

на правах рукописи



Фирсов Алексей Петрович

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

Специальность 1.5.6. Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва-2026

Работа выполнена в Лаборатории экспрессионных систем и модификации генома растений Филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (Филиал ГНЦ ИБХ РАН)

Научный консультант: Долгов Сергей Владимирович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией экспрессионных систем и модификации генома растений, главный научный сотрудник, Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Официальные оппоненты:

Дейнеко Елена Викторовна, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник, лаборатория биоинженерии растений, отдел молекулярных биотехнологий, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

Матвеева Татьяна Валерьевна, доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник, профессор кафедры генетики и биотехнологии, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

Савченко Татьяна Викторовна, доктор биологических наук, доцент, главный научный сотрудник, лаборатория фотосинтетического окисления воды, Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

Ведущая организация: Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

Защита состоится 19 октября 2026 г. в 11-00 на заседании диссертационного совета 24.1.016.01 (Д 006.027.01), на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ) по адресу 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 42, тел. +7(499)976-65-44.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке института и на официальном сайте ФГБНУ ВНИИСБ <http://www.vniisb.ru/ru/council/>

Автореферат разослан _____ 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Дудников Максим Васильевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 компартментализации 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 M2е вируса гриппа птиц H5N1 без слияния не экспрессировался, в то время как слияние пептида M2е с β -глюкуронидазой или с субъединицей В рицина вело к его стабильному накоплению в растениях. Накопление пептида M2е 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 M2е. Установлено, что накопление слитого белка M2е - RTB не зависело от его компартментализации.

6. Впервые получены стабильно трансформированные растения ряски малой, экспрессирующие пептид M2е, слитый с RTB. Оральная иммунизация мышей препаратами белка трансгенных растений ряски, содержащими RTB - M2е, вызывала индукцию специфических к M2е антител. Иммунизация мышей слитым белком RTB - M2е вызывала существенно более сильную индукцию анти-M2е 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. Использованные 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.

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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Результаты и обсуждение

1. Влияние на накопление рекомбинантных белков их локализации в гетерологичных растениях - продуцентах.

Для изучения влияния типа органа, компартментализации и локализации в апопластном пространстве на накопление рекомбинантных белков в гетерологичных растениях нами был выбран сверхслабкий белок индустриального назначения тауматин II.

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

Первым этапом 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 тауматина II, которые в зависимости от структуры белковой последовательности обеспечивали накопление рекомбинантного тауматина в различных компартментах клетки (рис. 1).

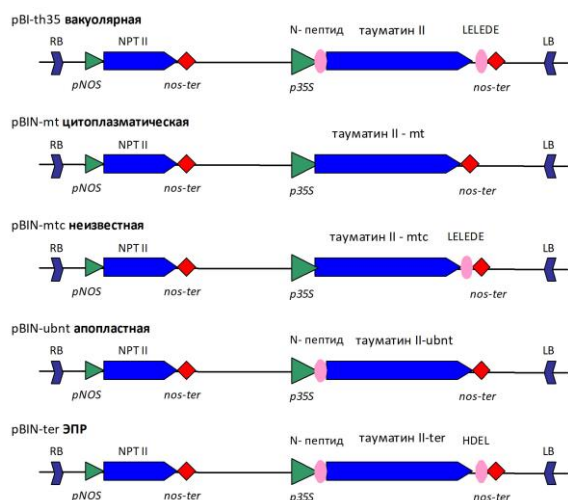


Рис. 1. Структура векторов, использованных в исследованиях по изучению влияния компартментализации на накопление рекомбинантного тауматина в трансгенных растениях табака.

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. Указана предполагаемая внутриклеточная локализация рекомбинантного тауматина.

В результате агробактериальной трансформации было получено по 11 (трансформация векторами pBI-th35, pBIN-ter и pBIN-ubnt) или по 12 (вектора pBIN-mt и pBIN-mtc) трансгенных линий табака со вставкой целевой нуклеотидной последовательности (подтверждено методом ПЦР- анализа ДНК канамициноустойчивых линий). После укоренения трансгенные растения табака были высажены в теплицу, где они культивировались до проведения последующих экспериментов.

Анализ экспрессии тауматина II в трансгенных растениях проводили методом Вестерн блот- анализа. В растениях табака, трансформированных вектором pBIN-mt, тауматин не детектировался. В трансгенных растениях, трансформированных вектором pBIN-mtc (сохранён C- 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. В растениях, трансформированных векторами pBI-th35, pBIN-ter, pBIN-ubnt рекомбинантный тауматин накапливался в большинстве изученных линий (рис. 2). Тауматин детектировался на уровне около 22 кДа и мигрировал на одном уровне со зрелым тауматином (22,4 кДа, рис. 2). Это указывало на отщепление N- терминального сигнального пептида и, следовательно, на корректный процессинг предшественника тауматина в растениях табака. Листья трансгенных растений характеризовались отчётливо выраженным сладким вкусом с характерным для тауматина послевкусием, что также подтверждает нормальный процессинг тауматина в трансгенных растениях.

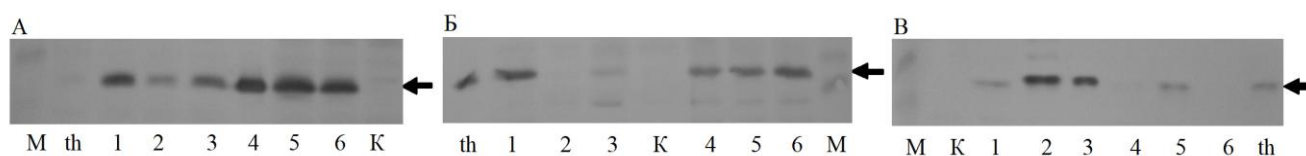


Рис. 2. Вестерн блот анализ экспрессии тауматина II в некоторых трансгенных линиях табака. **А.** Растения, трансформированные вектором pBI-th35. **Б.** Растения, трансформированные вектором pBIN-ter. **В.** Растения, трансформированные вектором pBIN-ubnt. Цифрами обозначены различные линии трансгенных растений. М- маркер молекулярной массы, th- тауматин (25 нг, «Sigma», США), К- нетрансгенное растение. Стрелкой показана полоса, соответствующая тауматину.

В среднем, накопление тауматина в линиях трансформированных вектором pBI-th35 составило 0,61% от ОРБ, вектором pBIN-ter- 0,64%, pBIN-ubnt- 0,28% (рис. 3, А). Различия между вариантами pBI-th35 и pBIN-ter не были статистически достоверными. В тоже время удаление C- 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 растений, трансформированных 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.

Методом Вестерн блот анализа было подтверждено, что рекомбинантный тауматин в растениях линий ubnt накапливался, главным образом, в апопластном пространстве; в тоже

время, тауматин в апопластном пространстве контрольных растений линий th35 и ter ожидаемо не детектировался (рис. 3, Б). Важно отметить, что нами не было детектировано признаков деградации рекомбинантного тауматина при его локализации в апопластном пространстве. Исходя из данных денситометрического анализа, более 90% рекомбинантного тауматина детектировалось в апопласте листовой ткани, т.е. в трансгенных линиях ubnt транспорт рекомбинантного тауматина в межклеточное пространство происходил с высокой эффективностью и рекомбинантный тауматин накапливался, главным образом, в межклеточной жидкости.

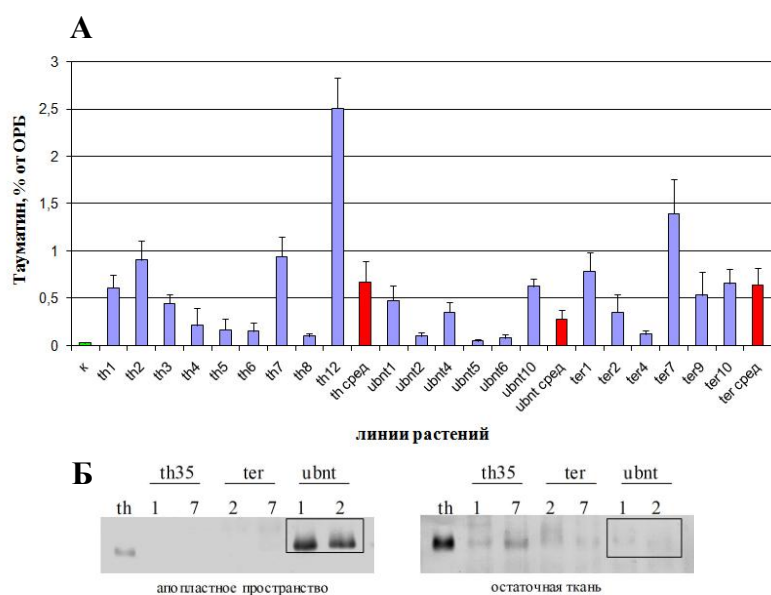


Рис. 3. **А.** Накопление рекомбинантного тауматина в трансгенных растениях табака, трансформированных векторами pBI-th35, pBIN-ubnt и pBIN-ter.

Б. Вестерн блот анализ распределения рекомбинантного тауматина II в листовой ткани трансгенных растений табака.

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

В результате данного этапа исследований было показано, что максимальное накопление рекомбинантного тауматина наблюдалось в трансгенных растениях табака, трансформированных геном тауматина в препроформе, с собственными N- и С- концевыми пептидами. Исходя из этих данных, для разработки экспрессионной системы в дальнейших экспериментах был использован вектор pBI-th35.

1.2. Влияние типа органа на накопление рекомбинантного тауматина II в трансгенных томатах.

1.2.1. Накопление тауматина II в листьях томата.

Растения томата Ялф были трансформированы геном тауматина II в составе вектора pBI-th35. В результате агробактериальной трансформации было получено 17 линий томатов, каждая

результат независимого трансформационного события. После подтверждения трансгенного статуса, трансформанты были высажены в теплицу для дальнейшего роста и изучения. Органолептический анализ листьев трансгенных линий томата выявил присутствие сладкого вкуса, характерного для тауматина, в большинстве проанализированных линий, в некоторых линиях сладкий вкус детектировался на слабом уровне или не детектировался вовсе (табл. 1).

Табл. 1. Накопление рекомбинантного тауматина II в листьях трансгенных растениях томата.

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

Методом ИФА была проведена оценка содержания рекомбинантного тауматина II в листьях трансгенных растений. В результате исследований было показано, что в 11 из 14 изученных линий наблюдалось накопление рекомбинантного тауматина II, в трех линиях тауматин II не детектировался. В трансгенных линиях наблюдались различные уровни накопления тауматина, в диапазоне от 0,007% (линия T140) до 0,17% (линия T157) от ОРБ. В остальных изученных линиях накопление тауматина было ниже и варьировало в диапазоне 0,01-0,06% от ОРБ (табл. 1).

Результаты органолептического анализа листьев хорошо коррелировали с накоплением рекомбинантного тауматина. В линиях, не экспрессирующих тауматин, а также в линиях с низким уровнем его накопления, 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 этого белка.

1.2.2. Анализ накопления тауматина II в плодах трансгенных растений томата.

Количественная оценка содержания тауматина в зрелых плодах томата была выполнена методом иммуноферментного анализа (рис. 4, А). 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 наблюдалась 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). Экспрессия рекомбинантного тауматина II в плодах томата и его корректный процессинг были дополнительно подтверждены методом Вестерн блот анализа (рис. 4, Б). Важно отметить отсутствие признаков деградации рекомбинантного тауматина, что подтверждает его стабильность в плодах томата.

