



Журналу 70 лет!

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Генетическая инженерия
растений – достижения
и перспективы



НАУКА
— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 71, номер 5, 2024

СПЕЦИАЛЬНЫЙ ВЫПУСК:

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ РАСТЕНИЙ — ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ

ОБЗОРЫ

Модификация генома растений методами генетической инженерии: направления и пути развития <i>Е. В. Дейнеко</i>	487
Транзиентная экспрессия генов в растениях – эффективная экспериментальная платформа для функциональной геномики <i>И. В. Голденкова-Павлова, О. С. Павленко, И. С. Демьянчук, В. А. Фридман, А. А. Тюрин</i>	502
Рекомбинантные моноклональные антитела, синтезируемые в растительных системах экспрессии: проблемы и перспективы <i>А. А. Загорская, Е. В. Дейнеко</i>	520
Биосинтез рекомбинантных вакцин в растительных системах экспрессии <i>Е. А. Уварова, П. А. Белагин, Н. В. Пермякова, Е. В. Дейнеко</i>	538
Генетическая инженерия как методологическая основа функциональной геномики растений <i>В. С. Фадеев</i>	555

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Сверхэкспрессия гена <i>ATOPR3</i> в пшенице стимулирует образование летучих метаболитов гидропероксидлиазной ветви биосинтеза оксипинов <i>В. И. Дегтярёва, Д. Н. Мирошниченко, А. В. Пиголев, Е. А. Дегтярёв, Е. М. Тебина, П. С. Стрельцова, С. В. Долгов, Т. В. Савченко</i>	569
Рост и солеустойчивость волосовидных корней табака с конститутивной экспрессией гена <i>TaNAC69</i> <i>З. А. Ибрагимова, А. А. Галимова, Х. Г. Мусин, А. А. Ямалеева, Е. А. Заикина, Б. Р. Кулуев</i>	580
Влияние экспрессии гетерологичной $\Delta 9$ -десатуразы на жирнокислотный состав растений томатов <i>И. Г. Миловская, Н. В. Варламова, А. Ю. Стариков, Д. В. Демиденко, О. С. Павленко, А. А. Тюрин, Д. С. Соболев, Л. В. Куренина, И. В. Голденкова-Павлова, М. Р. Халилуев</i>	591
Эффект неполного нокаутирования гена пластидной крахмалфосфорилазы <i>NtPHOI-L1</i> на метаболизм углеводов и каротиноидов в листьях <i>Nicotiana tabacum</i> L. <i>А. В. Нежданова, А. В. Кулакова, М. А. Слугина, А. М. Камионская, Е. З. Кочиева, А. В. Щенникова</i>	604
Особенности экспрессии eGFP гена у транспластомных растений табака <i>Nicotiana tabacum</i> L. CV. PETIT HAVANA <i>Ю. В. Сидорчук, П. А. Белагин, А. А. Загорская, Т. В. Маренкова, В. В. Кузнецов, Е. С. Хайрулина, Е. В. Дейнеко</i>	620
Влияние rol-генов <i>Agrobacterium rhizogenes</i> штаммов A4, 15834 и K599 на рост корней трансгенных растений табака и состояние антиоксидантной системы в условиях абиотического стресса <i>Д. Ю. Швец, З. А. Бережнева, Х. Г. Мусин, Б. Р. Кулуев</i>	632

УДК 581.1

МОДИФИКАЦИЯ ГЕНОМА РАСТЕНИЙ МЕТОДАМИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ: НАПРАВЛЕНИЯ И ПУТИ РАЗВИТИЯ

© 2024 г. Е. В. Дейнеко^{а, *}

^аФедеральное государственное бюджетное научное учреждение
“Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук”,
Новосибирск, Россия
^{*}e-mail: deineko@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 18.03.2024 г.

После доработки 19.04.2024 г.

Принята к публикации 24.04.2024 г.

Развитие и совершенствование методов молекулярной и клеточной биологии существенно расширило возможности исследователей по модификации геномов растительных клеток и послужило основой для развития новых технологий получения рекомбинантных белков, используемых в фармацевтике и других отраслях народного хозяйства, а также стимулировало создание новых высокоурожайных сортов важных сельскохозяйственных культур, устойчивых к неблагоприятным абиотическим и биотическим факторам среды. Перенос генов в растительный геном из других гетерологичных систем поставил перед исследователями ряд вопросов, связанных с функционированием трансгенов в новом окружении генома-реципиента, а также с их влиянием на функционирование собственных генов растения. За последние сорок лет с момента получения первого трансгенного растения возможности этих технологий были существенно углублены и расширены за счет разработки методов геномного редактирования, основанных на системе CRISPR/Cas. Это позволило не только изменять функционирование целевых генов путем нокаутов или исправлять нежелательные мутации, но и вносить гены интереса в заданные исследователем районы-мишени растительного генома. В предлагаемом обзоре рассматриваются основные этапы исследований по модификации геномов растений за последние сорок лет, с акцентом не только на практическую значимость созданных агробιοтехнологий, но и на важность для фундаментальных исследований функционирования генов и выявления структурных особенностей организации генома растений.

Ключевые слова: gene silencing, биобезопасность, генетическая инженерия, геномное редактирование, наследование трансгенов, природно-трансгенные растения, Т-ДНК индуцированные мутации

DOI: 10.31857/S0015330324050017, EDN: MNFGJU

ВВЕДЕНИЕ

Прошло сорок лет с момента создания первого трансгенного растения — *Nicotiana tabacum* L., в геном которого был перенесен химерный ген, включающий последовательности генов, кодирующих ферменты октопинсинтазы и хлорамфеникол-ацетилтрансферазы [1]. Авторами этой работы было показано, что замена кодирующей последовательности гена нопалинсинтазы *Agrobacterium tumefaciens* на последовательность другого гена — ок-

топинсинтазы, принципиально не влияла на регуляторные особенности промотора этого генов. Стало очевидным, что регуляторные элементы одних генов могут быть использованы для регуляции экспрессии других. Доставка гена хлорамфеникол-ацетилтрансферазы, клонированного из *E. coli* и слитого с геном октопинсинтазы, обеспечивала в растительных клетках образование функционально активного рекомбинантного белка, проявляющего ферментативную активность, что подтверждало возможность его корректной

трансляции. Это послужило в дальнейшем отправной точкой для развития систем отбора генетически-модифицированных клеток у растений. Полученные авторами результаты свидетельствовали о том, что транскрипционно-трансляционный аппарат растительной клетки способен поддерживать транскрипцию, трансляцию и пост-трансляционные модификации продуктов экспрессии генов, перенесенных из других гетерологичных систем [1]. Таким образом, перенос и успешная экспрессия в геноме растительной клетки первых созданных в лабораторных условиях генов (трансгенов) открывала перед исследователями широкие возможности для развития технологий модификации геномов с целью улучшения хозяйственно-ценных свойств у растений. Возможность переноса в растительный геном чужеродных генов из других гетерологичных систем – вирусов, микроорганизмов, человека, животных, а также из других отдаленных видов растений, не скрещивающихся между собой в природных условиях, с одной стороны послужило основой для развития не только агробιοтехнологий для улучшения хозяйственно-ценных признаков у важных сельскохозяйственных культур [2, 3], но и открыла широкие перспективы в области создания биопродуктов рекомбинантных белков, в том числе и для биофармацевтики [4, 5]. Уже через несколько лет после опубликования вышеупомянутой работы по созданию первого генетически модифицированного растения [1], были получены трансгенные растения с полезными свойствами, обеспечивающими устойчивость к гербицидам, насекомым-вредителям и вирусам, а в 1987 г. было получено первое разрешение на проведение полевых испытаний генетически модифицированных растений томата и картофеля [6, 7]. Первый коммерческий сорт томата, получивший название Flavr-Savr, был зарегистрирован компанией Calgene (США) в 1994 г. [8]. В геноме растений этого сорта был перенесен ген фермента полигалактуронидазы, принимающего участие в процессах распада пектина в тканях плодов, в результате чего ткани при созревании плодов быстро размягчались. Введение в геном инвертированной копии этого гена приводило к разрушению продуктов экспрессии собственного (хозяйского) гена, кодирующего полигалактуронидазу и, как результат, к существенному снижению уровня накопления фермента в тканях плодов томата, что обеспечивало более длительный срок их хранения. В последующие несколько лет после регистрации первого сорта генетически модифицированного растения томата, успешно прошли испытания и другие виды растений, рекомендованные для коммерциа-

лизации. Так, например, уже к 1996 г. площади посевов, занимаемых устойчивыми к гербицидам сортами сои и канолы, а также сортами кукурузы, хлопчатника и картофеля, устойчивыми к насекомым-вредителям, составили почти 1.7 млн га в США и Канаде [9].

В последующие годы отмечен неуклонный рост площадей, занимаемых генетически модифицированными культурами. Так, по данным Международной службы по агробιοтехнологиям к 2010 г. в 29 странах мира под генетически модифицированные сорта растений было отведено уже около 148 млн га [10]. Следует подчеркнуть, что к этому времени ввоз продукции, полученной с применением методов генетической инженерии, был разрешен в 30 странах, в том числе и в Российской Федерации, что в целом составило 75% населения Земного шара, имеющего прямой доступ к потреблению продуктов, полученных с использованием генетически модифицированных культур растений [10].

К настоящему времени площади, занимаемые под генетически модифицированными культурами, продолжают расти и достигли уже более 200 млн га [11]. Всего на этих площадях в 27 странах возделывается 10 сортов генетически модифицированных видов растений, доминирующими среди которых являются соя, занимающая 98.9 млн га и кукуруза – 66.2 млн га. Если рассматривать соотношение между возделываемыми сортами, относящимися к генетически модифицированным, по отношению к обычным, то лидирующей культурой выступает хлопчатник, доля возделывания которого по сравнению с традиционными технологиями в мировом производстве составляет 80.4%. Для сои и кукурузы эти показатели несколько ниже – 73.7% и 32.9%. Лидирующие позиции по производству продукции на основе генетически модифицированных растений занимают США, где площади посевов составляют 74.7 млн га, а также Бразилия (63.2 млн га) и Аргентина (23.5 млн га). Наиболее широкий ассортимент сортов, созданных на основе генетической модификации с применением методов геномной инженерии, отмечается в США, где возделываются соя, кукуруза, хлопчатник, люцерна, канولا и сахарная свекла [11]. Сорта других видов генетически модифицированных растений выращиваются в Бразилии (сахарный тростник), Аргентине (пшеница), на Филиппинах (рис) и в Бангладеш (баклажан). Следует отметить тенденцию к использованию стекерных сортов, сочетающих в себе устойчивость к гербицидам и инсектицидам, обеспечиваемые переносом и интеграцией в растительный геном двух и более разных трансгенов [10].

Наряду с улучшением хозяйственно-ценных характеристик важных продовольственных культур, модификация генома растений методами генетической инженерии получила широкое применение в биотехнологии, в частности в биофармацевтике, для биосинтеза рекомбинантных белков. На сегодняшний день это один из быстро развивающихся сегментов экономики, называемый иногда молекулярным фермерством. Такие крупнейшие биотехнологические и фармацевтические компании как Protalix Biotherapeutics (Израиль), Synthon (Нидерланды), Ventria (США), Medicago (Канада), Greenovation (Германия) и Pfizer (США) инвестируют значительные средства в развитие научных исследований и разработку новых платформ для производства ценных рекомбинантных белков на основе растительных систем экспрессии. В целом, современное молекулярное фермерство можно разделить на три главных направления, в которых для производства рекомбинантных белков используются трансгенные растения со стабильной, либо транзиторной экспрессией целевых генов или культуры растительных клеток, поддерживаемые в биореакторах [12].

Компания ProdiGeneInc. (США) впервые использовала генетически модифицированные растения кукурузы для промышленного получения рекомбинантных белков и провела оценку экономической целесообразности молекулярного фермерства, учитывая затраты на выращивание, выделение и очистку конечного рекомбинантного продукта [13, 14]. Экспертами установлено, что рекомбинантные авидин и β -глюкуронидаза, синтезируемые в зернах растений кукурузы, были вполне сравнимы и конкурентоспособны с коммерческими продуктами авидина, полученными из куриных яиц [15], и β -глюкуронидазой бактериального происхождения [16].

Мощное развитие за последнее десятилетие получило второе направление молекулярного фермерства, связанное с наработкой в растениях рекомбинантных белков на основе транзиторной экспрессии. Благодаря максимально сжатым срокам от момента выделения антигенной последовательности до наработки больших количеств антигенов [17], это направление открыло широкие возможности для крупномасштабного производства растительных вакцин, особенно при необходимости экстренного реагирования. [18]. Следует отметить, что такое производство постепенно сместилось в сторону использования закрытых систем культивирования. Для этого растения *N. benthamiana*, используемые в настоящее время как системы транзиторной экспрессии генов, кодирующих целевые антигены возбудителей инфекцион-

ных заболеваний, культивируют в помещениях закрытого типа при искусственном освещении. В таких условиях становится возможным использование автоматизированных роботов, управляющих процессами перемещения блоков с индивидуальными растениями от начала их культивирования до конечной стадии, связанной с измельчением биомассы и последующим извлечением из нее целевого продукта [19, 20]. Несмотря на более низкую стоимость производства рекомбинантных белков при крупномасштабном возделывании трансгенных растений со стабильной экспрессией целевых генов [21, 22], также наблюдается перемещение наработки исходной субстанции в закрытые системы на основе культивирования клеточных культур в биореакторах [23, 24]. Важным преимуществом при культивировании растительных клеток в биореакторах является возможность удешевления процесса производства целевого продукта по сравнению с целыми растениями за счет того, что рекомбинантные белки могут быть секретируются в культуральные среды, что упрощает процесс их выделения и очистки [22]. Немаловажное значение в пользу наработки целевых рекомбинантных белков медицинского назначения с использованием клеточных культур растений имеет и соответствие этой технологии существующим жестким правилам надлежащей производственной практики (GMP – good manufacturing practice), касающимся производства фармацевтических продуктов [4, 22]. Вопросы биобезопасности и анализ рисков при использовании растительных систем экспрессии для получения рекомбинантных белков рассмотрены на примере нормативно-правовой базы для молекулярного земледелия в Европе [25]. Успехи, достигнутые РМР-сообществом (Plant-Made Pharmaceutical) в области получения биофармацевтиков с использованием клеточных культур растений подробно рассмотрены нами ранее [12]. В текущем спецвыпуске журнала эти вопросы также рассматриваются в отдельных обзорных статьях на примере получения растительных рекомбинантных вакцин и различных видов рекомбинантных антител для фармацевтики.

Таким образом, возможность модификации генома растений методами генетической инженерии была достаточно быстро подхвачена практикой и за последующие 40 лет после создания первого трансгенного растения мировым сообществом исследователей были получены сорта с улучшенными характеристиками хозяйственно-ценных признаков, а также разработаны технологии наработки рекомбинантных белков, в том числе и медицинского назначения.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ ГЕНОМОВ: ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ

Традиционные методы селекции, основанные на рекомбинации генов. Рассматривая ретроспективно основные этапы исследований, направленных на улучшение хозяйственно-ценных признаков у растений, используемых человеком для своих целей, условно разделим применяемые для этого методы и подходы на две группы. Согласно схеме, представленной на рис. 1, к первой группе отнесены методы, основанные на использовании природного разнообразия и выявления спонтанных мутаций, где роль исследователя или селекционера определяется искусством их обнаружения, поддержания и закрепления в новом создаваемом сорте. Ко второй группе условно отнесем методы, основанные на внесении в геномную ДНК улучшаемых видов растений повреждений с последующим их восстановлением системами клеточной репарации, т.е. внесением в геном растения искусственных мутаций, индуцированных исследователем. Такое деление методов, используемых человеком для улучшения хозяйственно-ценных характеристик возделываемых видов растений, в рамках данного обзора нацелено на более глубокое понимание при обсуждении в дальнейшем как преимуществ, так и степени возможных рисков при внесении генетических модификаций для человека и окружающей среды.

Первые приемы улучшения различных видов растений были основаны на простом отборе форм растений, проявляющих какие-либо предпочтительные характеристики с последующей их рекомбинацией путем свободного опыления и повторными многократными отборами. Селекционерами было разработано достаточно большое число методов и приемов, позволяющих комбинировать гены, участвующие

в проявлении хозяйственно-ценных признаков у растений, и отбирать формы с максимальным их проявлением. В сочетании с современными методами молекулярного анализа селекционеры имеют возможность использовать такие приемы как выявление QTL-генов, т.е. тех генов, сцепленное наследование которых будет обеспечивать улучшение таких сложных признаков как, например, засухоустойчивость или урожайность [26, 27]. Выявление некоторых молекулярных маркеров (SSR, SCAR, SNP и др.), сцепленных с теми или иными хозяйственно полезными признаками у растений, также обеспечивает селекционеру возможность “концентрировать” эти гены в создаваемом сорте, ориентируясь на выявленные маркеры [28, 29]. Такой подход получил название маркер-ориентированной селекции. Заслуживают внимания современные подходы геномной селекции [30, 31], в том числе для улучшения древесных культур [32].

Современные методы, основанные на репарации повреждений ДНК. Следующий этап улучшения хозяйственно-ценных признаков у растений связан с применением химических мутагенов и радиоактивного излучения (рис. 1). Этот подход принципиально отличался от предыдущих, поскольку был нацелен на индукцию поломок в молекулах ДНК с последующим их восстановлением системами репарации растительной клетки. Среди растений, подвергшихся воздействию различных доз химических мутагенов или облучения, селекционеры могли отбирать те, в геноме которых восстановление повреждений в молекулах ДНК, приводящих к различным перестройкам (точечные мутации, делеции, инверсии, инсерции, транслокации и т.д.) могли быть связаны с рекомбинацией генов и улучшением каких-либо характеристик растения.

Открытие ферментов, позволяющих клонировать гены, соединять их в нужном для исследователя порядке и затем интегрировать в геном растения, стимулировало развитие методов

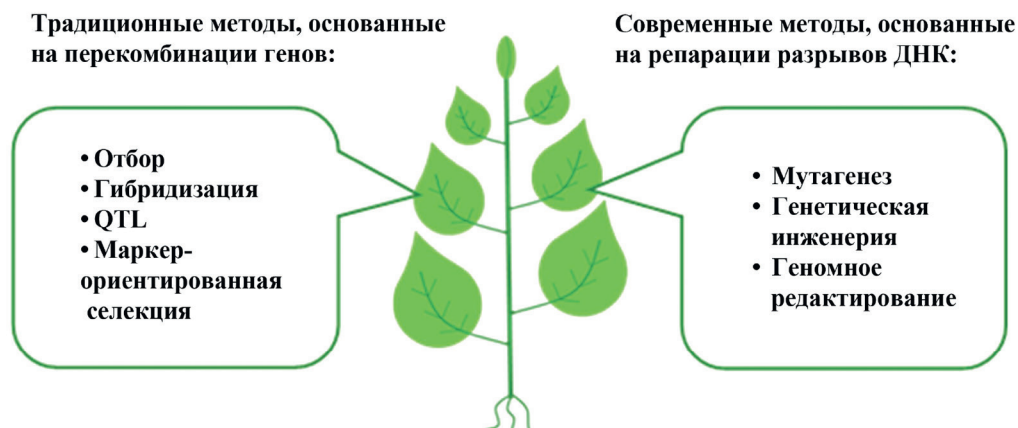


Рис. 1. Общая схема индукции генетических модификаций в растительных геномах.

