный в нашем исследовании уровень накопления рекомбинантного ГКСФ в трансгенных растениях (до 70 мг ГКСФ/кг сырой массы ряски) является весьма высоким. Накопление ГКСФ было существенно выше, чем накопление гирудина или пептида M2e, слитого с RTV в предыдущих экспериментах. Уровень аккумуляции ГКСФ в тканях растений ряски был близок к уровню, наблюдавшемуся при трансформации ряски слитым белком M130-β-глюкуронидаза. Это косвенно подтверждает устойчивость рекомбинантного ГКСФ к деградации протеиназами растительной клетки.

В наших экспериментах наблюдалось почти стократное варьирование накоплении целевого белка среди независимых трансгенных линий. Варьирование уровня экспрессии рекомбинантных белков в независимо полученных трансгенных линиях является обычным [472,473]. Оно, как правило, связано с различиями в количестве копий гетерологичного гена или с различиями в его положении в геноме растения-хозяина. Оба эти фактора применимы к трансгенным линиям ряски, которые были нами получены.

Необходимо отметить, что накопление ГКСФ, выраженное как его доля в общем растворимом белке, было относительно невысоким. Максимальная доля ГКСФ в ОРБ составила 0,36% (линия 19), в линиях 13 и 88 накопление ГКСФ было равным 0,28 и 0,24% ОРБ, соответственно. В остальных изученных линиях ГКСФ накапливался на уровне около 0,1% ОРБ (Таблица 43), эта величина является обычной для растительных экспрессионных систем. Однако из-за высокого содержания общего белка в растениях ряски, такая, относительно

небольшая доля рекомбинантного белка обеспечивала высокое накопление целевого белка, выраженное в абсолютных единицах (мг/кг сырой массы).

Препараты ОРБ из линий с максимальной экспрессией были проанализированы методом Вестерн блота (Рисунок 82). В образцах из трансгенных растений было показано присутствие иммунореактивной белковой полосы с молекулярной массой около 20 кДа. Масса этой полосы соответствовала ожидаемой. В контрольных нетрансгенных растениях иммунореактивные полосы, соответствующие ГКСФ, не детектировались.

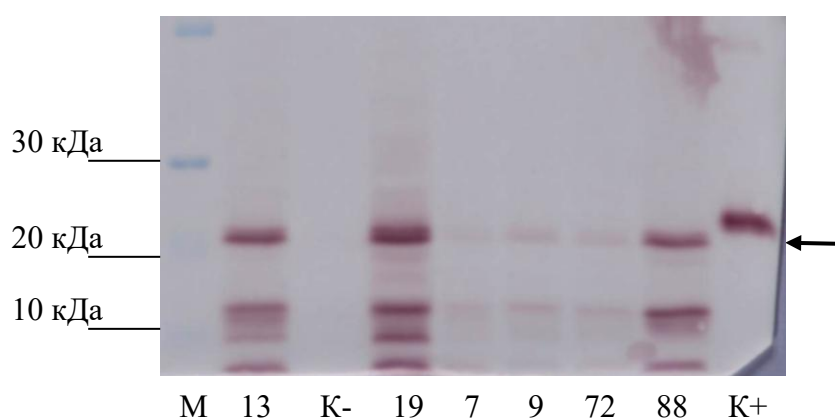


Рисунок 82 - Вестерн блот анализ некоторых линий ряски. Цифрами обозначены трансгенные линии; К⁻ - нетрансгенная ряска; К⁺ рекомбинантный ГКСФ из *E. coli*, 20 нг (AbCam, UK); М- маркер молекулярной массы. Стрелкой показана полоса, соответствующая ГКСФ.

Таким образом, Вестерн-блот анализ подтвердил экспрессию ГКСФ во всех изученных линиях. Как и ожидалось, максимальное накопление рекомбинантного ГКСФ наблюдалось в линиях 13, 19 и 88; в линиях ряски 7, 9 и 72 накопление целевого белка было существенно ниже.

Интенсивность иммунореактивных полос на блоте хорошо коррелировала с содержанием ГКСФ в растениях по данным ИФА. В образцах линий 13, 19 и 88 четко детектировались низкомолекулярные полосы (около 10 кДа и меньше), которые свидетельствовали о деградации целевого белка. Такие же полосы

наблюдались в линиях 7, 9 и 72, таким образом, деградация рекомбинантного ГКСФ в тканях трансгенных растений не зависела от линии.

Деградация рекомбинантных белков является процессом, обычным для растений. Фрагментация рекомбинантных белков как следствие их протеолиза наблюдалась во многих растениях-продуцентах, например, в табаке [474], кукурузе и сое [475], картофеле [476], как в семенах, так и в вегетативных тканях. При этом до сих пор имеется мало информации о механизмах протеолитической деградации гетерологичных белков в растениях. Такие исследования проводились на ограниченном числе объектов, наиболее подробные исследования в этой области были выполнены Sharp и Doran на примере экспрессии антител (IgG1) в растениях табака [477].

Sharp и Doran получали антитела в трансгенных растениях табака. Помимо характерной для антител полосы размером 150 кДа, методом Вестерн блота были детектированы дополнительные полосы, соответствующие фрагментам, размером 135, 120, 80, 50 и 43 кДа. Авторами было показано, что эти фрагменты не являются экспериментальными артефактами, вызванными деградацией антител при выделении белка из растительных тканей, они не были ни гликоформами легкой и тяжелой цепей антител, ни различными интермедиатами. Было установлено, что что 135- и 120-кДа фрагменты являются результатом протеолитической деградации рекомбинантных антител в секреторном пути, вероятнее всего, на этапе между ЭПР и аппаратом Гольджи. Фрагменты, размером 80 и 50 кДа были идентифицированы как продукты внеклеточной протеиназной активности в апопласте побегов и корней. Природа 43-кДа фрагмента осталась неясной [477].

Для дополнительного подтверждения интеграции нуклеотидной последовательности ГКСФ в геном растений был проведён Саузерн блот высокоэкспрессирующих линий ряски – 13, 19 и 88 (Рисунок 83). Тотальная ДНК растений была обработана рестриктазой SacI, которая режет Т-ДНК вектора pVI-GCSF по одному сайту. Ожидаемая длина гибридизационных фрагментов – не

менее 3981 п.н. Полученные данные подтвердили интеграцию целевой последовательности в геном изученных линий и независимый характер трансформационных событий. Количество вставок целевого гена составило 1 (линия 13) или 2 (линии 19 и 88), что является типичным для агробактериальной трансформации. В образце ДНК из контрольного нетрансформированного растения гибридизации с зондом не наблюдалось.

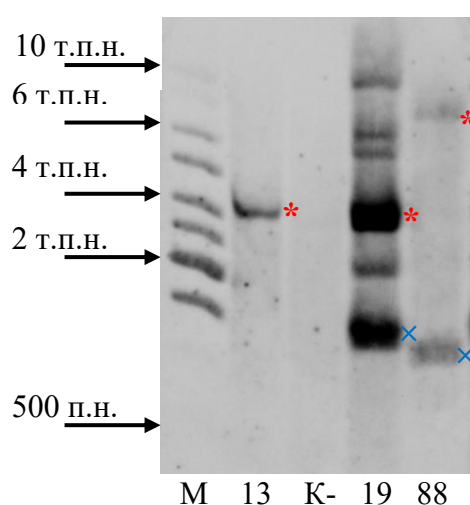


Рисунок 83 - Саузерн блот анализ трансгенных линий ряски с максимальной экспрессией рекомбинантного ГКСФ. 13, 19 и 88 – трансгенные линии ряски; К- - ДНК контрольного нетрансформированного растения; М- маркер молекулярной массы ДНК. Знаком * обозначены гибридизационные фрагменты ожидаемой длины (≥ 3981 п.н.); знаком × - фрагменты, чья длина меньше ожидаемой (≤ 3981 п.н.).

В линии 19, характеризующейся максимальным уровнем экспрессии, были детектированы две вставки гетерологичной последовательности, в линиях с меньшей экспрессией – 1 или 2 вставки (линии 13 и 88, соответственно) (Рисунок 85). В линиях 19 и 88 детектировались вставки, длиной меньше 1 т.п.н., т.е. имел место неполный перенос Т-ДНК вектора. Таким образом, экспрессия гена ГКСФ во всех трёх изученных линиях происходила, по-видимому, с одной полноразмерной копии. Исходя из полученных данных, мы выбрали для проведения дальнейших исследований линию 19, обеспечивающую максимальное накопление рекомбинантного ГКСФ, трансгенный статус которой подтверждён данными ПЦР- и Саузерн блот анализов.

3.6.4. Хроматографический анализ ГКСФ - содержащих препаратов общего белка ряски

Как и в ранее описанных экспериментах по частичной очистке слитых белков M130- β -глюкуронидаза и RTB-M130 для иммунизации, удаление различных примесей из препарата общего белка ряски проводили методом осаждения сульфатом аммония, концентрация сульфата аммония- 33, 70 и 100% от насыщения. Полученные осадки осаждали центрифугированием, растворяли в 20 мМ ацетата Na (pH 7,4), обессоливали и лиофилизировали. Полученные лиофилизированные препараты растворяли в буфере PBS (pH 7,4) и количественно анализировали методом ELISA с использованием антител к ГКСФ.

Как следует из полученных данных, основное количество рекомбинантного ГКСФ - 81% от его суммарного содержания в исходном препарате - находилось во фракции, полученной при использовании сульфата аммония в концентрации 33-70% от насыщенного. В двух других фракциях (0-33 и 70-100% от насыщения) содержалось 9 и 10% ГКСФ от его суммарного содержания в исходном образце. Исходя из полученных результатов, в последующих экспериментах нами были использованы препараты белка ряски, полученные после осаждения сульфатом аммония в концентрации 33 - 70% от насыщения.

Результаты электрофоретического анализа фракции ОРБ ряски, полученной после осаждения сульфатом аммония при концентрации 33-70%, представлены на Рисунке 84, А. В изученных образцах наиболее обильно представлен белок с молекулярной массой около 45-48 кДа, наиболее вероятно, большая субъединица рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы (Рубиско) ряски. По данным денситометрического анализа (Рисунок 84, Б), этот белок составляет 35-38% от всего белка в образцах. Также обильно представлены белки, мигрирующие на уровне около 10 кДа, которые, по-видимому, представляют

собой гистоны ряски. Белки, представленные в этой полосе, составляют 24-26% от всего экстрагируемого белка. Таким образом, на мажорные белки размером около 10 и 48 кДа приходится 59 – 64% от всего белка в изученных образцах.

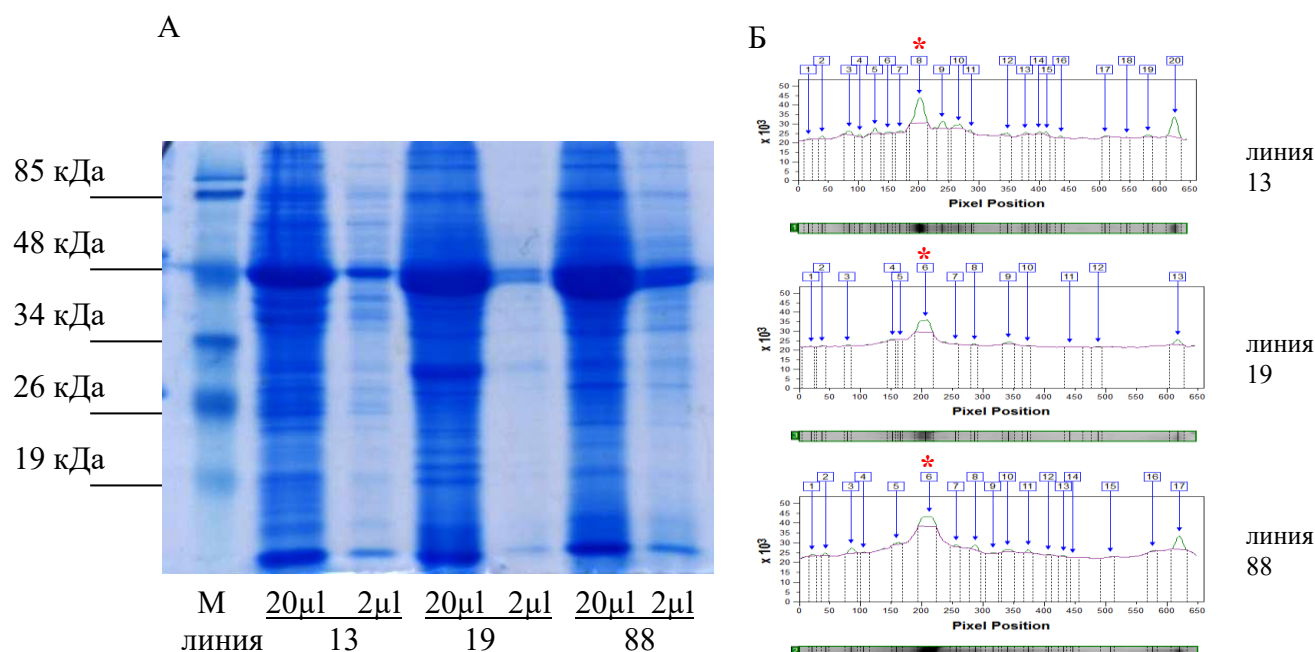


Рисунок 84 - Результаты анализа фракции общего белка ряски, полученной после осаждения сульфатом аммония при концентрации 33-70%. А. Электрофоретический анализ фракции в 10 - 25% ПААГ. Б. Денситометрический анализ фракции. М – маркер молекулярной массы. * - пики, соответствующие молекулярной массе около 48 кДа.

На первом этапе исследований была использована ионно-обменная хроматография на SP-сефарозе. Препараты, полученные после осаждения общего белка ряски сульфатом аммония, были растворены в 20 мл 50 мМ Трис-НСl (рН 7,6) и обессолены на колонке, содержащей Сефадекс G25, уравновешенной 20 мМ ацетата Na (рН 5,35). Полученный препарат был разведён до 50 мл 20 мМ ацетатом Na (рН 5,35) и нанесён на колонку с SP-сефарозой в этот же буфере. Колонка промывалась двумя объёмами 20 мМ ацетата Na (рН 5,35). Элюцию связавшихся с SP-сефарозой белков проводили градиентом NaCl (0-500 мМ в 20 мМ Na-ацетатном буфере, рН 5,35). Фракции элюата, проскок и образцы буфера

после промывки были собраны и проанализированы методами электрофореза в ПААГ и Вестерн блота.

Данные Вестерн блот анализа выявили присутствие рекомбинантного ГКСФ во всех 22 проанализированных хроматографических фракциях, полученных после элюции связавшихся с SP-сефарозой белков. ГКСФ детектировался также в проскоке, среди не связавшихся с SP-сефарозой белков, и в буфере после промывки колонки. Электрофоретический анализ полученных препаратов показал наличие в полученных фракциях значительных количеств примесных белков. Во фракциях детектировались мажорные белки с молекулярной массой 48,0 и 10 кДа, а также другие белки, имеющие молекулярную массу в диапазоне 25 – 40 кДа. Таким образом, хроматография на SP-сефарозе при использованных условиях вела к большим потерям рекомбинантного ГКСФ, полученные препараты были сильно загрязнены растительными белками. Дальнейшие эксперименты с использованием SP-сефарозы не привели к улучшению степени его очистки.

В ходе исследований было показано, что при хроматографии препаратов общего белка ряски на DEAE-сефарозе при pH 6,25 мажорный белок массой около 48 кДа связывался с носителем и при промывке колонки оставался на DEAE-сефарозе. При этом проскок характеризовался незначительным содержанием этого белка, а также уменьшенным содержанием других растительных белков.

Нами был более подробно изучен этот подход (Рисунок 85). Препараты, полученные после осаждения белка ряски сульфатом аммония, были растворены в минимальном объёме 50 мМ Трис-HCl (pH 6,25) и обессолены на колонке, содержащей Сефадекс G25 (колонка была предварительно уравновешена буфером этого же состава). Полученный препарат был разведён до 50 мл 50 мМ Трис-HCl, pH 6,25 и нанесён на колонку с DEAE-сефарозой, уравновешенной этим же буфером. Колонка промывалась двумя объёмами вышеуказанного буфера. Связавшиеся с носителем белки, после промывки колонки, были элюированы

градиентом NaCl (0-500 мМ в 50 мМ Трис-НСl, рН 6,25). Фракции элюата (объёмом 5 мл), а также проскок и образцы буфера после промывки колонки были собраны и проанализированы методами электрофореза в ПААГ и Вестерн блота (Рисунок 85).

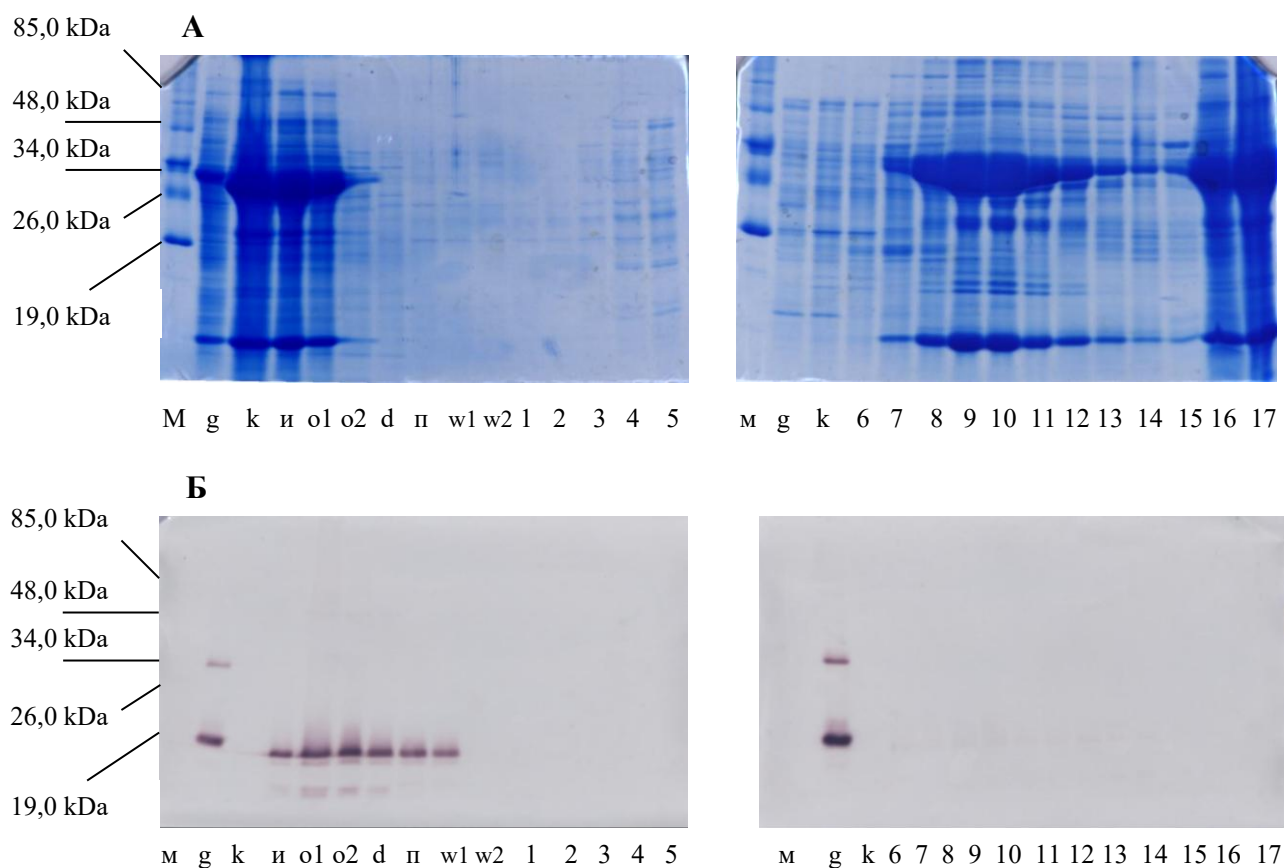


Рисунок 85 - Ионно-обменная хроматография рекомбинантного ГКСФ на DEAE -сефарозе. А. Электрофоретический анализ полученных препаратов в 12-20% градиентном ПААГ. Б. Вестерн блот анализ препаратов. М- маркер молекулярной массы; g- рекомбинантный ГКСФ (50 ng) в 20мкл препарата общего белка нетрансгенной ряски, положительный контроль; k - образец общего белка нетрансгенной ряски, негативный контроль; и - образец общего белка ряски после осаждения сульфатом аммония 33-70% до обессоливания; o1 и o2 - образцы общего белка ряски после осаждения сульфатом аммония и обессоливания на колонке с Сефадексом G25, нанесено 10 и 5 мкл, соответственно; d – образец общего белка ряски перед нанесением на колонку с DEAE-сефарозой (после разведения 50 мМ Трис-НСl, рН 6,25); п – проскок после нанесения образца на колонку; w1 и w2 - образец буфера после промывки колонки одним и двумя объёмами буфера, соответственно. Цифрами 1-17 обозначены фракции, полученные после элюции связавшихся с DEAE -сефарозой белков в 0-500 мМ градиенте NaCl.