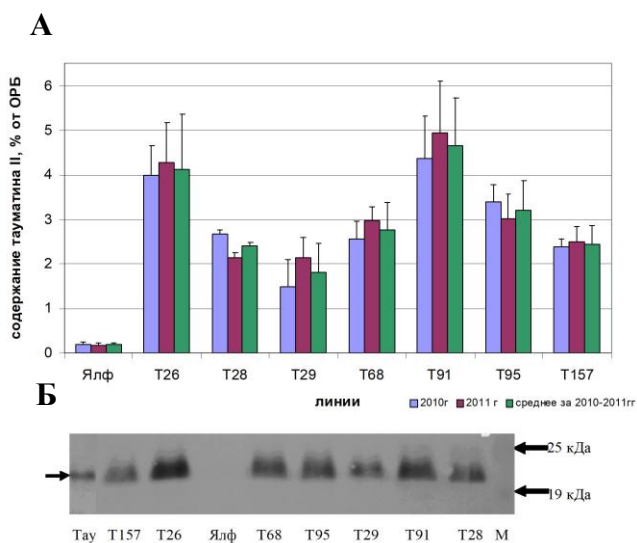


Рис. 4. **А.** Анализ содержания рекомбинантного тауматина II в плодах трансгенных линий томата методом ИФА. T26-T157 - различные трансгенные линии. Представлены результаты измерений за два года, а также их среднее.

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

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 (рис. 4, А). Полученные данные указывают на стабильный характер экспрессии гена тауматина II в трансгенных растениях томата.

Результаты органолептического анализа показывают, что плоды линий, трансформированных геном тауматина II, обладали заметно более сладким вкусом, чем плоды

нетрансгенных растений томата (табл. 2). Выраженность вкуса тауматина зависела от степени зрелости плодов. В зелёных плодах, диаметром 4-5см, 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 вполне отчетливо. 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. Таким образом, сладость плодов зависела, также, и от их зрелости. Полностью зрелые плоды характеризовались гораздо более выраженным сладким

Таблица 2. Органолептический анализ 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 выраженный сладкий вкус; 5- сильный сладкий вкус

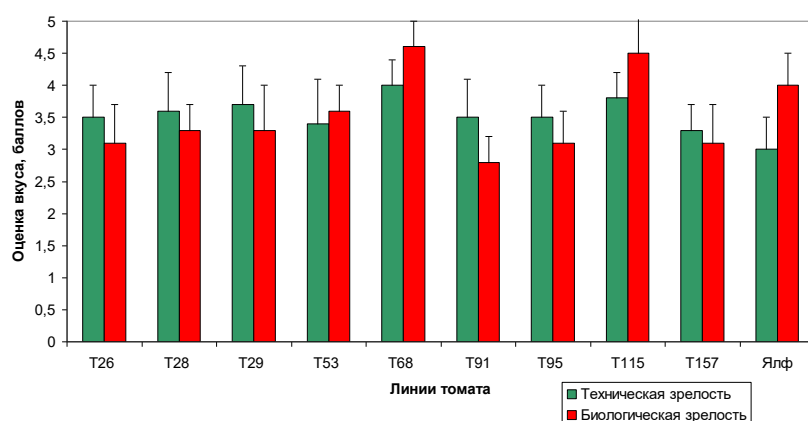


Рис. 5. Результаты оценки общего вкуса плодов трансгенных линий и нетрансформированных растений томата сорта Ялф. Представлены усреднённые данные за 3 года.

вкусом, чем плоды в состоянии технической зрелости, что позволяет предполагать возможность накопления рекомбинантного тауматина в плодах по мере их созревания и его высокую стабильность в тканях плодов томата.

Общий вкус зрелых плодов томата отличался от вкуса плодов нетрансгенных контрольных растений (рис. 5). Он оценивался испытателями как излишне сладкий и не характерный для томата. Длительное послевкусие, возникающее после употребления плодов, оценивалось всеми испытателями негативно. В целом, вкус зрелых томатов большинства изученных линий 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 плодов сорта Ялф. Особенно эти различия были заметны на стадии технической зрелости. На стадии биологической зрелости плоды этих линий оценивались как более сладкие, чем плоды сорта Ялф, при этом характерное для тауматина послевкусие было выражено незначительно.

Общий вкус плодов томатов трансгенных линий на стадии технической зрелости оценивался выше, чем вкус контрольных плодов сорта Ялф, хотя усиление сладости плодов на этой фазе их созревания было выражено незначительно. Это может быть связано со свойством тауматина выступать усилителем вкуса. 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. Важно отметить, что сбор плодов томата для потребления или переработки производится именно на стадии технической зрелости.

В результате исследований показано, что рекомбинантный тауматин накапливался в зрелых плодах томата на много более высоком уровне, чем в листьях. В плодах накапливалось в 25-100 раз больше тауматина, чем в тканях листа. Так, в плодах линии T26 накапливалось тауматина в 67 раз больше, чем в листьях, в плодах линии T91 - в 77 раз больше. Таким образом, плоды являются органом, оптимальным для накопления рекомбинантного тауматина II при его экспрессии в растениях томата.

В пересчете на сырой вес, содержание тауматина II в зрелых плодах линии 91 варьировало в диапазоне 61-154 мг/кг. Тауматин приблизительно в 3000 раз слаще сахарозы по весовому соотношению. Таким образом, 1кг плодов трансгенных томатов эквивалентен по сладости 180-460г сахара. Полученные в наших экспериментах линии трансгенных томатов 26 и 91, экспрессирующие более 40 мкг рекомбинантного белка / мг ОРБ, могут являться перспективными продуцентами этого сверхсладкого белка для нужд пищевой и фармацевтической отраслей промышленности.

1.3. Некоторые агрономические характеристики растений томата, трансформированных вектором pBI-th35.

Линии томата, трансформированные вектором pBI-th35, по своим морфологическим и ростовым характеристикам не отличались от нетрансформированных растений сорта Ялф (рис. 6). Трансгенные линии не отличались от исходного сорта по урожайности; за период исследований урожайность была стабильной и незначительно варьировала по годам. По срокам цветения и завязывания плодов, по их количеству и среднему весу, трансгенные и контрольные растения были идентичны друг другу. Плоды трансгенных линий нормально развивались, образуя по 20-30 выполненных всхожих семян. По срокам созревания плодов трансгенные и нетрансформированные растения, также, не различались.

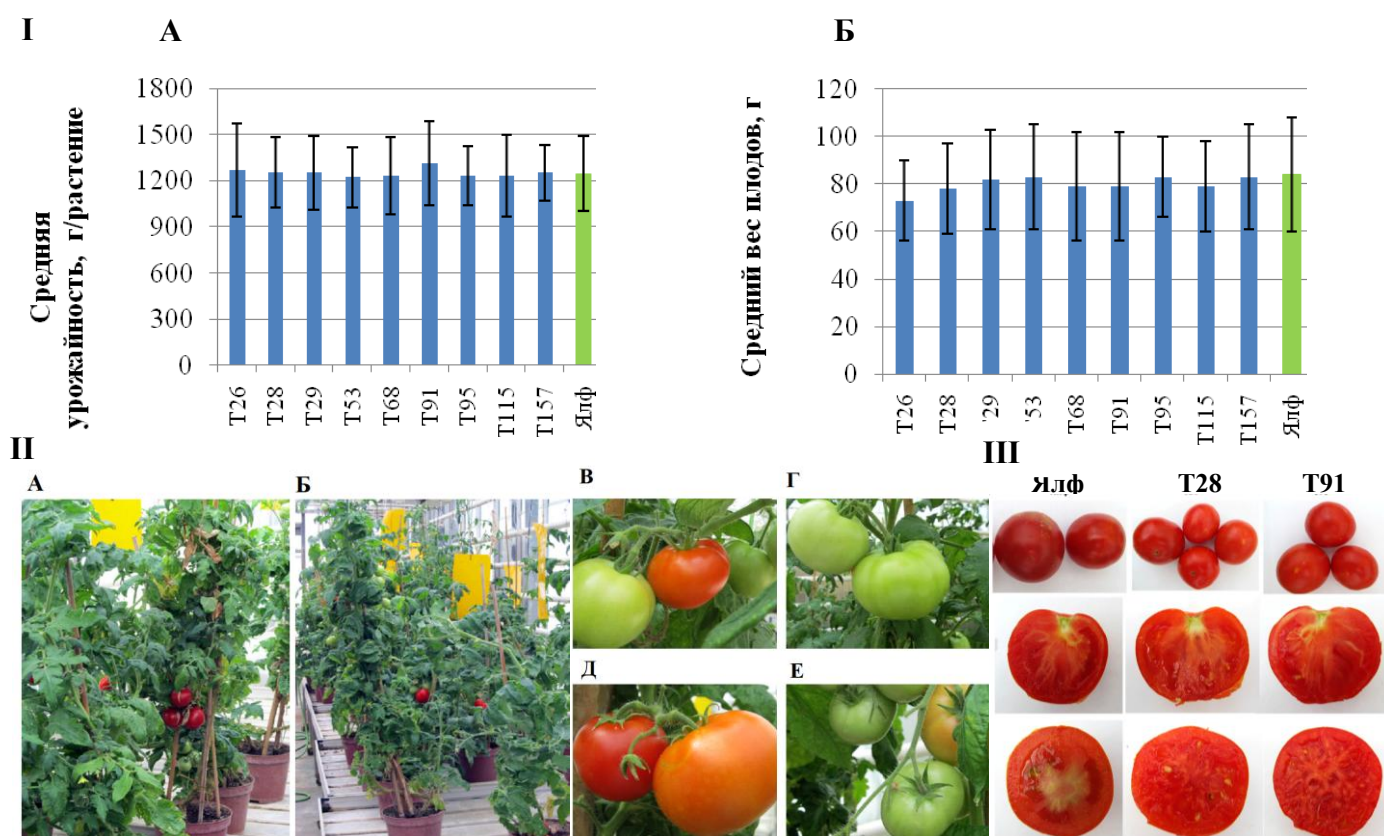


Рис. 6. Рост и плодоношение томатов в теплице. **I.** Средняя урожайность и вес плодов растений томата линии Ялф, трансформированных вектором pBI-th35. Представлены средние значения за 2 года. **II.** А. Трансгенные растения томатов линии Т91. Б. Нетрансформированные растения томатов сорта Ялф. В. Плоды нетрансформированных растений сорта Ялф. Г, Д, Е. Плоды трансгенных томатов линий Т91, Т95 и Т157, соответственно. Плоды различной степени зрелости. **III.** Плоды контрольных и трансгенных линий томата Т28 и Т91, трансформированные вектором pBI-th35.

Как PR- белок (Pathogenesis Related) тауматин является частью защитной системы растений и участвует в их защите от фитопатогенов, в частности, грибных. Установлено, что растения, трансформированные геном тауматина II, характеризуются повышенной устойчивостью к фитопфоре *Phytophthora infestans* и бактерии *Xanthomonas vesicatoria*. При искусственном заражении этими фитопатогенами, трансгенные растения продемонстрировали замедление развития симптомов поражения на 1-3 недели в зависимости от линии (Korneeva et al., 2008; 2011). В наших экспериментах, в силу регулярного проведения соответствующих защитных мероприятий, различий в устойчивости трансгенных и нетрансформированных растений к фитопатогенам в ходе их культивирования в теплице не наблюдалось. Таким образом, растения томата, трансформированные геном тауматина II, не отличались по основным агрономическим характеристикам от исходного сорта Ялф. Это позволяет использовать полученные линии как для проведения различных исследований, так и для целей практической селекции томата. Важно отметить, что полученный нами вектор pBI-th35 был успешно использован для трансформации других культур, в частности, гиацинта, для повышения его устойчивости к грибным фитопатогенам (Porowich et al., 2007).

1.4. Влияние локализации рекомбинантного тауматина II в апопластном пространстве на его накопление в растениях томата.

Для изучения влияния локализации рекомбинантного тауматина II в апопластном пространстве на уровень его накопления, мы трансформировали растения томата вектором pGD-It. Структура целевого гена была модифицирована путём замены N-концевого сигнального пептида тауматина на соответствующий пептид дефензина редьки *rs-afp2*. В последовательность химерного гена тауматина II была включена нуклеотидная последовательность первого интрона гена *rs-afp2*; последовательность, кодирующая C-концевой пропептид тауматина LELEDE была удалена (рис 7, А).