рекомбинантных ДНК или генетической инженерии и привело к созданию нового направления, которое позволяло модифицировать геномы растений путем включения искусственно созданных генетических конструкций с генами различного происхождения из разных гетерологических систем (рис. 2). Такой подход снимал природные барьеры, сложившиеся между видами, родами и царствами живых организмов и позволял исследователям манипулировать различными источниками генов. Для того, чтобы перенести созданные генетические конструкции в растительный геном, исследователи наиболее часто используют методы векторного переноса, основанные на природной способности почвенной бактерии *A. tumefaciens* доставлять часть своих генов в геном растения. Перенос в геном растительных клеток части своей ДНК, обозначаемой как Т-ДНК, является этапом жизненной стратегии *A. tumefaciens*, нацеленной на биосинтез необходимых питательных веществ (опинов) за счет транскрипционно-трансляционной машины и ресурсов растительной клетки. Таким образом, в результате замены собственных генов в составе плазмиды *A. tumefaciens* на искусственно созданные генетические конструкции, был получен инструмент для их доставки в растительный геном. Так как круг хозяев для *A. tumefaciens* ограничен в основном двудольными растения-

ми, для однодольных разработана доставка генетических конструкций на поверхности частиц золота или вольфрама с помощью генной пушки. Важная особенность этих двух методов состоит в том, что процесс доставки и встраивания созданной генетической конструкции протекает случайным образом и не контролируется исследователем, т.е. с использованием этих методов исследователь не имеет возможности направить созданную генетическую конструкцию с целевым геном в желаемый район генома.

Доставленные в ядро растительной клетки трансгены попадают в открытые петли хроматина и ферментами репарации включаются в восстанавливаемые места разрывов в ДНК по механизму негомологичной рекомбинации [33, 34]. Переносимые в геном растительной клетки искусственно созданные генетические конструкции в виде фрагментов экзогенных ДНК еще до их интеграции в геном могут объединяться друг с другом и образовывать конкатемеры, включающие несколько копий генов, в том числе и в различной ориентации по отношению друг к другу. Число и включение в геном трансгенов может быть самым разнообразным — от единичных копий, интегрированных в один или в разные районы генома, так и до сложноорганизованных инсерций [35]. Более того, в геном могут быть интегрированы модифицированные

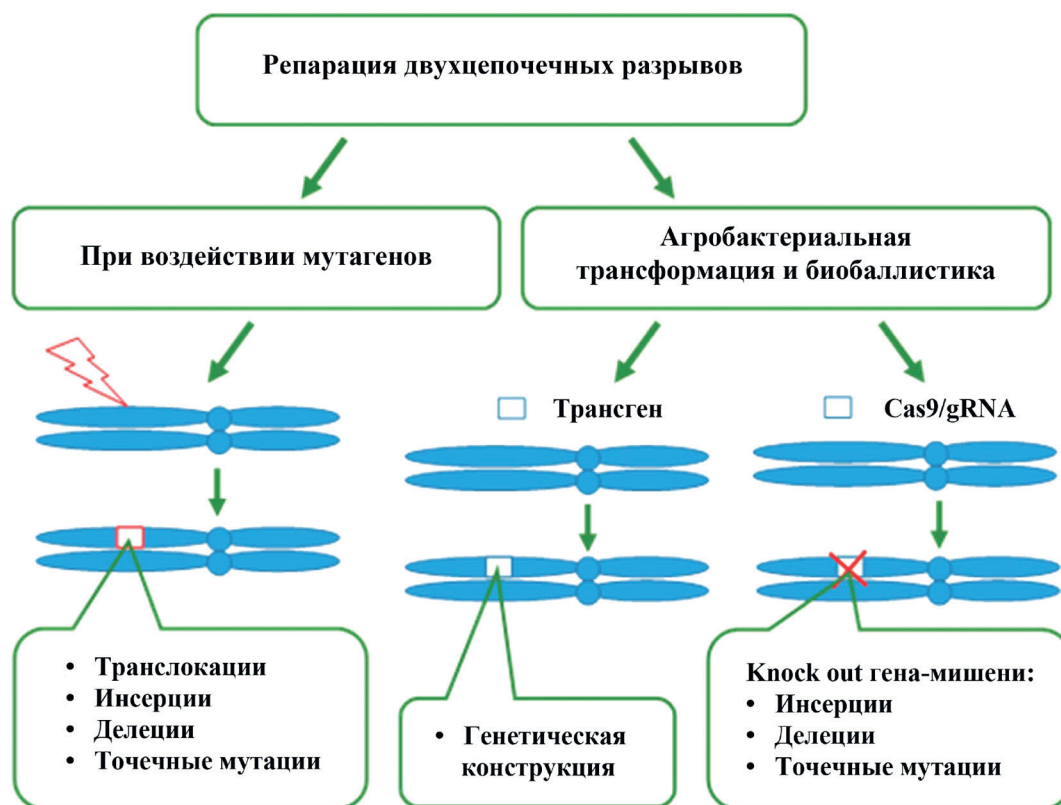


Рис. 2. Схема нарушений в геномной ДНК растений под воздействием мутагенов и Т-ДНК-инсерций при агробактериальной трансформации и биобаллистике.

нефункциональные фрагменты генетических конструкций, выявляемые только в случае полногеномного секвенирования [36].

Интегрированные в геном растения трансгены становятся его резидентной частью, проявляются как доминантные признаки, передаются потомкам согласно законам менделевского наследования [37] и мутируют с такой же частотой, как и аутентичные (собственные) гены [38].

На основании большого фактического материала об экспрессии трансгенов в геноме трансгенных растений стало очевидным, что дальнейшая “судьба” привнесенных в геном чужеродных генов зависит от того, в каком виде (одиночной копии или в составе нескольких сцепленных между собой копий) и в какой район генома интегрировалась та или иная инсерция [39]. Исследование таких событий позволило выявить различные пути проявления генов, входящих в состав инсерции, как среди потомков от самоопыления исходного трансгенного растения, так и среди гибридов, полученных от их переопыления [40]. Интеграция в растительный геном нескольких сцепленных копий трансгена, в том числе и инвертированных, увеличивает вероятность инактивирования целевого гена [41]. Различные варианты эпигенетического инактивирования трансгенов у трансгенных растений рассмотрены в обзоре [42]. Итак, технология модификации геномов растений, основанная на случайной интеграции в геном генетических конструкций с целевыми генами, предполагает проведение крупномасштабных скринингов среди полученных трансформантов, нацеленных на поиск однокопийных инсерций с высоким уровнем экспрессии целевого гена, сохраняющегося в последующих поколениях трансгенного растения. Более того, оценивая реализацию целевого гена в зависимости от особенностей района его интеграции в геноме, следует также рассмотреть вопрос об инсерционной природе самого процесса генетической модификации растений.

Генетическая конструкция может быть интегрирована в геном как в межгенные районы, так и в районы расположения собственных генов, индуцируя при этом различные типы мутационных изменений, известных как инсерционные мутации [43]. Первая коллекция Т-ДНК инсерционных мутаций *A. thaliana* была создана Фельдман [44]. В настоящее время эта коллекция существенно пополнена и представляет собой мощный мировой ресурс для изучения как функционирования растительных генов, так и для выявления особенностей структурной организации генома в целом [45, 46]. Таким образом, среди разнообразных случайных событий интеграции генетических конструкций в растительный геном улучшаемого вида растения исследователю необходимо отобрать отдельные

события с желаемым результатом, оценить стабильное сохранение индуцируемого признака среди потомков, а также выявить возможные побочные негативные влияния инсерции.

Итак, технология модификации растительных геномов путем экзогенного включения специально созданных генетических конструкций с определенным набором генов, за сорокалетний промежуток времени от начала появления первого трансгенного растения продемонстрировала свою успешность в создании сортов с улучшенными характеристиками, а также биопродукторов рекомбинантных белков. Однако сложность и высокая стоимость этой технологии, включающей широкомасштабные отборы благоприятных событий интеграции генетических конструкций, стимулировала необходимость поиска более простых путей целенаправленной модификации генома, что и послужило следующим этапом в развитии методов модификации растительных геномов.

Открытие механизма, позволяющего бактериям целенаправленно разрушать ДНК бактериофагов, используя при этом ранее сохраненные копии фаговой ДНК в специфическом районе своего генома, получившего название (CRISPR – Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats), открыла новые перспективы для исследователей [47]. Именно эта особенность послужила основой для создания инструмента для целенаправленного внесения двуцепочечных разрывов в выбранном районе-мишени молекулы ДНК и развития технологии направленной модификации геномов, получившей название геномного редактирования. Суть этого подхода состоит в том, что исследователями создается специальный инструментарий для геномного редактирования – генетические конструкции, включающие участок ДНК, комплементарный району гена-мишени в геноме модифицируемого растения, в котором необходимо произвести двуцепочечный разрез. В качестве “молекулярных ножниц” для осуществления таких разрезов выступают нуклеазы, в частности, нуклеаза Cas9 из *Streptococcus pyogenes*. Таким образом, объединенные в составе генетической конструкции последовательности гена, кодирующего нуклеазу, а также последовательность, гомологичную району гена-мишени, можно интегрировать в геном, используя уже хорошо зарекомендовавшие себя способы агробактериальной и биобаллистической трансформации. Важно подчеркнуть, что такие инструменты для геномного редактирования могут быть наработаны и в другой системе экспрессии, например, в *E. coli*, а затем интегрированы в геном растения в виде рибонуклеиновых комплексов [48].

В зависимости от поставленной перед исследователем цели, геномное редактирование

может быть выполнено в двух вариантах, в одном из которых нацеливание нуклеазы на определенный ген-мишень предполагает внесение в его последовательность двухцепочечного разрыва с последующей репарацией, сопровождающейся сдвигом рамки считывания, делецией или инсерцией, что приведет к нокауту этого гена. Во втором варианте в состав генетической конструкции может быть дополнительно включен ген интереса, последовательность которого ферментами репарации растительной клетки будет включена в двухцепочечный разрыв района-мишени. Более подробное описание этого метода можно найти в обзорах [49, 50]. Следует подчеркнуть, что метод геномного редактирования, так же, как и методы генной инженерии, были достаточно быстро подхвачены практикой. Сравнительный вклад двух методов – трансгеноза и геномного редактирования, в улучшение хозяйственно-ценных признаков у растений рассмотрены нами ранее [51]. Достаточно отметить лишь тот факт, что с момента опубликования сообщения о возможности целенаправленного внесения двухцепочечных разрывов в целевой район-мишень до появления первого сорта сои с улучшенным составом жирных кислот в растительном масле, прошло всего лишь несколько лет. Вклад геномного редактирования в улучшение хозяйственно-ценных признаков у важных сельскохозяйственных видов растений можно найти в обзорах [52–54], в том числе в улучшение древесных [55], плодово-ягодных культур и декоративных видов [56].

Широкие перспективы открываются при совместном применении трансгеноза и геномного редактирования. Например, для того, чтобы избежать широкомасштабных отборов при создании сорта риса, в геном которого предполагалось доставить генетическую конструкцию с геном β -каротина, группа исследователей провела предварительный анализ районов интеграции для будущей генетической конструкции [57]. Для этого в геноме местного сорта риса, наиболее адаптированного к условиям района возделывания, были индуцированы мутации, среди которых с помощью метода фенотипирования [58] были отобраны только те мутации, которые не повлияли на изменение хозяйственно-ценных характеристик и урожайность сорта. Именно эти районы, получившие название “тихие гавани” (genomic safe harbors), и были выбраны исследователями для доставки целевого гена с применением метода геномного редактирования [57].

Поиск районов, обеспечивающих высокий выход рекомбинантных белков, для доставки в них целевых генов, проводится исследователями для клеток млекопитающих [59, 60] и насекомых [61]. Данный подход использован нами для

поиска районов в геноме *A. thaliana*, характеризующихся высокой транскрипционной активностью, которые могли бы послужить мишенями для доставки целевых генов методом геномного редактирования в варианте knock-in [62].

ОЦЕНКА РИСКОВ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ ГЕНОМОВ РАСТЕНИЙ

Приведенные данные о широкомасштабном использовании генетически модифицированных организмов свидетельствуют о востребованности этой технологии по сравнению с технологиями интенсивного земледелия с применением химических веществ (гербицидов и инсектицидов). Однако успешное продвижение новых технологий создания сортов с новыми улучшенными характеристиками породили и настороженное отношение части общества к данным модификациям.

Во многих странах, использующих методы генетической модификации геномов для улучшения хозяйственно ценных характеристик важных сельскохозяйственных растений, обсуждаются и разрабатываются системы, обеспечивающие надзор за генетическими инновациями. Регистрация нового сорта в той или иной стране связана не только с закреплением прав собственности авторов, но и оценкой рисков, которые могут быть нанесены здоровью человека и окружающей среде. Обеспокоенность выявлением потенциальных рисков связана с тем, что технологии генетической модификации растений предполагают внедрение в геном генов из различных гетерологичных систем. Именно это обстоятельство и вызывает негативное отношение некоторой части человечества к коммерческому использованию генетически модифицированных сортов растений, так как ранее используемые методы селекции растений основывались на применении новых источников генов из природных дикорастущих популяций, либо на индукции новых мутаций с помощью мутагенеза. Даже несмотря на то, что улучшение хозяйственно-ценных признаков у растений с применением геномного редактирования, представляет собой усовершенствованную технологию генетической модификации растительного генома, в ряде стран все еще сохраняется некоторое недоверие части общества к таким технологиям.

На рис. 2 схематично представлены результаты изменений в последовательности ДНК после воздействия на растение мутагенов, либо после доставки генетических конструкций с помощью агробактериальной трансформации или биобаллистики. Сравнивая между собой все три варианта следует отметить, что в их основе лежит репарация индуцированных воздействием

извне повреждений в молекуле ДНК. Репарация повреждений ДНК после воздействия мутагенами (рис. 2) индуцирует различные перестройки — инсерции, делеции, транслокации и т.д., тогда как генетическая трансформация сопровождается внесением в геном инсерций экзогенного происхождения. В варианте геномного редактирования в результате репарационных событий также происходит возникновение инсерций, делеций и однонуклеотидных замен, приводящих к сдвигу рамки считывания и как результат — к нокаутам генов-мишеней (рис. 2). В результате всех этих рассмотренных вариантов генетической модификации генома у важных сельскохозяйственных видов растений селекционером отбираются только те варианты, которые соответствуют критериям улучшенного признака или свойства модифицируемого сорта. Таким образом, важным критерием при оценке биобезопасности генетически модифицированных сортов является рассмотрение тех доказательств, по которым данный продукт может быть допущен на рынок.

Следует отметить, что отношение потребителей к использованию продукции, полученной на основе ГМО-технологий, существенно изменилось с момента крупномасштабного выпуска генетически модифицированных растений и разгоревшихся дебатов о последствиях их выращивания за период с 2006 по 2020 г. [63]. Рассматривая развитие ГМО-технологий в мировом масштабе, отмечается тенденция предпочтения крупными биотехнологическими компаниями коммерческих культур, предназначенных для скормливания животным или для переработки в изделия (например, волокна), тогда как коммерциализация продовольственных культур все еще сталкивается с трудностями при выведении готовых продуктов на рынок [64]. В связи с этим проводятся исследования по безопасности продуктов, полученных на основе ГМО-технологий, а также разрабатываются различные рекомендации по повышению осведомленности общественности и потребителей результатами этих исследований [65].

В аналитическом обзоре [66] представлены данные оценки рисков при использовании технологий, основанных на ГМО-культурах, в частности, культурах, устойчивых к гербицидам и пестицидам. Автором отмечено, что выращивание ГМО-культур, у которых устойчивость к гербициду или инсектициду обеспечивается самим растением, существенно снижает дозы распыления этих химикатов на посевных площадях и оказывает меньшую экологическую нагрузку по сравнению с традиционными технологиями. Рассматривая опасения относительно генов, обеспечивающих устойчивость нового сорта, например, к гербицидам или инсектици-

дам, следует учитывать возможность адаптации других организмов, против которых направлена та или иная инновация. Автором подчеркивается, что использование только одного гербицида в течение нескольких лет приводило к повышению устойчивости сорняков именно к этому гербициду [66]. Применение глифосата для борьбы с сорняками при возделывании устойчивых к нему генетически модифицированных сортов, оказывало на сорняки сильное селективное давление. Под действием этого давления происходил отбор растений с повышенной устойчивостью к глифосату, либо отбор смещался в сторону тех видов сорняков, которые плохо контролируются глифосатом. Приведенные выше наблюдения послужили основой корректировок ГМО-технологий, основанных на применении гербицидов и инсектицидов путем введения большего их разнообразия. Влияние выращивания трансгенных растений, а также их остатков, на физико-химические свойства почвы, ее ферментативную активность и микробную биомассу за 20-летний период их возделывания, рассматриваются и обсуждаются в обзоре [67].

Оценивая степени риска и настороженное отношение потребителей к использованию в качестве источников питания сельскохозяйственных продуктов, полученных на основе применения ГМО-технологий, необходимо отметить, что практически в то же время, когда было получено сообщение о первом генетически модифицированном растении [1], созданном исследователями в условиях лаборатории, в геноме не трансформированного вида табака *N. glauca*, Graham. была идентифицирована последовательность, характеризующаяся высокой степенью гомологии (80%) с Т-ДНК *A. rhizogenes* [68]. Эта последовательность получила название клеточной ДНК (кл-ДНК). Впоследствии такие кл-ДНК-последовательности агробактериального происхождения были выявлены у достаточно большого числа видов растений, среди которых были и употребляемые в пищу, такие как батат и арахис. Возможность передачи кл-ДНК от *A. rhizogenes* в геномы природных популяций описана для растений рода *Linaria* [69]. Всего на данный момент кл-ДНК обнаружена среди представителей более 40 видов растений [70, 71]. Тот факт, что культивируемый сладкий картофель (*Ipomoea batatas* [L.] Lam.), являющийся традиционной пищевой культурой в странах Африки, Китае, Южной и Центральной Америки и употребляемый ежегодно миллионами людей, относится к природно-трансгенным растениям [72], вполне может повлиять на все еще существующее недоверие к безопасности пищевых растений, полученных с применением ГМО-технологий.

ДАЛЬНЕЙШИЕ ПУТИ РАЗВИТИЯ МЕТОДОВ ТРАНСГЕНЕЗА И ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ РАСТЕНИЙ

Интеграция в растительный геном фрагментов экзогенных ДНК, основанная на случайном их распределении по геному, поставила перед исследователями ряд вопросов фундаментального характера, связанных с функционированием гена в новом окружении генома, т.е. с его местоположением, а также вопросы структурно-функциональной организации генома в целом. Дальнейшее развитие исследований особенностей интеграции в растительный геном трансгенов, а также их “судьбы” в последующих поколениях исходных трансгенных растений, позволило исследователям выявить новые закономерности в реализации наследственной информации, такие как РНК-интерференция [73], замолкание трансгенов [74–76] и Т-ДНК-индуцированные мутации [77–79]. Таким образом, трансгенез следует рассматривать не только как метод переноса в геном растения-донора целевых генов из различных гетерологичных систем, но и как инструмент, позволяющий манипулировать уровнем экспрессии генов клетки-хозяина, а также индуцировать мутации.