Электрофоретический анализ образцов показал, что основная масса растительных белков связывалась с DEAE-сефарозой и задерживалась на колонке (Рисунок 85, А). Мажорные белки массой около 48 и 10 кДа элюировались с колонки градиентом NaCl и детектировались во фракциях 7-17. В проскоке суммарное содержание примесных белков было существенно ниже, чем во фракциях элюата.

Вестерн блот анализ подтвердил присутствие рекомбинантного ГКСФ в проскоке среди не связавшихся с DEAE-сефарозой белков (Рисунок 85, Б). Также ГКСФ детектировался в образце, полученным после промывки колонки одним объёмом буфера; в образце, полученном после промывки колонки вторым объёмом, ГКСФ не детектировался. Слабые полосы, соответствующие ГКСФ, детектировались во фракциях 7-14, полученных после элюции градиентом NaCl связавшихся с DEAE-сефарозой белков. В других фракциях ГКСФ не был детектирован. Во всех образцах рекомбинантный ГКСФ детектировался как одна иммунореактивная полоса, мигрирующая на одном уровне с положительным контролем. Таким образом, в данных условиях (низкая ионная сила, pH 6,25) при ионно-обменной хроматографии на DEAE –сефарозе наблюдалось связывание основной массы растительных белков с носителем, при этом целевой белок с DEAE –сефарозой практически не связывался и оставался в проскоке.

ГКСФ - содержащий препарат проскока, полученный после хроматографии на DEAE-сефарозе, далее анализировался методом эксклюзионной хроматографии на колонке с носителем SepFast GF-HS-M. Препарат был обессолен на колонке с Сефадексом G25, уравновешенной 20 мМ бикарбоната аммония (pH 8,1) и лиофилизирован. Лيوфилизированный образец был растворён в буфере, содержащем 150 мМ NaCl, 20 мМ Трис-HCl, pH 7,6. Колонка SepFast GF-HS-M (11x300 мм) была уравновешена буфером этого же состава, на колонку наносили 0,7 мг общего белка в объёме 100 мкл. В ходе хроматографии собирали фракции объёмом 1 мл, которые далее анализировали

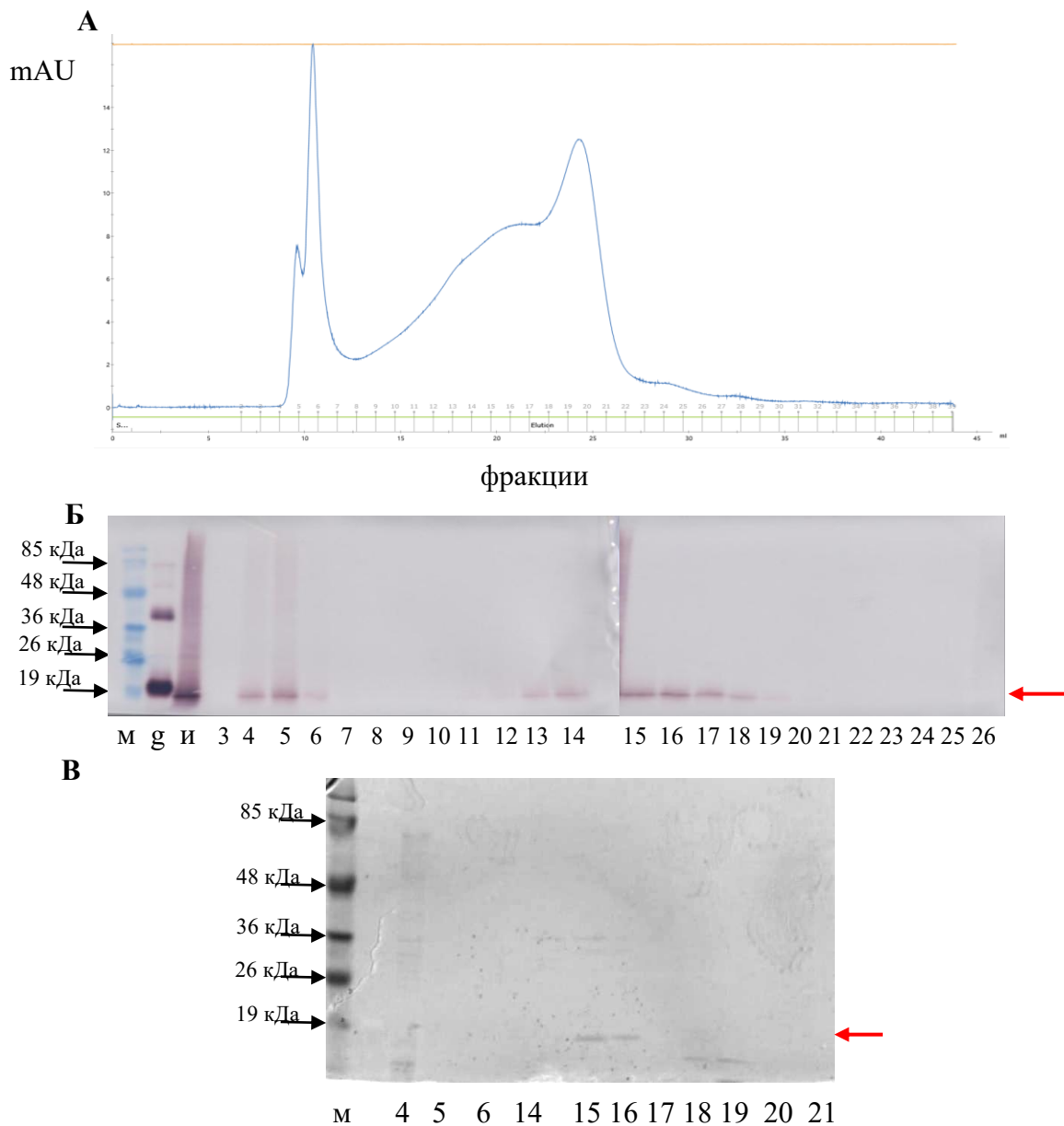


Рисунок 86 - Хроматографический анализ рекомбинантного ГКСФ на колонке с SepFast GF-HS-M. А. Хроматография на SepFast GF-HS-M. Цифрами 1-39 обозначены номера хроматографических фракций. Б. Вестерн блот анализ препаратов. Цифрами 3-26 обозначены хроматографические фракции. В. Электрофоретический анализ полученных препаратов в 5-20% ПААГ. Цифрами обозначены хроматографические фракции. М- маркер молекулярной массы; g- рекомбинантный ГКСФ, 100 ng (AbCam, UK), положительный контроль; и - образец общего белка ряски после осаждения сульфатом аммония 25-70% и обессоливания на колонке с Сефадексом G25. Стрелкой показаны полосы, соответствующие рекомбинантному ГКСФ.

методом электрофореза в ПААГ и Вестерн блота. Хроматограмма и результаты анализа полученных фракций представлены на Рисунке 86.

Вестерн блот анализ подтвердил присутствие рекомбинантного ГКСФ во фракциях 4-5 и 13-18 (Рисунок 86, Б). Слабые полосы, соответствующие ГКСФ, детектировались во фракциях 6, 11-12 и 19-20, в остальных фракциях ГКСФ не детектировался. Во всех фракциях рекомбинантный ГКСФ детектировался как одна иммунореактивная полоса, мигрирующая на уровне, соответствующем положительному контролю.

Препараты фракций 4-6 и 14-21 были сконцентрированы посредством лиофильной сушки и проанализированы в 5-20% ПААГ (Рисунок 86, В). Полосы, соответствующие по молекулярному весу ГКСФ, присутствовали в препаратах фракций 15 и 16, что совпадает с интенсивностью иммунореактивных полос по данным Вестерн блот анализа.

Необходимо отметить присутствие ГКСФ во фракциях 4-6, что соответствует кажущейся молекулярной массе около 70 кДа (исходя из данных калибровки колонки с помощью хроматографических стандартов молекулярной массы). Вместе с тем, методом Вестерн блот анализа ГКСФ в этих фракциях детектируется на уровне около 20 кДа, что соответствует его ожидаемой молекулярной массе. Мы предполагаем, что часть рекомбинантного ГКСФ представлена в виде агрегатов, которые элюируются с колонки во фракциях 4-6 и, затем, при электрофорезе денатурируют до мономеров соответствующей молекулярной массы.

Таким образом, проведённые нами исследования показали перспективность подхода, основанного на хроматографии грубых белковых экстрактов на DEAE-сефарозе при pH равном 6,25, для удаления примесных белков. Полученные данные будут использованы в дальнейших исследованиях по разработке методов выделения и очистки рекомбинантного ГКСФ из растений ряски.

В результате данного этапа исследований нами были получены и изучены трансгенные растения ряски, трансформированные генами гирудина и ГКСФ человека [411,471]. Трансгенные линии экспрессировали как гирудин, так и ГКСФ. Накопление гирудина в растениях варьировало в диапазоне 1,3 – 2,1 мкг/г сырого веса ряски, что является типичным результатом экспериментов по экспрессии пептидов в растениях.

Гирудин в наших экспериментах экспрессировался без слияния с каким-либо белком. Предполагалось, что это позволит упростить последующее выделение рекомбинантного гирудина из растений, так как не будет необходимости в ферментативном расщеплении слитого белка и его дальнейшей очистки от партнёра. Однако полученный уровень экспрессии оказался недостаточным для разработки экспрессионной системы для получения гирудина в растениях ряски. Увеличение накопления гирудина может быть достигнуто путём его экспрессии в составе слитого белка. Основным недостатком этого подхода является необходимость точного и полного отщепления белка-партнёра от целевого белка. Эта проблема может быть решена с использованием различных подходов, в частности, экспрессией гирудина в слиянии с интеином. Возможность экспрессии в растениях различных интеинов и сохранение их функциональных свойств уже подтверждена рядом исследований [478]. Данный подход был успешно использован для получения рекомбинантных аналогов гирудина в *E. coli* и потенциально применим для разработки растительных экспрессионных систем [364].

Рекомбинантный ГКСФ человека накапливался в растениях ряски малой на существенно более высоком уровне – до 70 мкг/г сырой массы ряски. Это выше, чем в большинстве экспериментов с использованием стабильно трансформированных растений, и сопоставимо со многими транзиентными экспрессионными системами. Полученный в наших экспериментах уровень

экспрессии ГКСФ является одним из самых высоких, полученных при экспрессии рекомбинантных белков в трансгенных растениях ряски (Таблица 7). Это обусловлено как использованием оптимизированной для экспрессии в ряске последовательности гена ГКСФ, так и, по-видимому, достаточной устойчивостью ГКСФ к деградации протеиназами растения-хозяина.

В ходе конструирования вектора pBI-GCSF нами была проведена оптимизация нуклеотидной последовательности целевого гена ГКСФ применительно к частотам использования кодонов у растений семейства Рясковые. Также была проведена замена нативного N-концевого сигнального пептида на соответствующий сигнальный пептид α -амилазы риса, однодольного растения. В результате, полученный нами вектор pBI-GCSF был успешно использован для генетической трансформации вольфии бескорневой, другого представителя семейства рясковые. Полученные растения характеризовались стабильной экспрессией гена ГКСФ и его накоплением на высоком уровне [479].

Изучение свойств ГКСФ - содержащих препаратов общего белка ряски показало, что ряска с точки зрения выделения рекомбинантных белков не отличалась существенно от других растений. Основная масса примесей веществ полисахаридной и полифенольной природы удалялась из грубых экстрактов посредством преципитации сульфатом аммония. Как и при экспрессии белков в хлорофилл – содержащих тканях других растений-продуцентов, основной белковой примесью являлся Рубиско, который составлял у ряски 35-40% суммарного белка в образцах. Нами было показано, что при ионно-обменной хроматографии на DEAE-сефарозе при pH 6,25 происходило связывание Рубиско с носителем. В то же время ГКСФ не сорбировался на DEAE-сефарозе и элюировался вместе с несвязавшимися белками. Этот подход будет использован в дальнейших исследованиях по разработке методов выделения и очистки рекомбинантного ГКСФ и других белков из растений ряски.

Таким образом, в результате проведённых экспериментов, нами показана на примере рекомбинантного ГКСФ возможность экспрессии на высоком

уровне гетерологичных белков в растениях ряски. Полученные данные подтверждают перспективность ряски малой как экспрессионной платформы для получения рекомбинантных белков различного назначения [480].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение можно констатировать, что проведённые нами исследования показали возможность экспрессии на высоком уровне в растительных системах рекомбинантных белков различного функционального назначения. Так, после детального исследования особенностей экспрессии сверхсладкого белка тауматина II в гетерологичных растениях были получены линии томатов, накапливающие до 150 мг рекомбинантного тауматина II в 1 кг сырой массы плодов. Это позволяет уже сейчас использовать полученные линии как продуценты этого ценного белка для нужд пищевой и биофармацевтической отраслей промышленности.

В ходе исследований, нами уделялось особое внимание изучению особенностей экспрессии рекомбинантных белков в ряске малой как вида, оптимального для культивирования в биореакторах. В ряске был успешно получен пептид M2e вируса гриппа птиц H5N1, слитый с субъединицей В рицина. Лабораторные испытания на животных подтвердили иммуногенность полученного белка. Рекомбинантный ГКСФ человека, другой белок медицинского назначения, накапливался в растениях ряски на уровне до 70 мг/кг сырой массы, что является наивысшим уровнем, полученным в экспериментах с ядерно-трансформированными растениями. Важно отметить, что растения-продуценты ряски и томата могут культивироваться в замкнутых культивационных системах, что минимизирует риски неконтролируемого распространения рекомбинантной ДНК в окружающей среде.

Нами были изучены особенности экспрессии пептида M2e вируса гриппа птиц H5N1 в стабильно трансформированных растениях. Для усиления иммуногенности M2e в ходе исследований была клонирована из генома клещевины нетоксичная субъединица В рицина и подробно изучены особенности её экспрессии в трансгенных растениях. В результате были получены трансгенные растения ряски, стабильно экспрессирующие слитый белок пептид M2e - субъединица В рицина, в экспериментах на животных подтверждена его способность индуцировать образование специфических антител. Таким образом, на примере ряски малой нами была дополнительно подтверждена перспективность использования растений семейства Рясковые для получения рекомбинантных белков медицинского назначения.

В результате исследований был разработан простой протокол выделения и очистки рекомбинантного тауматина II из плодов томата. Кроме того, нами были изучены некоторые особенности препаратов общего белка ряски, содержащих рекомбинантный ГКСФ. Эти исследования показали принципиальную важность разработки эффективных методов очистки грубых препаратов растительных белков от мажорных белков растения-продуцента и примесей небелковой природы. В этом отношении удобной платформой для биофарминга являются плоды томата, особенно зрелые, по причине относительно невысокого содержания растительных белков. В целом, одним из путей совершенствования растительных систем как экспрессионных платформ для биофарминга, должна быть модификация процессов их вторичного метаболизма в направлении снижения количества примесей небелковой природы, затрудняющих очистку целевых белков. Этого можно добиться использованием методов метаболической инженерии растений, исследования в этом направлении до сих пор практически не проводились.

В ходе исследований нами получены растения – продуценты рекомбинантных белков различного назначения, как терапевтического, так и индустриального. Были изучены различные аспекты функционирования

экспрессионных систем на основе растений томата и ряски малой, продемонстрированы новые возможности их использования в биотехнологии, изучены особенности культивирования и биологии растений-продуцентов. Полученные результаты подтвердили актуальность и важность дальнейших исследований в области разработки растительных экспрессионных систем как для получения новых знаний в области прикладной молекулярной биологии растений, так и для устойчивого развития биотехнологической отрасли и дальнейшего повышения её вклада в удовлетворение различных общественных потребностей.

ВЫВОДЫ

1. Максимальное накопление рекомбинантного тауматина II наблюдается при его экспрессии в препроформе с нативными N- и C- концевыми сигнальными пептидами. Транспорт тауматина II в апопластное пространство ведёт к снижению уровня его накопления; в цитоплазме клетки тауматин II не накапливается. Органом, оптимальным для накопления тауматина II в растениях томата, являются его плоды - накопление тауматина II в плодах в 20-100 раз выше, чем в листьях.

2. Накопление тауматина II в плодах томата достигает 4% от общего растворимого белка. Его накопление не оказывает влияния на агрономические характеристики растений-продуцентов, они полностью соответствуют исходной линии Ялф. Разработан лабораторный протокол выделения рекомбинантного тауматина II, обеспечивающий выход, равный 73,7% и чистоту 93,1%.

3. Органолептические характеристики рекомбинантного тауматина II, полученного в плодах томата, идентичны соответствующим характеристикам тауматина II из *T. daniellii*.

4. Без слияния с белком – партнёром пептид M2e вируса гриппа птиц не накапливается в тканях растения – продуцента; гирудин 2 накапливается на

низком уровне. Пептид M2e стабильно экспрессируется в слиянии с β -глюкуронидазой и с субъединицей В рицина как в растениях табака, так и в растениях ряски малой. Накопление пептида M2e выше при его слиянии с β -глюкуронидазой, чем при слиянии с субъединицей В рицина.

5. Оральная иммунизация мышей препаратами белка трансгенных растений ряски, содержащими слитый белок RTB - M2e, вызывает индукцию специфических к M2e антител на более высоком уровне, чем иммунизация слитым белком M130 - β -глюкуронидаза.

6. Рекombинантный гранулоцитарный колониестимулирующий фактор человека накапливается в тканях растений ряски малой на уровне до 70 мг рекомбинантного GCSF/кг сырой массы продуцента.

Список сокращений и условных обозначений

2,4Д – 2,4-Дихлорфеноксиуксусная кислота

6БАП – 6-Бензиламинопурин

35S CaMV - промотор 35S вируса мозаики цветной капусты (Cauliflower Mosaic Virus)

Cf – Цефотаксим

CP – Белок оболочки вируса (virus coat protein)

GFP – зеленый флуоресцентный белок

Km – Канамицин

MS – Среда Мурасиге-Скуга

PBS – Фосфатно-солевой буфер

PBST – Фосфатно-солевой буфер с Tween 20

ИМК – Индолил-3-масляная кислота

ИУК – β -индолилуксусная кислота

ИФА – Иммуноферментный анализ

ОРБ – Общий растворимый белок

ЭПР - Эндоплазматический ретикулум

СНО - Клетки яичника китайского хомячка (Chinese hamster ovary)

VLP – Вирусо-подобные частицы (Virus-Like Particle)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Walsh G., Walsh E. Biopharmaceutical benchmarks 2022 // *Nature Biotechnology*. 2022. Vol. 40. P. 1722–1760.
2. Kaufman J., Kalaitzandonakes N. The economic potential of plant-made pharmaceuticals in the manufacture of biologic pharmaceuticals // *Journal of Commercial Biotechnology*. 2011. Vol. 17. № 2. P. 173-182.
3. Rader R.A., Langer E.S. Biopharmaceutical manufacturing: historical and future trends in titers, yields, and efficiency in commercial-scale bioprocessing // *BioProcess Journal*. 2015. Vol. 13. № 4. P. 47–54.
4. Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2018 // *Nature Biotechnology*. 2018. Vol. 36. № 12. P. 1136–1145.
5. Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2014 // *Nature Biotechnology*. 2014. Vol. 32. № 10. P. 992-1000.
6. Chiba Y., Suzuki M., Yoshida S. Production of human compatible high mannose-type (Man5GlcNAc2) sugar chains in *Saccharomyces cerevisiae* // *Journal of Biological Chemistry*. 1998. Vol. 273. № 41. P. 26298-263.
7. Bannach, C.; Buck, D.R.; Bobby, G.; Graves, L.P.; Li, S.; Chambers, A.C.; Gan, E.; Arinto-Garcia, R.; Possee, R.D.; King, L.A. Optimizing Recombinant Baculovirus Vector Design for Protein Production in Insect Cells // *Processes*. 2021. Vol. 9. № 12. P. 2118.
8. Kost T.A., Kemp C.W. Fundamentals of Baculovirus Expression and Applications // In: *Advanced Technologies for Protein Complex Production and Characterization*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 896. 2016. Springer, Cham.
9. Tripathi N.K., Shrivastava A. Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2019. Vol. 7. P. 420.