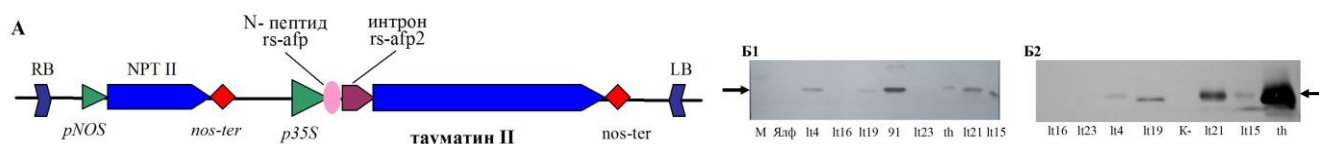


Рис. 7. А. Структура вектора pGD-It для накопления тауматина II в апопласте. N-пептид - N-концевой сигнальный пептид дефензина редьки *rs-afp2*; интрон *rs-afp2*- нуклеотидная последовательность первого интрона гена *rs-afp2*.

Б. Экспрессия тауматина в трансгенных растениях томата, трансформированных вектором pGD-It. Б1. Экспрессия тауматина в листьях томата. Б2. Экспрессия тауматина в плодах томата. It - трансгенные растения; К- - контрольное нетрансформированное растение, М- маркер молекулярной массы; th- тауматин (100 нг). 91- линия томата T91, трансформированная вектором pBI-th35. Стрелкой показана полоса, соответствующая тауматину.

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

Методом Вестерн блот- анализа показано, что в линиях, трансформированных вектором pGD-lt, тауматин детектировался в 4 линиях из 6 изученных. Рекомбинантный тауматин II был детектирован как в листьях трансгенных растения, так и в их плодах (рис. 7, Б). Исходя из данных Вестерн блот- анализа, максимальное накопление тауматина было показано в линии lt21. Рекомбинантный тауматин в растениях, трансформированных вектором pGD-lt, детектировался в виде полосы размером 22,4 кДа, мигрирующей на одном уровне со зрелым тауматином, это указывает на корректное отщепление N- концевое сигнального пептида дефензина *rs-afp2* в растениях томата. Для подтверждения транспорта рекомбинантного тауматина в апопласт, нами была определена его локализация в тканях листа растений; рекомбинантный тауматин детектировался большей частью в апопластной жидкости. Исходя из данных денситометрического анализа, в апопластное пространство транспортировалось более 60,0% рекомбинантного тауматина. Таким образом, транспорт рекомбинантного тауматина в апопластное пространство осуществлялся достаточно эффективно.

Табл. 3. Накопление тауматина II и результаты органолептического анализа плодов линий томата, трансформированных вектором pGD-lt (среднее за 2 года).

Линия	Накопление тауматина II, % от ОРБ			Сладость плодов* (Общая оценка вкуса, баллы**)		
	1 год	2 год	Среднее за 2 года	1 год	2 год	Среднее за 2 года
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)
lt23	н.д	н.д	н.д.	-	-	-
				(3,7±0,51)	(3,5±0,38)	(3,8±0,29)
lt16	н.д	н.д	н.д.	-	-	-
				(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.

Растения томата, трансформированные вектором pGD-lt, продемонстрировали более низкий уровень накопления рекомбинантного тауматина по сравнению с растениями, трансформированными вектором pBI-th35 (табл. 3). Максимальное накопление тауматина наблюдалось в линии lt21- $0,45 \pm 0,12\%$ ОРБ (среднее за период исследований), что соответствует $4,5 \pm 0,8$ мкг тауматина/мг общего растворимого белка. Как и в экспериментах с табаком, апопластная локализация тауматина вела к снижению его аккумуляции в трансгенных растениях томата. Таким образом, апопластное пространство является неоптимальным компартментом для накопления рекомбинантного тауматина.

Вкус плодов трансгенных линий в целом оценивался испытателями более высоко, чем вкус плодов нетрансгенных растений сорта Ялф. Выше всего, как наиболее сбалансированный и гармоничный, был оценен вкус плодов линии lt4 - 4,2 балла, которая характеризовалась наименьшим накоплением тауматина среди изученных линий. Вкус плодов растений линии lt21 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 экспрессирующих тауматин линий lt16 и lt23 оценивался на одном уровне со вкусом плодов нетрансгенных растений- 3,7-3,8 балла. Более высокая оценка вкуса плодов низкоэкспрессирующих линий связана, по-видимому, с более выраженным собственным вкусом плодов трансгенных линий, что обусловлено способностью тауматина действовать как усилитель вкуса.

1.4.1. Некоторые агрономические характеристики трансгенных растений томата, трансформированных вектором pGD-lt.

Растения томата, трансформированные вектором pGD-lt, существенно отличались от нетрансформированных растений или растений, трансформированных вектором pBI-th35. Эти различия заключались в резко сниженной урожайности, обусловленной уменьшением количества и веса плодов на растении (табл. 4).

Табл. 4. Урожайность и средний вес плодов растений томата сорта Ялф, трансформированных вектором pGD-lt (среднее за 2 года).

Линия	Урожайность, г/растение			Средний вес плодов, г		
	1 год	2 год	Среднее за 2 года	1 год	2 год	Среднее за 2 года
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, 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; линии lt16, трансформированной вектором pGD-lt, но не экспрессирующей тауматин- 70,5г (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 составляло 15-20 шт. В результате растения трансгенных линий lt характеризовались резко сниженной урожайностью по сравнению с сортом Ялф. Кроме того, важно отметить, что плоды томатов линий lt практически не образовывали семян. 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 сорта Ялф образовывалось по 15-30 семян, которые характеризовались нормальной всхожестью.

Высота растений серии lt была существенно ниже, чем нетрансгенных растений. Так, растения сорта Ялф достигали в первой декаде июля (после их обрезки во второй декаде марта) высоты 110 ± 21 см, а растения серии lt- 89 ± 24 см. Таким образом, линии томата, трансформированные вектором pGD-lt, 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.

1.5. Выделение и очистка рекомбинантного тауматина из плодов томата.

В экспериментах по выделению и очистке рекомбинантного тауматина из плодов томата была использована трансгенная линия T91. Для экстракции общего белка из плодов томата оптимальным оказался буфер I, содержащий 50 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, 5 мМ EDTA, 5 мМ 2-меркаптоэтанола (pH 7,6). Методом Вестерн блот анализа в белковых препаратах, полученных из плодов трансгенных растений, детектировалась полоса, соответствующая тауматину II.

Препараты общего белка, полученные из плодов томата, обессоливали на колонке с Сефадексом G25, уравновешенным 20 мМ аммоний-бикарбонатным буфером (pH 8,2) и лиофилизировали. Далее препараты растворяли в 20 мМ Na-фосфатном буфере (pH 6,8) и наносили на колонку с SP-Сефакрилом, уравновешенную 20 мМ Na-фосфатным буфером, pH 6,8. Белки, связавшиеся с SP-Сефакрилом, элюировали градиентом NaCl (0-200 мМ) в этом же буфере. Рекомбинантный тауматин элюировался с SP-Сефакрила в виде отчетливо выраженного пика. Вестерн блотт анализ хроматографических фракций показал присутствие полосы, соответствующей тауматину II во фракциях 11-17, максимальным содержание

тауматина было во фракциях 14 и 15 (рис. 8). Финальный выход рекомбинантного тауматина во фракциях 13-16 составил 5,4 мг/100г сырого веса плодов (табл. 5).

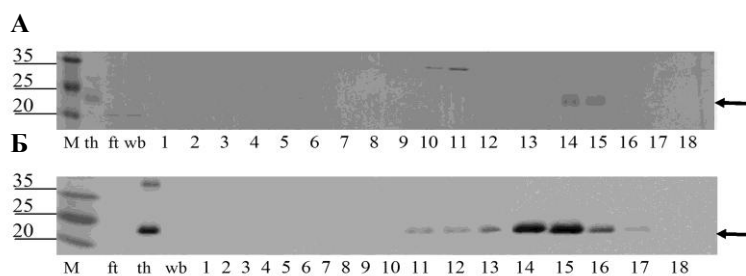


Рис. 8. Очистка рекомбинантного тауматина II при помощи ионно-обменной хроматографии на SP-Сефакриле. А и Б. Анализ полученных фракций методом электрофореза в СДС-ПААГ (А) и Вестерн блотта (Б).

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.

Табл. 5. 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. Определённая методом MALDI-MS анализа молекулярная масса тауматина, выделенного из плодов томата, составила 22145 Да. Расчетная масса тауматина, с учетом отщепления N- и C- концевых пептидов, и образования 8 дисульфидных связей, составляет 22142 Да. Полученные данные подтвердили корректный процессинг препратауматина в растениях томата, включая отщепление концевых сигнальных пептидов, и образование всех восьми дисульфидных связей. Помимо зрелого тауматина, MALDI-MS выявил присутствие в препарате минорных примесей с молекулярной массой 22250, 22344, 22550 Да. Наиболее вероятно, что эти примеси представляют собой различные недопроцессированные формы тауматина. Таким образом, данные MALDI-MS подтвердили идентичность тауматина II, полученного в растениях томата, натуральному. Результаты органолептического анализа продемонстрировали, что тауматин II из *T. daniellii* и рекомбинантный тауматин II, выделенный из плодов томата, по своим вкусовым характеристикам не отличались друг от друга и были полностью идентичными.

2. Влияние структуры рекомбинантного белка на экспрессию в растениях – продуцентах.

Изучение влияния структуры рекомбинантного белка, в том числе его слияния с различными белками – партнёрами, на его накопление в растениях мы проводили на примере пептида M2e вируса гриппа птиц H5N1 и гирудина 2.

2.1. Экспрессия пептида M2e в трансгенных растениях табака в составе аминокислотного фрагмента 1 - 43 а.о. белка M2 вируса гриппа птиц H5N1.

Для экспрессии в трансгенных растениях был выбран аминокислотный фрагмент белка M2 вируса гриппа птиц A/Chicken/Kurgan/5/05 H5N1 (GenBank DQ449633.1) длиной 43 аминокислотных остатка, включающий пептид M2e (1 - 22 а.о., фрагмент далее обозначен как M143). После обратной трансляции аминокислотной последовательности M143 и оптимизации её кодонного состава была получена нуклеотидная последовательность, представленная на рисунке 9. Синтетическая последовательность M143 была клонирована в вектор pBI121 вместо гена β-глюкуронидазы под контролем промотора 35S вируса мозаики цветной капусты. Полученная плазмида, обозначенная как pBIM2, была использована для трансформации табака.

В результате агробактериальной трансформации было получено 15 трансгенных линий, содержащих вставку целевого фрагмента M143. Для проведения ОТ-ПЦР анализа были использованы трансгенные растения, культивируемые в теплице в течение двух месяцев. Амплификация фрагментов ожидаемого размера была показана во всех изученных линиях, что указывало на транскрипцию последовательности M143. При этом накопления пептида M143 в тканях листа трансгенных растений методом Вестерн блот анализа не было выявлено. Таким образом, пептид M143 без слияния с белком-партнёром в трансгенных растениях не экспрессировался.

А. **MSLLTEVETPTR**NEWECRCSDD**PLVVAASHGILHLILWIL**
Б. CTGATCTGCAGATG**TCCTCCTCACTGAAGTCGAACTCCTACTAGAAA**
TGAATGGGAGTGCAGATGCTGTGATTCAGCGACCCCTGGTGGTGGC
GGCGTCCATCATCGGCATCCTGCATCTCATCCTCTGGATCCTC

Рис. 9. Аминокислотная (А) и нуклеотидная (Б) последовательности аминокислотного участка белка M2 (фрагмент M143) с оптимизированным для экспрессии в растениях ряска кодон-

ным составом. Подчеркнуты сайты рестрикции *Pst*I и *Bam*HI, использованные для клонирования, красным шрифтом показан антигенный эпитоп пептида M2e, синим – трансмембранный домен.

2.2. Экспрессия рекомбинантного гирудина в трансгенных растениях ряски.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая гирудин, с оптимизированным для экспрессии в ряске кодонным составом была клонирована в вектор pBI121 вместо гена β -глюкуронидазы (результатирующий вектор pBI121-hir, рис. 10). В результате трансформации ряски вектором pBI121-hir были получены 8 независимых линий трансгенных растений.