Инсерционный мутагенез. Случайное попадание трансгена в функционально-значимые районы генома может быть причиной нарушений проявления генов, локализованных в данной области. В терминах классической генетики подобные нарушения относятся к инсерционным мутациям. Важным преимуществом таких мутаций является их доступность для молекулярного анализа, поскольку последовательности, фланкирующие Т-ДНК-инсерцию, могут быть использованы в качестве маркеров для выделения интактного гена, что позволяет рассматривать трансгенез как инструмент для поиска и изучения новых генов у растений. Широкий спектр мутаций, полученных при интеграции фрагментов экзогенных ДНК в геном растений *A. thaliana* при генетической трансформации [80], и к настоящему времени представленный обширными коллекциями в банке данных (GABI-Kat), привлекает пристальное внимание исследователей. С применением методов биоинформатики, позволяющих анализировать большие выборки данных о составе нуклеотидных последовательностей для районов интеграции Т-ДНК-инсерций у трансгенных растений *A. thaliana*, выявлены различные типы хромосомных перестроек, индуцированных такими инсерциями [81, 82]. С развитием технологий полногеномного секвенирования стало возможным проведение более глубокого анализа событий Т-ДНК инсерций и особенностей их интеграции путем ресеквенирования генома трансгенного растения [83]. Ав-

торами выявлены различные делеции в правой и левой областях, прилегающих к Т-ДНК-инсерции, а также во фланкирующих последовательностях самой инсерции. Необходимо подчеркнуть, что за 40 лет применения метода генетической трансформации для модификации геномов растений исследователями накоплены обширные коллекции инсерционных мутаций, представляющих огромный интерес для проведения секвенирования и оценки масштабов возможных геномных нарушений. Последние данные по локализации и структуре Т-ДНК-инсерций, а также представленности в геноме крупномасштабных геномных перестроек как результата интеграции чужеродной ДНК, обсуждаются в обзоре [84]. Обобщение и более глубокое понимание молекулярных процессов, лежащих в основе модификации растительных геномов с привлечением методов трансгенеза, несомненно, имеет огромное значение для дальнейшего развития и усовершенствования этих методов, например, в направлении поиска “тихих гаваней” для доставки целевых генов в геномы модифицируемых видов растений.

Исследование изменений нуклеотидного состава, выявленного нами во фланкирующих районах целевого гена, доставленного в район-мишень с помощью системы CRISPR/Cas9, может дать новую информацию о функционировании репарационных систем у растений [85]. В связи с этим накопление новых данных о перестройках в районах доставки целевых генов при геномном редактировании представляет большой интерес и является предметом наших будущих исследований.

Широкие возможности открываются перед исследователями, анализирующими природно-трансгенные виды растений, поскольку события интеграции последовательностей из генома *A. rhizogenes*, произошедшие в древние времена (возможно, сотни тысяч или миллионы лет назад), отражают особенности проявления чужеродных ДНК среди потомков первых древних модифицированных растений. Горизонтальный перенос генов между различными видами является мощным фактором эволюции прокариот, однако, несмотря на приобретение ядерной мембраны, изолирующей поток генов извне, этот процесс встречается и у эукариотических организмов, например, перенос генов агробактериального происхождения с их интеграцией в ядерный геном у различных видов покрытосеменных [86, 87]. Спонтанно созданные природно-трансгенные виды растений представляют собой уникальные модели для выявления роли агробактериальных генов в их эволюции, возможной роли кл-Т-ДНК как инсерций в природных трансформантах, а также исследования разнообразия различных штам-

мов *Agrobacterium* [88]. Установлено, что в геноме природно-трансгенного растения *N. noctiflora* Hook. при использовании метода глубокого секвенирования обнаруживались две разные кл-Т-ДНК, включающие интактные гены [89], экспрессия которых наиболее активно проявлялась в корнях по сравнению с другими органами растения. Избыточное накопление транскриптов RolB/RolC в клеточной культуре, индуцированной из тканей *I. batatas*, усиливало вторичный метаболизм сладкого картофеля посредством еще неизвестного к настоящему времени механизма [90]. Обсуждение функций генов агробактериального происхождения в геномах природно-трансгенных растений, а также возможная роль кл-Т-ДНК в эволюции растений представлены в мини-обзоре [91].

Замолкание трансгенов. Отдельные случаи потери экспрессии трансгена среди потомков трансгенных растений, зарегистрированные уже через несколько лет после получения первого трансгенного растения, а впоследствии выявленные среди большого числа трансформантов [92–94], явились отражением эволюционно сложившихся в растениях механизмов подавления эндогенных генов (TGS-транскрипционная инактивация генов; transcriptional gene silencing), а также механизма разрушения ДНК экзогенного происхождения (PTGS – пост-транскрипционная инактивация генов; post transcription gene silencing). В ходе эволюции у растений сформировались механизмы эпигенетической регуляции экспрессии генов, направленные на защиту от неконтролируемого размножения в геноме мобильных генетических элементов, а также от проникновения в растительные ткани вирусов и вириодов. Истории выявления путей инактивирования трансгенов на примере генетически модифицированных растений за сорок лет со дня создания первого трансгенного растения посвящен обзор Н. Vaucheret [95]. Выявление механизмов, позволяющих растению быстро и пластично регулировать экспрессию собственных генов в ответ на непредсказуемые условия внешней среды, стимулировало разработку новых подходов подавления экспрессии целевых генов, основанных на РНК-интерференции [96]. Включение в геном трансгенного растения дополнительных копий генов с целью получения сверхэкспрессии, а также снижение экспрессии других нежелательных генов за счет нокдаунов (РНК-интерференции) являются важными этапами в изучении метаболических путей у растений, а также создания трансгенных растений с измененными путями в биосинтезе вторичных метаболитов [97].

Геномное редактирование с применением CRISPR/Cas9, как усовершенствованный метод транскрипции, в настоящее время широко ис-

пользуется для получения мутаций по многим хозяйственно-ценным признакам у растений, в том числе и таким как устойчивость к неблагоприятным факторам среды, ответными реакциями растений на стрессовые воздействия и т.д. [98]. Изменения в биосинтезе антоцианов были достигнуты сайт-направленным редактированием гена F3H моркови с помощью системы CRISPR/Cas9 [99]. Известны работы по улучшению профиля гликозилирования путем нокаутов генов *XylT* и *FucT*, кодирующих ферменты $\alpha(1,3)$ -фукозилтрансферазу и $\beta(1,2)$ -ксилозилтрансферазу в клеточной культуре табака [100, 101]. Следует подчеркнуть, что дальнейший прогресс в развитии инструментария для геномного редактирования клеточных культур ожидается в направлении индукции биаллельных мутаций, т.е. индукции нокаутов по двум аллелям выбранного гена-мишени. Разработка такого инструментария актуальна и для работ по геномному редактированию вегетативно-размножающихся и древесных видов растений. Следует отметить успешное редактирование аллелей генов, представленных в разных гомеологах злаковых культур – тритикале [102] и пшеницы [103]. Современное состояние исследований в области клеточной инженерии в направлении улучшения качества рекомбинантных терапевтических белков представлено в обзоре [104].

Таким образом, к концу 20-го столетия в биологии завершилось создание новых направлений, таких, как биотехнология и генетическая инженерия растений. В настоящее время генетическая инженерия представляет собой не только мощный инструмент для проведения фундаментальных исследований в области генетики растений, но и открывает широкие перспективы практического применения в направлении улучшения хозяйственно-ценных признаков у важных сельскохозяйственных культур, а также использования растительных клеток в качестве платформ экспрессии для биосинтеза широкого спектра рекомбинантных белков, в том числе и для биофармацевтики. Дальнейшее развитие методов транскрипции предоставило исследователям новые современные инструменты молекулярной биологии, такие как технологии РНК-интерференции и редактирования геномов с применением CRISPR/Cas. Широкие возможности открываются при использовании клеточных культур растений в качестве биореакторов рекомбинантных белков. Дальнейшее развитие метода “тихих гаваней” для геномного редактирования в варианте knock-in открывает широкие перспективы в направлении повышения выхода рекомбинантного белка в клеточных культурах растений. Совершенствование методов клеточной инженерии с применением сайт-направленного мутагенеза обеспечивает

прогресс в направлении улучшения биотехнологических характеристик клеточных культур растений для производства терапевтических рекомбинантных белков. В целом современные методы генетической инженерии, в том числе и геномного редактирования, являются мощным дополнением к традиционным методам повышения урожайности сельскохозяйственных культур и улучшения их характеристик, а также к биотехнологическим методам наработки рекомбинантных белков с использованием растительных систем экспрессии. Выявление более 40 видов природно-трансгенных растений, в том числе и длительно употребляемых человечеством в качестве пищи, дает основание к пересмотру сложившегося все еще настороженного отношения сообщества к современным технологиям модификации растительных геномов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования (грант № FWNR-2022–0022). Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Herrera-Estrella L., Depicker A., Van Montagu M., Schell J. Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector // *Nature*. 1983. V. 303. N. 5914. P. 209. <https://doi.org/10.1038/303209a0>
- Kamthan A., Chaudhuri A., Kamthan M., Datta A. Genetically modified (GM) crops: milestones and new advances in crop improvement // *Theor. Appl. Genet.* 2016. V. 129. P. 1639. <https://doi.org/10.1007/s00122-016-2747-6>
- Marone D., Mastrangelo A. M., Borrelli G. M. From transgenesis to genome editing in crop improvement: applications, marketing, and legal issues // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24: 7122. <https://doi.org/10.3390/ijms24087122>
- Zahmanova G, Aljabali A., Takova K, Minkov G, Tambuwala M., Minkov I., Lomonosoff G. Green biologics: harnessing the power of plants to produce pharmaceuticals // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. P. 17575. <https://doi.org/10.3390/ijms242417575>
- Eidenberger L., Kogelmann B., Steinkellner H. Plant-based biopharmaceutical engineering // *Nat. Rev. Bioeng.* 2023. V. 1. P. 426. <https://doi.org/10.1038/s44222-023-00044-6>
- Агробиотехнологии в мире / Под ред. К. Г. Скрыбина. Москва: Рост Медиа. 2009. С. 126.
- James C.M., Krattiger A.F. The first decade of crop biotechnology in global review of the field testing and commercialization of transgenic plants: 1986 to 1995 / ISAAA: Ithaca, NY, USA. 1996. V. 1.
- Kramer M.G., Redenbaugh K. Commercialization of a tomato with an antisense polygalacturonase gene: the FLAVR SAVR™ tomato story // *Euphytica*. 1994. V. 79. P. 293.
- James C. Global review of commercialized transgenic crops: 1998. ISAAA Briefs № 8. ISAAA: Ithaca, NY. 1998.
- James C. Global status of commercialized Biotech/ GM Crops: 2010. ISAAA Briefs № 42. ISAAA: Ithaca, NY. 2010.
- AgbioInvestor.Global GM Crop Area Review May 2023. AgbioInvestor: Pathhead, UK, 2023. <https://gm.agbioinvestor.com/downloads>
- Zagorskaya A.A., Deineko E.V. Plant-expression systems: a new stage in production of biopharmaceutical preparations // *Russ. J. Plant Physiol.* 2021. V. 68. P. 17. <https://doi.org/10.1134/S1021443721010210>
- Hood E.E., Kusnadi A., Nikolov Z., Howard J. Molecular farming of industrial proteins from transgenic maize // *Chemicals via Higher Plant Bioengineering* / Eds. F. Shahidi et al. New York: Plenum. 1999. P. 127.
- Kusnadi A.R., Evangelista R., Hood E., Howard J., Nikolov Z. Processing of transgenic corn seed and its effect on the recovery of recombinant glucuronidase // *Biotechnol. Eng.* 1998. V. 60. P. 44.
- Hood E.E., Witcher D.R., Maddock S., Meyer T., Baszczynski C., Bailey M., Flynn P., Register J., Marshall L., Bond D., Kulisek E., Kusnadi A., Evangelista R., Nikolov Z., Wooge C. et al. Commercial production of avidin from transgenic maize: characterization of transformant, production, processing, extraction and purification // *Mol. Breed.* 1997. V. 3. P. 291.
- Witcher D., Hood E., Peterson D., Bailey M., Bond D., Kusnadi A., Evangelista R., Nikolov Z., Wooge C., Mehigh R., Kappel W., Register J., Howard J. A. Commercial production β -glucuronidase (GUS): a model system for the production of proteins in plants // *Mol. Breed.* 1998. V. 4. P. 301.
- D'Aoust M.A., Couture M.M., Charland N., Trépanier S., Landry N., Ors F., Vézina L. P. The production of hemagglutininbased virus-like particles in plants: a rapid, efficient and safe response to pandemic influenza // *Plant Biotechnol. J.* 2010. V. 8. P. 607. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2009.00496.x>
- Ward B.J., Séguin A., Couillard J., Trépanier S., Landry N. Phase III: randomized observer-blind trial to evaluate lot-to-lot consistency of a new plant-derived quadrivalent virus like particle influenza vaccine in adults 18–49 years of age // *Lancet*. 2021. V. 396. P. 1491. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.01.004>
- Stander J., Mbewana S., Meyers A. E. Plant-derived human vaccines: recent developments // *BioDrugs*. 2022. V. 36. P. 573. <https://doi.org/10.1007/s40259-022-00544-8>
- Su H., van Eerde A., Rimstad E., Bock R., Branza-Nichita N., Yakovlev I. A., Clarke J. L. Plant-made

- vaccines against viral diseases in humans and farm animals // *Front. Plant Sci.* 2023. V. 14: 1170815. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1170815>
21. Rybicki E. P. Plant molecular farming of virus-like nanoparticles as vaccines and reagents // *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 2020. V. 12: e1587. <https://doi.org/10.1002/wnan.1587>
 22. Huebbers J. W., Buyel J. F. On the verge of the market – plant factories for the automated and standardized production of biopharmaceuticals // *Biotechnol. Adv.* 2021. V. 46: 107681. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107681>
 23. Schillberg S., Raven N., Fischer R., Twyman R. M., Schiermeyer A. Molecular farming of pharmaceutical proteins using plant suspension cell and tissue cultures // *Curr. Pharm. Des.* 2013. V. 19. P. 5531. <https://doi.org/10.1002/bit.27475>
 24. Corbin J. M., McNulty M. J., Macharoen K., McDonald K. A., Nandi S. Technoeconomic analysis of semicontinuous bioreactor production of biopharmaceuticals in transgenic rice cell suspension cultures // *Biotechnol. Bioeng.* 2020. V. 117. P. 3053. <https://doi.org/10.1002/bit.27475>
 25. Kopertekh L., Wilhelm R. Biosafety, risk analysis, and regulatory framework for molecular farming in Europe // *Techniques of Plant Molecular Farming. Concepts and Strategies in Plant Sciences* / Eds. C. Kole et al. Tools & Springer. 2023. P. 359. https://doi.org/10.1007/978-981-99-4859-8_14
 26. Gao F., Wen W., Liu J., Rasheed A., Yin G., Xia X., Wu X., He Zh. Genome-wide linkage mapping of QTL for yield components, plant height and yield-related physiological traits in the chinese wheat cross zhou 8425B/Chinese spring // *Front. Plant Sci.* 2015. V. 6. P. 1099. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01099>
 27. Soriano J. M., Alvaro F. Discovering consensus genomic regions in wheat for root-related traits by QTL metaanalysis // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 10537. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47038-2>
 28. Rozanova I. V., Khlestkina E. K. NGS sequencing in barley breeding and genetic studies // *Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2020. V. 24. P. 348. <https://doi.org/10.18699/VJ20.627>
 29. Stepochkin P. I., Gordeeva E. I., Khlestkina E. K. Marker-assisted breeding of hybrid lines of *Triticum dicoccon* (Schrack) Schuebl. × *Triticum aethiopicum* Jakubz. with purple grain // *Proceedings on applied botany, genetics and breeding.* 2023. V. 184. P. 139. <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2023-2-139-148>
 30. Xu Y., Liu X., Fu J., Wang H., Wang J., Huang C., Prasanna B. M., Olsen M. S., Wang G., Zhang A. Enhancing genetic gain through genomic selection: from livestock to plants // *Plant Communications.* 2020. V. 1. P. 100005. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2019.100005>
 31. Sandhu K. S., Merrick L. F., Sankaran S., Zhang Z., Carter A. H. Prospectus of genomic selection and phenomics in cereal, legume and oilseed breeding programs // *Front. Genet.* 2022. V. 12. P. 829131. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.829131>
 32. Lebedev V. G., Lebedeva T. N., Chernodubov A. I., Shestibratov K. A. Genomic selection for forest tree improvement: methods, achievements and perspectives // *Forests.* 2020. V. 11. P. 1190. <https://doi.org/10.3390/f11111190>
 33. Shimatani Z., Nishizawa-Yokoi A., Endo M., Toki S., Terada R. Positive-negative-selection-mediated gene targeting in rice // *Front. Plant Sci.* 2015. V. 5. P. 748. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00748>
 34. Nester E. W. Agrobacterium: nature's genetic engineer // *Front. Plant Sci.* 2015. V. 5. P. 730. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00730>
 35. Chu P., Agapito-Tenfen S. Z. Unintended genomic outcomes in current and next generation gm techniques: a systematic review // *Plants.* 2022. V. 11. <https://doi.org/10.3390/plants11212997>
 36. Jupe F., Rivkin A. C., Michael T. P., Zander M., Motley S. T., Sandoval J. P., Keith Slotkin R., Chen H., Castanon R., Nery J. R., Ecker J. R. The complex architecture and epigenomic impact of plant T-DNA insertions // *PLoS Genet.* 2019. V. 15. P. 1. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007819>
 37. Дейнеко Е. В., Новоселя Т. В., Загорская А. А., Филипенко Е. А., Шумный В. К. Стабильность экспрессии и наследования гена *nptII* в популяции трансгенных растений табака // *Доклады академии наук.* 1999. Т. 369. С. 420.
 38. Dehio Ch., Schell J. Stable expression of a single-copy *rolA* gene in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants allow an exhaustive mutagenic analysis of the transgene-associated phenotype // *Mol. Gen. Genet.* 1993. V. 241. P. 359. <https://doi.org/10.1007/BF00284689>
 39. Iglesias V. A., Moscone E. A., Papp I., Neuhauser F., Michalowski S., Phelan T., Spiker S., Matzke M., Matzke A. J. Molecular and cytogenetic analyses of stably and unstably expressed transgene loci in tobacco // *Plant Cell.* 1997. V. 9. P. 1251. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.8.1251>
 40. Matzke M. A., Neuhauser F., Matzke A. J. M. A variety of epistatic interaction can occur between partially homologous transgene loci brought together by sexual crossing // *Mol. Gen. Genet.* 1993. V. 236. P. 379. <https://doi.org/10.1007/BF00277137>
 41. Matzke A. J. M., Neuhauser F., Park Y. D., Ambros P. F., Matzke M. A. Homology-dependent gene silencing in transgenic plants: epistatic silencing loci contain multiple copies of methylated transgenes // *Mol. Gen. Genet.* 1994. V. 244. P. 218. <https://doi.org/10.1007/BF00285449>
 42. Rajeevkumar S., Anunanthini P., Sathishkumar R. Epigenetic silencing in transgenic plants // *Front. Plant Sci.* 2015. V. 6. P. 693. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00693>