10. Shi X., Jarvis D.L. Protein N-glycosylation in the baculovirus-insect cell system // *Current Drug Targets*. 2007. Vol. 8. № 10. P. 1116-1125.
11. Rendić D., Wilson I. The Glycosylation Capacity of Insect Cells // *Croatica Chemica Acta*. 2008. Vol. 81. № 1. P. 7-21.
12. Wurm F.M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells // *Nature Biotechnology*. 2004. Vol. 22. P. 1393–1398.
13. Demain A.L., Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms // *Biotechnology Advances*. 2009. Vol. 27. № 3. P. 297-306.
14. Maksimenko O.G., Deykin A.V., Khodarovich Yu. M., Georgiev P.G. Use of Transgenic Animals in Biotechnology: Prospects and Problems // *Acta Naturae*. 2013. Vol. 5. № 1. P. 33-46.
15. Wang M., Sun Z., Yu T., Ding F., Li L., Wang X., Fu M., Wang H., Huang J., Li N., Dai Y. Large-scale production of recombinant human lactoferrin from high-expression, marker-free transgenic cloned cows // *Scientific Reports*. 2017. Vol. 7. № 1. P. 10733.
16. Shepelev M.V., Kalinichenko S.V., Deykin A.V., Korobko I.V. Production of Recombinant Proteins in the Milk of Transgenic Animals: Current State and Prospects // *Acta Naturae*. 2018. Vol. 10. № 3. P. 40-47.
17. Rudolph N. Technologies and Economics for Protein Production in Transgenic Animal Milk // *Genetic Engineering and Biotechnology News*. 1997. Vol. 17. № 16. P. 36–37.
18. Houdebine L.-M. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals // *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2009. Vol. 32. P. 107–121.
19. Bösze Z., Baranyi M., Bruce C., Whitelaw A. Producing Recombinant Human Milk Proteins in the Milk of Livestock Species // *In Bioactive Components of Milk*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 606. Springer, New York, NY. 2008. P. 357–395.

20. Paul M., Reljic R., Klein K., Drake P.M.W., van Dolleweerd C., Pabst M., Windwarder M., Arcalis E., Stoger E., Altmann F., Cosgrove C., Bartolf A., Baden S., Ma J.K.-C. Characterization of a plant-produced recombinant human secretory IgA with broad neutralizing activity against HIV // *mAbs*. 2014. Vol. 6. № 6. P. 1585-1597.
21. Viana A.A., Pelegrini. P., Grossi-de-Sá M. Plant biofarming: Novel insights for peptide expression in heterologous systems // *Biopolymers*. 2012. Vol. 98. № 4. P. 416-427.
22. Strasser R. Challenges in O-glycan engineering of plants // *Frontiers in Plant Science*. 2012. Vol. 3. P. 218.
23. Montero-Morales L., Steinkellner H. Advanced plant-based glycan engineering // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2018. Vol. 6. P. 81. 10.3389/fbioe.2018.00081
24. Rup B., Alon S., Amit-Cohen B. C., Brill Almon E., Chertkoff R., Tekoah Y. Immunogenicity of glycans on biotherapeutic drugs produced in plant expression systems -The taliglucerase alfa story // *PLoS One*. 2017. Vol. 12. P. e0186211.
25. Ma J.K., Drake P.M., Christou P. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants // *Nature Reviews Genetic*. 2003 Vol. 4. № 10. P. 794-805.
26. Twyman R.M., Schillberg S., Fischer R. Transgenic plants in the biopharmaceutical market // *Expert Opinion on Emerging Drug*. 2005. Vol. 10. № 1. P. 185-218.
27. Liénard D., Sourrouille C., Gomord V., Faye L. Pharming and transgenic plants // *Biotechnology annual review*. 2007. Vol. 13. P. 115-47.
28. He Z., Du X., Yao W., Dai J. Pharmaceutical proteins produced in plant bioreactor in recent years // *African Journal of Biotechnology*. 2009. Vol. 7. № 25. P. 4917-4925.
29. Yusibov V., Streatfield S.J., Kushnir N. Clinical development of plant-produced recombinant pharmaceuticals: vaccines, antibodies and beyond // *Human Vaccines*. 2011. Vol. 7. № 3. P. 313-321.

30. Paul M., Ma J.K. Plant-made pharmaceuticals: leading products and production platforms // *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2011. Vol. 58. № 1. P. 58-67.
31. Wiktorek-Smagur A., Hnatuszko-Konka K., Gerszberg A., Kowalczyk T., Luchniak P., Kononowicz A.K. Green Way of Biomedicine – How to Force Plants to Produce New Important Proteins // In *Transgenic Plants - Advances and Limitations*. InTechOpen. 2012. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/31145>
32. Juarez P., Viridi V., Depicker A., Orzaez D. Biomanufacturing of protective antibodies and other therapeutics in edible plant tissues for oral applications // *Plant Biotechnology Journal*. 2016. Vol. 14. № 9. P. 1791-9.
33. Rojas-Anaya E., Loza-Rubio E., Olivera-Flores M.T., Gomez-Lim M. Expression of rabies virus G protein in carrots (*Daucus carota*) // *Transgenic Research*. 2009. Vol. 18. № 6. P. 911-919.
34. Loza-Rubio E., Rojas-Anaya E., López J., Olivera-Flores M.T., Gómez-Lim M.A., Tapia-Perez G. Induction of a protective immune response to rabies virus in sheep after oral immunization with transgenic maize, expressing the rabies virus glycoprotein // *Vaccine*. 2012. Vol. 30. № 37. P. 5551–5556.
35. Singh A., Srivastava S., Chouksey A., Panwar B.S., Verma P.C., Roy S., Singh P.K., Saxena G., Tuli R. Expression of rabies glycoprotein and ricin toxin B chain (RGP-RTB) fusion protein in tomato hairy roots: a step towards oral vaccination for rabies // *Molecular Biotechnology*. 2015. Vol. 57. № 4. P. 359-70.
36. Rosales-Mendoza S., Soria-Guerra R.E., Moreno-Fierros L., Martinez-Gonzalez L., Alpuche-Solis A.G., Korban S.S. Expression of an immunogenic F1–V fusion protein in lettuce as a plant-based vaccine against plague // *Planta*. 2010. Vol. 232. P. 409–416.
37. Rosales-Mendoza S., Soria-Guerra R.E., Moreno-Fierros L., Han Y., Alpuche-Solis A.G., Korban S.S. Transgenic carrot tap roots express the immunogenic F1–V fusion protein from *Yersinia pestis* are immunogenic in mice // *Journal of Plant Physiology*. 2011. Vol. 168. № 2. P. 174–180.

38. Legocki A.B., Miedzinska K., Czaplińska M., Płucieniczak A., Wedrychowicz H. Immunoprotective properties of transgenic plants expressing E2 glycoprotein from CSFV and cysteine protease from *Fasciola hepatica* // *Vaccine*. 2005. Vol. 23. № 15. P. 1844-1846.
39. Jung M, Shin YJ, Kim J, Cha SB, Lee WJ, Shin MK, Shin SW, Yang MS, Jang YS, Kwon TH, Yoo HS. Induction of immune responses in mice and pigs by oral administration of classical swine fever virus E2 protein expressed in rice calli // *Archives of Virology*. 2014. Vol. 159. №12. P. 3219-30.
40. Fan Y.L., Li J., Ruan Y., Liu C.L. Study on introduction of avian influenza antigen gene NA into lettuce // *Hunan Agricultural Sciences*. 2012. Vol 05. P. 13-16.
41. Lee G., Na Y.J., Yang B.G., Choi J.P., Seo Y.B., Hong C.P., Yun C.H., Kim D.H., Sohn E.J., Kim J.H., Sung Y.C., Kim Y.K., Jang M.H., Hwang I. Oral immunization of haemagglutinin H5 expressed in plant endoplasmic reticulum with adjuvant saponin protects mice against highly pathogenic avian influenza A virus infection // *Plant Biotechnology. J.* 2015. Vol. 13. № 1. P. 62-72.
42. Nahampun H.N., Bosworth B., Cunnick J., Mogler M., Wang K. Expression of H3N2 nucleoprotein in maize seeds and immunogenicity in mice // *Plant Cell Reports*. 2015. Vol. 34. № 6. P. 969-980.
43. Uvarova E.A., Belavin P.A., Permyakova N.V., Zagorskaya A.A., Nosareva O.V., Kakimzhanova A.A., Deineko E.V. Oral Immunogenicity of plant-made *Mycobacterium tuberculosis* ESAT6 and CFP10 // *BioMed Research International*. 2013. Vol. 2013. P. 316304.
44. Permyakova N.V., Belavin P.A., Pirozhkova D.S., Ufimtseva E.G., Rozov S.M., Mursalimov S.R., Sidorchuk Y.V., Uvarova E.A., Zagorskaya A.A., Marenkova T.V., Bannikova S.V., Demidov E.A., Starostin K.V., Kravchenko M.A., Vakhrusheva D.V., Berdnikov R.B., Ereemeeva N.I., Skornyakov S.N., Peltek S.E., Deineko E.V. The recombinant fusion protein CFP10-ESAT6-dIFN has

- protective effect against tuberculosis in guinea pigs // *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*. 2018. Vol. 65. № 1. P. 39-58.
- 45.Zhang X, Yuan Z, Guo X, Li J, Li Z, Wang Q. Expression of *Chlamydomonas reinhardtii* MOMP heat-labile toxin B subunit fusion gene in transgenic rice // *Biologicals*. 2008. Vol. 36. № 5. P. 296-302.
- 46.Lamphear B.J., Jilka J.M., Kesl L., Welter M., Howard J.A., Streatfield S.J. A corn-based delivery system for animal vaccines: an oral transmissible gastroenteritis virus vaccine boosts lactogenic immunity in swine // *Vaccine*. 2004. Vol. 22. № 19. P. 2420-2424.
- 47.Ghiasi SM, Salmanian AH, Chinikar S, Zakeri S. Mice orally immunized with a transgenic plant expressing the glycoprotein of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus // *Clinical and Vaccine Immunology*. 2011. Vol. 18. № 12. P. 2031-7.
- 48.Wang Y, Deng H, Zhang X, Xiao H, Jiang Y, Song Y, Fang L, Xiao S, Zhen Y, Chen H. Generation and immunogenicity of Japanese encephalitis virus envelope protein expressed in transgenic rice // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009. Vol. 380. № 2. P. 292-297.
- 49.Lee R.W.H., Cornelisse M., Ziauddin A., Slack P.J., Hodgins D.C., Strommer J.N., Shewen P.E., Lo R.Y.C. Expression of a modified *Mannheimia haemolytica* GS60 outer membrane lipoprotein in transgenic alfalfa for the development of an edible vaccine against bovine pneumonic pasteurellosis // *Journal of Biotechnology*. 2008. Vol. 135. № 2. P. 224-231.
- 50.Hahn B.-S., Jeon I.-S., Jung Y.-J., Kim J.-B., Park J.-S., Ha S.-H., et al. Expression of hemagglutinin-neuraminidase protein of Newcastle disease virus in transgenic tobacco // *Plant Biotechnology Reports*. 2007. Vol. 1. № 2. P. 85–92.
- 51.Gómez E., Chimeno Zoth S., Carrillo E., Estela Roux M., Berinstein A. Mucosal immunity induced by orally administered transgenic plants // *Immunobiology*. 2008. Vol. 213. № 8. P. 671-675.
- 52.Lai, K.S., Yusoff, K. and Mahmood, M. Functional ectodomain of the hemagglutinin-neuraminidase protein is expressed in transgenic tobacco cells as a

- candidate vaccine against Newcastle disease virus // *Plant Cell, Tissue Organ Culture*. (PCTOC). 2013. Vol. 112. P. 117–121.
53. Ma F., Zhang E., Li Q., Xu Q., Ou J., Yin H., Li K., Wang L., Zhao X., Niu X., Li X., Zhang S., Wang Y., Deng R., Zhou E., Zhang G. A Plant-Produced Recombinant Fusion Protein-Based Newcastle Disease Subunit Vaccine and Rapid Differential Diagnosis Platform // *Vaccines (Basel)*. 2020. Vol. 8. № 1. P. 122.
54. Shahid N., Samiullah T.R., Shakoor S., Latif A., Yasmeen A., Azam S., Shahid A.A., Husnain T., Rao A.Q. Early Stage Development of a Newcastle Disease Vaccine Candidate in Corn // *Frontiers in Veterinary Science*. 2020. Vol. 7. P. 499.
55. Wang B.-Z., Gill H.S., Kang S.-M., Wang L., Wang Y.-C., Vassilieva E.V., Compans R.W. Enhanced Influenza Virus-Like Particle Vaccines Containing the Extracellular Domain of Matrix Protein 2 and a Toll-Like Receptor Ligand // *Clinical and Vaccine Immunology : CVI*. 2012. Vol. 19. № 8. P. 1119–1125.
56. Rao J., Agrawal P., Rao S.K., Reddy G.R., Joyappa D., Suryanarayana V. Expression of VP1 protein of serotype A and O of foot-and-mouth disease virus in transgenic sunnhemp plants and its immunogenicity for guinea pigs // *Acta virologica*. 2012. Vol. 56. № 2. P. 91-99.
57. Matsui, T., Takita, E., Sato, T., Aizawa, M., Ki, M., Kadoyama, Y., Hirano, K. et al. Production of double repeated B subunit of Shiga toxin 2e at high levels in transgenic lettuce plants as vaccine material for porcine edema disease // *Transgenic Research*. 2011. Vol. 20. № 4. P. 735–748.
58. Rossi L., Di Giancamillo A., Reggi S., Domeneghini C., Baldi A., Sala V., Dell'Orto V., Coddens A., Cox E., Fogher C. Expression of verocytotoxic *Escherichia coli* antigens in tobacco seeds and evaluation of gut immunity after oral administration in mouse model // *Journal of Veterinary Science*. 2013. Vol. 14. № 3. P. 263–270.

59. Huy N.-X., Yang M.-S., Kim T.-G. Expression of a cholera toxin B subunit-neutralizing epitope of the porcine epidemic diarrhea virus fusion gene in transgenic lettuce (*Lactuca sativa* L.) // *Molecular Biotechnology*. 2011. Vol. 48. № 3. P. 201–209.
60. Chia M.-Y., Hsiao S.-H., Chan H.-T., Do Y.-Y., Huang, P.-L., Chang H.-W., Tsai Y.-C., Lin C.M., Pang V.F., Jeng C.R. Immunogenicity of recombinant GP5 protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus expressed in tobacco plant // *Veterinary immunology and immunopathology*. 2010. Vol. 135. № 3-4. P. 234–242.
61. Chan H., Chia M., Pang V.F., Jeng C.R., Do Y.Y., Huang P.L. Oral immunogenicity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antigen expressed in transgenic banana // *Plant Biotechnology. J.* 2013. Vol. 11. № 3. P. 315-324.
62. Mikschofsky H., Schirrmeyer H., Keil G.M., Lange B., Polowick P.L., Keller W., Broer I. Pea-derived vaccines demonstrate high immunogenicity and protection in rabbits against rabbit haemorrhagic disease virus // *Plant Biotechnology. J.* 2009. Vol. 7. № 6. P. 537–549.
63. Kohl T., Hitzeroth I., Stewart D., Varsani A., Govan V., Christensen N., Williamson A.-L. et al. Plant-produced cottontail rabbit papillomavirus L1 protein protects against tumor challenge: a proof-of-concept study // *Clinical and Vaccine Immunology*. 2006. Vol. 13. № 8. P. 845–853.
64. Shi, Y., Habibi, P., Haq, A. N. U., Saeed, M., Gulghutay Amjad, N., & Khan, I. Seed-Based System for Cost-Effective Production of Vaccine Against Chronic Respiratory Disease in Chickens // *Molecular biotechnology*. 2023. Vol. 65. № 4. P. 570–580.
65. Giddings G. Transgenic plants as protein factories // *Current Opinions in Biotechnology*. 2001. Vol. 12. № 5. P. 450–454.
66. Dove A., 2002. Uncorking the biomanufacturing bottleneck // *Nature Biotechnology*. Vol. 20. № 8. P. 777-779.

- 67.Sala,F., Rigano M., Barbante A., Basso B., Walmsley AM., Castiglione S. Vaccine antigen production in transgenic plants: strategies, gene constructs and perspectives // *Vaccine*. 2003. Vol. 21. № 7-8. P. 803-808.
- 68.Spök A., Karner S. Plant Molecular Farming. Opportunities and Challenges // In *JRC Scientific and Technical Reports. IFZ - Inter-University Research Centre for Technology, Work and Cultur, Graz, Austria*. 2008.
- 69.Tusé D., Tu T., McDonald K.A. Manufacturing Economics of Plant-Made Biologics: Case Studies in Therapeutic and Industrial Enzymes // *BioMed Research International*. 2014. Vol. 2014. P. 256135.
- 70.Tschofen M., Knopp D., Hood E., Stöger E. Plant Molecular Farming: Much More than Medicines // *Annual Review of Analytical Chemistry (Palo Alto California)*. 2016. Vol. 9. № 1. P. 271-294.
- 71.Yao J., Weng Y., Dickey A., Wang K.Y. Plants as Factories for Human Pharmaceuticals: Applications and Challenges // *International journal of molecular sciences*. 2015. Vol. 16. № 12. P. 28549–28565.
- 72.Moustafa K, Makhzoum A, Trémouillaux-Guiller J. Molecular farming on rescue of pharma industry for next generations // *Critical Reviews in Biotechnology*. 2016. Vol. 36. № 5. P. 840-850.
- 73.Zahmanova G., Takova K., Valkova R., Toneva V., Minkov I., Andonov A., Lukov G.L. Plant-Derived Recombinant Vaccines against Zoonotic Viruses // *Life (Basel)*. 2022. Vol. 12. № 2. P. 156.
- 74.De Block, M.; Herrera-Estrella, L.; van Montagu, M.; Schell, J., Zambryski, P. Expression of foreign genes in regenerated plants and their progeny // *EMBO Journal*. 1984. Vol. 3. № 8. P. 1681-1689.
- 75.Klein T.M., Harper E.C., Svab Z., Sanford J.C., Fromm,M.E., Maliga,P. Stable genetic transformation of intact *Nicotiana* cells by the particle bombardment process // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 1988. Vol. 85. № 22. P. 8502-8505.

76. Gordon-Kamm W.J., Spencer T.M., Mangano M.L., Adams T.R., Daines R.J., Start W.G., O'Brien J.V., Chambers S.A., Adams Jr.W.R., Willetts N.G., Rice T.B., Mackey C.J., Krueger R.W., Kausch A.P., Lemaux, P.G. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. // *The Plant Cell*. 1990. Vol. 2. № 7. P. 603-618.
77. Barampuram S, Zhang Z.J. Recent advances in plant transformation // *Methods in Molecular Biology*. 2011. Vol. 701. P. 1-35.
78. Sood P., Bhattacharya A., Sood A. Problems and possibilities of monocot transformation // *Biologia Plantarum*. 2011. Vol. 55. № 1. P. 1-15.
79. de Alda J.A.G.O., Esteban R., Diago M.L., Houmard J. The plastid ancestor originated among one of the major cyanobacterial lineages // *Nature Communications*. 2014. Vol. 5. P. 4937.
80. Daniell H, Choun-S.L, Ming Y, Wan- JC. Chloroplast genomes: diversity, evolution, and applications in genetic engineering // *Genome Biology*. 2016. Vol. 17. P. 134.
81. Gould S.B., Waller R.F., McFadden G.I. Plastid evolution // *Annual Review of Plant Biology*. 2008. Vol. 59. P. 491–517.
82. Waheed M.T., Ismail H., Gottschamel J., Mirza B., Lössl A.G.. Plastids: The Green Frontiers for Vaccine Production // *Frontiers in Plant Science*. 2015. Vol. 6. P. 1005.
83. Shchelkunov S.N., Konstantinov Yu.M., Deineko E.V. Transplastome plants // *Russian journal of genetics: applied research*. 2012. Tom 2. № 3. C. 270-276.
84. Adem M., Beyene D., Feyissa T. Recent achievements obtained by chloroplast transformation // *Plant Methods*. 2017. Vol. 13. P.30.
85. Scotti N., Bellucci M., Cardi T. The Chloroplasts as Platform for Recombinant Proteins Production // In: *Translation in Mitochondria and Other Organelles*. Springer, Berlin, Heidelberg. 2013. P. 225-262.