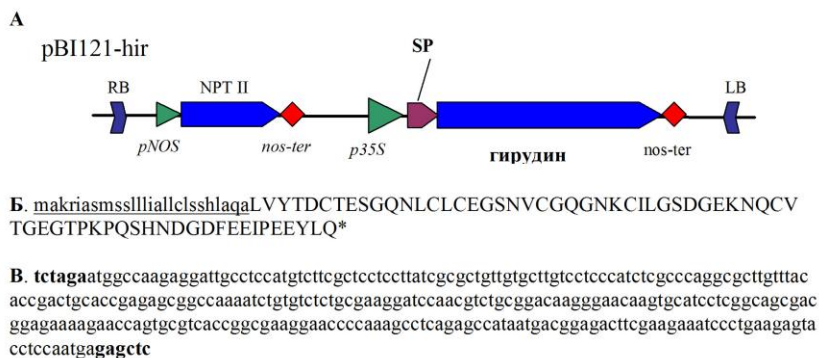


Рис. 10. Экспрессионный вектор pBI121-hir. **А** – Структура экспрессионной кассеты вектора pBI121-hir. SP – N-концевой сигнальный пептид α -амилазы риса; RB и LB – правый и левый граничные повторы Т-ДНК; pNOS и nos-ter – промотор и терминатор гена нопалинсинтазы,

соответственно; NPTII – ген неомифосфотрансферазы II; p35S – 35S промотор вируса мозаики цветной капусты; **Б** – аминокислотная последовательность гирудина; подчеркнута последовательность сигнального пептида α -амилазы риса. **В** – нуклеотидная последовательность гирудина после оптимизации кодонного состава, длина последовательности – 276 п.н.

ОТ-ПЦР анализ трансгенных растений ряски продемонстрировал амплификацию фрагментов кДНК гирудина ожидаемой длины (рис. 11, А). Полученные данные подтвердили транскрипцию гена гирудина в трансгенных растениях всех полученных линий. Количественная оценка накопления рекомбинантного гирудина в трансгенных линиях была выполнена с использованием иммуноферментного анализа (рис. 11, Б). Присутствие гирудина было детектировано в трех линиях (h3, h4 и h5) из восьми изученных. В остальных пяти линиях рекомбинантный гирудин не детектировался.

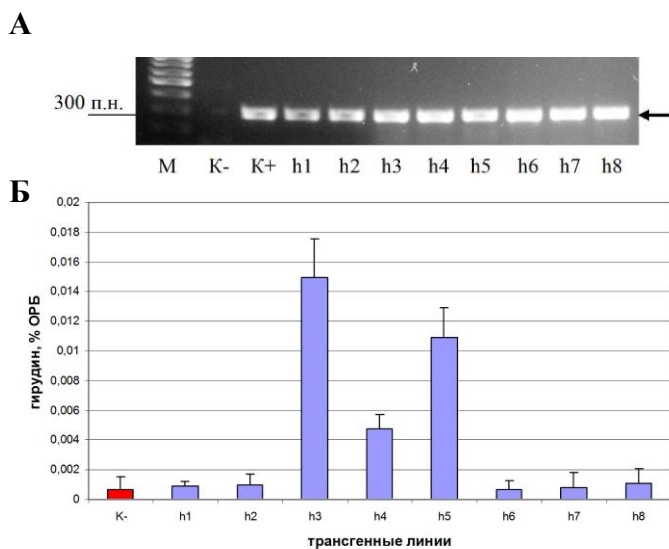


Рис. 11. **А.** ОТ-ПЦР анализ транскрипции гена гирудина в трансгенных растениях ряски. h1–h8 – различные трансгенные линии. М – маркер молекулярной массы ДНК; К– – РНК нетрансформированного растения; К+ – ДНК вектора pBI121-hir. Стрелкой показан амплифицируемый фрагмент нуклеотидной последовательности гирудина.

Б. Результаты иммуноферментного анализа экспрессии рекомбинантного гирудина в растениях ряски, трансформированных вектором pBI121-hir. h1–h8 – различные трансгенные линии; (К–) – нетрансформированные растения ряски.

Максимальное накопление гирудина наблюдалось в линиях h3 и h5 ($0,015 \pm 0,003$ и $0,011 \pm 0,002\%$ ОРБ, соответственно). В линии h4 накопление гирудина было ниже – $0,005 \pm 0,001\%$ ОРБ. Исходя из содержания общего растворимого белка в трансгенных линиях ряски, в линии h3 накопление рекомбинантного гирудина составило 2,1 мкг/г сырой массы, линии h5 – 1,3 мкг/г. Исходя из имеющихся литературных данных, такой уровень накопления является типичным при экспрессии в растениях рекомбинантных пептидов (Yevtushenko et al., 2012; Holaskova et al., 2015). По-видимому, невысокий уровень накопления гирудина является следствием его нестабильности в растениях ряски, в частности, результатом деградации под воздействием растительных протеолитических ферментов. Возможно, условия апопластного пространства ряски, включая его протеолитический фон, не являются оптимальными для накопления рекомбинантного гирудина. Мы предполагаем, что уровень накопления гирудина может быть повышен путем его локализации в других, более подходящих, компартментах клетки, например, в эндоплазматическом ретикулуме, или путем экспрессии в составе более стабильного слитого белка.

2.3. Экспрессия пептида M2е вируса гриппа птиц в трансгенных растениях.

2.3.1. Экспрессия слитых белков M143-, M122- и M130-β-глюкуронидаза в трансгенных растениях табака.

Для экспрессии пептида M143 в трансгенных растениях в качестве белка-партнёра для слияния нами была выбрана β-глюкуронидаза - гидролаза, катализирующая расщепление многочисленных β-глюкуронидов. Ген β-глюкуронидазы (GUS) детально изучен и широко используется в генетической инженерии растений. В β-глюкуронидаза не оказывает токсического эффекта и может быть легко детектирована различными методами, что существенно для анализа экспрессии слитых белков в растениях.

Синтетическая последовательность M143 была клонирована в вектор pBI121 в слиянии с 5'- концом гена β-глюкуронидазы. Результирующая плазида, обозначенная как pBIM143, была использована в дальнейших исследованиях (рис. 12).

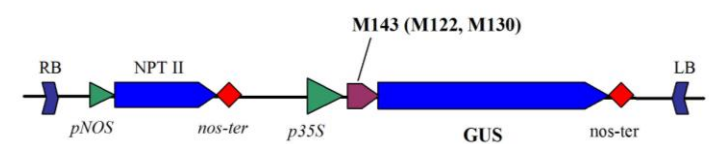


Рис. 12. Структура векторов pBIM143, pBIM130 и pBIM122. M143, M122 и M130 - фрагменты белка M2, включающие пептид M2е, с оптимизированным для

экспрессии в растениях ряски кодонным составом, длиной 43, 22 и 30 а.о., соответственно; 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 агробактериальной трансформации табака вектором pBIM143 было получено 11 линий трансгенных растений. Линии трансгенного табака, содержащие слитую последовательность M143- β -глюкуронидазы были адаптированы к условиям *in vivo* и далее культивировались в теплице. Через 3 недели роста в теплице высечки из листовых пластинок трансгенных растений были проанализированы на наличие активности β -глюкуронидазы. Степень окрашивания высечек из растений различных линий варьировала от интенсивной до очень слабой. Через 6 месяцев культивирования в теплице трансгенные растения табака были еще раз проанализированы методом гистохимического окрашивания. В результате этого анализа было показано отсутствие окрашивания высечек из листьев растений всех трансгенных линий. Вестерн-блот анализ препаратов общего белка трансгенных растений, с использованием антител против β -глюкуронидазы, также подтвердил отсутствие этого белка в изученных линиях. Таким образом, было показано, что после 6 месяцев культивирования в теплице растений табака, трансформированных вектором pBIM143, слитый белок M143- β -глюкуронида в их тканях не детектировался. Мы предполагаем, что на затухание синтеза белка M143- β -глюкуронида в трансгенных растениях могло повлиять наличие внутримембранного гидрофобного домена белка M2 (25-43 а.о.) в пептиде M143.

Исходя из полученных результатов, нами были клонированы укороченные варианты последовательности M143, кодирующие пептиды с частично или полностью удаленным трансмембранным доменом - последовательность M130 (длина 30 а.о.) и последовательность M122 (длина 22 а.о.). Последовательности M130 и M122 были клонированы в вектор pBI121 в слиянии с 5'-концом гена β -глюкуронидазы аналогично последовательности M143. Полученные векторы, обозначенные далее как pBIM130 и pBIM122, были использованы для агробактериальной трансформации растений табака (рис. 12). В результате трансформации растений табака векторами pBIM130 и pBIM122 было получено 14 и 13 независимых трансгенных линий, соответственно. После 6 месяцев культивирования в теплице трансгенные растения табака были проанализированы на активность β -глюкуронидазы. Было показано, что активность β -глюкуронидазы детектировалась во всех полученных линиях.

Дальнейшие исследования проводили с использованием линий трансгенных растений, которые продемонстрировали наиболее быстрое и интенсивное гистохимическое окрашивание. Вестерн блот анализ препаратов ОРБ, выделенного из листьев трансгенных растений этих линий, с использованием антител к β -глюкуронидазе продемонстрировал присутствие во всех изученных образцах белковых полос молекулярной массой около 74кДа, что соответствовало ожидаемому размеру слитых белков M130- β -глюкуронидаза и M122- β -глюкуронидаза (рис. 13). Вестерн-блот анализ препаратов трансгенных растений с использованием антител к пептиду M2e подтвердил его присутствие в составе слитых белков. Масса узнаваемых антителами

белков составляла около 74 кДа и соответствовала полосам, детектируемым с помощью антител к β -глюкуронидазе.

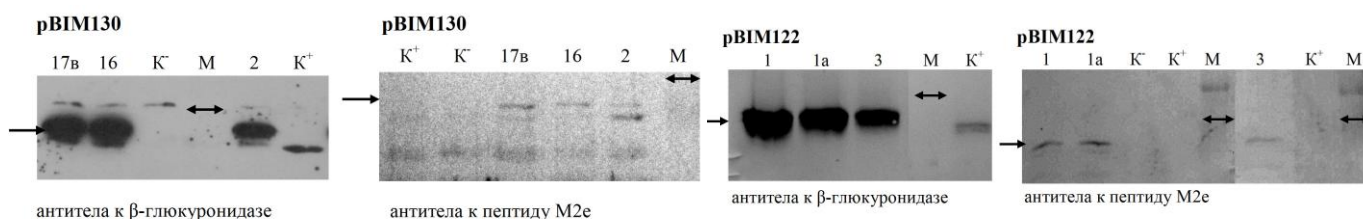


Рис. 13. Вестерн-блот анализ растений табака, трансформированных векторами pBIM130 и pBIM122. Цифрами обозначены линии трансгенных растений; K^- - нетрансформированное растение; K^+ - растения табака, трансформированные вектором pBIM121; М- маркер молекулярной массы белков. Стрелкой $\leftrightarrow$ обозначена полоса маркера, соответствующая 85 кДа. Стрелкой указаны слитые белки М130- β -глюкуронидаза (размер 74 кДа) и М122- β -глюкуронидаза (размер 73,1 кДа).

Данные Вестерн-блот анализа подтвердили экспрессию фрагментов гена М2 вируса гриппа птиц в слиянии с β -глюкуронидазой в трансгенных растениях табака. Пептид М2е стабильно синтезировался в составе слитого белка в виде фрагментов длиной 30 а.о. (вариант М130) и 22 а.о. (вариант М122), включающего только последовательность М2е; эти варианты не различались между собой по уровню экспрессии. Слитые белки М122- β -глюкуронидаза и М130- β -глюкуронидаза детектировались в виде одной полосы, что, учитывая конечное расположение аминокислотных последовательностей, узнаваемых использованными антителами (антитела к β -глюкуронидазе были получены на С- концевой участок этого белка), указывает на отсутствие заметной деградации целевых белков. В варианте М130 присутствовал фрагмент трансмембранного домена длиной 6 а.о. (PLVVAA), однако он не оказывал заметного влияния на уровень и стабильность экспрессии слитого белка М130- β -глюкуронидаза. Исходя из полученных результатов, для дальнейших исследований был выбран N- концевой участок белка М2, длиной 30 аминокислотных остатков (вариант М130).