43. Gelvin S.B. Integration of *Agrobacterium* T-DNA into the plant genome // *Annu. Rev. Genet.* 2017. V. 51. P. 195. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035320>
44. Feldmann K.A. T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: mutational spectrum // *Plant J.* 1991. V. 1. P. 71. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.1991.00071.x>
45. Gang H., Li G., Zhang M., Zhao Y., Jiang J., Chen S. Comprehensive characterization of T-DNA integration induced chromosomal rearrangement in a birch T-DNA mutant // *BMC Genom.* 2019. V. 20. P. 1. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5636-y>
46. Pucker B., Kleinbölting N., Weisshaar B. Large scale genomic rearrangements in selected *Arabidopsis thaliana* T-DNA lines are caused by T-DNA insertion mutagenesis // *BMC Genom.* 2021. V. 22. P. 1. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07877-8>
47. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. A programmable dual RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity // *Science.* 2012. V. 337. P. 816. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
48. Zhang Y., Iaffaldano B., Qi Y. CRISPR ribonucleoprotein-mediated genetic engineering in plants // *Plant Communications.* V. 2. P. 100168. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2021.100168>
49. Pramanik D., Shelake R.M., Kim M.J., Kim J.Y. CRISPR-mediated engineering across the central dogma in plant biology for basic research and crop improvement // *Mol. Plant.* 2021. V. 14. P. 127. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.11.002>
50. Liu H., Chen W., Li Y., Sun L., Chai Y., Chen H., Nie H., Huang C. CRISPR/Cas9 technology and its utility for crop improvement // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. P. 1. <https://doi.org/10.3390/ijms231810442>
51. Permyakova N.V., Deineko E.V. Crop improvement: comparison of transgenesis and gene editing // *Horticulturae.* 2024. V. 10. P. 57. <https://doi.org/10.3390/horticulturae10010057>
52. Das T., Anand U., Pal T., Mandal S., Kumar M., Radha, Gopalakrishnan A.V., Lastra J.M.P., Dey A. Exploring the potential of CRISPR/Cas genome editing for vegetable crop improvement: an overview of challenges and approaches // *Biotechnol. Bioeng.* 2023. V. 120. P. 1215. <https://doi.org/10.1002/bit.28344>
53. Guo Y., Zhao G., Gao X., Zhang L., Zhang Y., Cai X., Yuan X. CRISPR/Cas9 gene editing technology: a precise and efficient tool for crop quality improvement // *Planta.* 2023. V. 258. P. 1. <https://doi.org/10.1007/s00425-023-04187-z>
54. Das S., Kwon M., Kim J.Y. Enhancement of specialized metabolites using CRISPR/Cas gene editing technology in medicinal plants // *Front. Plant Sci.* 2024. V. 15. P. 1279738. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1279738>
55. Cao H.X., Vu G.T.H., Gailing O. CRISPR/Cas genome editing and applications in forest tree breeding // *Genome Modified Plants and Microbes in Food and Agriculture* / Academic Press, 2024. P. 343. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-18444-4.00001-6>
56. Rukavtsova E.B., Zakharchenko N.S., Lebedev V.G., Shestibratov K.A. CRISPR-Cas genome editing for horticultural crops improvement: advantages and prospects // *Horticulturae.* 2023. V. 9. P. 38. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9010038>
57. Dong O.X., Yu S., Jain R., Zhang N., Duong P.Q., Butler C., Li Y., Lipzen A., Martin J.A., Barry K.W., Schmutz J., Tian L., Ronald P.C. Marker-free carotenoid-enriched rice generated through targeted gene insertion using CRISPR-Cas9 // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. P. 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14981-y>
58. Yang W., Feng H., Zhang X., Zhang J., Doonan J.H., Batchelor W.D., Xiong L., Yan J. Crop phenomics and high-throughput phenotyping: past decades, current challenges, and future perspectives // *Mol. Plant.* 2020. V. 13. P. 187. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.01.00>
59. Shin S., Hyun Kim S., Wook Shin S., Marie Grav L., Ebdrup Pedersen L., Seong Lee J., Min Lee G. Comprehensive analysis of genomic safe harbors as target sites for stable expression of the heterologous gene in HEK293 cells // *ACS Synth. Biol.* 2020. V. 9. P. 1263. <https://doi.org/10.1002/bit.28390>
60. Hilliard W., Lee K.H. A compendium of stable hotspots in the CHO genome // *Biotechnol. Bioeng.* 2023. V. 120. P. 2133. <https://doi.org/10.1002/bit.28390>
61. Miyata Y., Tokumoto S., Arai T., Shaikhutdinov N., Deviatiiarov R., Fuse H., Gogoleva N., Garushyants S., Cherkasov A., Ryabova A., Gazizova G., Cornette R., Shagimardanova E., Gusev O., Kikawada T. Identification of genomic safe harbors in the anhydrobiotic cell line, Pv11 // *Genes.* 2022. V. 13. P. 406. <https://doi.org/10.3390/genes13030406>
62. Permyakova N.V., Marenkova T.V., Belavin P.A., Zagorskaya A.A., Sidorchuk Y.V., Uvarova E.A., Kuznetsov V.V., Rozov S.M., Deineko E.V. Assessment of the level of accumulation of the difn protein integrated by the knock-in method into the region of the histone H3.3 gene of *Arabidopsis thaliana* // *Cells.* 2021. V. 10. P. 2137. <https://doi.org/10.3390/cells10082137>
63. Torres C.S., Osalla M.T.B., Gopela J.L.N., Torres D.M.S. Public perception of agricultural biotechnology: 16 years after the public debates on GM crops // Department of Agriculture Biotech Program Office, International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, Inc., College of Development Communication, UP Los Baños, and Southeast Asian Regional Center for Graduate Study and Research in Agriculture: Los Baños, Laguna, Philippines. 2023.
64. Zhang J. Overview of global GMO development // *AgNews.* 25 February. 2021. <https://news.agropages.com/News/NewsDetail---38175.htm>
65. Sendhil R.R., Nyika J., Yadav S., Mackolil J., Prashat R.G., Workie E., Ragupathy R., Ramasundaram P. Genetically modified foods:

- bibliometric analysis on consumer perception and preference // *GM Crops & Food*. 2022. V. 13. P. 65. <https://doi.org/10.1080/21645698.2022.2038525>
66. *Graham Brookes P.G.* Genetically modified (GM) crop use 1996–2020: environmental impacts associated with pesticide use change // *GM Crops & Food*. 2022. V. 13. P. 262. <https://doi.org/10.1080/21645698.2022.2118497>
 67. *Lebedev V., Lebedeva T., Tikhonova E., Shestibratov K.* Assessing impacts of transgenic plants on soil using functional indicators: twenty years of research and perspectives // *Plants*. 2022. V. 11. P. 2439. <https://doi.org/10.3390/plants11182439>
 68. *White F.F., Garfinkel D.J., Huffman G.A., Gordon M.P., Nester E.W.* Sequence homologous to *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA in the genomes of uninfected plants // *Nature*. 1983. V. 301. P. 348. <https://doi.org/10.1038/30348a0>
 69. *Matveeva T.V., Bogomaz D.I., Pavlova O.A., Nester E.W., Lutova L.A.* Horizontal gene transfer from *Agrobacterium* to the plant *Linaria* in nature // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2012. V. 25. P. 1542. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-12-0169-R>
 70. *Zhidkin R., Zhurbenko P., Bogomaz O., Gorodilova E., Katsapov I., Antropov D., Matveeva T.* Biodiversity of rolB/C-like natural transgene in the genus *Vaccinium* L. and its application for phylogenetic studies // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. P. 6932. <https://doi.org/10.3390/ijms24086932>
 71. *Chen K., Zhurbenko P., Danilov L., Matveeva T., Otten L.* Conservation of an *Agrobacterium* cT-DNA insert in *Camellia* section *Thea* reveals the ancient origin of tea plants from a genetically modified ancestor // *Front. Plant Sci.* 2022 V. 13. P. 997762. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.997762>
 72. *Kyndt T., Quispe D., Zhai H., Jarret R., Ghislain M., Liu Q., Gheysen G., Kreuze J.F.* The genome of cultivated sweet potato contains *Agrobacterium* T-DNAs with expressed genes: an example of a naturally transgenic food crop // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015. V. 112. P. 5844. <https://doi.org/10.1073/pnas.1419685112>
 73. *Svoboda P.* Key mechanistic principles and considerations concerning RNA interference // *Front. Plant Sci.* 2020. V. 11. P. 1237. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01237>
 74. *Smith N.A., Singh S.P., Wang M.B., Stoutjesdijk P.A., Green A.G., Waterhouse P.M.* Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs // *Nature*. 2000. V. 407. P. 319. <https://doi.org/10.1038/35030305>
 75. *Teng C., Zhang C., Guo F., Song L., Fang Y.* Advances in the study of the transcriptional regulation mechanism of plant miRNAs // *Life*. 2023. V. 13. P. 1917. <https://doi.org/10.3390/life13091917>
 76. *Zhang Y., Niu N., Li S., Liu Y., Xue C., Wang H., Liu M., Zhao J.* Virus-induced gene silencing (VIGS) in Chinese Jujube // *Plants*. 2023. V.12. P. 2115. <https://doi.org/10.3390/plants12112115>
 77. *Mestiri I., Norre F., Gallego M.E., White C.I.* Multiple host-cell recombination pathways act in *Agrobacterium*-mediated transformation of plant cells // *Plant J.* 2014. V. 7. P. 511. <https://doi.org/10.1111/tj.12398>
 78. *Park S.Y., Vaghchhipawala Z., Vasudevan B., Lee L-Y., Shen Y., Singer K., Waterworth W.M., Zhang Z.J., West C.E., Mysore K.S., Gelvin S.B.* *Agrobacterium* T-DNA integration into the plant genome can occur without the activity of key non-homologous end-joining proteins // *Plant J.* 2015. V. 81. P. 934. <https://doi.org/10.1111/tj.12779>
 79. *Kleinboelting N., Huep G., Appelhagen I., Viehoever P., Li Y., Weisshaar B.* The structural features of thousands of T-DNA insertion sites are consistent with a double-strand break repair-based insertion mechanism // *Mol. Plant*. 2015. V. 8. P. 1651. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.08.011>
 80. *Azpiroz-Leehan R., Feldmann K.A.* T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: going back and forth // *Trends Genet.* 1997. V. 13. P. 152. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(97\)01094-9](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(97)01094-9)
 81. *Gang H., Liu G., Zhang M., Zhao Y., Jiang J., Chen S.* Comprehensive characterization of T-DNA integration induced chromosomal rearrangement in a birch T-DNA mutant // *BMC Genom.* 2019. V. 20. P. 311. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5636-y>
 82. *Pucker B., Kleinbölting N., Weisshaar B.* Large scale genomic rearrangements in selected *Arabidopsis thaliana* T-DNA lines are caused by T-DNA insertion mutagenesis // *BMC Genom.* 2021. V. 22. P. 599. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07877-8>
 83. *Chen X., Dong Y., Huang Y., Fan J., Yang M., Zhang J.* Whole-genome resequencing using next generation and Nanopore sequencing for molecular characterization of T-DNA integration in transgenic poplar 741 // *BMC Genom.* 2021. V. 22. P. 329. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07625-y>
 84. *Thomson G., Dickinson L., Jacob Y.* Genomic consequences associated with *Agrobacterium*-mediated transformation of plants // *Plant J.* 2024. V. 117. P. 342. <https://doi.org/10.1111/tj.16496>
 85. *Permyakova N.V., Marenkova T.V., Belavin P.A., Zagorskaya A.A., Sidorchuk Y.V., Deineko E.V.* CRISPR/Cas9-mediated targeted DNA integration: rearrangements at the junction of plant and plasmid DNA // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. P. 8636. <https://doi.org/10.3390/ijms2318636>
 86. *Matveeva T.V.* *Agrobacterium*-mediated transformation in the evolution of plants // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2018. V. 418. P. 421. https://doi.org/10.1007/82_2018_80
 87. *Matveeva T.V., Otten L.* Widespread occurrence of natural genetic transformation of plants by *Agrobacterium* // *Plant Mol. Biol.* 2019. V. 101. P. 415. <https://doi.org/10.1007/s11103-019-00913-y>
 88. *Matveeva T.V., Sokornova S.V.* Biological traits of naturally transgenic plants and their evolutionary roles // *Russ. J. Plant Physiol.* 2017. V. 64. P. 635. <https://doi.org/10.1134/S1021443717050089>
 89. *Khafizova G.V., Sierro N., Ivanov N.V., Sokornova S.V., Polev D.E., Matveeva T.V.* *Nicotiana noctiflora* Hook.

- genome contains two cellular T-DNAs with functional genes // *Plants*. 2023. V. 12. P. 3787.
<https://doi.org/10.3390/plants12223787>
90. Vasyutkina E.A., Yugay Y.A., Grigorchuk V.P., Grishchenko O.V., Sorokina M.R., Yaroshenko Y.L., Kudinova O.D., Stepochkina V.D., Bulgakov V.P., Shkryl Y.N. Effect of stress signals and Ib-rolB/C overexpression on secondary metabolite biosynthesis in cell cultures of *Ipomoea batatas* // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. P. 15100.
<https://doi.org/10.3390/ijms232315100>
 91. Матвеева Т.В. Зачем растениям агробактериальные гены? // *Экологическая генетика*. 2021. Т. 19. С. 365. <https://doi.org/10.17816/ecogen89905>
 92. Matzke M.A., Priming M., Tronovsky J., Matzke A.J.M. Reversible methylation and inactivation of marker genes in sequentially transformed tobacco plants // *EMBO J.* 1989. V. 8. P. 643.
<https://doi.org/10.1002/i.1460-2075.1989.tb.03421.x>
 93. Scheid M.O., Pazkowsky J., Potrycus I. Reversible inactivation of a transgene in *Arabidopsis thaliana* // *Mol. Gen. Genet.* 1991. V. 228. P. 104.
<https://doi.org/10.1007/BF00282454>
 94. Finnegan J., McElroy D. Transgene inactivation: plants fight back! // *Nat. Biotechnol.* 1994. V. 12. P. 883. <https://doi.org/10.1038/nbt0994-883>
 95. Vaucheret H. Epigenetic management of self and non-self: lessons from 40 years of transgenic plants // *C. R. Biol.* 2023. V. 345. P. 149.
<https://doi.org/10.5802/crbiol.96>
 96. Animasaun D.A., Lawrence J.A. Antisense RNA (asRNA) technology: the concept and applications in crop improvement and sustainable agriculture // *Mol. Biol. Rep.* 2023. V. 50. P. 9545.
<https://doi.org/10.1007/s11033-023-08814-6>
 97. Rajput M., Choudhary K., Kumar M., Vivekanand V., Chawade A., Ortiz R., Pareek N. RNA interference and CRISPR/Cas gene editing for crop improvement: paradigm shift towards sustainable agriculture // *Plants*. 2021. V. 10. P. 1914.
<https://doi.org/10.3390/plants10091914>
 98. Zhao G., Cheng Q., Zhao Y., Wu F., Mu B., Gao J., Yang L., Yan J., Zhang H., Cui X., Chen Q. The abscisic acid—responsive element binding factors MAPKKK18 module regulates abscisic acid-induced leaf senescence in *Arabidopsis* // *J. Biol. Chem.* 2023. V. 9. P. 103060.
<https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.103060>
 99. Klimek-Chodacka M., Oleszkiewicz T., Lowder L.G., Qi Y., Baranski R. Efficient CRISPR/Cas9-based genome editing in carrot cells // *Plant Cell Rep.* 2018. V. 37. P. 575.
<https://doi.org/10.1007/s00299-018-2252-2>
 100. Mercx S., Smargiasso N., Chaumont F., De Pauw E., Boutry M., Navarre C. Inactivation of the $\beta(1,2)$ -xylosyltransferase and the $\alpha(1,3)$ -fucosyltransferase genes in *Nicotiana tabacum* BY-2 cells by a multiplex CRISPR/Cas9 strategy results in glycoproteins without plant-specific glycans // *Front. Plant Sci.* 2017. V. 8. P. 403.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00403>
 101. Sheva M., Hanania U., Ariel T., Turbovski A., Rathod V.K.R., Oz D., Tekoah Y., Shaaltiel Y. Sequential genome editing and induced excision of the transgene in *N. tabacum* BY2 cells // *Front. Plant Sci.* 2020. V. 11. P. 607174.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.607174>
 102. Miroshnichenko D., Timerbaev V., Divashuk M., Pushin A., Alekseeva V., Kroupin P., Bazhenov M., Samarina M., Ermolaev A., Karlov G., Dolgov S. CRISPR/Cas9-mediated multiplexed multi-allelic mutagenesis of genes located on A, B and R subgenomes of hexaploid triticale // *Plant Cell Rep.* 2024. V. 43. P. 59.
<https://doi.org/10.1007/s00299-023-03139-x>
 103. Zhang S., Zhang R., Gao J., Gu T., Song G., Li W., Li D., Li Y., Li G. Highly efficient and heritable targeted mutagenesis in wheat via the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated CRISPR/Cas9 system // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. P. 4257.
<https://doi.org/10.3390/ijms20174257>
 104. Karki U., Fang H., Guo W., Unnold-Cofre C., Xu J. Cellular engineering of plant cells for improved therapeutic protein production // *Plant Cell Rep.* 2021. V. 40. P. 1087.
<https://doi.org/10.1007/s00299-021-02693-6>

УДК 581.1

ТРАНЗИЕНТНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ В РАСТЕНИЯХ – ЭФФЕКТИВНАЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПЛАТФОРМА ДЛЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ГЕНОМИКИ

© 2024 г. И. В. Голденкова-Павлова^{а,*}, О. С. Павленко^а, И. С. Демьянчук^а,
В. А. Фридман^а, А. А. Тюрин^а

^аФедеральное государственное бюджетное научное учреждение
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук,
Москва, Россия

*e-mail: irengold58@gmail.com

Поступила в редакцию 23.03.2024 г.

После доработки 29.03.2024 г.

Принята к публикации 31.03.2024 г.

Большой массив данных об экспрессии генов растений, накопленный благодаря сравнительным исследованиям, направляет усилия исследователей для изучения тонких механизмов влияния целевых генов и, как следствие, на разработку относительно простых и одновременно эффективных подходов, позволяющих понять физиологическую роль белковых продуктов гена. Многочисленные исследования убедительно продемонстрировали эффективность стратегии транзientной экспрессии для характеристики функций генов растений. Цели обзора: (i) рассмотреть преимущества и ограничения различных растительных систем и методов временной экспрессии, используемых для выяснения роли генных продуктов; (ii) обобщить текущие данные об использовании подходов к временной экспрессии для понимания тонких механизмов, лежащих в основе функции генов; (iii) описать достижения в области эффективной временной экспрессии генов растений. В обзоре обсуждаются основные и критические этапы каждого из методов транзientной экспрессии генов у растений, области их применения, а также основные результаты, полученные с использованием растительных объектов и их вклад в наши знания о тонких механизмах функций генов, лежащих в основе роста и развития растений, включая выяснение механизмов, регулирующих сложные метаболические пути.