86. Saveleva N.V., Burlakovskiy M.S., Yemelyanov V.V., Lutova L.A. Transgenic plants as bioreactors to produce substances for medical and veterinary uses // *Russian Journal of Genetics: Applied Research*. 2016. Tom 6. № 6. C. 712-724.
87. Castiglia D., Sannino L., Marcolongo L., Ionata E., et al. High-level expression of thermostable cellulolytic enzymes in tobacco transplastomic plants and their use in hydrolysis of an industrially pretreated *Arundo donax* L. biomass // *Biotechnology for Biofuels*. 2016. Vol. 9. P. 154.
88. Daniell H. Transgene containment by maternal inheritance: effective or elusive? // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 2007. Vol. 104. № 17. P. 6879–6880.
89. Ruf S., Karcher D., Bock R. Determining the transgene containment level provided by chloroplast transformation // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 2007. Vol. 104. № 17. P. 6998–7002.
90. Svab Z., Maliga P. Exceptional transmission of plastids and mitochondria from the transplastomic pollen parent and its impact on transgene containment // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 2007. Vol. 104. № 17. P. 7003–7008.
91. Obembe O.O., Popoola J.O., Leelavathi S., Reddy S.V. Advances in plant molecular farming // *Biotechnology Advances*. 2011. Vol. 29. № 2. P. 210–222.
92. Wani S.H., Sah S.K., Sági L., Solymosi K. Transplastomic plants for innovations in agriculture. A review // *Agronomy for Sustainable Development*. 2015. Vol. 35. P. 1391–1430.
93. Bohmert-Tatarev K., McAvoy S., Daughtry S., Peoples O.P., Snell K.D. High levels of bioplastic are produced in fertile transplastomic tobacco plants engineered with a synthetic operon for the production of polyhydroxybutyrate // *Plant Physiology*. 2011. Vol. 155. P. 1690–708.
94. Madanala R., Gupta V., Pandey A.K., Srivastava S., Pandey V., Singh P.K., et al. Tobacco chloroplasts as bioreactors for the production of recombinant superoxide

- dismutase in plants, an industrially useful enzyme // *Plant Molecular Biology Reporter*. 2015. Vol. 33. P. 1107–1115.
95. Espinoza-Sanchez E.A., Alvarez-Hernandez M.H., Torres-Castillo J.A., Rascon-Cruz Q., Gutierrez-Diez A., Zavala-Garcia F., Sinagawa S. Stable expression and characterization of a fungal pectinase and bacterial peroxidase genes in tobacco chloroplast // *Electronic Journal of Biotechnology*. 2016. Vol. 18. № 3. P. 161–168.
96. Komarova T.V., Baschieri S., Donini M., Marusic C., Benvenuto E., Dorokhov Y.L. Transient expression systems for plant-derived biopharmaceuticals // *Expert Review of Vaccines*. 2010. Vol. 9. № 8. P. 859-76.
97. Kapila J., De Rycke R., Van Montagu M., Angenon G.. An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves // *Plant Science*. 1997. Vol. 122. №1. P. 101-108.
98. Chen Q., Lai H., Hurtado J., Stahnke J., Leuzinger K., and Dent. M. Agroinfiltration as an Effective and Scalable Strategy of Gene Delivery for Production of Pharmaceutical Proteins // *Advanced Techniques in Biology and Medicine*. 2013. Vol. 1. № 1. P. 103.
99. Chen Q., Lai H. Gene Delivery into Plant Cells for Recombinant Protein Production. // *BioMed Research International*. 2015. Vol. 2015. P. 932161.
100. Jones H.D., Doherty A., Sparks C.A. Transient transformation of plants // *Methods in Molecular Biology*. 2009. Vol. 513. P. 131–152
101. Lacomme C. Milestones in the Development and Applications of Plant Virus Vector as Gene Silencing Platforms // *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2011. Vol. 375. P. 89-105.
102. Pogue G.P. and Holzberg S. Transient Virus Expression Systems for Recombinant Protein Expression in Dicot- and Monocotyledonous Plants // *In Plant Science*. InTechOpen Ltd, London. 2012.
103. Boivin E.B., Lepage É., Matton D.P., De Crescenzo G., Jolicoeur M. 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 // *Biotechnol. Progress.* 2010. Vol. 26. № 6. P. 1534–1543.
104. Danielson D.C., Pezacki J.P. Studying the RNA silencing pathway with the p19 protein // *FEBS Lett.* 2013. Vol. 587. № 8. P. 1198-1205.
105. Goodin M.M., Zaitlin D., Naidu R.A., Lommel S.A. *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant-pathogen interactions // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2008. Vol. 21. № 8. P. 1015–1026.
106. Hull R., Davies J.W. Genetic Engineering with Plant Viruses, and Their Potential as Vectors // *Advances in Virus Research.* 1983. Vol. 28, P. 1-33.
107. Siegel A. Plant-virus-based vectors for gene transfer may be of considerable use despite a presumed high error frequency during RNA synthesis // *Plant Molecular Biology.* 1985. Vol. 4. № 5. P. 327-329.
108. Gronenborn B. Cauliflower Mosaic Virus: A Plant Gene Vector // *In The Impact of Gene Transfer Techniques in Eukaryotic Cell Biology.* 35. Colloquium der Gesellschaft für Biologische Chemie 12.–14. April 1984 in Mosbach/Baden, vol 35. Springer, Berlin, Heidelberg. 1984. P. 108-118.
109. Weising K., Schell J., Kahl G. Foreign genes in plants: transfer, structure, expression, and applications // *Annu. Rev. Genet.* 1988. Vol. 22. P. 421-477.
110. Ahlquist P., French R., Janda M., Loesch-Fries S. Multicomponent RNA plant virus infection derived from cloned viral cDNA // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1984. Vol. 81. № 22. P. 7066–7070.
111. Grimsley N., Hohn B., Hohn T., Walden R. “Agroinfection,” an alternative route for viral infection of plants by using the Ti plasmid // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1986. Vol. 83. № 10. P. 3282–3286.
112. Turpen T.H., Turpen A.M., Weinzettl N., Kumagai M.H., Dawson W.O. Transfection of whole plants from wounds inoculated with *Agrobacterium tumefaciens* containing cDNA of tobacco mosaic virus // *J. Virol. Methods.* 1993. Vol. 42. № 2-3. P. 227–239.

113. Hefferon K. Plant Virus Expression Vectors: A Powerhouse for Global Health // *Biomedicines*. 2017. Vol. 5. P. 44.
114. Nosaki S, Hoshikawa K, Ezura H, Miura K. Transient protein expression systems in plants and their applications // *Plant Biotechnol (Tokyo)*. 2021. Vol. 38. № 3. P. 297-304.
115. De Muynck B., Navarre C., Boutry M. Production of antibodies in plants: status after twenty years // *Plant biotechnology journal*. 2010. Vol. 8. № 5. P. 529–563.
116. Merlin M., Gecchele E., Capaldi S., Pezzotti M., Avesani L. Comparative Evaluation of Recombinant Protein Production in Different Biofactories: The Green Perspective // *BioMed Research International*. 2014. Vol. 2014, P. 136419.
117. Shahid N., Daniell H. Plant-based oral vaccines against zoonotic and non-zoonotic diseases // *Plant Biotechnology Journal*. 2016. Vol. 14. № 11. P. 2079–2099.
118. Bendandi M., Marillonnet S., Kandzia R., et al. Rapid, high yield production in plants of individualized idiotypic vaccines for non-Hodgkin's lymphoma // *Ann. Oncol.* 2010. Vol. 21. № 12. P. 2420–2427.
119. Franconi R., Di Bonito P., Dibello F. et al. Plant-derived *Human papillomavirus* 16 E7 oncoprotein induces immune response and specific tumor protection // *Cancer Res.* 2002. Vol. 62. № 13. P. 3654–3658.
120. Perea Arango I., Loza Rubio E., Rojas Anaya E., Olivera Flores T., Gonzalez de la Vara L., Gómez Lim M.A. Expression of the rabies virus nucleoprotein in plants at high-levels and evaluation of immune responses in mice // *Plant Cell Rep.* 2008. Vol. 27. № 4. P. 677-85.
121. Alvarez M.L., Pinyerd H.L., Crisantes J.D., Rigano M.M., Pinkhasov J., Walmsley A.M., Mason H.S., Cardineau G.A. Plant-made subunit vaccine against pneumonic and bubonic plague is orally immunogenic in mice // *Vaccine*. 2006. Vol. 24. № 14. P. 2477–2490.

122. Kim T.G., Ruprecht R., Langridge W.H. Synthesis and assembly of a cholera toxin B subunit SHIV 89.6p Tat fusion protein in transgenic potato // *Protein Expr. Pur.* 2004. Vol. 35. №2. P. 313–319.
123. Lentz E.M., Segretin M.E., Morgenfeld M.M., Wirth S.A., Santos M.J.D., Mozgovej M.V., Wigdorovitz A. et al. High expression level of a foot and mouth disease virus epitope in tobacco transplastomic plants // *Planta.* 2010. Vol. 231. № 2. P. 387–395.
124. Arlen P.A., Singleton M., Adamovicz J.J., Ding Y., Davoodi-Semiromi A., Daniell H. Effective plague vaccination via oral delivery of plant cells expressing F1–Vs in chloroplasts // *Infect. Immun.* 2008. Vol. 76. № 8. P. 3640–3650
125. Santi L., Giritch A., Roy C.J., Marillonnet S., Klimyuk V., Gleba Y., Webb R., Arntzen C. J., Mason, H.S. Protection conferred by recombinant *Yersinia pestis* antigens produced by a rapid and highly scalable plant expression system // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2006. Vol. 103. № 4. P. 861–866.
126. Wigdorovitz A., Pérez Filgueira D. M., Robertson N., Carrillo C., Sadir A. M., Morris T. J., Borca M. V. Protection of mice against challenge with *Foot and mouth disease virus* (FMDV) by immunization with foliar extracts from plants infected with recombinant Tobacco mosaic virus expressing the FMDV structural protein // *Virology.* 1999. Vol. 264. № 1. P. 85–91.
127. Gil F., Titarenko E., Terrada E., Arcalis E., Escribano J.M. Successful oral prime-immunization with VP60 from rabbit haemorrhagic disease virus produced in transgenic plants using different fusion strategies. // *Plant Biotechnol.* 2006. J. Vol. 4. № 1. P. 135–143.
128. Massa S., Franconi R., Brandi R., Muller A., Mett V., Yusibov V., Venuti A. Anti-cancer activity of plant-produced HPV16 E7 vaccine // *Vaccine.* 2010. Vol. 25. № 16. P. 3018–3021.
129. Laguia-Becher M., Martin V., Kraemer M., Corigliano M., Yacono M.L., Goldman A. and Clemente M. Effect of codon optimization and subcellular targeting on *Toxoplasma gondii* antigen SAG1 expression in tobacco leaves to

- use in subcutaneous and oral immunization in mice // BMC Biotechnol. 2010. Vol. 10. P. 52.
130. Albarracin R.M., Becher M.L., Farran I., et al. The fusion of *Toxoplasma gondii* SAG1 vaccine candidate to *Leishmania infantum* heat shock protein 83-kDa improves expression levels in tobacco chloroplasts // Biotechnol. J. 2015. Vol. 10. № 5. P. 748–759.
131. Karasev A.V., Foulke S., Wellens C. et al. Plant based HIV-1 vaccine candidate: Tat protein produced in spinach // Vaccine. 2005. Vol. 23. № 15. P. 1875–1880.
132. Mett V., Lyons J., Musiychuk K., Chichester J.A., Brasil T., Couch R., Sherwood R., Palmer G.A., Streatfield S.J., Yusibov V. A plant-produced plague vaccine candidate confers protection to monkeys // Vaccine. 2007. Vol. 25. № 16. P. 3014–3017.
133. Alvarez M.L., Cardineau G.A. Prevention of bubonic and pneumonic plague using plant derived vaccines // Biotechnol. Adv. 2010. Vol. 28. № 1. P.184–196.
134. Wilken L.R., Nikolov Z.L. Downstream processing of transgenic plant systems: protein recovery and purification strategies // In: Molecular Farming in Plants: Recent Advances and Future Prospects. Springer, New York, NY. 2012. P. 217–257.
135. Nandi S., Kwong A.T., Holtz B.R., Erwin R.L., Marcel S., McDonald K.A. Techno-economic analysis of a transient plant-based platform for monoclonal antibody production // MAbs. 2016. Vol. 8. № 8. P. 1456-1466.
136. Chan H.-T., Daniell H. Plant-made oral vaccines against human infectious diseases—Are we there yet? // Plant biotechnology journal. 2015. Vol. 13. № 8. P. 1056-1070.
137. Kumar G. B., Ganapathi T. R., Revathi C. J., Srinivas L., Bapat V. A. (2005). Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic banana plants // Planta. Vol. 222. № 3. P. 484–493.

138. Cabrera-Ponce J. Towards a practical and affordable oral papaya-based vaccine: a crucial tool for Taeniasis cysticercosis control programs // In *Bioprocess Sciences and Technology*. Nova Science Publishers Inc. 2011. P. 325-339.
139. Pniewski T. The Twenty-Year Story of a Plant-Based Vaccine Against Hepatitis B: Stagnation or Promising Prospects? // *International Journal of Molecular Sciences*. 2013. Vol. 14. № 1. P. 1978-1998.
140. Fragoso G., Hernández M., Cervantes-Torres J. et al. Transgenic papaya: a useful platform for oral vaccines // *Planta*. 2017. Vol. 245. № 5. P. 1037-1048.
141. Boothe J., Nykiforuk C., Shen Y., Zaplachinski S., Szarka S., Kuhlman P., Murray E., Morck D., Moloney M.M. Seed-based expression systems for plant molecular farming // *Plant Biotechnol. J.* 2010. Vol. 8. № 5. P. 588-606.
142. Marvier M. Pharmaceutical crops have a mixed outlook in California // *Calif. Agr.* 2007. Vol. 61. № 2. P. 59-66. <https://doi.org/10.3733/ca.v061n02p59>.
143. Geigert J. The Challenge of CMC Regulatory Compliance for Biopharmaceuticals. Springer-Verlag New York. 2013.
144. Appenroth K.J., Sree K.S., Böhm V., Hammann S., Vetter W., Leiterer M., Jahreis G. Nutritional value of duckweeds (*Lemnaceae*) as human food // *Food Chem.* 2017. Vol. 217. P. 266-273.
145. Soda S., Ohchi T., Piradee J., Takai Y., Ike M. Duckweed biomass as a renewable biorefinery feedstock: Ethanol and succinate production from *Wolffia globosa* // *Biomass and Bioenergy*. 2015. Vol. 81. P. 364-368.
146. Landolt E. Physiologische und ökologische Untersuchungen an *Lemnaceen* // *Ber. Schweiz. Bot. Ges.* 1957. Vol. 67. P. 271-410.
147. Chang S.M., Yang C.C., Sung S.C. The cultivation and the nutritional value of *Lemnaceae* // *Bull. Inst. Chem., Acad. Sin.* 1977. Vol. 24. P. 19-30.
148. Gasdaska J.R., Spenser D., Dickey L. Advantages of therapeutic protein production in the aquatic plant *Lemna* // *BioProcessing Journal*. 2003. Vol. 2. № 2. P. 49-56.

149. Everett K.M., Dickey L., Parsons J., Loranger R., and Wingate V. Development of a plant-made pharmaceutical production platform // *Bioprocess Int.* 2012. Vol. 10. № 1. P. 16–25.
150. van Hoeck A., Horemans N., Monsieurs P., Cao H.X., Vandenhove H., Blust R. The first draft genome of the aquatic model plant *Lemna minor* opens the route for future stress physiology research and biotechnological applications // *Biotechnology for Biofuels.* 2015. Vol. 8. P. 188.
151. Wang W., Haberer G., Gundlach H. et al. The *Spirodela polyrhiza* genome reveals insights into its neotenus reduction fast growth and aquatic lifestyle // *Nature Communications.* 2014. Vol. 5. P. 3311.
152. Michael T.P., Bryant D., Gutierrez R., Borisjuk N., Chu P., Zhang H., Xia J., Zhou J., Peng H., El Baidouri M., Ten Hallers B., Hastie A.R., Liang T., Acosta K., Gilbert S., McEntee C., Jackson S.A., Mockler T.C., Zhang W., Lam E. Comprehensive definition of genome features in *Spirodela polyrhiza* by high-depth physical mapping and short-read DNA sequencing strategies // *Plant Journal.* 2017. Vol. 89. № 3. P. 617-635.
153. Moon H.K., Stomp A.M. Effects of medium components and light on callus induction, growth and frond regeneration in *Lemna gibba* (duckweed) // *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant.* 1997. Vol. 33. P. 20-25.
154. Frick H. Callogenesis and carbohydrate utilization in *Lemna minor* // *Journal of Plant Physiology.* 1991. Vol.137. № 4. P. 397-401.
155. Yamamoto Y.T., Rajbhandary N., Lin X., Bergman B.A., Nishimura Y., Stomp A.M. Genetic transformation of duckweed *Lemna gibba* and *Lemna minor* // *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant.* 2001. Vol. 37. P. 349-353.
156. Li J., Jain M., Vunsh R. et al. Callus induction and regeneration in *Spirodela* and *Lemna* // *Plant Cell Reports.* 2004. Vol. 22. № 7. P. 457–464.

157. Гайдукова С.Е., Ракитин А.Л., Равин Н.В., et al: Разработка системы генетической трансформации ряски малой *Lemna minor* // Экологическая генетика. 2008. Т. 6. № 4. С. 20–28.
158. Chhabra G., Chaudhary D., Sainger M., Jaiwal P.K. Genetic transformation of Indian isolate of *Lemna minor* mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and recovery of transgenic plants // Physiology and Molecular Biology of Plants. 2011. Vol. 17. № 2. P. 129–136.
159. Cantó-Pastor A., Mollá-Morales A., Ernst E., et al. Efficient transformation and artificial miRNA gene silencing in *Lemna minor* // Plant biology (Stuttgart, Germany). 2015. Vol. 17. № Suppl 1(0 1). P. 59-65.
160. Dickey L., Gasdaska J., Cox K. Expression of biologically active polypeptides in duckweed: Patent 8022270 USA; application 2003-09-30; publication 2006-08-31, <https://patents.google.com/patent/US8022270B2/en>
161. Dickey L.F., Gasdaska J.R., Cox K.M., Peele C.G., Spencer D. Expression of monoclonal antibodies in duckweed: Patent 7632983 USA; application 2004-03-05, publication 2004-12-23, <https://patents.google.com/patent/US7632983B2/en>
162. Ko S.-M., Sun H.-J., Oh M.J., Song, I.-J., Kim, M.-J., Sin, H.-S., et al. Expression of the protective antigen for PEDV in transgenic duckweed *Lemna minor* // Horticulture, Environment, and Biotechnology. 2011. Vol. 52. № 5. P. 511–515.
163. Peterson A.A., Vasylenko M.Y., Matvieieva N.A., Kuchuk M.V. Accumulation of recombinant fusion protein – secretory analog of Ag85B and ESAT6 Mycobacterium tuberculosis proteins – in transgenic *Lemna minor* L. plants // Biotechnologia Acta. 2015. Vol. 8. № 5. P. 39–48.
164. Bertran K., Thomas C., Guo X., Bublot M., Pritchard N., Regan J.T., Cox K.M., Gasdaska J.R., Dickey L.F., Kapczynski D.R., Swayne D.E. Expression of H5 hemagglutinin vaccine antigen in common duckweed (*Lemna minor*) protects

- against H5N1 high pathogenicity avian influenza virus challenge in immunized chickens // 2015. *Vaccine*. Vol. 33. № 30. P. 3456–3462.
165. Sun Y., Cheng J.J., Himmel M.E., Skory C.D., Adney W.S., Thomas S.R., et al. Expression and characterization of *Acidothamus cellulolyticus* E1 endoglucanase in transgenic duckweed *Lemna minor* 8627 // *Bioresource Technology*. 2007. Vol. 98. № 15. P. 2866–2872.
166. Ghosh M., Sharma N., Gera M., Kim N., Huynh D., Zhang J., Min T., Singh S.S., Kim M.B., Rekha V.P.B., Ko S., Jeong D.K. Insights into phytase-containing transgenic *Lemna minor* (L.) as a novel feed additive // *Transgenic Research*. 2018. Vol. 27. № 2. P. 211-224.
167. Rival S., Wisniewski J.P., Langlais A., et al. Spirodela (duckweed) as an alternative production system for pharmaceuticals: a case study, aprotinin // *Transgenic Research*. 2008. Vol. 17. № 4. P. 503–513.
168. Thu P., Huong P., Tien V., Ham L., Khanh, T. Regeneration and Transformation of Gene Encoding the Hemagglutinin Antigen of the H5N1 Virus in Frond of Duckweed (*Spirodela polyrhiza* L.) // *Journal of Agricultural Studies*. 2015. Vol. 3. № 1. P. 48-59.
169. Cox K.M., Sterling J.D., Regan J.T., Gasdaska J.R., Frantz K.K., Peele C.G., et al. Glycan optimization of a human monoclonal antibody in the aquatic plant *Lemna minor* // *Nature Biotechnology*. 2006. Vol. 24. P. 1591–7.
170. Woodard S.L., Wilken L.R., Barros G.O., White S.G., Nikolov Z.L. Evaluation of monoclonal antibody and phenolic extraction from transgenic *Lemna* for purification process development // *Biotechnology and Bioengineering*. 2009. Vol. 104. № 3. P. 562-571.
171. Barros G., Woodard S., Nikolov Z. Phenolics Removal from Transgenic *Lemna minor* Extracts Expressing mAb and Impact on mAb Production Cost // *Biotechnology progress*. 2011. Vol. 27. № 2. P. 410-418.