2.3.2. Получение и анализ экспрессии слитого белка М130- субъединица В рицина в трансгенных растениях табака.

Для использования в качестве орального адъюванта нами была клонирована нуклеотидная последовательность субъединицы В рицина (RTB) длиной 786 п.н., в качестве матрицы была использована геномная ДНК, выделенная из листьев местного сорта клещевины.

Клонированная последовательность полностью соответствовала последовательностям RTB, представленным в базе данных GenBank. На данном этапе работы нами предполагалось использование аффинной хроматографии на хитинсодержащих носителях для частичной очистки целевого белка из растительного экстракта. Выбор хитинсодержащих носителей был обусловлен их относительно низкой стоимостью. В качестве аффинной метки был выбран хитинсвязывающий домен (CBD) из хитиназы A1 *Bacillus circulans*.

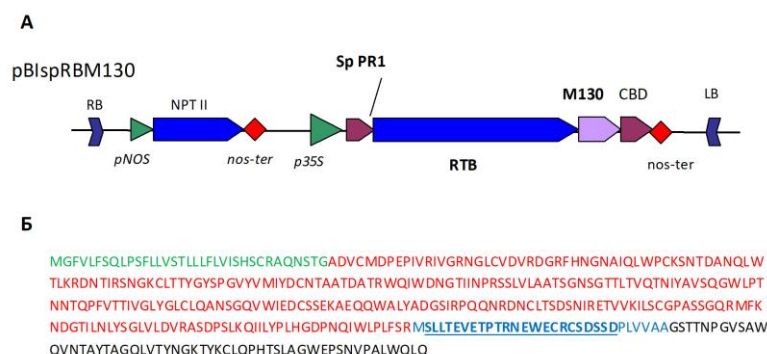


Рис. 14. Вектор для трансформации растений pBIspRBM130 (А) и аминокислотная последовательность слитого белка spPR1a-RTB-M130-CBD (Б). Цветом выделены фрагменты целевого белка: зеленым- сигнальный пептид белка PR1a табака (spPR1); красным- субъединица В рицина (RTB);

синим- последовательность M130 (M1-30 а.а.); черным- хитинсвязывающий домен (CBD). Подчеркнут пептид M2е. NPT II - ген неомицинфосфотрансферазы 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*.

Нами был сконструирован вектор pBIspRBM130, содержащий слитую последовательность N- концевого сигнального пептида PR1a (sp)-субъединицы В рицина (RTB)-5'фрагмента гена M2 (M130)-хитинсвязывающего домена (CBD) (рис. 14). Вектор pBIspRBM130 был перенесен в *A. tumefaciens* CBE 21. В результате трансформации табака вектором pBIspRBM130 было получено 8 линий трансгенных растений, содержащих вставку нуклеотидной последовательности spPR1a-RTB-M130-CBD длиной 1152 п.н. (далее- RTB-M130).

Анализ экспрессии слитой последовательности RTB-M130 в растениях табака был проведен после трех месяцев культивирования трансгенных линий в теплице. Результаты анализа белковых препаратов трансгенных растений с помощью асиалофетуин-связывающей ELISA представлены на рис. 15. Полученные результаты свидетельствовали о экспрессии целевой последовательности и о корректном процессинге рекомбинантной субъединицы В рицина в составе целевого белка в четырёх линиях трансгенных растений. При использовании антител к пептиду M2е, присутствие последовательности M130 в составе слитого белка было подтверждено в двух линиях трансгенных растений, sp3 и sp14 (рис. 15, Б).

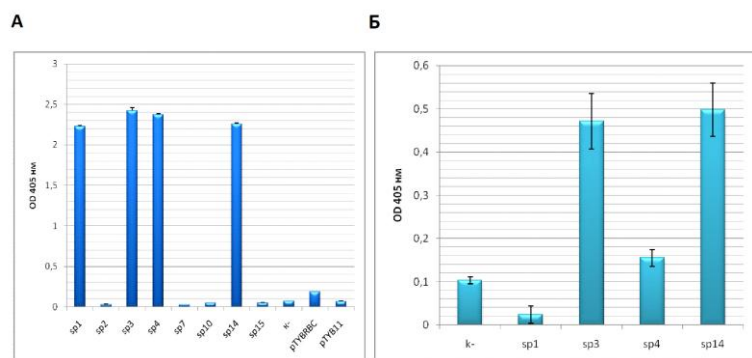


Рис. 15. Анализ экспрессии слитой последовательности RTB-M130 в трансгенных растениях табака с помощью асиалофетуин-связанной ELISA с использованием антител к RTB (А) или к пептиду M2e (Б).

sp1-sp15 –линии трансгенных растений табака; K⁻ - препарат нетрансгенного растения табака; pTYB11- осветленный лизат клеток *E.coli* BL21(DE3), синтезирующих интеин; pTYBRBC-осветленный лизаты клеток *E.coli* BL21(DE3), экспрессирующих слитую последовательность интеин- RTB.

Количественная оценка содержания RTB в составе целевого белка в трансгенных растениях табака проводилась с использованием антител к субъединице В рицина. В линиях sp3 и sp14 накопление RTB составило 2,4 и 3,3 мкг на 1 грамм сырой массы листьев, что соответствовало 0,01 и 0,02% от содержания общего растворимого белка (табл. 6). Полученные результаты свидетельствуют о сопоставимой в сравнении с аналогичными работами экспрессии RTB в составе целевого белка в растениях табака (Reed et al., 2005; Choi et al., 2006; Woffenden et al., 2008).

Табл. 6. Накопление слитого белка RTB-M130 в различных линиях трансгенного табака, трансформированных вектором pBIspRBM130.

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±0,37	19,1±3,3	0,012±0,003
sp2	0,03±0,01	18,4±3,1	0,0002±0,0001
sp3	3,29±0,41	20,1±4,2	0,02±0,002
sp4	2,94±0,28	16,8±2,9	0,019±0,003
sp7	0,03±0,008	19,3±4,1	0,0001±0,0001
sp10	0,04±0,007	19,9±4,0	0,0001±0,0001
sp14	2,42±0,39	20,5±4,7	0,011±0,002
sp15	0,03±0,01	16,4±2,8	0,0002±0,0001
K-	0,00	18,5±3,6	0,00

Для дополнительного подтверждения экспрессии целевой последовательности RTB-M130 в трансгенных растениях, препараты общего белка были проанализированы методом Вестерн-блота с использованием антител к субъединице В рицина и пептиду M2e. При использовании антител к пептиду M2e было показано, что в двух линиях трансгенных растений табака, sp3 и sp14, детектируется белок размером около 80-82 кДа (Ожидаемый размер рекомбинантного белка RTB-M130 с учетом возможных вариантов гликозилирования – около 40 кДа.) (рис. 16, А). В других линиях, так же как и в нетрансгенном контроле, соответствующий белок не детектировался.

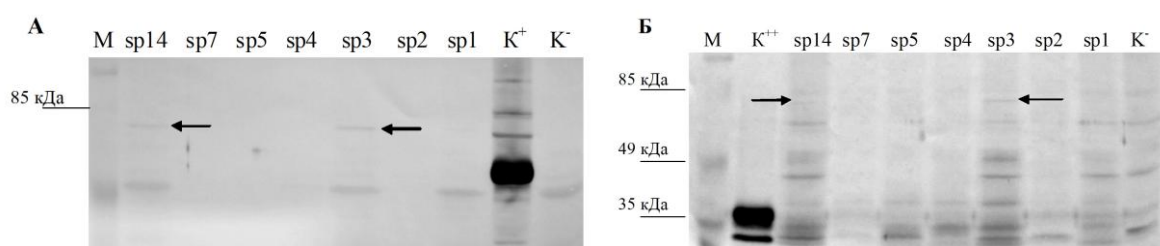


Рис. 16. Вестерн-блот анализ экспрессии слитого белка RTB-M130-CBD в трансгенных растениях табака. **А.** Использованы антитела к пептиду M2e. **Б.** Использованы антитела к RTB. sp1-sp14- линии трансгенных растений; K⁻ - препарат общего белка нетрансгенных растений; K⁺ - пептид M130, синтезированный в бактериальных клетках в слиянии с интеином; K⁺⁺ - рицин, выделенный из семян клещевины; М- маркер молекулярной массы белков. Стрелками указан слитой протеин RTB-M130-CBD (предполагаемый димер, размер около 80 кДа).

При использовании антител к субъединице В рицина, полосы, соответствующие белкам с молекулярным весом около 80 кДа, были, также, детектированы в линиях sp3 и sp14 (рис. 16, Б). Отсутствие четкого сигнала в других линиях может быть обусловлено как более низким содержанием целевого белка, так и его более быстрой деградацией в этих линиях.

Мы предположили, что слитый белок RTB-M130 экспрессировался в трансгенных растениях в виде димера. Для более детального изучения экспрессии целевого белка в трансгенных растениях была проведена частичная очистка препарата общего белка табака линии sp3 методом афинной 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 (рис. 17). Слитый белок детектировался как единичная полоса, без видимых признаков деградации.

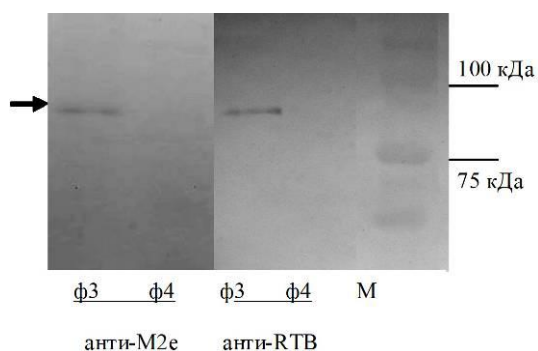


Рис. 17. Вестерн блот фракций, полученных после частичной очистки препарата общего белка табака линии sp3 методом аффинной хроматографии с использованием антител к пептиду M2e и к RTB. М- маркер молекулярной массы, стрелкой показан слитый белок RTB-M130. Ф3 и Ф4 – номера хроматографических фракций

В наших экспериментах слитый белок RTB-M130 детектировался, предположительно, в виде димера. При этом слитый белок RTB-M130, по результатам асиалофетуин-иммобилизованной ELISA, сохранял свою функциональную активность. Мы предположили, что димеризация (агрегирование) RTB не влияет на её способность связываться с галактозой в составе асиалофетуина и, по-видимому, на способность связываться с соответствующими клеточными рецепторами. Исходя из этого предположения, мы использовали вектор pBIspRBM130 и линии табака sp3 и sp14 в дальнейших исследованиях.

2.3.3. Влияние внутриклеточной локализации слитого белка M130- субъединица В рицина на его накопление в трансгенных растениях табака.

Одним из путей повышения экспрессии гетерологичных белков является их транспорт в компартменты клетки, оптимальные для их накопления. Нами было изучено влияние внутриклеточной компартментализации 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 (рис. 18). Полученными векторами были трансформированы листовые экспланты табака и успешно получены трансгенные растения.

Экспрессия слитого белка RTB-M130 с различными сигналами внутриклеточной локализации изучалась с помощью количественной асиалофетуин-связывающей ELISA. Среднее содержание функционально активного RTB в листовых тканях трансгенных линий, экспрессирующих RTB, составило: для линий, полученных после трансформации вектором pGDRTBap - $26,1 \pm 5,8$ нг/мг общего белка; вектором pGDRTBvac1 - $20,2 \pm 4,8$ нг/мг; pGDRTBvac3 - $25,7 \pm 6,2$ нг/мг и вектором pGDRTBer - $24,3 \pm 5,6$ нг/мг общего белка (рис. 19). Это соответствовало 0,020-0,026% субъединицы В рицина в общем растворимом белке.