Ключевые слова: белок-белковые взаимодействия, геномное редактирование, локализация белков, растительные системы, транзientная экспрессия, функции генов

DOI: 10.31857/S0015330324050023, EDN: MNDXFM

ВВЕДЕНИЕ

Использование технологий генетической инженерии, т.е. получения трансгенных растений, позволило получить уникальные экспериментальные модели, многосторонний молекулярный и физиолого-биохимический анализ которых предоставил беспрецедентные экспериментальные подтверждения о функциональной роли множества растительных генов [1]. Однако несмотря на кажущуюся простоту получения трансгенных растений, главные ограничения

широкого использования этой технологии следующие: зависимость эффективности трансформации от генотипа; значительные материальные и временные затраты при создании трансгенных линий, включающие эффективный отбор истинных трансгенных растений из огромного количества первичных трансформантов; доказательство интеграции переносимых последовательностей и событий интеграции в единственной копии в геном растений; определение уровня экспрессии как на уровне мРНК, так и на уровне белкового продукта; и т.п. Эти ограничения в создании стабильных трансформантов растений, и, прежде всего, с точки зрения затрат времени, несколько снижают ее полезность [1], отсюда стала очевидной востребованность более

Сокращения: PTGS – пост-транскрипционное замолкание генов; ББВ – белок-белковые взаимодействия; ТФ – транскрипционный фактор.

простых и эффективных подходов для экспериментальной верификации физиологической роли растительных генов.

Большой экспериментальный задел по изучению агробактериальной трансформации разных видов растений прояснил ключевые механизмы переноса, интеграции и экспрессии гетерологичных генов в них. Согласно экспериментальным данным, процесс переноса генной конструкции — а это, как правило, Т-ДНК — можно разделить на два основных этапа: проникновение агробактерий в растительную ткань (трансфекция) и трансформация Т-ДНК в геном растения (интеграция). Следует отметить, что первый этап (трансфекция) намного эффективнее второго. Действительно, второй этап — интеграция — зачастую настолько малоэффективен, что крайне мало трансформированных клеток из общей популяции могут быть отобраны с использованием селективных маркеров. Дифференциальная эффективность этих этапов означает, что в течение короткого времени миллионы растительных клеток трансфицируются Т-ДНК, но не обязательно трансформируются, и это дает возможность для кратковременной (транзиентной) экспрессии генных конструкций в растительной клетке [2], при которой неинтегрированные копии Т-ДНК временно остаются в ядре и могут транскрибироваться и транслироваться [2–5].

В представленном обзоре освещены современные экспериментальные подходы к исследованию физиологической роли генов у растений с использованием стратегии транзиентной экспрессии и обсуждены их преимущества и ограничения. В настоящее время было бы несправедливым говорить о недостатке публикаций, в которых представлены подробные базовые протоколы транзиентной экспрессии для различных видов растений, а также описаны технические аспекты, связанные с эффективным использованием этого подхода для оценки функциональной роли гена(ов) у определенных видов растений [1, 6]. Отметим также, что есть многочисленные обзоры, в которых транзиентная экспрессия генов в растительных системах применена для наработки рекомбинантных белков, прежде всего медицинского назначения [7]. Однако обзоры, в которых рассмотрены и обсуждены ключевые составляющие стратегии транзиентной экспрессии для разных растительных систем, применительно к исследованию физиологической роли растительных генов, в настоящее время в доступной научной литературе не представлены.

Цель обзора состоит в том, чтобы: (i) рассмотреть преимущества и ограничения различных растительных систем и разных методов транзиентной экспрессии, используемых для выяснения роли целевых генных продуктов; (ii) суммировать современные данные об использовании

подходов транзиентной экспрессии для выявления тонких механизмов функционирования целевых генных продуктов; (iii) представить успехи в обеспечении эффективного функционирования целевых последовательностей при транзиентной экспрессии в растениях, в том числе и за счет использования вирусных супрессоров замолкания генов, подбора штаммов агробактерий и условий выращивания растений. В обзоре будут обсуждены основные и критические шаги для каждого метода этой общей стратегии, области их использования и основные результаты, полученные на растительных объектах, а также их вклад в наши знания о тонких механизмах функционирования генов у растений, задействованных процессах роста и развития, в реакции на действие факторов среды, а также для прояснения механизмов регуляции сложных метаболических путей.

ТРАНЗИЕНТНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ ГЕНОВ: ГЕННЫЕ КОНСТРУКЦИИ, РАСТИТЕЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ И ИХ ДОСТАВКА В РАСТИТЕЛЬНЫЕ КЛЕТКИ

Генетическая трансформация на основе *Agrobacterium* включает два конкретных механизма: стабильную (интеграция Т-ДНК в геном стабильно наследуется) [8] и транзиентную трансформацию (отсутствие интеграции Т-ДНК в геном, но способную осуществлять транскрипцию и трансляцию) [2].

Хорошо известно, что наследственные мутации, включая и Т-ДНК мутации или инсерции, могут передаваться только следующим поколениям, но это не относится к транзиентной экспрессии, поскольку гены в области Т-ДНК только временно экспрессируются в соматических клетках растительных тканей, но не в половых клетках, и поэтому не передаются по наследству.

Убедительно продемонстрировано, что временная экспрессия генов приводит к образованию больших количеств рекомбинантных белков за очень короткое время (несколько дней) [7, 9].

Временная генетическая трансформация демонстрирует высокую эффективность трансформации — до 21.8%, по сравнению с эффективностью стабильной генетической трансформации — 0.14% [10]. Стабильная трансформация — трудоемкий процесс, занимающий часто несколько месяцев для получения трансформированных растений [1]. С другой стороны, транзиентная трансформация — это быстрый метод с высоким уровнем экспрессии. Временная экспрессия гетерологичных генов в растениях является многообещающей по сравнению с реализацией утомительных и трудоемких методов стабильной экспрессии [3, 11].

Таким образом, согласно текущему мнению, технология транзientной экспрессии генов в растительных системах в сравнении со стабильной экспрессией имеет важные преимущества: не требуется регенерации трансформированной клетки (не использует культуру тканей растений); отсутствует влияние на стабильность генома хозяина (вследствие отсутствия интеграции переносимой Т-ДНК); отсутствует зависимость от позиционных эффектов мест интеграции Т-ДНК; требует меньших материальных затрат; более эффективна по сравнению со стабильной. Применение этой технологии позволяет радикально ускорить сроки исследования, поскольку изучение функции целевого гена может быть проанализировано в короткий временной промежуток (от 2 до 10 дней) после доставки генной конструкции в растительные клетки (рис. 1). Эти преимущества сделали систему транзientной экспрессии мощным инструментом для изучения функции генов *in vivo* посредством физиологической и молекулярной характеристики различного растительного материала [1, 3, 11].

Для транзientной экспрессии в основном используют два типа генных конструкций: экспрессионные векторы, полученные на основе бинарных Ti-плазмид с генными кассетами в виде Т-ДНК, и векторы, несущие модифицированные геномные последовательности растительных вирусов, в том числе и клонированные в кассеты Т-ДНК [1, 12].

Для транзientной экспрессии в качестве растительных систем используют протопласты [13], каллус, суспензионные культуры [12], интактные растения [14], а также изолированные органы [15] или специализированные ткани растений [13] (рис. 1).

Для доставки генных конструкций при транзientной экспрессии генов в растениях разработаны и используются несколько подходов: трансфекция протопластов с использованием полиэтиленгликоля или электропорации; биобаллистика и агроинфильтрация [1].

Получение лишенных клеточных стенок протопластов представляет собой эффективный подход преобразования сложно организованных тканей растений в объекты, более доступные наблюдению [16, 17], что обеспечивает их широкую применимость в исследованиях субклеточной локализации белковых продуктов целевых генов, а также в тестировании различных регуляторных последовательностей, таких как промоторы и трансляционные энхансеры. Протопласты могут быть крайне полезны и в исследованиях клеточно-автономных регуляторных процессов и ответов количественным и высокопроизводительным способом. Однако протопласты имеют ограниченную применимость для

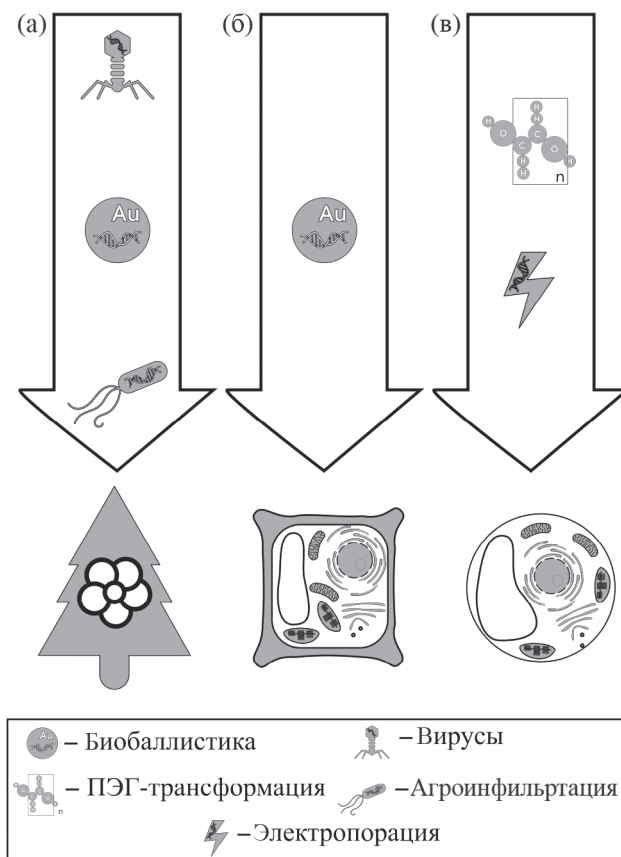


Рис. 1. Растительные системы, используемые для транзientной экспрессии и их доставка в растительные клетки: (а) – интактные растения, изолированные органы или специализированные ткани растений, основные способы доставки – агроинфильтрация, вирусные частицы, биобаллистика; (б) – каллус, суспензионные культуры растительных клеток, основные способы доставки – биобаллистика; (в) – протопласты растительных клеток, основные способы доставки – электропорация.

случаев, когда требуется тканевый и/или организменный контекст [15]. Следует при этом отметить, что трансфекция протопластов работает хорошо только для некоторых видов растений, при этом для высокого выхода жизнеспособных протопластов и их эффективной трансфекции необходимы сложные подготовительные процедуры [18].

Временная экспрессия гена(ов) в растительных клетках также может осуществляться методом высокоскоростной биобаллистики. Впервые этот метод был продемонстрирован в лаборатории Дж.К. Сэнфорда из Корнельского университета в конце 1980-х годов [19]. Преимущество метода доставки с использованием биобаллистики – применимость для различных видов растений. Этот способ доставки также оказался полезным при использовании каллуса и специализированных тканей растений.

Например, таких, как слой алейрона сои, который является биологическим показателем доли семян этих растений, поскольку одноклеточный слой алейрона сравним с семядольной тканью сои, согласно морфологического анализу и данным сравнительного анализа белков и метаболитов [20]. Как следствие, такая растительная система является потенциально полезной платформой для транзientной экспрессии в исследованиях функционального анализа генов, которые влияют на признаки семян у сои [21]. Однако при использовании биобаллистики есть определенные ограничения, среди которых следует отметить низкую эффективность доставки генных конструкций; относительно сложную процедуру подготовки биологического материала, например, для спелых мясистых плодов, анатомически не подходящих для бомбардировки; необходимость наличия специального лабораторного оборудования и материалов [20].

Суспензионные культуры клеток в основном получены для модельных растений, таких как *Arabidopsis thaliana* и *Nicotiana tabacum* (BY-2). Эти виды имеют схожие ограничения в области применения с методом протопластов. Например, поскольку клетки BY-2 являются недифференцированными, с этой тканью можно тестировать только конститутивные регуляторные элементы [21].

Транзientная экспрессия, опосредованная *Agrobacterium*, обычно известная как агроинфильтрация или агроинъекция, основана на проникновении раствора, содержащего агробактерии, в межклеточные пространства растительных тканей [22]. Агроинфильтрация может осуществляться с помощью многочисленных методов, таких как инфильтрация шприцем, вакуумная инфильтрация, агроинфильтрация на основе перекиси водорода, специальный метод агроинфильтрации, вакуумная инфильтрация с помощью листового диска, агроинфильтрация на основе опрыскивания и метод инфильтрации с использованием отдельных листьев [6].

Согласно текущему мнению, транзientную экспрессию генов в растениях технически легче проводить именно с использованием технологии агроинфильтрации, которая имеет ряд преимуществ. Во-первых, агроинфильтрация позволяет преодолеть ряд критических этапов, связанных с получением протопластов и их трансфекцией: (i) при выделении протопластов из интактного растения значение имеют условия их выращивания; (ii) часто требуется стерилизация растительной ткани; (iii) для эффективности трансфекции протопластов необходим строгий контроль качества и количества протопластов и плазмидной ДНК [23]. Во-вторых, при ис-

пользовании технологии агроинфильтрации минимизируются как процедуры трансформации, так и стрессовые воздействия на растительную клетку [24]. В-третьих, технология агроинфильтрации характеризуется высокой эффективностью, которая обусловлена тем, что до одной трети объема растительной ткани составляет межклеточное пространство, и агробактерии активно доставляются в межклеточное пространство растительной ткани [13]. Дополнительными преимуществами этой технологии являются быстрая масштабируемость процесса, которая дает возможность обрабатывать большое количество растений, а также гибкость введения нескольких трансгенных конструкций в разные области листовой пластинки, что позволяет проводить несколько анализов на одном листе [24]. Более того, такой эксперимент проводится в нативных условиях, благодаря чему сохраняется тканевая организация и клеточная целостность растения [13].

Необходимым условием успешной агроинфильтрации растения является его восприимчивость к инфекции *A. tumefaciens*. Среди восприимчивых растений важным критерием является податливость различных видов к агроинфильтрации, которая зависит от генетического фона растения-хозяина и значительно варьирует из-за структурных различий в кутикуле, компактности клеток мезофилла [25]. Наиболее популярным растением-хозяином для агроинфильтрации является *Nicotiana benthamiana* и родственные ему виды. В то же время усовершенствование технологии транзientной экспрессии позволило применить агроинфильтрацию ко многим видам растений (на сегодняшний день — более 40 видов), в том числе и древесным. Кроме тканей листа трансгенными конструкциями также успешно были агроинфильтрованы лепестки табака, петунии, цветки нескольких видов дендробиума, плоды томатов и клубники [13].

ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТРАНЗИЕНТНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В РАСТЕНИЯХ

Оценка генетических конструкций и регуляторных последовательностей. Исторически транзientная экспрессия генов в растительных системах была применена для тестирования функциональности генетических конструкций, сконструированных для получения трансгенных растений. Основная цель такой верификации — оценить, будет ли эффективно экспрессироваться переносимый целевой ген в растительных клетках. Многочисленные исследования продемонстрировали корректность

такого подхода и согласованность результатов транзientной и стабильной экспрессии перенесенных генов.

Интерес исследователей в оценке функциональной активности регуляторных последовательностей, таких как промоторы и энхансеры, а также модифицированных последовательностей целевых генов, на простых и надежных моделях, привел к развитию направления использования транзientной экспрессии для предварительного тестирования активности последовательностей (рис. 2). И технологию транзientной экспрессии исследователи используют для решения фундаментальных и прикладных задач. Например, в работе пакистанских исследователей продемонстрирована успешная модификация кодового состава гена *EPSPS*, продукт которого способен обеспечить устойчивость к гербицидам [26].

В нашем недавно проведенном исследовании с использованием технологии транзientной экспрессии генов в растениях предложены новые подходы для оптимизации кодового состава целевых генов (на примере интерферона αA) и поиска регуляторных последовательностей, на примере 5'-НТО, с целью модуляции ключевого клеточного процесса — трансляции — и, как следствие, для эффективного синтеза белковых продуктов целевых генов в растительных системах [27]. Убедительно продемонстрировали, что обеспечение стабильности белкового продукта в соответствии с правилом N-конца или за счет нового белок-стабилизирующего партнера (термостабильной лихеназы) достаточно эффективно и приводит к значимому увеличению белкового продукта в растительной системе. При транзientной экспрессии убедительно доказано, что термостабильная лихеназа

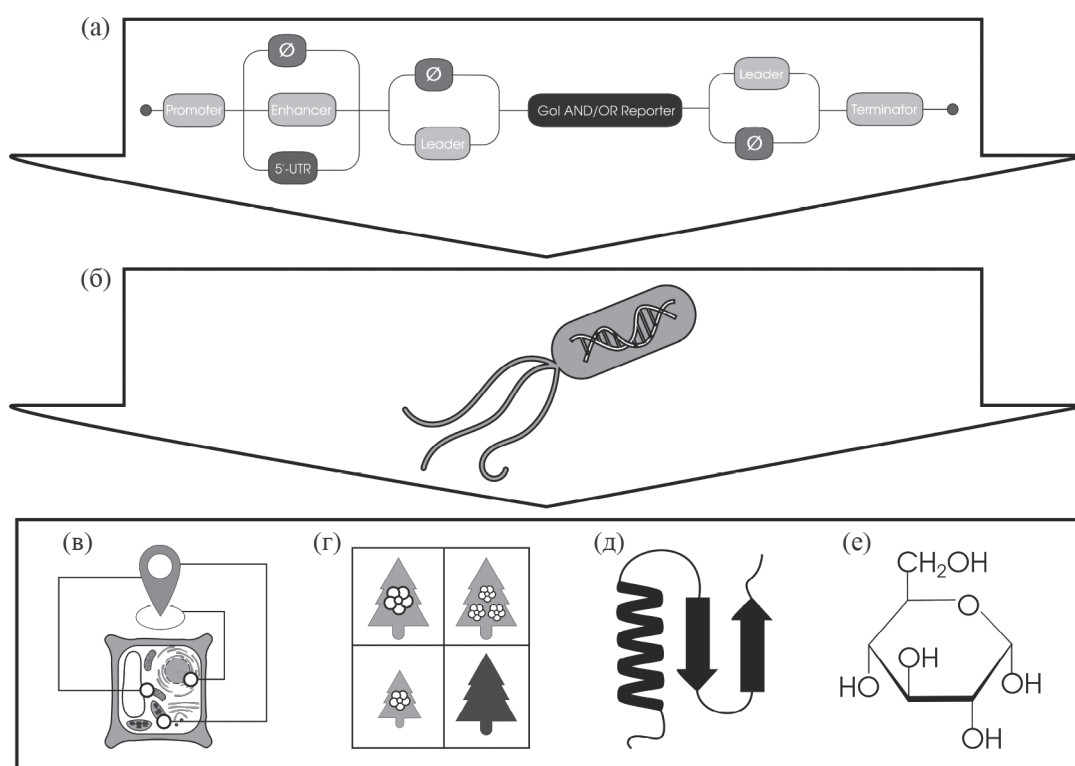


Рис. 2. Схема генных конструкций Т-ДНК для различных аспектов изучения продуктов гена в растительной клетке: (а) — общая схема Т-ДНК области, включающая промотор и терминатор (Promoter, Terminator — обязательные составляющие); энхансер (Enhancer, клонируется при тестировании функциональной активности последовательностей); лидерный сигнал (Leader, клонируется при изучении локализации генного продукта в растительной клетке); целевой ген и/или репортерный ген (GoI and/or Reporter — целевой ген клонируется при изучении функциональной роли генного продукта целевого гена; транскрипционно-трансляционное слияние целевого гена с репортерным геном используется при изучении локализации генного продукта в растительной клетке, а также в исследованиях белок-белкового взаимодействия; репортерный ген используется при тестировании функциональной активности последовательностей); (б) — генными конструкциями трансформируют агробактерии, которые используют при транзientной экспрессии для (в) изучения локализации генного продукта в растительной клетке; (г) — оценки фенотипа растений при изучении функциональной роли генного продукта целевого гена; (д) — исследовании свойств белкового продукта целевого гена, включая активности целевого белка, белок-белковые взаимодействия и др.; (е) для тестирования продуктов его функционирования с целью прояснение механизмов регуляции сложных метаболических путей.