172. Sato S., Tabata S., Hirakawa H. et al. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. The Tomato Genome Consortium // Nature. 2012. Vol. 485. P. 635–641.
173. Kudo T., Kobayashi M., Terashima S., Katayama M., Ozaki S., Kanno M., Saito M., Yokoyama K., Ohyanagi H., Aoki K., Kubo Y., Yano K. TOMATOMICS: A Web Database for Integrated Omics Information in Tomato // Plant and Cell Physiology. 2017. Vol. 58. № 1. P. e8.
174. McCormick S., Niedermeyer J., Fry J., Barnason A., Horsch R., Fraley R. Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens* // Plant Cell Reports. 1986. Vol. 5. № 2. P. 81–84.
175. Martineau B. First fruit: the creation of the Flavr Savr tomato and the birth of genetically engineered food. McGraw-Hill, New York. 2001.
176. Hamamoto H., Sugiyama Y., Nakagawa N., Hashida E., Matsunaga Y., Takemoto S., Watanabe Y., Okada Y. A new tobacco mosaic virus vector and its use for the systemic production of angiotensin-I-converting enzyme inhibitor in transgenic tobacco and tomato // Biotechnology (N Y). 1993. Vol. 11. № 8. P. 930-2.
177. McGarvey P.B., Hammond J., Dienelt M.M., Hooper D.C., Fu Z.F., Dietzschold B., Koprowski H., Michaels F.H. Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes // Biotechnology (N Y). 1995. Vol. 13. № 13. P. 1484-1487.
178. Jani D., Meena L.S., Rizwan-ul-Haq Q.M., Singh Y., Sharma A.K., Tyagi A.K. Expression of cholera toxin B subunit in transgenic tomato plants // Transgenic Research. 2002. Vol.11. № 5. P. 447–454.
179. Sharma M.K., Singh N.K., Jani D., Sisodia R., Thungapathra M., Gautam J.K., Meena L.S., Singh Y., Ghosh A., Tyagi A.K., Sharma A.K. Expression of toxin co-regulated pilus subunit A (TCPA) of *Vibrio cholerae* and its immunogenic epitopes fused to cholera toxin B subunit in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum*) // Plant Cell Rep. 2008. Vol. 27. № 2. P. 307–318.

180. Jang X., He Z., Peng Z., Qi Y., Chen Q., Yu S. Cholera toxin B protein in transgenic tomato fruit induces systemic immune response in mice // *Transgenic Research*. 2007. Vol. 16. № 2. P. 169–175.
181. Sharma M.K., Jani D., Thungapathra M., Gautam J.K., Meena L.S., Singh Y., Ghosh A., Tyagi A.K., Sharma A.K. Expression of accessory colonization factor subunit A (ACFA) of *Vibrio cholerae* and ACFA fused to cholera toxin B subunit in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum*) // *Journal of Biotechnology*. 2008. Vol. 135. № 1. P. 22–27.
182. Cueno M.E., Hibi Y., Karamatsu K., Yasutomi Y., Imai K., Laurena A.C., Okamoto T. Preferential expression and immunogenicity of HIV-1 Tat fusion protein expressed in tomato plant // *Transgenic Research*. 2010. Vol. 19. № 5. P. 889–895.
183. Ramírez Y.J., Tasciotti E., Gutierrez-Ortega A., Donayre Torres A.J., Olivera Flores M.T., Giacca M., Gómez Lim M.A. Fruit-specific expression of the human immunodeficiency virus type 1 tat gene in tomato plants and its immunogenic potential in mice // *Clinical and Vaccine Immunology*. 2007. Vol. 14. № 6. P. 685–692.
184. Lou X., Yao Q., Zhang Z., Peng R., Xiong A., Wang H. Expression of the human hepatitis B virus large surface antigen gene in transgenic tomato plants // *Clinical and Vaccine Immunology*. 2007. Vol. 14. № 4. P. 464–469.
185. Guan Z.-J., Guo B., Hao H.-Y., Huo Y.-L., Dai J.-K., Wei Y.-H. Expression of hepatitis B surface antigen (HBsAg) gene in transgenic cherry tomato // *African Journal of Biotechnology*. 2012. Vol. 11. № 28. P. 7186-7192.
186. Soria-Guerra R.E., Rosales-Mendoza S., Moreno-Fierros L., López-Revilla R., Alpuche-Solís A.G. Oral immunogenicity of tomato derived sDPT polypeptide containing *Corynebacterium diphtheriae*, *Bordetella pertussis* and *Clostridium tetani* exotoxin epitopes // *Plant Cell Reports*. 2011. Vol. 30. № 3. P. 417–424.

187. Paz de la Rosa G., Monroy-Garcia A., Mora-Garcia M.L., Peña C.G.R., Hernández-Montes J., Weiss-Steider B., Gómez Lim A.M. An HPV 16 L1-based chimeric human papilloma virus-like particles containing a string of epitopes produced in plants is able to elicit humoral and cytotoxic T-cell activity in mice // *Virology Journal*. 2009. Vol. 6. P. 2.
188. Pan L., Zhang Y., Wang Y., Wang B., Wang W., Fang Y., Jiang S., Lv J., Wang W., Sun Y. Foliar extracts from transgenic tomato plants expressing the structural polyprotein, P1-2A, and protease, 3C, from foot-and-mouth disease virus elicit a protective response in guinea pigs // *Veterinary immunology and immunopathology*. 2008. Vol. 121. № 1-2. P. 83–90.
189. Zhang X., Buehner N. A., Hutson A. M., Estes M. K. and Mason H. S. Tomato is a highly effective vehicle for expression and oral immunization with Norwalk virus capsid protein // *Plant Biotechnology Journal*. 2006. Vol. 4. № 4. P. 419–432.
190. Chen H.-F., Chang M.-H., Chiang B.-L., Jeng S.-T. Oral immunization of mice using transgenic tomato fruit expressing VP1 protein from enterovirus 71 // *Vaccine*. 2006. Vol. 24. № 15. P. 2944–2951.
191. Chung H.Y., Park J.-H., Lee H. H., Il Kim K., Chung H.Y., Sunter G., Kim J.-B., Kim W., Sik Chung I. Expression of a functional recombinant chimeric protein of human hepatitis A virus VP1 and an Fc antibody fragment in transgenic tomato plants // *Plant Biotechnology Reports*. 2014. Vol. 8. P. 243–249.
192. Zhou F., Badillo-Corona J.A., Karcher D., Gonzalez-Rabade N., Piepenburg K., Borchers A.M., Maloney A.P., Kavanagh T.A., Gray J.C., Bock R. High-level expression of human immunodeficiency virus antigens from the tobacco and tomato plastid genomes // *Plant Biotechnology Journal*. 2008. Vol. 6. № 9. P. 897–913.

193. Youm J.W., Jeon J.H., Kim H., Kim Y.H., Ko K., Joung H., Kim H. Transgenic tomatoes expressing human β -amyloid for use as a vaccine against Alzheimer's disease // *Biotechnology Letters*. 2008. Vol. 30. P. 1839–1845.
194. Agarwal S., Singh R., Sanyal I., Amla D.V. Expression of modified gene encoding functional human α -1-antitrypsin protein in transgenic tomato plants // *Transgenic Research*. 2008. Vol. 17. № 5. P. 881–896.
195. Zhi Q., Wang S., Zhang F., Li Q., Li S., Sun M. Transgenic mini-tomato and protection against alcohol-induced gastric injury // *Journal of Genetics and Genomics*. 2007. Vol. 34. № 8. P. 756–763.
196. Kim H.H., Youm J.W., Moon K.B., Ha J.H., Joung H., Jeon J.H. Expression analysis of human β -secretase in transgenic tomato fruits // *Protein Expression and Purification*. 2012. Vol. 82. №1. P. 125–131.
197. Jha S., Agarwal S., Sanyal I., Jain G.K., Amla D.V. Differential subcellular targeting of recombinant human α 1-proteinase inhibitor influences yield, biological activity and *in planta* stability of the protein in transgenic tomato plants // *Plant Science*. 2012. Vol. 196. P. 53–66.
198. Juarez P., Presa S., Espi J., Pineda B., Anton M.T., Moreno V., Buesa J., Granell A., Orzaez D. Neutralizing antibodies against rotavirus produced in transgenically labelled purple tomatoes // *Plant Biotechnology Journal*. 2012. Vol. 10. № 3. P. 341–352.
199. Kantor M., Sestras R., Chowdhury K. Transgenic tomato plants expressing the antigen gene PfCP-2.9 of *Plasmodium falciparum* // *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 2013. Vol. 48. №1. P. 73-79.
200. Hirai T., Fukukawa G., Kakuta H., Fukuda N., and Ezura H. Production of Recombinant Miraculin Using Transgenic Tomatoes in a Closed Cultivation System // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010. Vol. 58. № 10. P. 6096–6101.

201. Yano M., Hirai T., Kato K., Hiwasa-Tanase K., Fukuda N., Ezura H. Tomato is a suitable material for producing recombinant miraculin protein in genetically stable manner // *Plant Science*. 2010. Vol. 178. № 5. P. 469-473.
202. Hiwasa-Tanase K., Nyarubona M., Hirai T., Kato K., Ichikawa T., Ezura H. High-level accumulation of recombinant miraculin protein in transgenic tomatoes expressing a synthetic miraculin gene with optimized codon usage terminated by the native miraculin terminator // *Plant Cell Reports*. 2011. Vol. 30. № 1. P. 113–124
203. Koul B., Srivastava S., Sanyal I., Tripathi B., Sharma V., Vijay D. Transgenic tomato line expressing modified *Bacillus thuringiensis* cry1Ab gene showing complete resistance to two lepidopteran pests // *SpringerPlus*. 2014. Vol. 3. P. 84.
204. Deikman J., Kline R., Fischer R.L. Organization of Ripening and Ethylene Regulatory Regions in a Fruit-Specific Promoter from Tomato (*Lycopersicon esculentum*) // *Plant Physiology*. 1992. Vol. 100. № 4. P. 2013-2017
205. Lim C.J., Lee H.Y., Kim W.B., Lee B.-S., Kim J., Ahmad R., Kim H.A., Yi S.Y., Hur C.-G., Kwon S.-Y. Screening of Tissue-Specific Genes and Promoters in Tomato by Comparing Genome Wide Expression Profiles of Arabidopsis Orthologues // *Molecules and Cells*. 2012. Vol. 34. № 1. P. 53-60.
206. Timerbaev V., Pushin A., Dolgov S. Production of marker-free tomato plants expressing the supersweet protein thaumatin II gene under the control of predominantly fruit-specific promoters // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2019. Vol. 139. P. 621–634.
207. Holtz B.R., Berquist B.R., Bennett L.D., Kommineni V.J., Munigunti R.K., White E.L., Wilkerson D.C., Wong K.Y., Ly L.H., Marcel S. Commercial-scale biotherapeutics manufacturing facility for plant-made pharmaceuticals // *Plant biotechnology journal*. 2015. Vol. 13. № 8. P. 1180–1190.
208. Erwin R. Plant-based Protein Expression for Rapid, Green Bioprocessing // *Pharma's almanac*. 2019. May 24, 2019. PAP-Q2-2019-CL-022.

<https://www.pharmasalmanac.com/articles/plant-based-protein-expression-for-rapid-green-bioprocessing>

209. Kozai T. (2005). Closed Systems with Lamps for High Quality Transplant Production at Low Costs Using Minimum Resources // In: Kozai T., Afreen F., Zobayed S. (eds) Photoautotrophic (sugar-free medium) Micropropagation as a New Micropropagation and Transplant Production System. Springer, Dordrecht, Germany.
210. Farran I., Río-Manterola F., Íñiguez M., Gárate S., Prieto J., Mingo-Castel A.M. High-density seedling expression system for the production of bioactive human cardiotrophin-1, a potential therapeutic cytokine, in transgenic tobacco chloroplasts // *Plant Biotechnology Journal*. 2008. Vol. 6. № 5. P. 516–527.
211. Magnusdottir A., Vidarsson H., Björnsson J.M., Örvar B.L. Barley grains for the production of endotoxin-free growth factors. // *Trends in Biotechnology*. 2013. Vol. 31. № 10. P. 572–580.
212. Wilson S.A., Roberts S.C. Recent advances towards development and commercialization of plant cell culture processes for the synthesis of biomolecules // *Plant Biotechnology Journal*. 2012. Vol. 10. № 3. P. 249–268.
213. Schillberg S., Raven N., Spiegel H., Rasche S., Buntru M. Critical Analysis of the Commercial Potential of Plants for the Production of Recombinant Proteins // *Frontiers in Plant Science*. 2019. Vol. 10. P. 720.
214. Buyel J.F., Twyman R.M., Fischer R. Very-large-scale production of antibodies in plants: The biologization of manufacturing // *Biotechnology Advances*. 2017. Vol. 35. № 4. P.458-465.
215. Santos R.B., Abranches R., Fischer R., Sack M., Holland T. Putting the Spotlight Back on Plant Suspension Cultures // *Frontiers in Plant Science*. 2016. Vol. 7. P. 297.
216. Zagorskaya A.A., Deineko E.V. Suspension-Cultured Plant Cells as a Platform for Obtaining Recombinant Proteins // *Russian Journal of Plant Physiology*. 2017. Vol. 64. №. 6. P. 795–807.

217. Moon K.-B., Park J.-S., Park Y.-I., Song I.-J., Lee H.-J., Cho H.S., Jeon J.-H., Kim H.-S. Development of Systems for the Production of Plant-Derived Biopharmaceuticals // *Plants*. 2020. Vol. 9. № 1. P. 30.
218. Karki U., Fang H., Guo W., Unnold-Cofre C., Xu J. Cellular engineering of plant cells for improved therapeutic protein production // *Plant Cell Reports*. 2021. Vol. 40. P. 1087–1099.
219. Dhiman N., Patial V., Bhattacharya A. The Current Status and Future Applications of Hairy Root Cultures // In *Biotechnological Approaches for Medicinal and Aromatic Plants*. Springer, Singapore. 2018. P. 87-155.
220. Pham N.B., Schäfer H., Wink M. Production and secretion of recombinant thaumatin in tobacco hairy root cultures // *Biotechnology Journal*. 2012. Vol. 7. № 4. P. 537-545.
221. Martínez C.A., Petruccelli S., Giulietti A.M., Alvarez M. Expression of the antibody 14D9 in *Nicotiana tabacum* hairy roots // *Electronic Journal of Biotechnology*. 2005. Vol. 8. № 2. P. 170-176.
222. Alvarez M.A., Alvarez M.A. The Antibody 14D9 as an experimental model for molecular farming // In *Plant Biotechnology for Health*. Springer International Publishing, Cham. 2014. P. 111–131.
223. Chilton M.D., Tepfer D.A., Petit A., David C., Casse Delbart F., and Tempé J. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells // *Nature*. 1982. Vol. 295. P. 432–434.
224. Singh B., Sharma R.A. Hairy Root Culture // In *Secondary Metabolites of Medicinal Plants - Ethnopharmacological Properties, Biological Activity and Production Strategies*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Germany. 2020. P. 1413-1433.
225. Gutierrez-Valdes N., Häkkinen S.T., Lemasson C., Guillet M., Oksman-Caldentey K.-M., Ritala A., Cardon F. Hairy Root Cultures - A Versatile Tool With Multiple Applications // *Frontiers in Plant Science*. 2020. Vol. 11. P. 33.
226. Cui W., Cheng J.J. Growing duckweed for biofuel production: a review // *Plant Biology*. 2015. Vol. 17 Suppl 1. P. 16-23.

227. Cheng J.J., Stomp A.-M. Growing Duckweed to Recover Nutrients from Wastewaters and for Production of Fuel Ethanol and Animal Feed // *Clean - Soil, Air, Water*. 2009. Vol. 37. № 1. P. 17–26.
228. Xiao Y., Fang Y., Jin Y., Zhang G., Zhao H. Culturing duckweed in the field for starch accumulation // *Industrial Crops and Products*. 2013. Vol. 48. P. 183-190.
229. Khvatkov P.A., Chernobrovkina M.A., Sinyov V.V., and Dolgov S.V. Study on conditions for *Wolffia arrhiza* (L.) Horkel ex Wimm submerged culturing in a modified bioreactor // *Biotechnology in Russia*. 2013. № 6. P. 51-56.
230. Buyel J.F., Fischer R. Predictive models for transient protein expression in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) can optimize process time, yield, and downstream costs // *Biotechnology and Bioengineering*. 2012. Vol. 109. № 10. P.2575–2588.
231. Buyel J.F., Fischer R. A juice extractor can simplify the downstream processing of plant-derived biopharmaceutical proteins compared to blade-based homogenizers // *Process Biochemistry*. 2014. Vol. 50. № 5. P. 859–866.
232. Streatfield S.J. Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants // *Plant Biotechnology Journal*. 2007. Vol. 5. № 1. P. 2-15.
233. Desai P.N., Shrivastava N., Padh H. Production of heterologous proteins in plants: strategies for optimal expression // *Biotechnology Advances*. 2010. Vol. 28. № 4. P. 427-35.
234. Woodard S.L., Mayor J.M., Bailey M.R., Barker D.K., Love R.T., Lane J.R., Delaney D.E., McComas-Wagner J.M., Mallubhotla H.D., Hood E.E., Dangott L.J., Tichy S.E., Howard J.A. Maize (*Zea mays*)-derived bovine trypsin: characterization of the first large-scale, commercial protein product from transgenic plants // *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2003. Vol. 38. № Pt 2. P. 123-130.

235. Devaiah S.P., Requesens D.V., Chang Y.-K., Hood K.R., Flory A., Howard J.A., Hood E.E. Heterologous expression of cellobiohydrolase II (Cel6A) in maize endosperm // *Transgenic Research*. 2013. Vol. 22. № 3. P. 477–488.
236. Sugita K., Endo-Kasahara S., Tada Y., Lijun Y., Yasuda H., Hayashi Y., Jomori T., Ebinuma H., Takaiwa F. Genetically modified rice seeds accumulating GLP-1 analogue stimulate insulin secretion from a mouse pancreatic betacell line // *FEBS Letters*. 2005. Vol. 579. № 5. P. 1085–1088.
237. Sardana R., Dudani A.K., Tackaberry E., Alli Z., Porter S., Rowlandson K., Ganz P., Altosaar I. Biologically active human GM-CSF produced in the seeds of transgenic rice plants // *Transgenic Research*. 2007. Vol. 16. № 6. P. 713-21.
238. Xie T., Qiu Q., Zhang W., Ning T., Yang W., Zheng C., Wang C., Zhu Y., Yang D. A biologically active rhIGF-1 fusion accumulated in transgenic rice seeds can reduce blood glucose in diabetic mice via oral delivery // *Peptides*. 2008. Vol. 29. № 11. P.1862–1870.
239. Mackenzie A., Pridham J.B., Saunders N.A. Changes in the sweet proteins (Thaumatin) in *Thaumatococcus danielli* fruits during development // *Phytochemistry*. 1985. Vol. 24. № 11. P. 2503-2506.
240. Yeboa S.O., Hilgerand T.H., Kroschel J. *Thaumatococcus danielli* (Benn.) Benth: A natural sweetener from the rain forest zone in west africa with potential for income generation in small scale farming // In *Proceedings of International Research on Food Security, National Resource Management and Rural Development*. Georg-August-Universitat, Gottingen. 2003.
241. Waliszewski W.S., Oppong S., Hall J.B., Sinclair F.L. Implications of local knowledge of the ecology of a wild super sweetener for its domestication and commercialization in West and Central Africa // *Economic Botany*. 2005. Vol. 59. P. 231-243.
242. Bonn  hin L. Economic value and role of NTFP in the long term management of forests resources in the Cote d' Ivoire // In *Non-Timber Forest*

- Products values, use and management issues in Africa including examples from Latin America. IUCN, The World Convention Union, Nairobi. 1997. P. 68-69.
243. van der Wel H., Loeve K. Isolation and characterization of thaumatin I and II, the sweet-tasting proteins from *Thaumatococcus daniellii* Benth // European journal of biochemistry. 1972. Vol. 31. № 2. P. 221-225.
244. Edens L., Heslinga L., Klok R., Ledebøer A.M., Maat J., Toonen M.Y., Visser C., Verrips C.T. Cloning of cDNA encoding the sweet-tasting plant protein thaumatin and its expression in *Escherichia coli* // Gene. 1982. Vol. 18. № 1. P. 1-12.
245. Iyengar R.B., Smits P., van der Ouderaa F., van der Wel H., van Brouwershaven J., Ravestein P., Richters G., van Wassenaar P.D. The complete amino-acid sequence of the sweet protein Thaumatin I // European journal of biochemistry. 1979. Vol. 96. 1. P. 193-204.
246. Ide N., Kaneko R., Wada R., Mehta A., Tamaki S., Tsuruta T., Fujita Y., Masuda T., Kitabatake N. Cloning of the Thaumatin I cDNA and characterization of recombinant Thaumatin I secreted by *Pichia pastoris* // Biotechnology Progress. 2007. Vol. 23. 5. P. 1023-1030.
247. Lee J.-H., Weickmann J.L., Koduri R.K., Ghosh-Dastidar P., Saito K., Blair L.C., Date T., Lai J.S., Hollenberg S.M., Kendall R.L. Expression of Synthetic Thaumatin Genes in Yeast // Biochemistry. 1988. Vol. 27. № 14. P. 5101-5107
248. Ledebøer A.M., Theo Verrips C., Dekker B.M.M. Cloning of the natural gene for the sweet-tasting plant protein thaumatin // Gene. 1984. Vol. 30. № 1-3. P. 23-32.
249. Liu J.-J., Sturrock R., Ekramoddoullah A.K.M. The superfamily of thaumatin-like proteins: its origin, evolution, and expression towards biological function // Plant Cell Reports. 2010. Vol. 29. № 5. P. 419–436.