Различия по среднему содержанию RTB между этими вариантами были статистически не достоверны. Необходимо отметить, что в растениях, трансформированных вектором pGDRTBvac3, ни в одной из изученных линий экспрессия RTB не была детектирована в семенах. Добавление в слитый белок линкерного пептида рицина не привело к возрастанию экспрессии RTB.

локализация

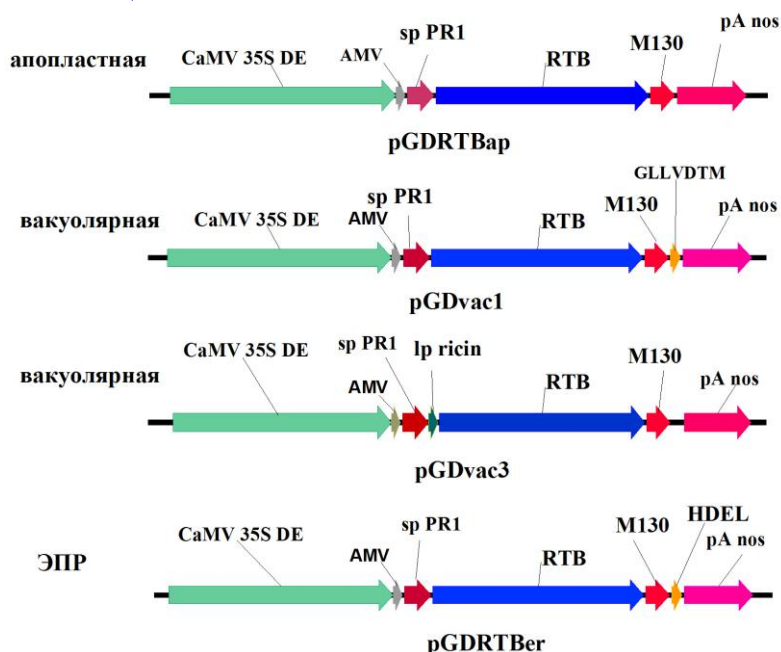


Рис. 18. Структура гена слитого белка RTB-M130 с различной внутриклеточной локализацией в векторах серии pGD, использованных для трансформации табака. RTB - субъединица В рицина; CaMV 35S DE - двойной энхансированный 35S промотор вируса мозаики цветной капусты CaMV; AMV - энхансер AMV RNA4 вируса мозаики люцерны; pA nos - терминатор гена нопалин-синтазы *A. tumefaciens*;

Lp ricin - линкерный пептид рицина (SLLIRPVVPNFN), GLLVDTM - C- концевой сигнал вакуолярного сортирования хитиназы А табака; spPR1a - N- концевой сигнальный пептид белка PR1 табака.

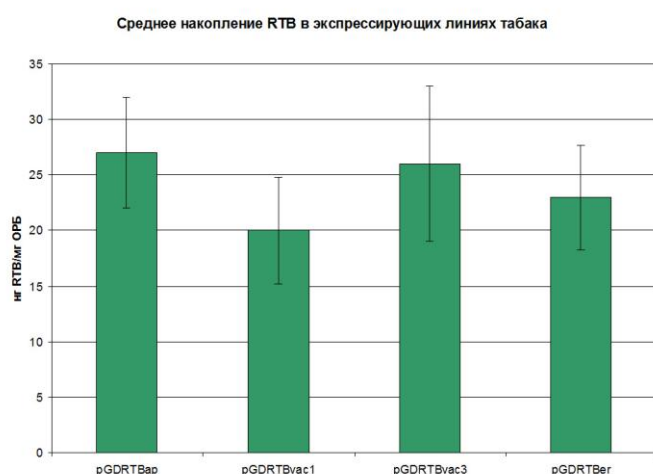


Рис. 19. Накопление субъединицы В рицина в трансгенных растениях табака при его различной внутриклеточной локализации. pGDRTBap - локализация RTB в апопластном пространстве; pGDvac1 - вакуолярная локализация, сигнал вакуолярного сортирования хитиназы А табака; pGDvac3 - запасующие вакуоли, линкерный пептид рицина; pGDRTBer - локализация в ЭПР клетки.

Таким образом, 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, в частности с деградацией RTB на самых ранних этапах его секреторного пути (Chamberlain et al., 2008; Barbier et al., 2012; Spooner et al., 2015; Sowa-Rogozńska et al., 2019). Исходя из того, что уровень экспрессии RTB не зависел от его внутриклеточной локализации, для дальнейших экспериментов нами был выбран вектор с апопластной локализацией целевого белка.

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

Ряска малая была трансформирована вектором pBI121, содержащим ген β -глюкуронидазы под контролем 35S промотора CaMV. В результате были получены 7 независимых трансгенных линий, присутствие нуклеотидной последовательности β -глюкуронидазы в геноме растений было подтверждено методом ПЦР. После 2 мес. роста на жидкой среде, трансгенные растения были проанализированы методом гистохимического окрашивания на наличие активности β -глюкуронидазы. Все трансгенные линии продемонстрировали окрашивание (рис. 20, А). Интенсивность окрашивания варьировала от слабой бледно-голубой, до темно-синей, почти черной. Трансгенные фронды были окрашены по всей поверхности, причем наиболее интенсивно окрашивались жилки и кармашек, что согласуется с тем фактом, что 35S промотор CaMV работает наиболее интенсивно в метаболически активных частях растения (Sunilkumar et al., 2002; Dutt et al., 2014).

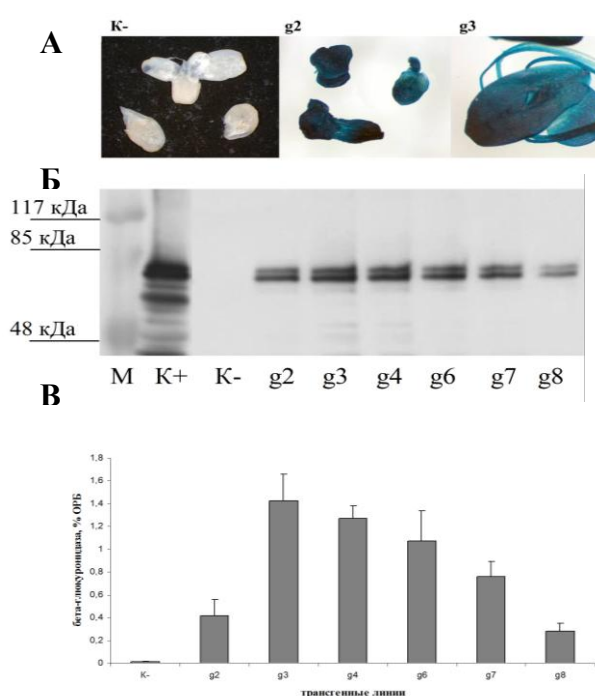


Рис. 20. Анализ экспрессии β -глюкуронидазы в различных линиях ряски: А – гистохимическое окрашивание растений; Б – вестерн-блот-анализ экспрессии β -глюкуронидазы; В – количественная оценка накопления β -глюкуронидазы. g2–g8 – различные трансгенные линии; К- – нетрансформированные растения ряски; К+ – β -глюкуронидаза, 40 нг; М – маркер молекулярной массы белков

Методом вестерн-блота в препаратах белка изученных линий было показано присутствие иммунореактивной белковой полосы с молекулярной массой около 70 кДа. Масса этой полосы соответствовала β -глюкуронидазе *E. coli* (рис. 20, Б). Таким образом, Вестерн-блот анализ подтвердил экспрессию β -глюкуронидазы во всех изученных линиях. Накопление β -глюкуронидазы варьировало в диапазоне от 0,28% до 1,43% ОРБ (рис. 20, В). Максимальное накопление рекомбинантной 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 по уровню накопления β -глюкуронидазы занимали промежуточное положение.

В растениях, трансформированных вектором pBI121, наблюдался высокий уровень накопления рекомбинантной β -глюкуронидазы – до 1,4% ОРБ в линии g3, что соответствует 120 мг рекомбинантного белка в 1кг сырой массы ряски. Таким образом, потенциальный уровень накопления рекомбинантных белков в растениях ряски является весьма высоким. Полученные в данных экспериментах результаты подтвердили перспективность использования ряски в исследованиях по разработке экспрессионных систем для получения различных рекомбинантных белков.

2.3.5. Экспрессия пептида M2e в трансгенных растениях ряски.

2.3.5.1. Экспрессия слитого гена M130- β -глюкуронидаза в трансгенных растениях ряски.

В результате трансформации ряски малой вектором pBIM130 было получено 115 линий, нормально растущих и пролиферирующих в жидкой селективной среде с канамицином. Из этих линий 22 линии были выбраны для анализа; методом ПЦР было подтверждено наличие последовательности слитого гена M130- β -глюкуронидаза в геномной ДНК всех изученных линий.

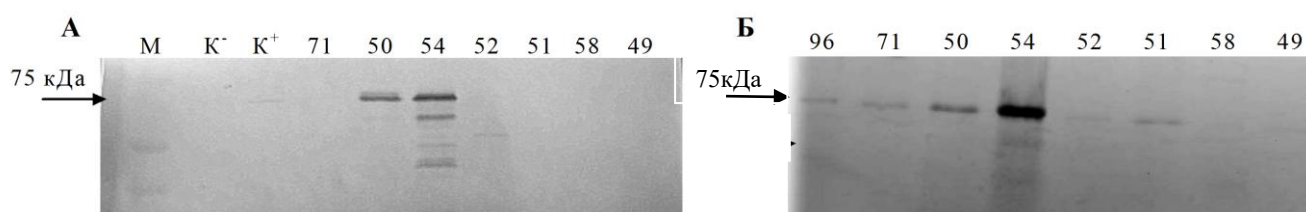


Рис. 21. Вестерн-блот анализ некоторых трансгенных растений ряски, трансформированных вектором pBIM130, с использованием антител к β -глюкуронидазе (А) и пептиду M2e (Б). Цифрами обозначены линии трансгенных растений ряски, K⁺-растение табака, трансформированное вектором pBI121, K⁻ - нетрансгенное растение, М-маркеры молекулярной массы белков, ожидаемый размер детектируемого белка - 74 кДа.

Анализ экспрессии слитого белка M130- β -глюкуронидаза проводили в 20-ти линиях ряски, продемонстрировавших наиболее быстрое и интенсивное окрашивание в ходе

гистохимического анализа. Методом Вестерн-блот анализа с использованием антител к β -глюкуронидазе в образцах белка, выделенного из трансгенных растений, было показано присутствие белковых полос молекулярной массой 74кДа, что точно соответствовало ожидаемому размеру слитого белка М130- β -глюкуронидаза (рис. 21). Присутствие целевого белка было показано в препаратах 12-ти линий трансгенных растений ряски. При использовании антител к пептиду М2е, последовательность пептида детектировалась в 8-ми линиях ряски. Масса узнаваемой этими антителами белка составляла около 74 кДа, что соответствовало размеру белка, детектируемому с помощью антител к β -глюкуронидазе. В препаратах белка из растений, экспрессирующих только β -глюкуронидазу, соответствующий сигнал отсутствовал.

Табл. 7. Накопление слитого белка М130- β -глюкуронидаза в линиях трансгенной ряски.