как белок-стабилизирующий партнер не только не оказывает достоверного негативного влияния на активность целевого белка интерферона αA , входящего в его состав, но и увеличивает его накопление в растительных клетках [27].

Большой объем данных об экспрессии генов, полученный в сравнительных омиксных исследованиях, и, как правило, тщательно обработанный с помощью доступных инструментов биоинформатики, позволил выявить общие сети транскриптома, контролируемые ту или иную функцию. Более того, разработаны алгоритмы для предсказания функциональной роли нуклеотидных контекстов в регуляторных последовательностях. Следует подчеркнуть, что подходы *in silico* анализа в основном опираются на предсказательную функциональную классификацию генов или консервативность мотивов в регуляторных последовательностях, построенных на основе поиска и сравнительного анализа с известными последовательностями. И, как правило, такое предсказание требует экспериментальной верификации.

Технология транзientной экспрессии востребована исследователями для такой экспериментальной верификации с использованием репортерных генов. Так, предсказание сайтов связывания транскрипционного фактора (ТФ) и цис-регуляторных элементов (CRE) на промоторах генов FvSPR1-like2 (SPIRAL) и FvSPT (SPATULA) земляники лесной диплоидной (*Fragaria vesca* L.) с последующей верификацией их функциональности за счет делеционного анализа при транзientной экспрессии в растениях позволили подтвердить следующие регуляторные элементы и их функции: (i) в промоторе гена FvSPR1-like2: (1) мотивы для ТФ MYB59, WRKY25 и WRKY8, которые играют роль в передаче сигналов этилена; (2) мотивы для семейства ТФ ARF (auxin response factors), которые играют роль в передаче сигналов ауксина; (ii) в промоторе гена FvSPT: (1) мотивы для семейства ТФ ARR (Arabidopsis response regulators), которые играют роль в передаче сигналов цитокининов; (2) мотивы для семейства ТФ ERF (ethylene response factors), которые играют роль в передаче сигналов этилена. Эти результаты обеспечивают понимание функции генов, участвующих в не климактерическом созревании плодов клубники, и механизма, лежащего в основе этого процесса [28].

Согласно имеющемуся мнению, растения являются перспективной платформой для производства рекомбинантных белков. Одна из основных проблем эффективного использования их в качестве биофабрик связана с обеспечением высокого уровня выхода целевых продуктов. Недавно предложен новый подход к повышению уровня синтеза рекомбинантного белка, опосре-

дованного вирусным вектором. Этот подход основан на гипотезе о том, что противовирусная защита ослабляется во время антибактериального клеточного ответа [29]. Авторы работы предположили, что введенные в клетку чужеродные белки, локализованные в ядре, в том числе эффекторы, такие как бактериальные нуклеомодулины, могут препятствовать импорту клеточных ядерных белков и запускать реакции антибактериальной защиты, создавая благоприятные условия для цитоплазматической репродукции вируса. С целью подтверждения гипотезы проведены исследования по синтезу искусственного ядерного белка – красного флуоресцентного белка (mRFP), слитого с последовательностью ядерной локализации (NLS), как миметика бактериального эффектора. Было убедительно продемонстрировано, что суперпродукция mRFP:NLS индуцировала в *N. benthamiana* накопление мРНК γ -тионина (*Nb γ Thio*). Синтез NLS-содержащего белка и повышение экспрессии *Nb γ Thio* стимулировали размножение вирусного вектора на основе генома крестоцветной табачной мозаики вирус (crTMV) в листьях *N. benthamiana*. Таким образом, показано, что NLS-индуцированная активация *PryThio* и повышенное накопление мРНК *Nb γ Thio* приводят к стимуляции экспрессии GFP из crTMV [29].

Прояснение функций генных продуктов целевого гена. Для выяснения функций генных продуктов целевого гена при транзientной экспрессии, как правило, используют два основных подхода: обеспечение высокого уровня экспрессии и замолкание экспрессии целевого гена, которые применяют независимо или в комбинации (рис. 2). Таким образом, подходы, которые используют при транзientной экспрессии, сходны с подходами, используемыми при стабильной трансформации растений. Однако, согласно экспериментальным данным, при транзientной экспрессии эти два подхода, как правило, эффективны для выяснения функций генных продуктов, вариации в экспрессии которых приводят либо к видимому изменению фенотипа используемой растительной системы, либо к вариациям активности белков в метаболических путях, что отражается на качественном и/или количественном составе метаболома растений. Но в то же время очевидно и преимущество использования подходов транзientной экспрессии целевого генного продукта. Это, прежде всего, их применимость не только на ткани листьев, но и к отдельным органам растений, в частности к плодам и ягодам, что значительно сокращает временные и материальные затраты на исследование, по сравнению с получением стабильных трансформантов растений.

В качестве примера использования транзientной экспрессии можно привести недавние

исследования по функциональному анализу генов, важных в процессе старения растений. Система мониторинга транзientной экспрессии целевых генов в протопластах мезофилла растений *A. thaliana* включала в себя дифференциально экспрессирующийся репортер на основе люциферазы, который управлялся промоторами *SEN4* и *SAG12*. Данные гены (*SEN4* и *SAG12*) кодируют ксилотрансферазу эндотрансглюкозидазу/гидролазу 24 и цистеиновую протеазу соответственно, которые участвуют в деградации макромолекул, и активируются в процессе старения. Для контроля трансфекции использовали люциферазу под контролем промотора 35S (35S-RLUC). Каждую репортерную конструкцию, несущую ген люциферазы под контролем промоторов генов, чувствительных к старению, а также контрольную плазмиду под контролем 35S РНК СаMV промотора трансфицировали индивидуально в протопласты мезофилла модельного растения. Исследование показало, что экспрессия люциферазы под контролем чувствительных к старению промоторов в протопластах мезофилла демонстрирует динамику, аналогичную той, которую ранее наблюдали в исследованиях на интактных листьях. Так, экспрессия *SEN4-LUC* индуцировалась и достигала пика значительно раньше, чем *SAG12-LUC*. При этом уровни экспрессии *SEN4-LUC* и *SAG12-LUC* превышали уровень экспрессии репортера *LUC* без промотора (promoterless-LUC). А пики экспрессии *SEN4-LUC* и *SAG12-LUC* отличались от *35S-LUC*. Полученные результаты исследования убедительно продемонстрировали, что репортерная система на основе люциферазы в протопластах является надежной экспериментальной системой, которую можно эффективно использовать для изучения регуляторной роли генов, связанных со старением у растений [30].

В нашем недавнем исследовании транзientная экспрессия генов использована для изучения функциональной активности и субстратной специфичности гетерологичных десатураз, в том числе и при локализации десатуразы в разных компартментах растительной клетки (цитоплазма, хлоропласт и эндоплазматический ретикулум) на примере $\Delta 9$ -ацил-липидной десатуразы (*desC*) *Synechococcus vulcanus* [31]. Локализация $\Delta 9$ -ацил-липидной десатуразы в хлоропластах и эндоплазматическом ретикулуме обеспечивалась за счет лидерных последовательностей, направляющих белковый продукт целевого гена в соответствующие компартменты растительной клетки, а локализация в цитоплазме моделировалась экспрессией целевого гена без лидерных последовательностей. При транзientной экспрессии гена $\Delta 9$ -десатуразы в листьях *N. benthamiana* и *N. excelsior* наблюдалось достоверное снижение содержания пальмитиновой

кислоты (16:0) и увеличение доли олеиновой (18:1), линолевой (18:2), α -линоленовой (18:3) и пальмитолеиновой (16:3) жирных кислот (ЖК). Более того, было убедительно продемонстрировано, что *N. benthamiana* и *N. excelsior* являются хорошими модельными растениями в исследованиях по оценке функциональной активности и/или субстратной специфичности гетерологичных десатураз — не только $\Delta 9$ -десатуразы, но и десатуразы, которые катализируют превращение ЖК 18:1 в полиненасыщенные ЖК. Отметим, что апробированные в этом исследовании модельные растения *N. benthamiana* и *N. excelsior* характеризуются существенными различиями в композиции жирнокислотного состава, а также соотношением C18/C16 [31].

Методология транзientной экспрессии успешно применена в исследовании функциональности транскрипционных факторов на растении киноа (*Chenopodium quinoa*) [32]. Отметим, что эта культура рассматривается как главная продовольственная культура будущего, поскольку устойчива к большому числу неблагоприятных абиотических факторов. Известно, что фосфор является одним из важнейших элементов минерального питания растений, однако часто содержится в почве в недоступной для растений форме. Одной из реакций на фосфорное голодание (Pi starvation responses — PSR) у растений является повышенная экспрессия генов, индуцированных фосфатным голоданием (PSI). Частным случаем таких генов являются гены-переносчики фосфора (PHT), например, *PHR1* (PHOSPHATE STARVATION RESPONSE 1), который представляет собой центральный фактор транскрипции, контролирующий экспрессию генов PSI и соответствующие фенотипические реакции у арабидопсиса. С помощью транзientной экспрессии гена *CqPHR1* в клетках листа киноа (*CqPHR1* клонирован в вектор под контролем 35S РНК СаMV и слит с геном *GFP* в качестве репортерного). Продemonстрировано, что белок *CqPHR1* локализовался в ядрах клеток киноа, а сверхэкспрессия *CqPHR1* способствовала активации экспрессии гена PSI в листьях киноа. Таким образом, авторы доказали, что ортолог *PHR1* у киноа действует как транскрипционный активатор экспрессии гена PSI, и получили дополнительные представления о молекулярной основе адаптации киноа к почвам с ограниченным содержанием фосфора [32].

В качестве простого и быстрого способа оценки вклада белков-кандидатов в повышение устойчивости культурных растений к новым гербицидам авторы предлагают использование транзientной экспрессии соответствующих генов посредством агробактериальной трансформации культурных растений [33]. Для демонстрации данного подхода авторы провели

эксперимент по транзientной экспрессии *OsHIS1* в листьях *N. benthamiana* для последующей оценки способности белка *OsHIS1* обеспечивать толерантность растений к мезотриону (MST) – гербициду, принадлежащему к семейству ингибиторов 4-гидроксибензилпируват-диоксигеназы (HPPD). Кодовый состав гена *OsHIS1* был предварительно модифицирован для экспрессии в двудольном растении. У контрольных растений *N. benthamiana* под действием MST в концентрации от 50 мкМ и выше наблюдалось обесцвечивание апикальных меристем. В свою очередь, листья *N. benthamiana*, подвергшиеся транзientной экспрессии геном *OsHIS1m* характеризовались толерантностью к MST, не проявляя признаков обесцвечивания. С помощью транзientной экспрессии протестированы различные делеционные варианты гена *OsHIS1m*, что позволило выявить последовательность функционального домена и домена, отвечающего за стабильность исследуемого белка. Таким образом, авторы показали, что *OsHIS1* является антагонистом MST, а использование транзientной экспрессии позволяет ускорить оценку новых генов, обеспечивающих толерантность сельскохозяйственных растений к гербицидам [33].

Стратегия транзientной экспрессии использована как эффективный экспериментальный инструмент и в исследованиях функций генов, участвующих в реакции растений на действие биотических факторов среды, а также для раскрытия сложной сети защитных сигнальных путей у разных видов растений, в том числе и тех, для которых получение стабильных трансформантов требует значительного времени. Например, с использованием транзientной экспрессии выполнено детальное исследование одного из белков клеточной стенки винограда – полигалактуроназы. А именно за счет замолкания экспрессии этого гена убедительно продемонстрирована его роль в ограничении атаки патогенов, на примере *Botrytis cinerea*, вызывающего болезнь серой плесени [34]. В исследованиях по замолчанию экспрессии гена β -глюкозидазы при транзientной экспрессии приведены убедительные данные об участии этого гена в устойчивости клубники к *B. cinerea*, которая, вероятно, обусловлена увеличением активности PAL (L-фенилаланин-аммоний-лиаза) и повышением содержания фенольных соединений [35]. Транзientная экспрессия двух генов, кодирующих белки-транспортёры фосфатидилинозитола из сахарного тростника, в листьях *N. benthamiana* усиливала устойчивость этих модельных растений к инфекции патогенных микроорганизмов табака *Ralstonia solanacearum* и *Fusarium solani* var. *coeruleum*. При этом после кратковременной избыточной экспрессии у *N. benthamiana*

было обнаружено накопление H_2O_2 и развитие реакции гиперчувствительности после инокуляции *R. solanacearum* и *F. solani* var. *coeruleum*, а также изменение уровня транскриптов маркерных генов, связанных с развитием иммунитета у растений табака. Таким образом было получено убедительное доказательство, что один из генов сахарного тростника (*ScSEC14p*) тесно связан с иммунитетом растений и развитием реакции сверхчувствительности, а второй ген (*ScSEC14-1*) может быть вовлечен в иной механизм иммунитета растений [36].

Следовательно, применение транзientной экспрессии генов в растениях за счет сверхэкспрессии либо посредством замолкания позволяет выяснить, в какой степени эндогенные уровни целевого белка способствуют их защите, а также прояснить функции эндогенных генов, связанных с патогенезом или защитными механизмами. При этом следует особо подчеркнуть, что при изучении функций генов, участвующих в реакции растений на действие растительных патогенов, и для раскрытия защитных сигнальных путей у растений крайне важно применять корректные контрольные варианты, поскольку сама агроинфильтрация может вызывать защитные реакции хозяина, и, как следствие, препятствовать корректной интерпретации результатов [15]. В качестве адекватных контролей может быть применен подход, основанный на включении в эксперименты растений, инокулированных агробактериями, несущими пустой вектор [37].

Экспериментальная верификация локализации белкового продукта в предсказанных компартаментах. Согласно текущему мнению, функция белка тесно связана с его локализацией внутри клетки. Так, например, внутриклеточная локализация ферментов предоставляет ключевую информацию для понимания сложных метаболических путей. Общая стратегия в исследованиях по оценке локализации целевого белка, как правило, включает: *in silico* анализ аминокислотной последовательности белкового продукта целевого гена для предсказания его локализации; конструирование гибридных генов, в которых целевой ген имеет транскрипционно-трансляционное слияние с последовательностью репортерного гена (как правило, генов флуоресцентных белков) (рис. 2); определение локализации белкового продукта гибридного гена в одной из описанных выше растительных систем.

В распоряжении исследователей в настоящее время имеются многочисленные ресурсы для *in silico* предсказаний локализации белков. Например, для таких предсказаний могут быть использованы инструменты SignalP, ChloroP, iPSORT, TargetP и MultiLoc [38]. Результаты предсказаний не только дают информацию о потенциальной

локализации белкового продукта, но и зачастую о возможном расположении сигнальных пептидов (в N- или C-концевой области), которые могут опосредовать специфическую локализацию целевого белка. На основе этих предсказаний строится дизайн генных конструкций для экспериментальной верификации локализации белкового продукта в предсказанных компартментах с учетом предсказания о расположении сигнального пептида в белковой последовательности — в N- или C-концевой области [39]. Генные конструкции для экспериментальной верификации несут гибридный ген, в котором целевой ген имеет транскрипционно-трансляционное слияние, как правило, с последовательностью гена флуоресцентного белка под контролем сильного конститутивного промотора. Следует отметить, что выбор флуоресцентного белка для оценки локализации целевого генного продукта диктуется предсказанной локализацией в растительной клетке. Так, зеленый флуоресцентный белок показал себя эффективным маркером во многих исследованиях по экспериментальной верификации локализации целевого белка в ядре [40], цитоплазме [36], плазматической мембране [41], комплексе Гольджи [38], эндоплазматическом ретикулуле [42], тонопласте [43], митохондриях [44] и хлоропластах [42] тогда как желтый флуоресцентный белок (YFP) и mCherry, как продемонстрировано в недавнем сравнительном исследовании, наиболее подходят для оценки локализации в пероксисомах [45].

Следует отметить, что для надежной идентификации локализации белковых продуктов в растительных клетках и нивелирования ложных результатов крайне важны контрольные эксперименты. Эти контрольные эксперименты, как правило, должны включать: (i) положительный контроль, заключающийся в совместной локализации целевой последовательности со специфическими маркерами компартментов растительной клетки; (ii) отрицательный контроль — генную конструкцию, несущую только ген репортерного флуоресцентного белка под контролем того же промотора. Согласно экспериментальным данным, в качестве специфических маркеров для разных компартментов растительной клетки могут быть использованы белки, локализация которых в соответствующем компартменте подтверждена надежными методами: например, такими как гистохимический и иммуногистохимический анализ. В настоящее время такие маркеры известны и апробированы для локализации в разных компартментах: эндоплазматическом ретикулуле [38], пероксисомах [40], хлоропластах (используется автофлуоресценция хлоропластов) [38]. Следует отметить, что наиболее эффективным для этих целей может быть подход, основанный на коинфильтра-

ции суспензиями *Agrobacterium*, содержащими различные конструкции, в которых целевая последовательность и последовательности маркеров органелл слиты с различными флуоресцентными белками. Такой подход позволяет анализировать локализацию нескольких по-разному меченных флуоресцентных белков в одних и тех же клетках [38]. На наш взгляд, в качестве специфических маркеров для разных компартментов растительной клетки можно предложить и использование конструкций, в которых репортерные гены флуоресцентных белков слиты с известными лидерными последовательностями, обеспечивающими специфическую локализацию: например, лидерный сигнал гена малой субъединицы РБФК/О (для локализации в хлоропласты); лидерный сигнал гена легумина типа В4 гороха (*Vicia faba*) совместно с последовательностью SKDREL в 3'-концевой области репортерного гена, кодирующего аминокислоты C-концевой области белка (для локализации в эндоплазматическом ретикулуле) [42].

Существуют многочисленные примеры, подтверждающие, что транзистентная экспрессия флуоресцентно меченных белков является простым и универсальным способом изучения внутриклеточной локализации интересующих белков. С помощью этого подхода получены достоверные результаты о локализации в ядрах различных ТФ [40, 46] новой локализации белков в компартментах растительной клетки, например, для оксидаз с различной субстратной специфичностью [47], трансфераз [39] и многих других белков. На основании этих данных предложено вовлечение множества органелл и транспорт метаболитов между клеточными компартментами для ряда путей. Таким образом, подходы транзистентной экспрессии оказались весьма эффективными для оценки локализации генных продуктов в растительной клетке.