250. van Loon L.C., Rep M., Pieterse C.M. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants // *Annual review of phytopathology*, Vol. 44. P. 135–162.
251. Velazhahan R., Datta S.K., Muthukrishnan S. The PR-5 family: thaumatin-like proteins in plants // In *Pathogenesis-related proteins in plants*. CRC Press, Boca Raton. 1999. P. 107-129.
252. Campos M.A., Silva M.S., Magalhaes C.P., Ribeiro S.G., Sarto R.P., Vieira E.A., Grossi de Sá M.F. Expression in *Escherichia coli*, purification, refolding and antifungal activity of an osmotin from *Solanum nigrum* // *Microbial Cell Factories*. 2008. Vol. 7. P. 7.
253. Veronese P., Ruiz M.T., Coca M.A., Hernandez-Lopez A., Lee H., Ibeas J.I., Damsz B., Pardo J.M., Hasegawa P.M., Bressan R.A., Narasimhan M.L. In defense against pathogens: both plant sentinels and foot soldiers need to know the enemy // *Plant Physiology*. 2003. Vol. 131. № 4. P. 1580-1590.
254. Mortensen A. Sweeteners permitted in the European Union: safety aspects // *Scandinavian Journal of Food and Nutrition*. 2006. Vol. 50. № 3. P.104-116.
255. Newberne P., Smith R.L., Doull J., Feron V.J., Goodman J.I., Munro I.C., Portoghese P.S., Waddell W.J., Wagner B.M., Weil C.S., Adams T.B., Hallagan J.B. GRAS Flavoring Substances. The 19th publication by the Flavor and Extract Manufacturers' Association's Expert Panel on recent progress in the consideration of flavoring ingredients generally recognized as safe under the Food Additives Amendment // *FoodTechnology*. 2000. Vol. 54. № 6. P. 66-84.
256. Veličković T.Ć., Gavrović-Jankulović M. Food Allergens. *Biochemistry and Molecular Nutrition*. Springer Science+Business Media, New York. 2014.
257. Masuda T., Kitabatake N. Developments in biotechnological production of sweet proteins // *Journal of bioscience and bioengineering*. 2006. Vol. 102. № 5. P. 375-389.
258. Selitrennikoff C.P. Antifungal Proteins // *Applied and Environmental Microbiology*. 2001. Vol. 67. № 7. P. 2883-2894.

259. Luchakivska Y.S., Komarnytskii I.K., Kurchenko I.M., Yurieva O.M., Zhytkevich N.V., Kuchuk M.V. Construction and analysis of the transgenic carrot and celery plants expressing the recombinant thaumatin II protein // *Biopolymers and Cell*. 2015. Vol. 31. № 4. P. 285-293.
260. Masuda T., Ohta K., Mikami B., Kitabatake N. High-resolution structure of the recombinant sweet-tasting protein thaumatin I // *Acta Crystallographica. Section F. Structural Biology and Crystallization communications*. 2011. Vol. 67. № Pt 6. P. 652-658.
261. Masuda T., Ohta K., Mikami B., Kitabatake N., Tani F. Atomic structure of the sweet-tasting protein thaumatin I at pH 8.0 reveals the large disulfide-rich region in domain II to be sensitive to a pH change // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2012. Vol. 419. № 1. P. 72–76.
262. Masuda T., Mikami B., Tani F. Atomic structure of recombinant thaumatin II reveals flexible conformations in two residues critical for sweetness and three consecutive glycine residues // *Biochimie*. 2014. Vol. 106. P. 33-38.
263. Hellekant G., Danilova V. Species differences toward sweeteners // *Food Chemistry*. 1996. Vol. 56. № 3. P. 323-328
264. Liu B., Ha M., Meng X.-Y., Kaur T., Khaleduzzaman M., Zhang Z., Jiang P., Li X., Cui M. Molecular mechanism of species-dependent sweet taste toward artificial sweeteners // *The Journal of Neuroscience*. 2011. Vol. 31. № 30. P. 11070-11076.
265. Lindley M.G. Natural High-Potency Sweeteners // In *Sweeteners and sugar alternatives in food technology*, 2nd ed. // John Wiley & Sons Ltd. 2012. P.185-212.
266. Faus I., Sisniega H. Sweet-tasting proteins // In *Biopolymers, Polyamides and Complex Proteinaceous Materials II. Volume 8*. Wiley-VCH, New York. 2003. P. 687-705.

267. van der Wel H., Bel W.J. Enzymatic properties of the sweet-tasting proteins Thaumatin and Monellin after partial reduction // *European journal of biochemistry*. 1980. Vol. 104. № 2. P. 413-418.
268. Daniell S., Mellits K.H., Faus I., Connerton I. Refolding the sweet-tasting protein thaumatin II from insoluble inclusion bodies synthesised in *Escherichia coli* // *Food Chemistry*. 2000. Vol. 71. № 1. P. 105-110.
269. Temussi P.A. Why are sweet proteins sweet? Interaction of brazzein, monellin and thaumatin with the T1R2-T1R3 receptor // *FEBS Letters*. 2002. Vol. 526. № 1-3. P. 1-4.
270. Tancredi T., Pastore A., Salvadori S., Esposito V., Temussi P.A. Interaction of sweet proteins with their receptor. A conformational study of peptides corresponding to loops of brazzein, monellin and thaumatin // *European journal of biochemistry* m. 2004. Vol. 271. № 11. P. 2231-2240.
271. Picone D., Temussi P.A. Dissimilar sweet proteins from plants: Oddities or normal components? // *Plant Science*. 2012. Vol. 195. P. 135-142.
272. Kaneko R., Kitabatake N. Structure-sweetness relationship in thaumatin: importance of lysine residues // *Chemical Senses*. 2001. Vol. 26. № 2. P. 167–177.
273. Ohta K., Masuda T., Ide N., Kitabatake N. Critical molecular regions for elicitation of the sweetness of the sweet-tasting protein, thaumatin I // *The FEBS Journal*. 2008. Vol. 275. № 14. P. 3644-3652.
274. Ohta K., Masuda T., Tani F., Kitabatake N. Introduction of a negative charge at Arg82 in thaumatin abolished responses to human T1R2–T1R3 sweet receptors // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2011. Vol. 413. № 1. P. 41–45.
275. Masuda T., Ohta K., Ojio N., Murata K., Mikami B., Tani F., Temussi P.A., Kitabatake N. A hypersweet protein: removal of the specific negative charge at Asp21 enhances Thaumatin sweetness // *Scientific Reports*. 2016. Vol. 6. P. 20255.

276. Kaneko R., Kitabatake N. Sweetness of sweet protein Thaumatin is more thermoresistant under acid conditions than under neutral or alkaline conditions // *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 2001. Vol. 65. №2. P. 409-413.
277. Elemo B.O., Adu O.B. Studies of some functional properties of thaumatin, a protein sweetener // *JORMAR*. 2005. Vol. 2. P. 48-55.
278. Fan S.G., Wu G.J. Plant proteinase inhibitors against phytophagous insects // *Botanical Bulletin of Academia Sinica*. 2005. Vol. 46. P. 273–292.
279. Roberts W., Selitrennikoff C.P. Zeamatin, an antifungal protein from maize with membrane-permeabilizing activity // *Journal of General Microbiology*. 1990. Vol. 136. № 9. P. 1771-1778.
280. Witty M. Preprothaumatin II is processed to biological activity in *Solanum tuberosum* // *Biotechnology Letters*. 1990. Vol. 12. P. 131-136.
281. Szwacka M., Krzymowska M., Osuch A., Kowalczyk M.E., Malepszy S. Variable properties of transgenic cucumber plants containing the thaumatin II gene from *Thaumatococcus daniellii* // *Acta Physiologiae Plantarum*. 2002. Vol. 24. P. 173–185. doi: 10.1007/s11738-002-0009-5.
282. Bartoszewski G., Niedziela A., Szwacka M., Niemirowicz-Szczytt K. Modification of tomato taste in transgenic plants carrying a thaumatin gene from *Thaumatococcus daniellii* Benth // *Plant Breeding*. 2003. Vol. 122. № 4. P. 347–351.
283. Korneeva I., Firsov A., Lebedev V., Schestibratov K., Pushin A., Shulga O., Dolgov S. Expression and subcellular localization of PR-5 protein with different signal sequences in transgenic tomato and tobacco plants // *Revue de Cytologie et Biologie végétales - Le Botaniste*. 2005. Vol. 28. P. 260-267.
284. Schestibratov K.A., Dolgov S.V. Transgenic strawberry plants expressing a thaumatin II gene demonstrate enhanced resistance to *Botrytis cinerea* // *Scientia Horticulturae*. 2005. Vol. 106. № 2. P. 177-189.

285. Sidorova T., Miroschnichenko D., Dolgov S., Tjukavin G. Transgenic carrot expressing Thaumatin II gene has enhanced resistance against *Fusarium avenaceum* // *Acta Horticulturae*. 2013. Vol. 974. P. 123-130.
286. Lebedev V.G., Taran S.A., Shmatchenko V.V., Dolgov S.V. Pear transformation with the gene for supersweet protein thaumatin II // *Acta Horticulturae*. 2002. Vol. 596. P. 199-202.
287. Dolgov S.V., Schestibratov K.A., Mikhailov R.V. Apple transformation with the gene of supersweet protein Thaumatin II // *Acta Horticulturae*. 2004. Vol. 663. P. 507-510.
288. Dolgov S.V., Lebedev V.G., Firsov F.P. Pear fruit taste modification by thaumatin II gene expression // *Acta Horticulturae*. 2011. Vol. 909. P. 67-73.
289. Szwacka M., Burza W., Zawirska-Wojtasiak R., Goslinski M., Twardowska A., Gajc-Wolska J., Kosieradzka I., Kiełkiewicz M. Genetically modified crops expressing 35S-Thaumatin II transgene: sensory properties and food safety aspects // *Comprehensive reviews in food science and food safety*. 2012. Vol. 11. № 2. P. 174-186.
290. Zawirska-Wojtasiak R., Gośliński M., Szwacka M., Gajc-Wolska J., Mildner-Szkudlarz S. Aroma Evaluation of Transgenic, Thaumatin II-Producing Cucumber Fruits // *Journal of Food Science*. 2009. Vol. 74. № 3. P. C204–C210.
291. Schestibratov K.A., Dolgov S.V. Genetic engineering of strawberry for taste improvement and enhanced disease resistance by introduction of thau II gene // In: *Biotechnology and Sustainable Agriculture 2006 and Beyond: Proceedings of the 11th IAPTC&B Congress; 2006 August 13-18; Beijing, China*. Springer, Dordrecht. 2007. P. 279-282.
292. Popowich E.A., Firsov A.P., Mitiouchkina T.Y., Filipenya V.L., Dolgov S.V., Reshetnikov V.N. Agrobacterium-mediated transformation of *Hyacinthus orientalis* with thaumatin II gene to control fungal diseases // *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 2007. Vol. 90. P. 237-244.

293. Rajam M.V., Chandola N., Saiprasad Goud P., Singh D., Kashyap V., Choudhary M.L., Sihachakr D. Thaumatin gene confers resistance to fungal pathogens as well as tolerance to abiotic stresses in transgenic tobacco plants // *Biologia Plantarum*. 2007. Vol. 51. P. 135-141.
294. Stahl R., Luhrs R., Dargatz H. Thaumatin from transgenic barley: Patent 20090031458 USA; application 2006-07-28; publication 2009-01-29, <https://patents.google.com/patent/US20090031458A1/en>
295. Witty M., Harvey W.J. Sensory evaluation of transgenic *Solanum tuberosum* producing r-thaumatin II // *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. 1990. Vol. 18. P. 77-80.
296. Firsov A.P., Pushin A.S., Dolgov S.V. Transgenic Plants as Producers of Supersweet Protein Thaumatin II // In: Reference Series in Phytochemistry. Sweeteners. Springer, Part of Springer Science+Business Media. Chapter in the book. 2016. doi: 10.1007/978-3-319-26478-3
297. FT: США столкнулись с самой серьезной вспышкой птичьего гриппа. РИА Новости. Москва, 13 февраля 2025. <https://ria.ru/20250213/gripp-1999082716.html>
298. Whittaker G. Intracellular trafficking of influenza virus: clinical implications for molecular medicine // *Expert Reviews in Molecular Medicine*. 2001. Vol. 2001. P. 1-13.
299. Knipe D.M., Howley P.M., Griffin D.E., Lamb R.A., Martin M.A. Fields virology, 5-th edition // Lippincott Williams & Wilkins. 2006.
300. Schnell J., Chou J. Structure and mechanism of the M2 proton channel of influenza A virus // *Nature*. 2008. Vol. 451. № 7178. P. 591–595.
301. Ma Ch., Polishchuk A., Ohigashia Yu., Stoufferb A., Schön A., Magavern E. Identification of the functional core of the influenza A virus A. M2 proton-selective ion channel // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2009. Vol. 106. № 30. P. 12283–12288.

302. Park E., Castrucci M., Portner A., Kawaoka Y. The M2 ectodomain is important for its incorporation into influenza A virions // *Journal of Virology*. 1998. Vol. 72. № 3. P. 2449-2455.
303. Fiers W., Neiryneck S., Deroo T., Saelens X., Min Jou W. Soluble recombinant unfluenza vaccines // *The Royal Society*. 2001. Vol. 356. № 1416. P. 1961-1963.
304. Schotsaert M., De Filette M., Fiers W., Saelens X. Universal M2 ectodomain-based influenza A vaccines: preclinical and clinical developments // *Expert Review of Vaccines*. 2009. Vol. 8. № 4. P. 499–508.
305. Zharikova D., Mozdzanowska K., Feng J., Zhang M., Gerhard W. Influenza type A virus escape mutants emerge in vivo in the presence of antibodies to the ectodomain of matrix protein 2 // *Journal of Virology*. 2005. Vol. 79. № 11. P. 6644–6654.
306. Gerhard W., Mozdzanowska K., Zharikova D. Prospects for universal influenza virus vaccine // *Emerging Infectious Diseases*. 2006. Vol. 12. № 4. P. 569–574.
307. Wang R., Song A., Levin J. Therapeutic potential of a fully human monoclonal antibody against influenza A virus M2 protein // *Antiviral Research*. 2008. Vol. 80. № 2. P. 168-177.
308. Beerli R., Bauer M., Schmitz N., Buser R., et al. Prophylactic and therapeutic activity of fully human monoclonal antibodies directed against Influenza A M2 protein // *Virology Journal*. 2009. Vol. 6. P. 224.
309. Ebrahimi S.M., Tebianian M. Influenza A viruses: why focusing on M2e-based universal vaccines // *Virus Genes*. 2011. Vol. 42. № 1. P.1–8.
310. Liu W., Li H., Chen Y. N-terminus of M2 protein could induce antibodies with inhibitory activity against influenza virus replication // *FEMS immunology and medical microbiology*. 2003. Vol. 35. № 2. P.141– 146.

311. Feng J., Zhang M., Mozdzanowska K. Influenza A virus infection engenders a poor antibody response against the ectodomain of matrix protein 2 // *Virology Journal*. 2006. Vol. 3. P. 102.
312. De Filette M., Joua W., Birkett A., Lyons K, Schultz B., Tonkyro A., Resch S., Fiers W. Universal influenza A vaccine: Optimization of M2-based constructs // *Virology*. 2005. Vol. 337. № 1. P. 149 – 161.
313. Deng L., Kim J. R., Chang T. Z., Zhang H., Mohan T., Champion J. A., Wang B.-Z. Protein nanoparticle vaccine based on flagellin carrier fused to influenza conserved epitopes confers full protection against influenza A virus challenge // *Virology*. 2017. Vol. 509. P. 82–89.
314. Soema P.C., Kompier R., Amorij J.P., Kersten G.F. Current and next generation influenza vaccines: Formulation and production strategies // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutic*. 2015. Vol. 94. P. 251-263.
315. Wolf A.I., Mozdzanowska K., Williams K.L., Singer D., Richter M., Hoffmann R., Caton A.J., Otvos L., Erikson J. Vaccination with M2e-based multiple antigenic peptides: characterization of the B cell response and protection efficacy in inbred and outbred mice // *PLoS One*. 2011. Vol. 6. № 12. P. e28445.
316. Zhao G., Lin Y., Du L., Guan J., Sun S., Sui H., Kou Z., Chan C.C., Guo Y., Jiang S., Zheng B. J., Zhou Y. An M2e-based multiple antigenic peptide vaccine protects mice from lethal challenge with divergent H5N1 influenza viruses // *Virology Journal*. 2010. Vol.7. P. 9.
317. Wang L., Wang Y.-C., Feng H., Ahmed T., Compans R.W., Wang B.-Z. Virus-Like Particles Containing the Tetrameric Ectodomain of Influenza Matrix Protein 2 and Flagellin Induce Heterosubtypic Protection in Mice // *BioMed Research International*. 2013. Vol. 2013. P. 686549.
318. Wang Y., Shen Q., Jiang Y., Song Y., Fang L., Xiao S. Chen H. Immunogenicity of foot-and-mouth disease virus structural polyprotein P1 expressed in transgenic rice // *Journal of Virological Methods*. 2012. Vol. 181. № 1. P. 12–17.