Линия	Содержание М130- β -глюкуронидазы в 1г сырой массы фрондов, мг	Содержание общего экстрагируемого белка в 1г сырой массы фрондов, мг	Доля М130- β -глюкуронидазы в общем экстрагируемом белке, %
13	0,819 $\pm$ 0,123	44,4 $\pm$ 4,0	1,84 $\pm$ 0,26
14	0,606 $\pm$ 0,179	48,6 $\pm$ 5,6	1,25 $\pm$ 0,31
16	0,939 $\pm$ 0,211	48,3 $\pm$ 5,7	1,94 $\pm$ 0,27
17	0,3 $\pm$ 0,098	46,5 $\pm$ 3,8	0,65 $\pm$ 0,14
18	0,585 $\pm$ 0,145	51 $\pm$ 6,5	1,15 $\pm$ 0,18
19	0,068 $\pm$ 0,011	50,7 $\pm$ 4,4	0,11 $\pm$ 0,03
34	0,125 $\pm$ 0,068	50,4 $\pm$ 3,8	0,43 $\pm$ 0,11
49	0,24 $\pm$ 0,09	36 $\pm$ 4,1	0,67 $\pm$ 0,13
50	0,782 $\pm$ 0,231	41,4 $\pm$ 3,8	1,9 $\pm$ 0,24
51	0,773 $\pm$ 0,216	38,7 $\pm$ 2,9	2,0 $\pm$ 0,25
52	0,204 $\pm$ 0,068	42,2 $\pm$ 3,7	0,48 $\pm$ 0,13
54	0,873 $\pm$ 0,176	45,7 $\pm$ 2,1	2,0 $\pm$ 0,37
58	0,084 $\pm$ 0,007	49,2 $\pm$ 3,8	0,3 $\pm$ 0,1
71	0,408 $\pm$ 0,096	48,9 $\pm$ 4,1	0,83 $\pm$ 0,11
72	0,489 $\pm$ 0,15	43,6 $\pm$ 3,6	1,12 $\pm$ 0,17
73	0,438 $\pm$ 0,19	46,2 $\pm$ 3,9	0,95 $\pm$ 0,23
74	0,453 $\pm$ 0,145	36 $\pm$ 3,7	1,26 $\pm$ 0,25
93	0,096 $\pm$ 0,032	35,7 $\pm$ 3,4	0,27 $\pm$ 0,09
96	0,912 $\pm$ 0,201	49,2 $\pm$ 4,2	1,85 $\pm$ 0,33
99	0,531 $\pm$ 0,184	37,5 $\pm$ 2,9	1,42 $\pm$ 0,29
112	0,396 $\pm$ 0,076	33,6 $\pm$ 3,5	1,18 $\pm$ 0,16
*К ⁻	0,0	31,6 $\pm$ 3,4	0,0

*К⁻ - нетрансгенная ряска

Количественная оценка содержания слитого белка M130-β-глюкуронидаза в препаратах общего белка трансгенных растений ряски проводилась методом ИФА с использованием антител к β-глюкуронидазе (табл. 7). Количество белка M130-β-глюкуронидаза в трансгенных растениях ряски варьировало в диапазоне 0,1 - 0,9 мг на 1г сырого веса, что соответствовало 0,1% - 2,0% от общего растворимого белка. Максимальное накопление белка M130-β-глюкуронидаза наблюдалось в линиях 51 и 54 – $773 \pm 0,216$ и $873 \pm 0,276$ мкг/г сырой массы фрондов, соответственно. Учитывая молекулярную массу пептида M2e (3,5 кДа), его накопление в составе слитого белка M130-β-глюкуронидаза в этих линиях превышало 40 мкг/г сырого веса. Полученные значения являются весьма высокими (Wigdorovitz et al., 2004; Sun et al., 2007). Достигнутый уровень экспрессии синтетической последовательности M130 в слиянии с геном β-глюкуронидазы в трансгенных растениях ряски, позволил нам перейти к следующим этапам исследований.

2.3.5.2. Экспрессия пептида M2e, слитого с субъединицей В рицина, в трансгенных растениях ряски.

В результате трансформации ряски вектором pBIspRBM130 было получено 23 линии трансгенных растений. Анализ экспрессии слитой последовательности sp-RTB-M130, далее обозначенной как RTB-M130, в полученных линиях ряски был проведен с помощью асиалофетуин-связанной ELISA с использованием антител к субъединице В рицина. Препараты общего белка трансгенных растений ряски были выделены из листочков, растущих один месяц на селективной культуральной среде. Присутствие субъединицы В рицина в составе слитого белка было детектировано в 20-ти линиях трансгенных растений ряски из 23-х изученных (рис. 22, А). Количественное содержание слитого белка в различных линиях варьировало от 0,5 мкг/г сырого веса (линия L34) до 2,5 мкг/г сырого веса (линия L81). В процентном содержании по отношению к общему растворимому белку это составляло от 0,004% - 0,01%.

Полученные данные продемонстрировали существенно более низкий уровень накопления слитого белка RTB-M130 по сравнению с M130-β-глюкуронидазой. Наблюдаемые различия в экспрессии этих белков могут иметь несколько причин, в частности, это может быть связано с более активной деградацией субъединицы В рицина по сравнению с β-глюкуронидазой (Chamberlain et al., 2008).

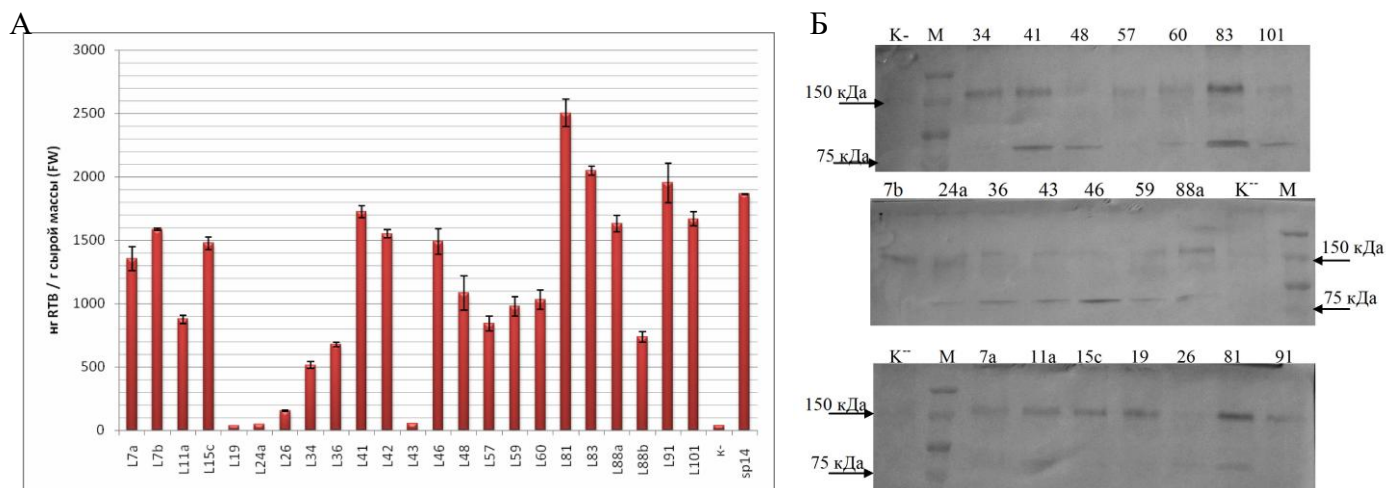


Рис. 22. **А.** Накопление слитого белка RTB-M130 в различных линиях трансгенных растений ряски. L7a - L101- линии трансгенных растений ряски; sp14- линия трансгенного табака, трансформированного вектором pBIspRBM130; K⁻ - нетрансгенная ряска. Накопление целевого белка выражено в нг эквивалента RTB на 1 г сырой массы. **Б.** Вестерн-блот анализ трансгенных растений ряски, трансформированных вектором pBIspRBM130. Использованы антитела к пептиду M2e. Цифрами обозначены линии трансгенных растений, K⁻ - нетрансгенное растение ряски, M- маркеры молекулярной массы белков. K⁺⁺ - растение, трансформированное вектором pBI121, негативный контроль.

С целью подтверждения присутствия пептида M2e в слитом белке RTB-M130 был выполнен Вестерн- блот анализ линий трансгенных растений ряски с использованием антител к M2e. Как представлено на рисунке 22, Б, в тринадцать линиях трансгенных растений был детектирован белок размером около 80-85 кДа, отсутствующий в контрольных нетрансформированных растениях. Размер белка, детектируемого в этих линиях, соответствовал предполагаемому димерному варианту слитой последовательности RTB-M130, как это наблюдалось в трансгенных растениях табака линий sp3 и sp14 (рис. 16). В отличие от табака, в ряде линий трансгенной ряски (7a, 7b, 34, 41, 15c и 81) антитела к пептиду M2e специфически связывались с еще более высокомолекулярным продуктом размером около 160 кДа, что позволяет предполагать наличие тетрамерных вариантов целевой последовательности RTB-M130. По-видимому, мультимеризация является характерным процессом при экспрессии гетерологичных белков, включающих последовательность субъединицы В рицина, независимо от экспрессионной системы. Поскольку результаты асиалофетуин-связанной ELISA в трансгенных линиях свидетельствуют о наличии правильно процессированной субъединицы В рицина, мы предположили, что мультимеризация целевого протеина не ведёт к потере его активности. Исходя из полученных данных, для проведения дальнейших исследований по иммунизации животных, были выбраны трансгенные линии ряски 41, 46, 81, 83 и 101. Эти линии характеризовались наибольшим накоплением целевого белка как на один грамм сырой массы ряски, так и относительно содержания общего растворимого белка.

3. Иммунизация мышей пептидом M2e, полученным в трансгенных растениях ряски малой.

В результате предварительных экспериментов было показано, что лабораторные мыши неохотно 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, иммунизацию проводили с помощью зонда. В составе слитого белка RTB-M130 был экспрессирован хитин-связывающий домен хитиназы A1 из *Bacillus circulans* (CBD). 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 в растениях ряски. Основное количество RTB-M130 детектировалось среди несвязавшихся с хитином белков. Концентрирования целевого белка RTB-M130, таким образом, не наблюдалось. В связи с этим данный подход был признан нецелесообразным и далее не изучался.

Все мыши, иммунизированные слитым белком RTB-M130 (10 животных, доза - 7 μg /мышь, всего 28 мкг антигена/мышь), продемонстрировали присутствие в сыворотке специфических к пептиду M2e антител (рис. 23). Различия значений ОП450 между группами, иммунизированными слитым белком RTB-M130 или белком из нетрансгенных растений (5 животных, доза - 100 μg ОРБ нетрансгенных растений/мышь, всего 400 мкг антигена), были статистически достоверными вплоть до разведения 1:1024. В тоже время, при иммунизации слитым белком M130- β -глюкуронидаза (10 животных, доза - 28 μg M130- β -глюкуронидаза/мышь, всего 112 мкг антигена/мышь), 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 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.

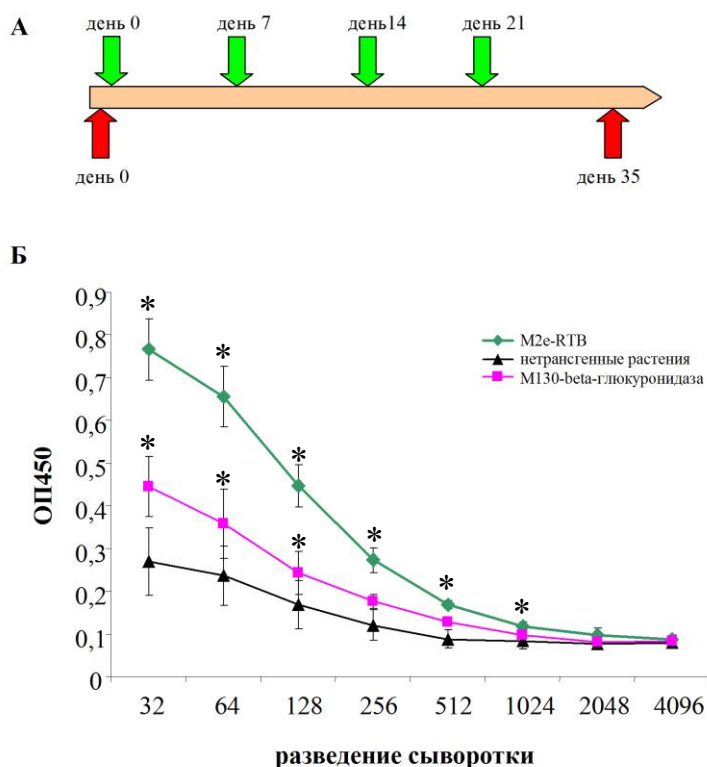


Рис. 23. Иммунизация мышей линии ICR пептидом M2e.