Прояснение механизмов регуляции сложных метаболических путей. Согласно многочисленным экспериментальным данным, транзистентная экспрессия генов в растениях оказалась крайне эффективной и для выяснения механизмов регуляции сложных метаболических путей, прежде всего вторичных метаболитов, которые имеют потенциал как ценные продукты в различных отраслях. А именно, с использованием транзистентной экспрессии выяснена роль ключевых участников метаболических путей и продемонстрирована возможность их изменения с целью направленного увеличения продукции нужного вторичного метаболита. Например, используя транзистентную экспрессию продемонстрировано, что ключевыми регуляторами флавоноидного пути являются специфические ТФ MYB и идентифицированы их гены-мишени в метаболических путях основных производных

флавоноидов: флавонолов, антоцианов и проантоцианидинов у винограда [48]. Так, экспериментальное подтверждение, что ТФ MYBA1 и MYBA2 специфически регулируют UDP-глюкозо-флавоноид-3-*O*-глюкозилтрансферазу (UFGT) в биосинтезе антоцианинов, а MYBPA1 участвует в регуляции биосинтеза проантоцианидинов, но не антоцианина, в то время как MYB5a и MYB5b активируют промоторы генов центрального пути, участвующих в биосинтезе флавоноидов [49]. Кроме того, было показано, что индуцируемый светом ТФ MYBF1 специфически активирует экспрессию гена, кодирующего флавонолсинтазу, а также генов, участвующих в синтезе халконов и флаванонов перед дигидрофлавонолами и другими флавоноидами [50]. В недавнем исследовании идентифицирован новый ТФ MYR R2R3 из китайского нарцисса (*Narcissus tazetta* L. var. *chinensis* Roem), с потенциалом подавления пути биосинтеза антоцианина, флавонола и проантоцианидина, который действует как репрессор экспрессии транскриптов ключевых генов ферментов, участвующих в биосинтезе флавоноидов [49]. Результаты этого исследования могут дать направление для улучшения цвета и структуры цветов у этого вида растений. С использованием транзientной экспрессии и замолкания в плодах груши и молодых листьях подтверждена биологическая функция ТФ MYB12b из плодов груши. Так, продемонстрировано, что его сверхэкспрессия положительно регулирует биосинтез флавонола, включая четыре основных кверцетиновых гликозида и два основных изорхаметиновых гликозида, путем позитивной регуляции общего гена биосинтеза флавоноидов (хальконсинтетазы) и гена биосинтеза флавонола (обозначенного как PbFLS) [51]. Временная экспрессия двух изоформ сплайсинга специфического ТФ WRINKLED1 (WRI1), который является членом класса ТФ AP2/EREBP плодов груши, в листьях *N. benthamiana* усиливала экспрессию генов-мишеней, таких как *PKp-b1*, *ACP1* и *KAS1*, и, как следствие, увеличивала содержание масла в 4.3–4.9 раза по сравнению с контролем. Таким образом, продемонстрирована роль этого ТФ как ключевого регулятора транскрипции генов, вовлеченных в биосинтез ЖК и масел в листовой биомассе, и, как следствие, его применение для создания растений с большой биомассой для увеличения промышленного производства растительных масел [52]. В недавнем исследовании транзientная экспрессия генов в растениях была применена для оценки полезности гибких линкерных последовательностей различного размера при конструировании слитых ферментов — 3,3-β-каротин-гидроксилазы (CRTZ) и 4,4-β-каротиноксигеназы, которые вовлечены в биосинтез ценного кетокаротиноида астаксан-

тина, природного красного красителя с мощной антиоксидантной активностью. Транзientная экспрессия гибридных генов в *N. benthamiana* позволила установить, что оба гена, слитые вместе и временно экспрессируемые, показали сходные уровни накопления астаксантина по сравнению с временной экспрессией отдельных ферментов. При этом размер линкеров, по-видимому, не влиял на активность ферментов. Полученные результаты говорят в пользу потенциала рассмотренного подхода к производству ценных продуктов растительного происхождения [53].

С использованием транзientной экспрессии проводились исследования по функциональному анализу генов CYP (цитохромов P450s), вовлеченных в биосинтез плюмбагина (5-гидрокси-2-метил-1,4-нафтахинон) из *P. zeylanica* — лекарственного растения из семейства *Plumbaginaceae*, использующегося в нетрадиционной медицине как противовоспалительное средство [54]. Уточнение функций белков-кандидатов на роль CYP проводили с использованием транзientной down-регуляции посредством искусственной microRNA, а также с помощью транзientной экспрессии в растениях *P. zeylanica*. Данные индивидуального и совместного молчания белков-кандидатов на роль CYP показали, что оба потенциальных CYP дополняют функции друг друга, и, следовательно, оба гена CYP необходимы для биосинтеза плюмбагина. Анализ временной сверхэкспрессии обоих CYP подтвердил их роль в биосинтезе плюмбагина, поскольку наблюдалось значительное повышение содержания этого вещества в листьях *P. zeylanica*. Таким образом, исследование позволило прояснить вклад каждого гена в синтез важного метаболита [54].

Изучение белок-белковых взаимодействий (ББВ) in vivo и их субклеточной локализации. В биологических системах белки представляют собой класс строго регулируемых биомолекул, которые редко работают независимо. Чтобы выполнять важные функции в клетке в различных биологических системах, белки часто организовано взаимодействуют друг с другом. Характеристика ББВ с помощью высокопроизводительных биологических и вычислительных методов, таких как, анализ взаимодействия белков *in silico*, скрининг дрожжевых двухгибридных библиотек и скрининг библиотек фагового дисплея, может дать глобальное представление о белковом интерактоме организма. Однако все эти методы требуют независимой проверки из-за ограничений, связанных с тем, что эти системы не могут имитировать нативную среду. ББВ также во многом зависит от физических свойств, модификации и состояния белков, поэтому важно обосновывать ББВ в нативных или близких к нативным условиях.

Транзиентная экспрессия оказалась весьма эффективным подходом и для изучения ББВ *in vivo* и их субклеточной локализации. Для этих целей в большинстве исследований применяют метод бимолекулярной флуоресцентной комплементации (BiFC) [55–57]. BiFC – подход, который позволяет качественно и количественно оценить и локализовать ББВ в живых клетках. Этот подход основан на оценке взаимодействия двух целевых белков, каждый из которых имеет транскрипционно-трансляционное слияние с одним из доменов флуоресцентного белка за счет совместного сворачивания флуоресцентного белка в структуру β -бочонка в случае ББВ целевых белков, что приводит к восстановлению флуорофора, т.е. основан на необратимой самосборке двух фрагментов флуоресцентного белка (рис. 3). Такое ББВ визуализируется с использованием обычной флуоресцентной или конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Хотя при использовании BiFC система расщепления GFP проявила себя в целом эффективным репортером, первоначально был отмечен ряд подводных камней или ограничений при его использовании: (i) плохое обнаружение в реальном времени из-за медленного и необратимого образования восстановленного флуоресцентного хромофора; (ii) неспецифические взаимодействия за счет высокого уровня экспрессии расщепленных флуоресцентных фрагментов, которые приводили к спонтанной самосборке и накоплению фоновых сигналов; (iii) нерастворимость или агрегация больших расщепленных флуоресцентных фрагментов, которые препятствуют ББВ [55]. Недавнее усовершенствование этого подхода, заключающегося в использовании трехсторонней сборки расщепленного GFP (вариант sfGFP – GFP с супер-fold) в растительных клетках в сочетании с использованием кассеты экспрессии, индуцируемой β -эстрадиолом, позволило преодолеть такие ограничения (рис. 3). А именно, кассета экспрессии, индуцируемая β -эстрадиолом, позволяет контролировать индукцию слитых белков, и это решает проблему клеточной токсичности, вызванной конститутивной сверхэкспрессией слитых белков; влияние стерических помех на ББВ в трехсторонней системе с расщепленным GFP сводится к минимуму за счет малого размера расщепленных фрагментов GFP, слитых с целевыми белками. Принцип трехсторонней системы расщепленного GFP состоит в следующем: каждый из двух фрагментов GFP, а именно, β -strand 10 (обозначенная авторами как S10, 20 amino acids) и β -strand 11 (обозначенная авторами как S11, 19 amino acids) используют для транскрипционно-трансляционного слияния с исследуемыми белками партнерами, а дополнительный фрагмент, обозначенный как

GFP1–9 (196 amino acids) экспрессируют отдельной кассетой (рис. 3) [55]. Как только происходит ББВ, фрагменты S10 и S11 привязываются к ассоциации с GFP1–9, что приводит к восстановлению полноразмерного GFP, который флуоресцирует (рис. 3) [55]. Получено экспериментальное подтверждение эффективности этого подхода в качестве потенциального эффективного инструмента для оценки взаимодействия мембранных белков у растений.

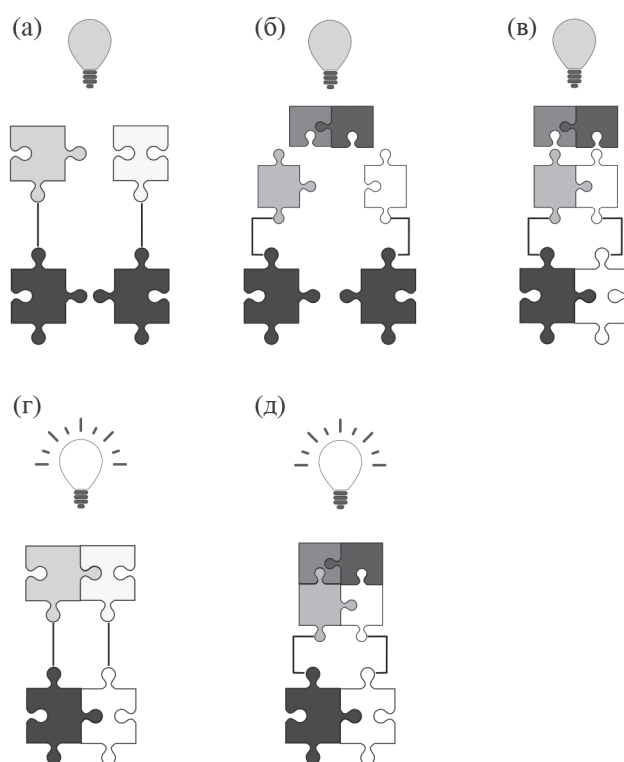


Рис. 3. Схема белок-белковых взаимодействий с использованием бимолекулярного флуоресцентного анализа комплементации (BiFC) и трехсторонней системы комплементации: (а, б) – система BiFC включает два взаимодействующих белка, каждый из которых имеет транскрипционно-трансляционное слияние с одним из белковых доменов флуоресцентного белка (а), за счет совместного сворачивания флуоресцентного белка в структуру β -бочонка в случае взаимодействия целевых белков, что приводит к восстановлению флуорофора (г). (б, в, д) – трехсторонняя система комплементации включает два фрагмента GFP, каждый из которых имеет транскрипционно-трансляционное слияние с одним из исследуемых белком-партнером, и дополнительную систему с дополнительными фрагментами GFP (б), при белок-белковом взаимодействии (в) дополнительные фрагменты GFP взаимодействуют с фрагментами GFP, которые слиты с белками-партнерами, что приводит к восстановлению полноразмерного GFP, который флуоресцирует (д). Принцип использования систем более подробно описан в тексте.

С использованием транзientной экспрессии также проводили исследования по функциональному анализу белка MORC1, который представляет собой консервативную АТФазу GHKL-типа, играющую важную роль в иммунитете растений и эпигенетике. Для того, чтобы охарактеризовать ББВ, ассоциированные с этим важным белком иммунитета, авторы идентифицировали 14 взаимодействующих с MORC1 белков с помощью двугибридного анализа дрожжей (Y2H-скрининга), используя MORC1 в качестве приманки [58]. Было обнаружено, что одним из взаимодействующих с MORC1 белков является белок поддержания структуры хромосомы 1 (SMC1), относящийся к группе белков SMCs, необходимых для удержания сестринских хроматид вместе во время митоза и мейоза. Используя целевой Y2H-анализ, авторы проверили, взаимодействуют ли SMC1 и его гомологи – SMC2 и DMS3 – физически с MORC1. В то время как все полноразмерные SMCs показали незначительное взаимодействие с MORC1, делеционный вариант SMC1 (838–1123 а.к.), показал существенное взаимодействие. Это наблюдение дает повод предполагать, что эти полноразмерные SMCs имеют домен, ингибирующий физическое взаимодействие с MORC1. Для того, чтобы идентифицировать домен SMC1, взаимодействующий с MORC1, и удалить предполагаемый ингибирующий домен, авторы создали конструкции для делеционных мутантов. Эти конструкции продуцировали SMC1-усеченные белки в растениях за счет агроинфильтрации *N. benthamiana*. В результате авторы отмечают, что SMC1-2, который содержит шарнирный домен, продемонстрировал взаимодействие с MORC1. Важно отметить, что в качестве отрицательного контроля использовали зеленый флуоресцентный белок (GFP). Таким образом, авторы идентифицировали взаимодействующий домен и обоснованно предположили, что SMC1 может иметь домен, препятствующий взаимодействию MORC1 [58].

Геномное редактирование. В последние годы возрос интерес исследователей к использованию технологии геномного редактирования растений в прикладных и фундаментальных исследованиях. Для решения критически важных проблем этой технологии, включая методические проблемы и проблемы безопасности, исследователи вполне успешно применяют технологию транзientной экспрессии генов в растениях. В настоящее время несколько модификаций метода транзientной экспрессии разработано, апробировано и доказана их эффективность [6]. Одно из усовершенствований редактирования генома CRISPR/Cas9 – Transiently Expressed CRISPR/Cas DNA (TECCDNA) – простой и эффективный подход к редактированию генома, при ко-

тором мутантные растения регенерируются после временной экспрессии ДНК CRISPR/Cas9 [59]. ДНК CRISPR/Cas9 (плазмидные конструкции) или РНК (транскрипты, синтезированные *in vitro*) могут быть доставлены с помощью биобаллистической техники. При использовании этого подхода удалось избежать длительных и трудоемких этапов отбора трансформантов и получить доказательство, что чужеродная ДНК не интегрируется в геном. Таким образом, подход TECCDNA позволяет исключить добавление гербицидов или антибиотиков в среду, предназначенную для отбора трансформированных растений.

Продemonстрировано, что замолкание цитоплазматической РНК может происходить во время транзientной экспрессии при агроинфильтрации [59, 60]. Недавно исследователи [61] определили эффекты химических добавок и предварительной обработки тепловым шоком для улучшения трансформации за счет агроинфильтрации у *N. tabacum*. Конструкция, состоящая из системы репликации геминивируса и двойного терминатора, включающего терминатор белка теплового шока в сочетании с терминатором экстенсина, также может увеличивать временную экспрессию белка в процессе агроинфильтрации [62]. Так, предварительная гиперосмотическая обработка сахарозой в течение 3 ч перед агроинфильтрацией значительно улучшила эффективность транзientной экспрессии [63].

Изучение регуляции путей биосинтеза каротиноидов привлекает многих исследователей. В качестве целевого гена часто выбирают ген *PDS*, необходимый для биосинтеза каротиноидов. Li с соавт. [64] использовали агроинфильтрацию для целевых модификаций генома *A. thaliana* (область модификации AtPDS3) и *N. benthamiana* (область модификации NbPDS). С помощью транзientной экспрессии соответствующих конструкций продемонстрировано, что нарушение *PDS* усиливало окисление хлорофилла, что приводило к развитию видимого фотообесцвеченного фенотипа [64, 65].

Редактирование генома растений поколения T0 без трансгенов весьма желательно, но сложно, особенно в отношении многолетних и вегетативно размножаемых растений. В своем недавнем исследовании [66] использовали стратегию совместного редактирования для создания растений без трансгенов посредством *Agrobacterium*-опосредованной временной экспрессии редактора цитозиновых оснований (CBE)/гРНК-Cas12a/crRNA-GFP. В частности, CBE/гРНК использовали для редактирования гена *ALS* для придания устойчивости к гербициду хлорсульфону в качестве маркера селекции, который не оказывает негативного воздействия

на фенотипы растений; Cas12a/crRNA использовали для редактирования представляющих интерес генов; GFP использовали для отбора трансгенных растений. Используя этот подход, были получены нетрансгенные растения с отредактированным геномом для различных генов (индивидуальных или множественных) в томатах, табаке, картофеле и цитрусовых в поколении T₀. Частота двуаллельных/гомозиготных нетрансгенных мутаций целевых генов среди устойчивых к гербицидам трансформантов колебалась от 8 до 50%. Полногеномное секвенирование дополнительно подтвердило отсутствие трансгенов и нецелевых мутаций в отредактированных растениях. Таким образом, убедительно продемонстрировано, что стратегия совместного редактирования эффективна для создания нетрансгенных растений с отредактированным геномом в поколении T₀, что является мощным инструментом для генетического улучшения растений [66].

Таким образом, транзистентная трансформация на основе *Agrobacterium* является безопасным, высокоуровневым и быстрым методом временной экспрессии гетерологичных генов в растительных системах [6] и широко используется как эффективный экспериментальный инструмент функциональной геномики для решения ее ключевых задач (рис. 4). Тем не менее

продолжаются исследования, направленные на увеличение эффективности методов транзистентной экспрессии, в частности, агроинфильтрации. Так, критическим шагом в успешном и эффективном использовании транзистентной экспрессии, и, в частности, агроинфильтрации, является обеспечение высокого уровня экспрессии целевой последовательности (как целевого гена, так и конструкции для замолкания). Согласно имеющемуся мнению, низкий уровень кратковременной экспрессии гетерологичных генов часто является результатом пост-транскрипционного замолкания генов (PTGS). PTGS часто происходит в растениях и является естественным защитным механизмом против вирусов и патогенов. Это узкое место можно преодолеть путем коэкспрессии супрессоров PTGS [67]. Многие вирусы растений кодируют генные продукты, которые способны подавлять PTGS, однако их способ действия и активность могут варьироваться в зависимости от семейства вирусов. Мощным подавителем замолкания генов считается белок p19, кодируемый геном вируса томата *Cymbidium ringspot* (*CymRSV*), который повышает уровни транзистентной экспрессии у различных видов растений путем секвестрации siRNA и предотвращения их ассоциации с комплексом RISC [61, 62].

Другое направление исследований направлено на усовершенствование технологии вакуумной инфильтрации. Например, авторами модифицирована процедура вакуумной инфильтрации листовых дисков, которая включает в себя вытягивание поршня шприца для создания небольшого вакуума [68]. Исследователями был разработан специальный метод агроинфильтрации для достижения высокого уровня экспрессии переносимых генов в течение 5 дней. Этот метод включает инъекцию интересующего гена в границы раздела между адаксиальным эпидермисом и мезофиллом с помощью пластикового шприца с иглой. Это приводит к образованию пузырька агроинфильтрации (площадью примерно 1 см²) с высоким содержанием агробактерий, несущих интересующий ген, который инфильтрируется в клетки эпидермиса. Предложен новый метод агроинфильтрации на основе распыления – это технология, которая применима без использования вакуумной камеры [69]. Метод инфильтрации на основе отдельных листьев также разработан для решения проблемы некроза, фотообесцвечивания, потемнения и гибели клеток в результате старения в интактных листьях [70].