319. Wang L., Zhang H., Compans R.W., Wang B.Z. Universal Influenza Vaccines - A Short Review // *Journal of Immunology and Clinical Research*. 2013. Vol. 1. P. 1003.
320. Kim Y.-J., Lee Y.-T., Kim M.-C., Lee Y.-N., Kim K.-H., Ko E.-J., ... Kang S.-M. Cross-Protective Efficacy of Influenza Virus M2e Containing Virus-Like Particles Is Superior to Hemagglutinin Vaccines and Variable Depending on the Genetic Backgrounds of Mice // *Frontiers in Immunology*. 2017. Vol. 8. P. 1730.
321. Yong C.Y., Yeap S.K., Ho K.L., Omar A.R., Tan W.S. Potential recombinant vaccine against influenza A virus based on M2e displayed on nodaviral capsid nanoparticles // *International Journal of Nanomedicine*. 2015. Vol. 10. P. 2751-63.
322. Deng L., Chang T.Z., Wang Y., Li S., Wang S., Matsuyama S., Yu G., Compans R.W., Li J.-D., Prausnitz M.R., Champion J.A., Wang B.-Z. Heterosubtypic influenza protection elicited by double-layered polypeptide nanoparticles in mice // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2018. Vol. 115. № 33. P. E7758-E7767.
323. Deng L., Mohan T., Chang T.Z., Gonzalez G.X., Wang Y., Kwon Y.-M., Kang S.-M., Compans R.W., Champion J.A., Wang B.-Z. Double-layered protein nanoparticles induce broad protection against divergent influenza A viruses // *Nature Communications*. 2018. Vol. 9. № 1. P. 359.
324. Layton S.L., Kapczynski D.R., Higgins S., Higgins J., Wolfenden A.D., Liljebjelke K.A., Bottje W.G., Swayne D., Berghman L.R., Kwon Y.M., Hargis B.M., Cole K. Vaccination of chickens with recombinant Salmonella expressing M2e and CD154 epitopes increases protection and decreases viral shedding after low pathogenic avian influenza challenge // *Poultry Science*. 2009. Vol. 88. № 11. P. 2244-52.
325. Hajam I.A., Lee J.H. An Influenza HA and M2e Based Vaccine Delivered by a Novel Attenuated Salmonella Mutant Protects Mice against Homologous

- H1N1 Infection // *Frontiers in Microbiology*. 2017. Vol. 8. P. 872. doi: 10.3389/fmicb.2017.00872
326. Deng L., Ibañez L.I., Van den Bossche V., Roose K., Youssef S.A., de Bruin A., Fiers W., Saelens X. Protection against Influenza A Virus Challenge with M2e-Displaying Filamentous *Escherichia coli* Phages // *PLoS ONE*. 2015. Vol. 10. №5. P. e0126650.
327. Tan M.P., Tan W.S., Mohamed Alitheen N.B., Yap W.B. M2e-Based Influenza Vaccines with Nucleoprotein: A Review // *Vaccines (Basel)*. 2021. Vol. 9. № 7. P. 739.
328. Subbiah J., Oh J., Kim, K.H., Shin C., Park B.R., Bhatnagar N., Seong B., Wang B.-Z., Kang S.-M. A chimeric thermostable M2e and H3 stalk-based universal influenza A virus vaccine // *npj Vaccines*. 2022. Vol. 7. P. 68.
329. Carascal MB, Pavon RDN, Rivera WL. Recent Progress in Recombinant Influenza Vaccine Development Toward Heterosubtypic Immune Response // *Frontiers in Immunology*. 2022. Vol. 13. P. 878943.
330. Turley C.B., Rupp R.E., Johnson C., Taylor D.N., Wolfson J., Tussey L., Kavita U., Stanberry L., Shaw A. Safety and immunogenicity of a recombinant M2e-flagellin influenza vaccine (STF2.4xM2e) in healthy adults // *Vaccine*. 2011. Vol. 29. № 32. P. 5145-5152. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.05.041.
331. Stoloff G.A., Caparros-Wanderley W. Synthetic multi-epitope peptides identified in silico induce protective immunity against multiple influenza serotypes // *European Journal of Immunology*. 2007. Vol. 37. № 9. P. 2441-2449.
332. De Filette M, Martens W, Smet A, Schotsaert M, Birkett A, Londono-Arcila P, et al. Universal influenza A M2e-HBc vaccine protects against disease even in the presence of pre-existing anti-HBc antibodies // *Vaccine*. 2008. Vol. 26. № 51. P. 6503–6507.
333. Schmitz N., Beerli,R.R., Bauer M., Jegerlehne, A., Dietmeier K., Maudrich M., Pumpens P., Saudan P. Bachmann M.F. Universal vaccine against influenza

- virus: Linking TLR signaling to anti-viral protection // *European Journal of Immunology*. 2012. Vol. 42. № 4. P. 863-869.
334. Mezhenskaya D., Isakova-Sivak I., Rudenko L. M2e-based universal influenza vaccines: a historical overview and new approaches to development // *Journal of Biomedical Science* 2019. Vol. 26. № 1. P. 76.
335. Fu T.-M., Grimm K.M., Citron M.P., Freed D.C., Fan J., Keller P.M., et al. Comparative immunogenicity evaluations of influenza A virus M2 peptide as recombi-nant virus like particle or conjugate vaccines in mice and monkeys // *Vaccine*. 2009. Vol. 27. № 9. P. 1440–1447.
336. Zhou D, Wu TL, Lasaro MO, et al. A universal influenza A vaccine based on adenovirus expressing matrix-2 ectodomain and nucleoprotein protects mice from lethal challenge // *Molecular Therapy*. 2010. Vol. 18. № 12. P. 2182-2189.
337. Mbewana S., Mortimer E., Pêra, F.F.P.G., Hitzeroth I.I., and Rybicki E.P. Production of H5N1 influenza virus matrix protein 2 ectodomain protein bodies in tobacco plants and in insect cells as a candidate universal influenza vaccine // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2015. Vol. 3. P. 197.
338. Nemchinov L.G., Natilla A. Transient expression of the ectodomain of matrix protein 2 (M2e) of avian influenza A virus in plants // *Protein Expression and Purification*. 2007. Vol. 56. № 2. P. 153–159.
339. Tyulkina L. G., Skurat E. V., Frolova O. Y., Komarova T. V., Karger E. M., Atabekov I. G. New viral vector for superproduction of epitopes of vaccine proteins in plants // *Acta Naturae*. 2011. Vol. 3. № 4. P. 73–82.
340. Meshcheryakova, Y. A., Eldarov, M. A., Migunov, A. I., Stepanova, L. A., Repko, I. A., Kiselev, C. I., et al. Cowpea mosaic virus chimeric particles bearing the ectodomain of matrix protein 2 (M2E) of the influenza A virus: production and characterization // *Molecular Biology*. 2009. Vol. 43. № 4. P. 741-750.
341. Mardanov E.S., Kotlyarov R.Y., Kuprianov V.V., Stepanova L.A., Tsybalova L.M., Lomonosoff G.P., Ravin N.V. Rapid high-yield expression of a

- candidate influenza vaccine based on the ectodomain of M2 protein linked to flagellin in plants using viral vectors // *BMC Biotechnology*. 2015. Vol. 15. P. 42.
342. Ravin, N.V., Kotlyarov, R.Y., Mardanova, E.S., Kuprianov V.V., Migunov A.I., Stepanova L.A., Tsybalova L.M., Kiselev O.I., Skryabin K.G. Plant-produced recombinant influenza vaccine based on virus-like HBc particles carrying an extracellular domain of M2 protein // *Biochemistry Moscow*. 2012. Vol.77. P. 33–40.
343. Petukhova N.V., Gasanova T.V., Ivanov P.A., Atabekov J.G. Highlevel systemic expression of conserved influenza epitope in plants on the surface of rod-shaped chimeric particles // *Viruses*. 2014. Vol. 6. № 4. P. 1789–1800.
344. Di Pasquale A., Preiss S., Tavares Da Silva F., Garçon N. Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond // *Vaccines (Basel)*. 2015. Vol. 3. № 2. P. 320-343.
345. Sarkar I., Garg R., van Drunen Littel-van den Hurk S. Selection of adjuvants for vaccines targeting specific pathogens // *Expert Review of Vaccines*. 2019. Vol. 18. № 5. P. 505-521.
346. Nanishi E., Dowling D.J. Ofer L. Toward precision adjuvants: optimizing science and safety // *Current Opinion in Pediatrics*. 2020. Vol. 32. № 1. P. 125-138.
347. Eriksson A.M., Schön K.M., Lycke N.Y.. The Cholera Toxin-Derived CTA1-DD Vaccine Adjuvant Administered Intranasally Does Not Cause Inflammation or Accumulate in the Nervous Tissues // *Journal of Immunology*. 2004. Vol. 173. № 5. P. 3310-3319.
348. Eliasson DG, El Bakkouri K, Schön K, Ramne A, Festjens E, Löwenadler B, Fiers W, Saelens X, Lycke N. CTA1-M2e-DD: a novel mucosal adjuvant targeted influenza vaccine // *Vaccine*. 2008. Vol. 26. № 9. P. 1243-1252.
349. Sphyris N., Lord J.M., Wales R., Roberts L.M. Mutational analysis of the Ricinus lectin B-chains. Galactose-binding ability of the 2 gamma subdomain of

- Ricinus communis* agglutinin B-chain // Journal of Biological Chemistry. 1995. Vol. 270. № 35. P. 20292-20297.
350. Medina-Bolivar, F., Wrighta, R., Funka, V., Sentza, D., Barroso, L., Wilkins, T. D., et al. A non-toxic lectin for antigen delivery of plant-based mucosal vaccines // Vaccine. 2003. Vol. 21. № 9-10. P. 997–1005.
351. Choi N.W., Estes M.K., Langridge W.H. Mucosal immunization with a ricin toxin B subunit-rotavirus NSP4 fusion protein stimulates a Th1 lymphocyte response // Journal of Biotechnology. 2006. Vol. 121. № 2. P. 272–283.
352. Woffenden B.J., Ñopo L.H., Cramer C.L., Dolan M.C., Medina-Bolivar F. Expression of a ricin B:F1:V fusion protein in tobacco hairy roots: Steps toward a novel pneumonic plague vaccine // Electronic Journal of Integrative Biosciences. 2008. Vol. 3. P. 10–19.
353. Donayre-Torres, A. J., Esquivel-Soto, E., de Lourdes Gutiérrez-Xicoténcatl, M., Esquivel-Guadarrama, F. R., and Gómez-Lim, M. A. Production and purification of immunologically active core protein p24 from HIV-1 fused to ricin toxin B subunit in *E. coli* // Virology Journal. 2009. Vol. 6. P. 17.
354. Liu W., Na Xu, Yuan H., Songyan Li, Liu L., Pu Z., Wan J., Wang H., Chang Y., Li R. Immunomodulatory activity of recombinant ricin toxin binding subunit B (RTB) // International Journal of Molecular Sciences. 2013. Vol. 14. № 6. P. 12401-12410.
355. Cherniack E.P. Bugs as drugs, part two: worms, leeches, scorpions, snails, ticks, centipedes, and spiders // Alternative Medicine Review. 2010. Vol. 16. № 1. P. 50–8.
356. Müller C., Mescke K., Liebig S., Mahfoud H., Lemke S., Hildebrandt J.P. More than just one: multiplicity of Hirudins and Hirudin-like Factors in the Medicinal Leech, *Hirudo medicinalis* // Molecular Genetics and Genomics. 2016. Vol. 291. № 1. P. 227-240.

357. Chang JY. Stability of hirudin, a thrombin-specific inhibitor. The structure of alkaline-inactivated hirudin // *Journal of Biological Chemistry*. 1991. Vol. 266. № 17. P.10839-43.
358. Stone S.R., Dennis S., Wallace A., Hofsteenge J. Use of Protein Chemistry and Molecular Biology to Determine Interaction Areas Between Proteases and their Inhibitors: The Thrombin-Hirudin Interaction as an Example // In: *Serine Proteases and Their Serpin Inhibitors in the Nervous System*. NATO ASI Series (Series A: Life Sciences), vol 191. Springer, Boston. 1990. P. 115-126.
359. Greinacher A., Warkentin T.E. The direct thrombin inhibitor hirudin // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2008. Vol. 99. № 5. P. 819-29.
360. Greinacher A., Lubenow N. Recombinant hirudin in clinical practice: focus on lepirudin // *Circulation*. 2001. Vol. 103. № 10. P. 1479–1484.
361. Markwardt F. Hirudin as an inhibitor of thrombin // *Methods in Enzymology*. 1970. Vol. 19. P. 924-932.
362. Harvey R.P., Degryse E., Stefani L., Schamber F., Cazenave J-P., Courtney M., Tolstoshev P., Lecocq J-P. Cloning and expression of a cDNA coding for the anticoagulant hirudin from the bloodsucking leech, *Hirudo medicinalis* // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1986. Vol. 83. № 4. P. 1084-1088.
363. Dodt J., Schmitz T., Schäfer T., Bergmann C. Expression, secretion and processing of hirudin in *E. coli* using the alkaline phosphatase signal sequence // *FEBS Letters*. 1986. Vol. 202. № 2. P. 373-377.
364. Kostromina M.A., Esipov R.S., Miroshnikov A.I. Biotechnological production of recombinant analogues of hirudin-1 from *Hirudo medicinalis* // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2012. Том. 38. № 2. С. 142–151.
365. Matsui T., Sato H., Yamamuro H., Shinzato N., Matsuda H., Misawa S., Sato S. High cell density cultivation of recombinant *E. coli* for hirudin variant 1 production by temperature shift controlled by pUC18-based replicative origin // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008. Vol. 80. № 5. P. 779–783.

366. Chen H.Y., Qi X.H., Geng X., Xu Q.G., Wang J., Wu Z.R. Expression, Purification and Characterization of the Recombinant Hirudin Variant III in the *Bacillus subtilis* // Advanced Materials Research. 2011. Vol. 343–344. P. 753–63.
367. Riehl-Bellon N., Carvalho D., Acker M., Van Dorsselaer A., Marquet M., Loison G., Lemoine Y., Brown S.W., Courtney M., Roitsch C. Purification and Biochemical Characterization of Recombinant Hirudin Produced by *Saccharomyces cerevisia* // Biochemistry. 1989. Vol. 28. № 7. P. 2941-2949.
368. Hu Z., Zhang N., Gu F., et al. Expression, purification and characterization of recombinant targeting bifunctional hirudin in *Pichia pastoris* // African Journal of Biotechnology. 2009. Vol. 8. №. 20. P. 5571–5577.
369. Kim C.H., Seo H.W., Kim H.Y., et al. Production of recombinant hirudin in *Hansenula polymorpha*: variation of gene expression level depends on methanol oxidase and fermentation strategies // Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 1998. Vol. 21, № 1. P. 1–5.
370. Radzio R., Kück U. Efficient synthesis of the blood-coagulation inhibitor hirudin in the filamentous fungus *Acremonium chrysogenum* // Applied Microbiology and Biotechnology. 1997. Vol. 48. № 1. P. 58-65.
371. Benatti L., Scacheri E., Bishop D.H.L., Sarmientos P. Secretion of biologically active leech hirudin from baculovirus-infected insect cells // Gene. 1991. Vol. 101. № 2. P. 255-260.
372. Yen C.-H., Yang C.-K., Chen I.-C., Lin Y.-S., Lin C.-S., Chu S., Tu C.-F. Expression of recombinant Hirudin in transgenic mice milk driven by the goat β -casein promoter // Biotechnology Journal. 2008. Vol. 3. № 8. P. 1067–1077.
373. Maraganore J.M., Fenton J.W. Thrombin Inhibition by Synthetic Hirudin Peptides // In Fibrinogen, Thrombosis, Coagulation, and Fibrinolysis. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol. 281. Springer, Boston, MA. 1990. P. 177–183.

374. Niehrs C., Huttner W.B., Carvallo D., Degryse E. Conversion of Recombinant Hirudin to the Natural Form by in Vitro Tyrosine Sulfation // *The Journal of biological chemistry*. 1990. Vol. 265. № 16. P. 9314-9318.
375. Muramatsu R., Nukup E., Sukesada A., Misawa S., Komatsu Y., Okayama T., Wada K., Morikawa T., Hayashi H., Kobashi K. Enzymic O-sulfation of tyrosine residues in hirudins by sulfotransferase from *Eubacterium* A-44 // *European journal of biochemistry*. 1994. Vol. 223. № 1. P. 243-248.
376. Parmenter D.L., Boothe J.G., van Rooijen G.J.H., Yeung E.C., Moloney M.M. Production of biologically active hirudin in plant seeds using oleosin partitioning // *Plant Molecular Biology*. 1995. Vol. 29. № 6. P. 1167-1180.
377. Chaudhary S., Parmenter D. L., Moloney M. M. Transgenic *Brassica carinata* as a vehicle for the production of recombinant proteins in seeds // *Plant Cell Reports*. 1998. Vol. 17. № 3. P. 195-200.
378. Kumar G.S., Ganapathi T., Srinivas L., Bapat V. Plant Molecular Farming: Host Systems, Technology and Products // *In Applications of Plant Metabolic Engineering*. Springer, Dordrecht. 2007. P. 45-77.
379. Moore K.L. Protein tyrosine sulfation: A critical posttranslation modification in plants and animals // *PNAS*. 2009. Vol. 106. №. 35. P. 14741–14742.
380. Komori R., Amano Y., Ogawa-Ohnishi M., Matsubayashi Y. () Identification of tyrosylprotein sulfotransferase in *Arabidopsis* // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2009. Vol. 106. № 35: P. 15067–15072.
381. Kaufmann C, Sauter M. Sulfated plant peptide hormones // *Journal of Experimental Botany*. 2019. Vol. 70. № 16. P. 4267-4277.
382. Yang Y.-S., Wang C.-C., Chen B.-H., Hou Y.-H., Hung K.-S., Mao Y.-C. Tyrosine Sulfation as a Protein Post-Translational Modification // *Molecules*. 2015. Vol. 20. P. 2138-2164.

383. Kaufmann C., Stührwohldt N., Sauter M. (2021). Tyrosylprotein sulfotransferase-dependent and -independent regulation of root development and signaling by PSK LRR receptor kinases in Arabidopsis // *Journal of experimental botany*. Vol. 72. № 15. P. 5508–5521.
384. Tay J., Levesque J.P., Winkler I.G. Cellular players of hematopoietic stem cell mobilization in the bone marrow niche // *International Journal of Hematology*. 2016. Vol. 105. № 2. P. 129–140.
385. Asano S. Human granulocyte colony-stimulating factor: its basic aspects and clinical applications // *American journal of pediatric hematology/oncology*. 1991. Vol. 13. № 4. P. 400-413.
386. Nagata S., Tsuchiya M., Asano S., Kaziro Y., Yamazaki T., Yamamoto O., Hirata Y., Kubota N., Oheda M., Nomura H., et al. Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor // *Nature*. 1986. Vol. 319. № 6052. P. 415-418.
387. Welte K., Platzer E., Lu L., Gabilove J. L., Levi E., Mertelsmann R., Moore M. A. Purification and biochemical characterization of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1985. Vol. 82. № 5. P. 1526-1530.
388. Souza L.M., Boone T.C., Gabilove J., Lai P.H., Zsebo K.M., Murdock D.C., Chazin V.R., Bruszewski J., Lu H., Chen K.K., Barendt J., Platzer E., Moore M.A.S., Mertelsmann R., Welte K. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: effects on normal and leukemic myeloid cells // *Science*. 1986. Vol. 232. № 4746. P. 61-5.
389. Welte K. G-CSF: filgrastim, lenograstim and biosimilars // *Expert Opinion on Biological Therapy* 2014. Vol. 14. № 7. P. 983-993.
390. Sivakumar R., Atkinson M.A., Mathews C.E., Morel L. G-CSF: A Friend or Foe? // *Immunome Research*. 2015. Vol. S2. P. 007.
391. Mehta H.M., Malandra M., Corey S.J. G-CSF and GM-CSF in Neutropenia // *Journal of Immunology*. 2015. Vol. 195. № 4. P. 1341–1349.

392. Авдеева Ж.И., Солдатов А.А., Алпатов Н.А., Киселевский М.В., Лысикова С.Л., Бондарев В.П., Медуницын Н.В., Мосягин В.Д., Меркулов В.А., Миронов А.Н. Биоаналоговые (биоподобные) лекарственные препараты рекомбинантного гранулоцитарного-колониестимулирующего фактора. Оценка качества // Биопрепараты. 2015. № 1. С. 4-14.
393. Oheda M., Hasegawa M., Hattori K., Kuboniwa H., Kojima T., Orita T., Tomonou K., Yamazaki T., Ochi N. O-linked sugar chain of human granulocyte colony-stimulating factor protects it against polymerization and denaturation allowing it to retain its biological activity // Journal of Biological Chemistry. 1990. Vol. 265. № 20. P. 11432–11435.
394. Ono M. Physicochemical and biochemical characteristics of glycosylated recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (lenograstim) // European Journal of Cancer. 1994. Vol. 30A Suppl 3. P. S7–11.
395. Wang C., Eufemi M., Turano C., Giartosio A. Influence of the carbohydrate moiety on the stability of glycoproteins // Biochemistry. 1996. Vol. 35. № 23. P. 7299–7307.
396. Carter C.R., Whitmore K.M., Thorpe R. The significance of carbohydrates on G-CSF: differential sensitivity of G-CSFs to human neutrophil elastase degradation // Journal of Leukocyte Biology. 2004. Vol. 75. №3. P. 515-22.
397. Kim C.K., Lee C.H., Lee S.-B., Oh J.-W. Simplified Large-Scale Refolding, Purification, and Characterization of Recombinant Human Granulocyte-Colony Stimulating Factor in *Escherichia coli* // PLoS ONE. 2013. Vol. 8. № 11. P. e80109.
398. Das KM, Banerjee S, Shekhar N, Damodaran K, Nair R, Somani S, Raiker VP, Jain S, Padmanabhan S. Cloning, soluble expression and purification of high yield recombinant hGMCSF in *Escherichia coli* // International Journal of Molecular Sciences. 2011. Vol. 12. № 3. P. 2064-2076.