А. Схема эксперимента по иммунизации. Зелёными стрелками показаны даты оральной иммунизации, красными стрелками – даты забора образцов крови. **Б.** Индукция антител к пептиду M2e при иммунизации мышей 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 ($p < 0,05$).

В наших экспериментах в качестве адъюванта была использована субъединица В рицина. Функциональная активность рекомбинантного RTB и её адъювантный 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. Таким образом, при оральной иммунизации мышей препаратами общего белка трансгенных растений яски показана индукция антител к пептиду M2e у подопытных животных и подтверждена иммуногенность слитого белка RTB-M130, полученного в гетерологичной экспрессионной системе. Полученные результаты подтверждают возможность создания экспрессионных систем на основе растений яски для получения рекомбинантных антигенов для последующей разработки вакцин различного назначения.

4. Агробактериальная трансформация яски геном гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека. Анализ экспрессии ГКСФ в трансгенных растениях.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая ГКСФ с оптимизированным для экспрессии в яске кодонным составом, длиной 603 п.н. была клонирована в вектор pBI121 вместо гена β-глюкуронидазы. Для обеспечения транспорта рекомбинантного ГКСФ в

A. 

B.
atggcgaagagatcgctccatgctctgctctctctgattgcgtctgctgctcagatcccaactctgcgaggccacgctctggcccgcctctctctcccacg
ctctctctctcaagctctctggagcaggtcaggaaatcaaggcagtgagccgctctcagagaagaactctgcgcgaactacagactctggccaccccagagaact
ctctctctggcccaatctctggcctctctggccctctctgctctctctccttcagacacgctcagctgcggatgctctccagctgcactggagactctctctat
caggcaactctccaaagctctcggagcagctctctccgaatcgacgaactcccaactcgaactctgctggagctctggcagcagctgacgaacaaagt
agaaactctgaaagtcggcccccctcagccccaatcagaagccgctgattccgctgtctcctctcagcggcggccggggagtgctggctgcgaactc
ctctctttcttcagttagctatcgctctcagcagctcgtcccaactgtag

B.
makriasmsslliallclsshlaqatplgpasslpqsfllkcleqvrkiqgdgaalqeklcatyklchpeelvlhghslgipwaplsscpsqalqagclsq
lhsgflfyqgllqalcgispclptldtlqldvadfattiwqqmcclgmapalqptggampafasafqrraggvlvashlqsflevsyrvlrhlqap

Качественный анализ канамицинустойчивых линий на экспрессию ГКСФ был проведён с использованием иммуноферментного анализа. Экспрессия ГКСФ была детектирована в большинстве полученных линий. Её максимальные значения наблюдались в линиях 13, 19 и 88. Эти линии были отобраны для дальнейших исследований. В исследования были, также, включены линии со средней и с низкой экспрессией. Изучение этих линий позволило бы нам получить более ясное представление об особенностях экспрессии рекомбинантного ГКСФ в ряске. Отобранные линии далее были проанализированы методом ПЦР на присутствие нуклеотидной последовательности ГКСФ. Присутствие целевой последовательности было подтверждено во всех выбранных для изучения линиях. Для дополнительного подтверждения интеграции нуклеотидной последовательности ГКСФ в геном растений был выполнен Саузерн-блот анализ линий ряски 13, 19 и 88. 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.

Рис. 24. Экспрессионный вектор pBI-GCSF. **А** - Структура экспрессионной кассеты вектора pBI-GCSF. GCSF - нуклеотидная последовательность синтетического гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека; RB и LB - правый и левый граничные повторы Т-ДНК; pNOS и

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 0,7 - 6,6 мкг/г (табл. 8).

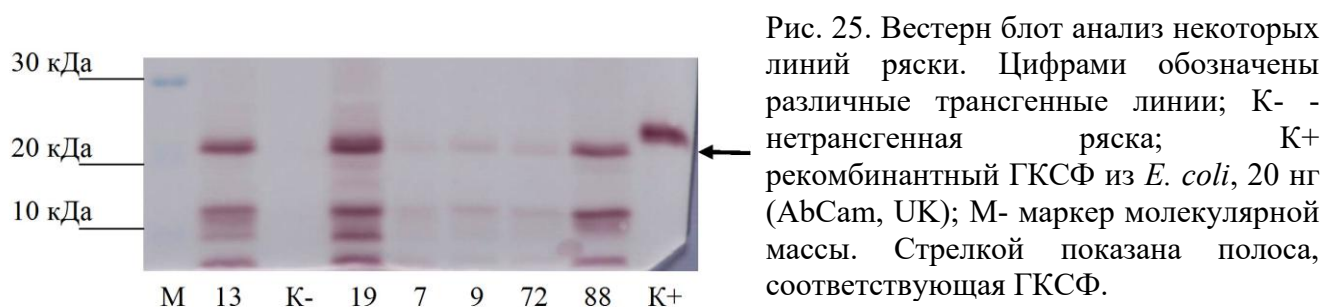
Полученный в нашем исследовании уровень накопления рекомбинантного ГКСФ в трансгенных растениях (до 70 мг ГКСФ/кг сырой массы ряски) является достаточно высоким. Накопление ГКСФ было существенно выше, чем накопление гирудина или пептида M2e, слитого с RTB в предыдущих экспериментах. Уровень аккумуляции ГКСФ в тканях растений ряски был близок к уровню, наблюдавшемуся при трансформации ряски слитым белком M130-β-глюкуронидаза.

Препараты общего белка из линий с максимальной экспрессией были проанализированы методом Вестерн блот анализа (рис. 25). В образцах из трансгенных растений было показано присутствие иммунореактивной белковой полосы с молекулярной массой около 20 кДа, что соответствовало ожидаемой. Как и предполагалось, максимальное накопление рекомбинантного ГКСФ наблюдалось в линиях 13, 19 и 88; в линиях ряски 7, 9 и 72 накопление

Табл. 8. Накопление рекомбинантного ГКСФ в различных линиях ряски, трансформированной вектором pBI-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

целевого белка было существенно ниже. В образцах линий 13, 19 и 88 детектировались низкомолекулярные полосы (около 10 кДа и меньше), которые свидетельствовали о деградации целевого белка в тканях растений. Такие же полосы наблюдались в линиях 7, 9 и 72, таким образом, деградация рекомбинантного ГКСФ в тканях трансгенных растений не зависела от линии. 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.



4.1. Электрофоретический и Вестерн блот анализ ГКСФ - содержащих препаратов общего белка ряски.

Электрофоретический анализ ГКСФ - содержащих препаратов ОРБ, полученных после осаждения белка ряски сульфатом аммония (33-70%), показал, что в изученных образцах наиболее обильно представлен белок с молекулярной массой 45-48 кДа, наиболее вероятно, большая субъединица рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы (Рубиско) ряски. По данным денситометрического анализа, этот белок составляет 35-38% от всего белка в образцах. Также обильно представлены белки, мигрирующие на уровне около 10 кДа. Белки, представленные в этой полосе, составляют 24-26% от всего экстрагируемого белка. Таким образом, на белки размером около 10 и 48 кДа приходится 59 – 64% от всего белка в образцах.

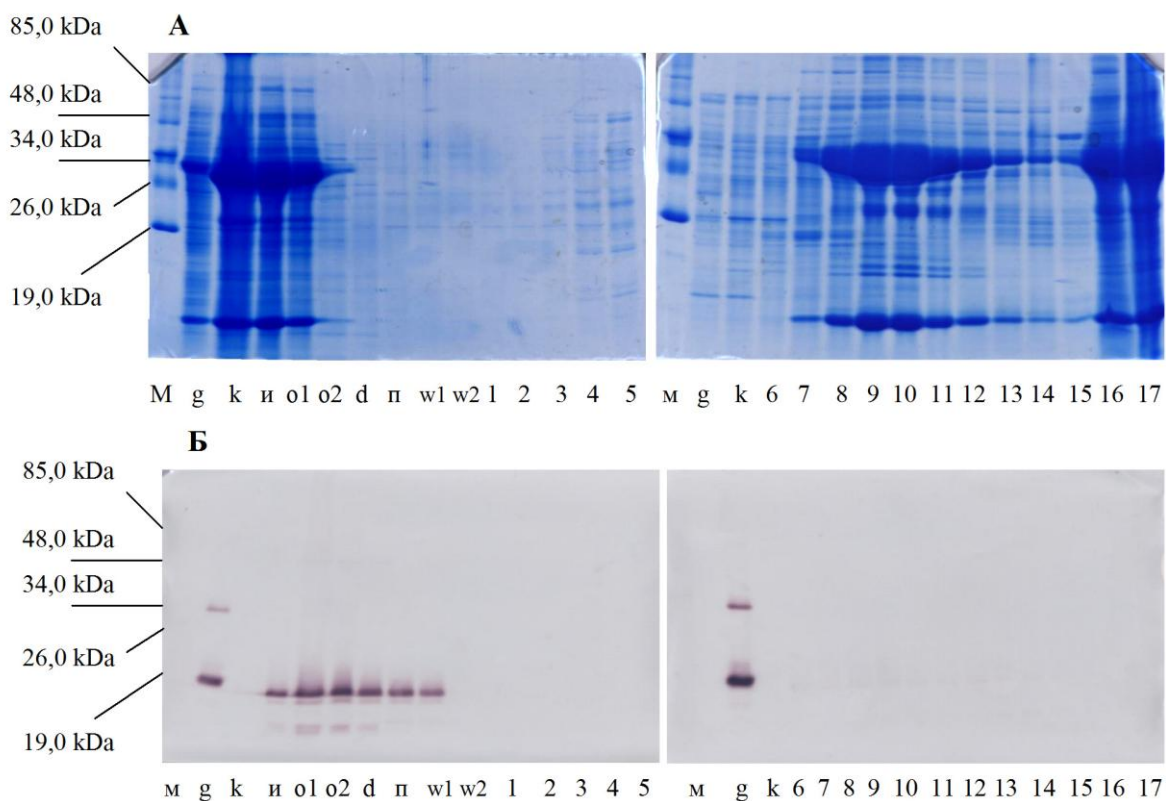


Рис. 26. Ионно-обменная хроматография рекомбинантного ГКСФ на DEAE -сефарозе. А. Электрофоретический анализ полученных препаратов в 12-20% градиентном ПААГ. Б. Вестерн блот анализ препаратов. М- маркер молекулярной массы; g- рекомбинантный ГКСФ (50 ng), добавленный в препарат ОРБ нетрансгенной ряски, 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 – пропуск 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.

В ходе исследований было показано, что при хроматографии препаратов общего белка ряски на DEAE-сефарозе при рН 6,25 основная масса растительных белков связывалась с DEAE-сефарозой и задерживалась на колонке (рис. 26, А). Вестерн блот анализ выявил присутствие рекомбинантного ГКСФ среди не связавшихся с DEAE-сефарозой белков (рис. 26, Б). Во всех образцах рекомбинантный ГКСФ детектировался как одна полоса, мигрирующая на одном уровне с положительным контролем. Таким образом, в данных условиях (низкая ионная сила, рН 6,25) при ионно-обменной хроматографии на DEAE – сефарозе наблюдалось связывание основной массы белков растения-хозяина с носителем, при этом целевой белок с DEAE – сефарозой практически не связывался и оставался в пропуске. Проведённые нами

исследования показали перспективность подхода, основанного на хроматографии грубых белковых экстрактов на DEAE-сефарозе при pH 6,25, для удаления примесных белков. Полученные данные будут использованы в дальнейших исследованиях по разработке методов выделения и очистки рекомбинантного ГКСФ из растений ряски. Полученные нами в результате исследований вектора pBI-GCSF и pBI121-hir, оптимизированные для экспрессии в рясковых, были с успехом использованы для получения рекомбинантного ГКСФ и гирудина в растениях вольфии бескорневой (Khvatkov et al., 2018; 2021).

4. 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. Рекомбинантный гранулоцитарный колониестимулирующий фактор человека накапливается в тканях растений ряски малой на уровне до 70 мг рекомбинантного GCSF/кг сырой массы продуцента.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ 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 коррегенты 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 рицина // *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., 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. 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: 10.1007/978-3-319-26478-3