399. Sigar M., Maity N., Mishra S. Enhancing granulocyte colony-stimulating factor expression in *Pichia pastoris* through fusion with human serum albumin // Preparative Biochemistry and Biotechnology. 2017. Vol. 47. № 4. P. 364-370.
400. Kraševc N., Milunović T., Lasnik M.A., Lukančič I., Komel R., Porekar V.G. Human granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) produced in the filamentous fungus *Aspergillus niger* // Acta Chimica Slovenica. 2014. Vol. 61. № 4. P. 709-17.
401. Hosoi S., Murosumi K., Sasaki K., Satoh M., Miyaji H., Hasegawa M., Itoh S., Tamaoki T., Sato S. Optimization of cell culture conditions for G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) production by genetically engineered *namalwa* KJM-1 cells // Cytotechnology. 1991. Vol. 7. № 1. P. 25–32.
402. Rotondaro L., Mazzanti L., Mele A., Rovera G. High-level expression of a cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor in *Chinese hamster* ovary cells. Effect of 3'-noncoding sequences // Molecular Biotechnology. 1997. Vol. 7. № 3. P. 231-240.
403. Ko J.H., Lee C.S., Kim K.H., Pang M.G, Koo J.S., et al. Production of biologically active human granulocyte colony stimulating factor in the milk of transgenic goat // Transgenic Research. 2000. Vol. 9. № 3. P. 215-22.
404. Tian L., Sun S.S. Ubiquitin fusion expression and tissue-dependent targeting of hG-CSF in transgenic tobacco // BMC Biotechnology. 2011. Vol. 11. P. 91.
405. Tabar M.S., Solouki M., Tohidfar M., Sadeghizadeh M. Expression of human granulocyte-colony stimulating factor (hG-CSF) gene in tobacco (*Nicotiana tabacum*) // Australian Journal of Crop Science. 2012. Vol. 6. № 1. P. 135-140.
406. Tabar M.S., Habashi A.A., Memari H.R. Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor (hG-CSF) Expression in Plastids of *Lactuca sativa* // Iranian Biomedical Journal. 2013. Vol. 17. № 3. P. 158-164.

407. Абеуова Л.С., Шолтхоф Г.Б., Раманкулов Е.М., Манабаева Ш.А. Транзиентная экспрессия рекомбинантного Г-КСФ человека в растениях *Nicotiana benthamiana* с помощью вирусного вектора, созданного на основе генома вируса кустистой карликовости томатов // Биотехнология. Теория и практика. 2015. № 2, С. 25-34.
408. Ramírez-Alanis I.A., Renaud J.B., García-Lara S., Menassa R., Cardineau G.A. Transient co-expression with three *O*-glycosylation enzymes allows production of GalNAc-*O*-glycosylated Granulocyte-Colony Stimulating Factor in *N. benthamiana* // Plant Methods. 2018. Vol. 14. P. 98.
409. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. Мир, Москва. 1984.
410. Horsch R.B., Fry J.E., Hofmann N.L., et al. A simple and general method for transferring genes into plants // Science. 1985. Vol. 227. № 4691. P. 1229–1231.
411. Kozlov O.N., Mitiouchkina T.Y., Tarasenko I.V., Shaloiko L.A., Firsov A.P., Dolgov S.V. Agrobacterium-Mediated transformation of *Lemna minor* L. with hirudin and β -glucuronidase genes // Applied Biochemistry and Microbiology. 2019. Vol. 55. № 8. P. 805–815.
412. Lorimer D., Raymond A., Walchli J. et al. Gene Composer: database software for protein construct design, codon engineering, and gene synthesis // BMC Biotechnol. 2009. Vol. 9. P. 36.
413. Rouillard JM, Lee W, Truan G, Gao X, Zhou X, Gulari E. Gene2Oligo: oligonucleotide design for in vitro gene synthesis // Nucleic Acids Research. 2004. Vol. 32 (Web Server issue). P. W176-80.
414. Tarasenko I.V., Taranov A.I., Firsov A.P., Dolgov S.V. Expression of the nucleotide sequence for the M2e peptide of avian influenza virus in transgenic tobacco plants // Applied Biochemistry and Microbiology. 2013. Vol. 49. № 8. P. 695–701.

415. Dellaporta S.L., Wood J., Hicks J.B. A plant DNA miniprep version II // *Plant Molecular Biology Reporter*. 1983. Vol. 1. P. 19–21.
416. Jefferson R.A., Kavanagh T.A., Bevan M.W. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants // *EMBO Journal*. 1987. Vol. 6. № 13. P. 3901–3907.
417. Dawson RM, Alderton MR, Wells D, Hartley PG. Monovalent and polyvalent carbohydrate inhibitors of ricin binding to a model of the cell-surface receptor // *Journal of Applied Toxicology*. 2006. Vol. 26. № 3. P. 247-52.
418. Фирсов А.П., Тарасенко И.В., Пушин А.С., Шалойко Л.А., Винокуров Л.М., Долгов С.В. Экспрессия в трансгенных растениях табака гена пептида М2е вируса гриппа птиц H5N1 в трансляционном слиянии с субъединицей В рицина // *Биотехнология*. 2015. № 2. С. 55-64.
419. Tieman D., Bliss P., McIntyre L.M., Blandon-Ubeda A., Bies D., Odabasi A.Z., Rodríguez G.R., van der Knaap E., Taylor M.G., Goulet C., Mageroy M.H., Snyder D.J., Colquhoun T., Moskowitz H., Clark D.G., Sims C., Bartoshuk L., Klee H.J. The chemical interactions underlying tomato flavor preferences // *Current Biology*. 2012. Vol. 22. № 11. P. 1035–1039.
420. Firsov A., Tarasenko I., Mitiouchkina T., Shaloiko L., Kozlov O., Vinokurov L., Rasskazova E., Murashev A., Vainstein A., Dolgov S. Expression and immunogenicity of M2e peptide of avian influenza virus H5N1 fused to Ricin toxin B chain produced in duckweed plants // *Frontiers in Chemistry*. 2018. Vol. 6. P. 22.
421. Пушин А.С., Овчинникова Е.В., Шульга О.А., Фирсов А.П., Долгов С.В. Аккумуляция рекомбинантного суперсладкого белка тауматина II в апопласте трансгенных растений табака // *Биотехнология*. 2008. № 6. С. 31-40.
422. Korneeva I., Firsov A., Lebedev V., Schestibratov K., Pushin A., Shulga O., Dolgov S. Expression and subcellular localization of PR-5 protein with

- different signal sequences in transgenic tomato and tobacco plants // *Revue de Cytologie et Biologie végétales - Le Botaniste*. 2005. Vol. 28. P. 260-267.
423. Gelvin SB. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2003. Vol. 67. № 1. P. 16-37.
424. Firsov A.P., Pushin A.S., Korneeva I.V., Dolgov S.V. Transgenic tomato plants as supersweet protein thaumatin II producers // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2012. Vol. 48. № 9. P. 746–750.
425. Floss D.M., Falkenburg D., Conrad U. Production of vaccines and therapeutic antibodies for veterinary applications in transgenic plants: an overview // *Transgenic Research*. 2007. Vol. 16. № 3. P. 315-332.
426. Korneeva I.V., Varlamova N.V., Pushin A.S., Firsov A.P., Dolgov S.V., Monakhos G.F., Motamedi Shalamzari A., Dzhililov F.S. Transgenic tomato plants expressing PR-5 protein genes demonstrated disease resistance against *Phytophthora infestans* and *Xanthomonas vesicatoria* // *Acta Horticulturae*. 2011. Vol. 914. P. 415–418.
427. Korneeva I.V., Shestibratov K.A., Lavrova N.V., Firsov A.P., Lebedev V.G., Kharchenko P.N., Dolgov S.V. Expression of PR-5 protein thaumatin II for improving disease resistance and fruit quality of tomato // *Acta Horticulturae*. 2008. Vol. 789. P. 151–158.
428. Parashina E.V., Serdobinskii L.A., Kalle E.G., Lavrova N.V., Avetisov V.A., Lunin V.G., Naroditskii B.S. Genetic engineering of oilseed rape and tomato plants expressing a radish defensin gene // *Russian Journal of Plant Physiology*. 2000. Vol. 47. № 3. P. 417-423.
429. Trudel J., Grenier J., Potvin C., Asselin A. Several thaumatin like proteins bind to 1, 3-glucans // *Plant Physiology*. 1998. Vol. 118. № 4. P. 1431-1438.
430. Grenier J., Potvin C., Trudel J., Asselin A. Some thaumatin-like proteins hydrolyse polymeric β -1, 3-glucans // *Plant Journal*. 1999. Vol. 19. № 4. P. 473–480.

431. Grenier J., Potvin C., Asselin A. Some fungi express β -1,3-glucanases similar to thaumatin-like proteins // *Mycologia*. 2000. Vol. 92. № 5. P. 841–848.
432. Kim J.Y. Symplasmic Intercellular Communication through Plasmodesmata // *Plants (Basel, Switzerland)*. 2018. Vol. 7. № 1. P. 23.
433. Fierens E., Rombouts S., Gebruers K., Goesaert H., Brijs K., Beaugrand J., Volckaert G., Van Campenhout S., Proost P., Courtin C.M., Delcour J.A. TLXI, a novel type of xylanase inhibitor from wheat (*Triticum aestivum*) belonging to the thaumatin family // *Biochemical Journal*. 2007. Vol. 403. № 3. P. 583–591.
434. Scheller H.V., Ulvskov P. Hemicelluloses // *Annual Review of Plant Biology*. 2010. Vol. 61. P. 263-289. doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112315
435. Caffall K.H., Mohnen D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides // *Carbohydrate Research*. 2009. Vol. 344. № 14. P. 1879-900.
436. Firsov A., Shaloiko L., Kozlov O., Vinokurov L., Vainstein A., Dolgov S. Purification and characterization of recombinant supersweet protein thaumatin II from tomato fruit // *Protein Expression and Purification*. 2016. Vol. 123. P. 1–5.
437. Фирсов А.П., Куликов И.М., Долгов С.В. Сверхсладкий белок тауматин II в селекции садовых растений // *Садоводство и виноградарство*. 2024. № 5. С. 5-14.
438. Firsov A., Shaloiko L., Kozlov O., Vainstein A., Dolgov S. Tomatoes expressing Thaumatin II retain their sweet taste after salting and pickling processing // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2021. Vol. 101. № 12. P. 5286–5289. DOI:10.1002/jsfa.11168.
439. Фирсов Г.А., Бутанаев А.М., Суслина С.Н., Фирсов А.П. Сладкие белки как новые коррегенты вкуса для фармацевтической промышленности: перспективы использования. // *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова*. 2024; Том 20. № 3. С. 41–51.

440. Salom D, Hill BR, Lear JD, DeGrado WF. pH-dependent tetramerization and amantadine binding of the transmembrane helix of M2 from the influenza A virus // *Biochemistry*. 2000. Vol. 39. № 46. P. 14160-14170.
441. Blanco C, Nemoz G. One step purification of *Escherichia coli* beta-glucuronidase // *Biochimie*. 1987. Vol. 69. № 2. P. 157-61.
442. Korban S.S. Targeting and expression of antigenic proteins in transgenic plants for production of edible oral vaccines // *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. 2002. Vol. 38. № 3. P. 231-236.
443. Fulton R.J., Blakey D.C., Knowles P.P., Uhr J.W., Thorpe P.E., Vitetta E.S. Purification of ricin A1, A2, and B chains and characterization of their toxicity // *Journal of Biological Chemistry*. 1986. Vol 261. № 12. P. 5314-5319.
444. Dawson R.M., Paddle B.M., Alderton M. R. Characterization of the asialofetuin microtitre plate-binding assay for evaluating inhibitors of ricin lectin activity // *Journal of Applied Toxicology*. 1999. Vol. 19. № 5. P. 307–312.
445. Blome MC, Schengrund CL. Multivalent binding of ricin to bovine serum albumin-based neoglycoconjugates // *Toxicon*. 2008. Vol. 51. № 7. P. 1214-24.
446. Reed D.G., Nopo-Olazabal L.H., Funk V., Woffenden B.J., Reidy M.J., Dolan M.C., Cramer C.L., Medina-Bolivar F. Expression of functional hexahistidine-tagged ricin B in tobacco // *Plant Cell Reports*. 2005. Vol. 24. № 1. P. 15-24.
447. Sehnke P.C., Pedrosa L., Paul A.L., Frankel A.E., Ferl R.J. Expression of active, processed ricin in transgenic tobacco // *Journal of Biological Chemistry*. 1994. Vol. 269. № 36. P. 22473-22476.
448. Carter J.E. 3rd, Odumosu O., Langridge W.H. Expression of a ricin toxin B subunit: insulin fusion protein in edible plant tissues // *Molecular Biotechnology*. 2010. Vol. 44. № 2. P. 90-100.
449. Frigerio L., Jolliffe N.A., Di Cola, A., Felipe, D. H., Paris N., Neuhaus J. M., Lord J. M., Ceriotti A., Roberts L.M. The internal propeptide of the ricin

- precursor carries a sequence-specific determinant for vacuolar sorting // *Plant physiology*. 2001. Vol. 126. № 1. P. 167–175.
450. Barbier J., Bouclier C., Johannes L., Gillet D. Inhibitors of the Cellular Trafficking of Ricin // *Toxins*. 2012, Vol. 4. № 1. P. 15-27.
451. Spooner R.A., Lord J.M. Ricin Trafficking in Cells // *Toxins*. 2015. Vol. 7. № 1. P. 49-65.
452. Sowa-Rogozińska N., Sominka H., Nowakowska-Gołacka J., Sandvig K., Słomińska-Wojewódzka M. Intracellular Transport and Cytotoxicity of the Protein Toxin Ricin // *Toxins*. 2019. Vol. 11. № 6. P. 350.
453. Frigerio L., Vitale A., Lord J.M., Ceriotti A., Roberts L.M. Free ricin A chain, proricin, and native toxin have different cellular fates when expressed in tobacco protoplasts // *Journal of Biological Chemistry*. 1998. Vol. 273. № 23. P. 14194-14199.
454. Di Cola A., Frigerio L., Lord J.M., Ceriotti A., Roberts L.M. Ricin A chain without its partner B chain is degraded after retrotranslocation from the endoplasmic reticulum to the cytosol in plant cells // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2001. Vol. 98. № 25. P. 14726-14731.
455. Hartley M.R., Lord J.M. Cytotoxic ribosome-inactivating lectins from plants // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2004. Vol. 1701. № 1-2. P. 1-14.
456. Frigerio L., Roberts L.M. The Synthesis of *Ricinus communis* Lectins // In *Toxic Plant Proteins. Plant Cell Monographs*. Vol 18. Springer, Berlin, Heidelberg. 2010. P. 191-205.
457. Hunter P.R., Craddock C.P., Di Benedetto S., Roberts L.M., Frigerio L. Fluorescent reporter proteins for the tonoplast and the vacuolar lumen identify a single vacuolar compartment in Arabidopsis cells // *Plant Physiology*. 2007. Vol. 145. № 4. P. 1371–1382.
458. Chamberlain K.L., Marshall R.S., Jolliffe N.A., Frigerio L., Ceriotti A., Lord J.M., Roberts L.M. Ricin B chain targeted to the endoplasmic reticulum of tobacco protoplasts is degraded by a CDC48- and vacuole-independent

- mechanism // *Journal of Biological Chemistry*. 2008. Vol. 283. № 48. P. 33276–33286.
459. Acosta W., Ayala J., Dolan M. Cramer C.L. RTB Lectin: a novel receptor-independent delivery system for lysosomal enzyme replacement therapies // *Scientific Reports*. 2015. Vol. 5. P. 14144.
460. Yevtushenko D.P., Misra S. Transgenic Expression of Antimicrobial Peptides in Plants: Strategies for Enhanced Disease Resistance, Improved Productivity, and Production of Therapeutics // *Small Wonders: Peptides for Disease Control*. ACS Symposium Series. 2012. Vol. 1095 P. 445–458.
461. Holaskova E., Galuszka P., Frebort I., et al. Antimicrobial peptide production and plant-based expression systems for medical and agricultural biotechnology // *Biotechnology Advances*. 2015. Vol. 33. № 6 Pt2. P. 1005–1023.
462. Khvatkov P., Firsov A., Shvedova A., Kozlov O., Chernobrovkina M., Pushin A., Shaloiko L., Dolgov S. *Wolffia arrhiza* as a promising producer of recombinant hirudin // *3 Biotech*. 2021. Vol. 11. Article #209.
463. Sunilkumar G., Mohr L., Lopata-Finch E., Emani C., Rathore K.S. Developmental and tissue-specific expression of CaMV 35S promoter in cotton as revealed by GFP // *Plant Molecular Biology*. 2002. Vol. 50. № 3. P. 463–474.
464. Dutt M., Dhekney S., Soriano L. et al. Temporal and spatial control of gene expression in horticultural crops // *Horticulture Research*. 2014. Vol. 1. P. 14047.
465. Gil F., Brun A., Wigdorovitz A. et al: High-yield expression of a viral peptide vaccine in transgenic plants // *FEBS Letters*. 2001. Vol. 488. № 1-2. P. 13–17.
466. Dus Santos M.J., Wigdorovitz A., Trono K., Ríos R.D., Franzone P.M., Gil F., Moreno J., Carrillo C., Escribano J.M., Borca M.V. A novel methodology to develop a foot and mouth disease virus (FMDV) peptide-based vaccine in transgenic plants // *Vaccine*. 2002. Vol. 20. № 7-8. P. 1141–1147.

467. Dugdale B, Mortimer CL, Kato M, James TA, Harding RM, Dale JL. In plant activation: an inducible, hyperexpression platform for recombinant protein production in plants // *Plant Cell*. 2013. Vol. 25. № 7. P. 2429-2443.
468. Firsov A., Tarasenko I., Mitiouchkina T., Ismailova N., Shaloiko L., Vainstein A., Dolgov S. High-yield expression of M2e peptide of avian influenza virus H5N1 in transgenic duckweed plants // *Molecular Biotechnology*. 2015. Vol. 57. № 7. P. 653– 661.
469. Wigdorovitz A., Mozgovej M., Santos M.J.D., Parreño V., Gómez C., Pérez-Filgueira D.M., Trono K.G., Ríos R.D., Franzone P.M., Fernández F., Carrillo C., Babiuk L.A., Escribano J.M., Borca M.V. Protective lactogenic immunity conferred by an edible peptide vaccine to bovine rotavirus produced in transgenic plants // *Journal of General Virology*. 2004. Vol. 85. № Pt 7. P. 1825-1832.
470. Shim B.S., Choi Y.K., Yun C.H., Lee E.G., Jeon Y.S., Park S.M., et al. Sublingual immunization with M2-based vaccine induces broad protective immunity against influenza // *PLoS One*. 2011. Vol. 6. № 11. P. e27953.
471. Firsov A., Tarasenko I., Mitiouchkina T., Dolgov S. Expression of human Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) in transgenic duckweed (*Lemna minor* L) plants // *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*. 2018. Vol. 54. P. 107– 119.
472. Richter L.J., Thanavala Y., Arntzen C.J., Mason H.S. Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization // *Nature Biotechnology*. 2000. Vol. 18. № 11. P. 1167–1171.
473. Sharma A.K., Sharma M.K. Plants as bioreactors: recent developments and emerging opportunities // *Biotechnology Advances*. 2009. Vol. 27. № 6. P. 811–832.
474. Schiermeyer A., Schinkel H., Apel S., Fischer R., Schillberg S. Production of *Desmodus rotundus* salivary plasminogen activator a1 (DSPAa1) in tobacco is

- hampered by proteolysis // *Biotechnology and Bioengineering*. 2005. Vol. 89. № 7. P. 848–858.
475. Russell D.A., Spatola L.A., Dian T., Paradkar V.M., Dufield D.R., Carroll J.A., Schlittler M.R. Host limits to accurate human growth hormone production in multiple plant systems // *Biotechnology and Bioengineering*. 2005. Vol. 89. № 7. P. 775–782.
476. Outchkourov N.S., Rogelj B., Strukelj B., Jongsma M.A. Expression of sea anemone equistatin in potato. Effects of plant proteases on heterologous protein production // *Plant Physiology*. 2003. Vol. 133. № 1. P. 379–390.
477. Sharp J.M., Doran P.M. Characterization of monoclonal antibody fragments produced by plant cells // *Biotechnology and Bioengineering*. 2001. Vol. 73. № 5. P. 338–346.
478. Topilina N.I., Mills K.V. Recent advances in *in vivo* applications of intein-mediated protein splicing // *Mobile DNA*. 2014. Vol. 5. № 1. P. 5.
479. Khvatkov P., Firsov A., Shvedova A., Shaloiko L., Kozlov O., Chernobrovkina M., Pushin A., Tarasenko I., Chaban I., Dolgov S. Development of *Wolffia arrhiza* as a Producer for Recombinant Human Granulocyte Colony Stimulating Factor // *Frontiers in Chemistry*. 2018. Vol. 6. #304.
480. Khvatkov P., Firsov A., Mitiouchkina T., Chernobrovkina M., Dolgov S. Duckweeds for the Production of Therapeutic Proteins // In: *Exploring Plant Cells for the Production of Compounds of Interest*. Springer, Cham. 2021. DOI: 10.1007/978-3-030-58271-5_5