Эффективность транзистентной экспрессии зависит не только от компонентов экспрессионной кассеты, но и от дополнительных условий: используемого штамма агробактерий и плотности его культуры для агроинфильтрации; химических добавок в жидкой среде

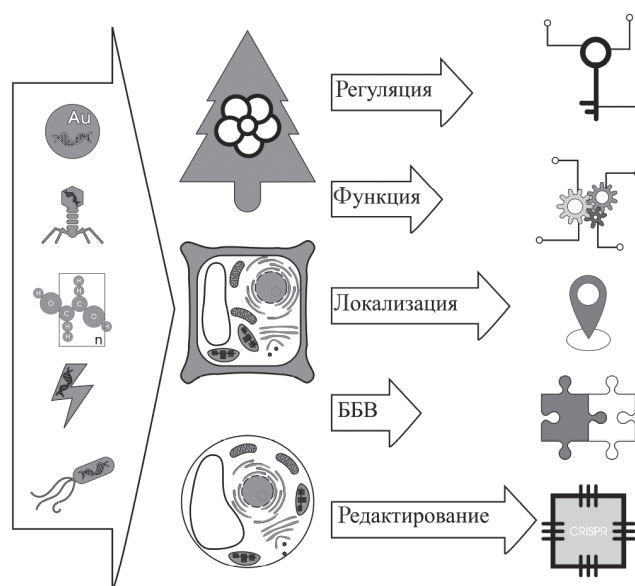


Рис. 4. Основные направления исследований с использованием транзистентной экспрессии генов в растениях. Доставка генных конструкций в растительные системы с использованием разных методических подходов расширяет экспериментальные возможности исследователей в области функциональной геномики растений. ББВ – белок-белковое взаимодействие.

для агроинфильтрации; вида и возраста растения, условий выращивания (в том числе и после агроинфильтрации) [14, 61]. Следует отметить, что, хотя оценка факторов и условий, обеспечивающих более эффективную транзientную экспрессию, в основном, основана на методах проб и ошибок, теоретическое обоснование для некоторых из них представлено.

В недавнем исследовании сравнили три распространенных лабораторных штамма на эффективность транзientной экспрессии репортерного гена у *N. benthamiana*. Эти штаммы представляли три из четырех типов использования опина: октопин (LBA4404), нопалин (C58C1) и сукцинамопин (AGL1) и члены, происходящие из изолятов-предшественников дикого типа C58 (AGL1 и C58C1) и Ach5 (LBA4404). Из протестированных штаммов *Agrobacterium* гипервирулентный штамм AGL1 показал наивысшую эффективность при транзientной экспрессии. Это позволяет предположить, что AGL1 обладает более агрессивной предрасположенностью к инфекции, или, возможно, более эффективным механизмом переноса Т-ДНК, кодируемым бактериями, по сравнению с двумя другими штаммами [61]. Схожие исследования проведены и для других видов растений [14, 71].

Усилить эффективность трансфекции можно за счет подбора плотности культуры агробактерий и химических добавок в жидкой среде для агроинфильтрации. Например, для *N. benthamiana* показано, что слишком разбавленная культура может привести к низкому соотношению бактерий к клеткам-мишеням, и это может вызвать снижение частоты трансформации, тогда как концентрированные бактериальные культуры могут способствовать усиленному росту бактерий и вызвать чрезмерное повреждение тканей [61]. На тех же модельных растениях убедительно продемонстрировано, что ацетосирингон, антиоксидант липоевая кислота и поверхностно-активное вещество Плурионик F-68 значительно повышают эффективность транзientной экспрессии целевого гена. Хотя неясно, как именно функционируют эти соединения, предполагается, что они снижают поверхностное натяжение среды для совместного культивирования и, возможно, устраняют определенные вещества, которые ингибируют прикрепление клеток, чтобы улучшить бактериальную инвазию и, в конечном итоге, доставку Т-ДНК [61].

Согласно имеющимся экспериментальным данным, возраст растений или их органов, например, листьев, может в значительной степени оказывать влияние на эффективность транзientной экспрессии. В настоящее время убедительно продемонстрировано, что в экспериментах для транзientной экспрессии лучше использовать листья более молодого возраста, но, поскольку

они, как правило, очень маленькие, выбирают второй, третий и четвертый лист сверху. Дополнительно рекомендуется не использовать для транзientной экспрессии листья растений, которые цветут. Такие рекомендации основаны на снижении транскрипции и трансляции клетки-хозяина в листьях более старого возраста и при цветении растений, что и ставит под угрозу эффективность экспрессии целевого гена [71].

В недавнем исследовании показано, что применение теплового шока всего растения (*N. benthamiana*) через 1-2 дня после агроинфильтрации приводило к значительному (в четыре-пять раз) увеличению эффективности экспрессии репортерного гена [71]. Причиной такого положительно влияния этого фактора может быть активация экспрессии белков теплового шока и шаперонов, поскольку хорошо известно, что такие белки активируются в растительных клетках в ответ на экстремальные температуры и другие абиотические стрессы для поддержания клеточного гомеостаза [71] и способствуют правильному конформационному сворачиванию нативных белков, связываясь с реакционноспособными поверхностями частично свернутых белков и эффективно изолируя их активные сайты. Это ограничивает взаимодействие между частично свернутыми интермедиатами, предотвращает агрегацию и деградацию окончательно неправильно свернутых белков, эффективно защищая их от окислительного стресса [61].

Несмотря на определенные успехи в обеспечении эффективной транзientной экспрессии целевых последовательностей в растениях, включая подбор супрессоров сайленсинга вирусных генов, агробактериальных штаммов, условий агроинфильтрации и роста растений, следует отметить, что транзientная сверхэкспрессия целевого гена может просто исчерпать возможности механизма транскрипции и трансляции клеток-хозяев, тем самым подвергая риску общую эффективность экспрессии. Следовательно, дальнейшие исследования, направленные на разработку дополнительных молекулярных инструментов, способных преодолеть негативные последствия временной экспрессии, имеют первостепенное значение для технического прогресса и будут способствовать более широкому использованию этого метода исследования.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 122042700043-9).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Viacheslavova A.O., Berdichevets I.N., Tiurin A.A., Shimshilashvili K.R., Mustafayev O., Goldenkova-Pavlova I. V. Expression of heterologous genes in plant systems: new possibilities. // *Genetika*. 2012. V. 48. P. 1245. <https://doi.org/10.1134/S1022795412110130>
2. Hwang H.-H., Yu M., Lai E.-M. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: biology and applications // *Arabidopsis Book*. 2017. V. 15. P. e0186. <https://doi.org/10.1199/tab.0186>
3. Wu H.Y., Liu K.H., Wang Y.C., Wu J.F., Chiu W.L., Chen C.Y., Wu S.H., Sheen J., Lai E.M. AGROBEST: an efficient *Agrobacterium*-mediated transient expression method for versatile gene function analyses in *Arabidopsis* seedlings // *Plant Methods*. 2014. V. 10. P. 1. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-10-19/FIGURES/10>
4. Tsuda K., Qi Y., Nguyen L. V., Bethke G., Tsuda Y., Glazebrook J., Katagiri F. An efficient *Agrobacterium*-mediated transient transformation of *Arabidopsis* // *Plant J*. 2012. V. 69. P. 713. <https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2011.04819.X>
5. Jones H.D., Doherty A., Sparks C.A. Transient transformation of plants // *Methods Mol. Biol.* 2009. V. 513. P. 131. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-427-8_8
6. Kaur M., Manchanda P., Kalia A., Ahmed F.K., Nepovimova E., Kuca K., Abd-Elsalam K.A. Agrobacterium-mediated scalable transient gene expression in genome edited crop plants // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. P. 10882. <https://doi.org/10.3390/IJMS221910882>
7. Zagorskaya A.A., Deineko E. V. Suspension-cultured plant cells as a platform for obtaining recombinant proteins // *Russ. J. Plant Physiol.* 2017. V. 64. P. 795. <https://doi.org/10.1134/S102144371705017X/METRICS>
8. Rivero L., Scholl R., Holomuzki N., Crist D., Grotewold E., Brkljacic J. Handling *Arabidopsis* plants: growth, preservation of seeds, transformation, and genetic crosses // *Methods Mol. Biol.* 2014. V. 1062. P. 3. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-580-4_1
9. Gleba Y., Klimyuk V., Marillonnet S. Magniffection – a new platform for expressing recombinant vaccines in plants // *Vaccine*. 2005. V. 23. P. 2042. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2005.01.006>
10. Heenatigala P.P.M., Yang J., Bishopp A., Sun Z., Li G., Kumar S., Hu S., Wu Z., Lin W., Yao L., Duan P., Hou H. Development of efficient protocols for stable and transient gene transformation for *Wolffia globosa* using *Agrobacterium* // *Front. Chem.* 2018. V. 6. P. 356676. <https://doi.org/10.3389/FCHEM.2018.00227/BIBTEX>
11. Kreněk P., Samajová O., Luptovciak I., Doskocilová A., Komis G., Samaj J. Transient plant transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: principles, methods and applications // *Biotechnol. Adv.* 2015. V. 33. P. 1024. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2015.03.012>
12. Zhang Y., Chen M., Siemiatkowska B., Toleco M.R., Jing Y., Strotmann V., Zhang J., Stahl Y., Fernie A.R. A highly efficient agrobacterium-mediated method for transient gene expression and functional studies in multiple plant species // *Plant Commun.* 2020. V. 1. P. 100028. <https://doi.org/10.1016/J.XPLC.2020.100028>
13. Chen Q., Lai H. Gene delivery into plant cells for recombinant protein production // *Biomed Res. Int.* 2015. V. 2015. P. 32161. <https://doi.org/10.1155/2015/932161>
14. Jelly N.S., Valat L., Walter B., Maillot P. Transient expression assays in grapevine: a step towards genetic improvement // *Plant Biotechnol. J.* 2014. V. 12. P. 1231. <https://doi.org/10.1111/PBI.12294>
15. Guidarelli M., Baraldi E. Transient transformation meets gene function discovery: the strawberry fruit case // *Front. Plant Sci.* 2015. V. 6. P. 139872. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2015.00444/BIBTEX>
16. Cao J., Yao D., Lin F., Jiang M. PEG-mediated transient gene expression and silencing system in maize mesophyll protoplasts: a valuable tool for signal transduction study in maize // *Acta Physiol. Plant.* 2014. V. 36. P. 1271. <https://doi.org/10.1007/S11738-014-1508-X/FIGURES/6>
17. Tan B., Xu M., Chen Y., Huang M. Transient expression for functional gene analysis using *Populus* protoplasts // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2013. V. 114. P. 11. <https://doi.org/10.1007/S11240-013-0299-X/FIGURES/4>
18. Burris K.P., Dlugosz E.M., Collins A.G., Stewart C.N., Lenaghan S.C. Development of a rapid, low-cost protoplast transfection system for switchgrass (*Panicum virgatum* L.) // *Plant Cell Rep.* 2016. V. 35. P. 693. <https://doi.org/10.1007/S00299-015-1913-7>
19. Klein T.M., Wolf E.D., Wu R., Sanford J.C. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells // *Nature*. 1987. V. 327. P. 70. <https://doi.org/10.1038/327070a0>
20. Schmidt M.A., Herman E.M. Characterization and functional biology of the soybean aleurone layer // *BMC Plant Biol.* 2018. V. 18. P. 1. <https://doi.org/10.1186/S12870-018-1579-8/FIGURES/4>
21. Fischer R., Emans N. Molecular farming of pharmaceutical proteins // *Transgenic Res.* 2000. V. 9. P. 279. <https://doi.org/10.1023/A:1008975123362>
22. Donini M., Marusic C. Current state-of-the-art in plant-based antibody production systems // *Biotechnol. Lett.* 2019. V. 41. P. 335. <https://doi.org/10.1007/S10529-019-02651-Z>
23. Wang H., Wang W., Zhan J., Huang W., Xu H. An efficient PEG-mediated transient gene expression system in grape protoplasts and its application in subcellular localization studies of flavonoids biosynthesis enzymes // *Sci. Hortic.* 2015. V. 191. P. 82. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2015.04.039>

24. Vaghchhipawala Z., Rojas C.M., Senthil-Kumar M., Mysore K.S. Agroinoculation and agroinfiltration: simple tools for complex gene function analyses // *Methods Mol. Biol.* 2011. V. 678. P. 65.
https://doi.org/10.1007/978-1-60761-682-5_6
25. Wang Y.C., Yu M., Shih P.Y., Wu H.Y., Lai E.M. Stable pH suppresses defense signaling and is the key to enhance *Agrobacterium*-mediated transient expression in *Arabidopsis* seedlings // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. P. 1.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-34949-9>
26. Shoukat S., Amir Zia M., Ali S. Functional characterization of a novel synthetic herbicide resistance gene in a model plant // *Sains Malays.* 2023. V. 52. P. 1133.
<https://doi.org/10.17576/jsm-2023-5204-08>
27. Tyurin A.A., Mustafaev O., Suhorukova A. V., Pavlenko O.S., Fridman V.A., Demyanchuk I.S., Goldenkova-Pavlova I. V. Modulation of the translation efficiency of heterologous mRNA and target protein stability in a plant system: the case study of interferon- α A // *Plants.* 2022. V. 11. P. 2450.
<https://doi.org/10.3390/PLANTS11192450/S1>
28. Hidvégi N., Gulyás A., Teixeira da Silva J.A., Wicaksono A., Kiss E. Promoter analysis of the SPATULA (FvSPT) and SPIRAL (FvSPR) genes in the woodland diploid strawberry (*Fragaria vesca* L.) // *Biol. Futur.* 2021. V. 72. P. 373.
<https://doi.org/10.1007/S42977-021-00089-X>
29. Sheshukova E.V., Ershova N.M., Lipskerov F.A., Komarova T.V. Enhanced synthesis of foreign nuclear protein stimulates viral reproduction via the induction of γ -thionin expression // *Plants.* 2022. V. 11. P. 11121530.
<https://doi.org/10.3390/PLANTS11121530>
30. Doan P.P.T., Kim J.H., Kim J. Rapid investigation of functional roles of genes in regulation of leaf senescence using *Arabidopsis* protoplasts // *Front. Plant Sci.* 2022. V. 13. P. 818239.
<https://doi.org/10.3389/FPLS.2022.818239/BIBTEX>
31. Berestovoy M., Pavlenko O.S., Tyurin A.A., Gorshkova E.N., Goldenkova-Pavlova I.V. Altered fatty acid composition of *Nicotiana benthamiana* and *Nicotiana excelsior* leaves under transient overexpression of the cyanobacterial *desC* gene // *Biol. Plant.* 2020. V. 64. P. 167.
<https://doi.org/10.32615/bp.2019.144>
32. Xiao X., Meng F., Satheesh V., Xi Y., Lei M. An *Agrobacterium*-mediated transient expression method contributes to functional analysis of a transcription factor and potential application of gene editing in *Chenopodium quinoa* // *Plant Cell Rep.* 2022. V. 41. P. 1975.
<https://doi.org/10.1007/S00299-022-02902-W>
33. Yao X., Qu F., Lewis M.L., Xia I.Y. Assessing herbicide tolerance potential of the rice HIS1 protein in *Nicotiana benthamiana* and soybean // MS thesis. Ohio State. 2021.
34. Bertazzon N., Raiola A., Castiglioni C., Gardiman M., Angelini E., Borgo M., Ferrari S. Transient silencing of the grapevine gene VvPGIP1 by agroinfiltration with a construct for RNA interference // *Plant Cell Rep.* 2012. V. 31. P. 133.
<https://doi.org/10.1007/S00299-011-1147-2>
35. Li Q., Ji K., Sun Y., Luo H., Wang H., Leng P. The role of FaBG3 in fruit ripening and *B. cinerea* fungal infection of strawberry // *Plant J.* 2013. V. 76. P. 24.
<https://doi.org/10.1111/TPJ.12272>
36. Hua-Ying M., Wen-Ju W., Wei-Hua S., Ya-Chun S., Feng L., Cong-Na L., Ling W., Xu Z., Li-Ping X., You-Xiong Q. Genome-wide identification, phylogeny, and expression analysis of Sec14-like PITP gene family in sugarcane // *Plant Cell Rep.* 2019. V. 38. P. 637.
<https://doi.org/10.1007/S00299-019-02394-1>
37. Olmedo P., Moreno A.A., Sanhueza D., Balic I., Silva-Sanzana C., Zepeda B., Verdonk J.C., Arriagada C., Meneses C., Campos-Vargas R. A catechol oxidase AcPPO from cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) is localized to the Golgi apparatus // *Plant Sci.* 2018. V. 266. P. 46.
<https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2017.10.012>
38. Zhang X.S., Ni R., Wang P.Y., Zhu T.T., Sun C.J., Lou H.X., Cheng A.X. Isolation and functional characterization of two Caffeoyle Coenzyme A 3-O-methyltransferases from the fern species *Polypodiodes amoena* // *Plant Physiol. Biochem.* 2019. V. 136. P. 169.
<https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2019.01.021>
39. Sun X., Yu G., Li J., Liu J., Wang X., Zhu G., Zhang X., Pan H. AcERF2, an ethylene-responsive factor of *Atriplex canescens*, positively modulates osmotic and disease resistance in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Sci.* 2018. V. 274. P. 32.
<https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2018.05.004>
40. Hou Y., Lu Q., Su J., Jin X., Jia C., An L., Tian Y., Song Y. Genome-wide analysis of the HDAC gene family and its functional characterization at low temperatures in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. P. 7622.
<https://doi.org/10.3390/IJMS23147622>
41. Tyurin A.A., Kabardaeva K.V., Berestovoy M.A., Sidorchuk Y.V., Fomenkov A.A., Nosov A.V., Goldenkova-Pavlova I.V. Simple and reliable system for transient gene expression for the characteristic signal sequences and the estimation of the localization of target protein in plant cell // *Russ. J. Plant Physiol.* 2017. V. 64. P. 672.
<https://doi.org/10.1134/S1021443717040173/METRICS>
42. Cheng J., Wen S., Xiao S., Lu B., Ma M., Bie Z. Overexpression of the tonoplast sugar transporter CmTST2 in melon fruit increases sugar accumulation // *J. Exp. Bot.* 2018. V. 69. P. 511.
<https://doi.org/10.1093/JXB/ERX440>
43. Wang B., Wang G., Shen F., Zhu S. A glycine-rich RNA-binding protein, CsGR-RBP3, is involved in defense responses against cold stress in harvested cucumber (*Cucumis sativus* L.) fruit // *Front. Plant Sci.* 2018. V. 9. P. 362717.
<https://doi.org/10.3389/FPLS.2018.00540/BIBTEX>
44. Wu B., Cao X., Liu H., Zhu C., Klee H., Zhang B., Chen K. UDP-glucosyltransferase PpUGT85A2 controls volatile glycosylation in peach // *J. Exp. Bot.* 2019. V. 70. P. 925.
<https://doi.org/10.1093/JXB/ERY419>

45. *Sasaki N., Takashima E., Nyunoya H.* Altered subcellular localization of a tobacco membrane raft-associated remorin protein by tobamovirus infection and transient expression of viral replication and movement proteins // *Front. Plant Sci.* 2018. V. 9. P. 302384. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2018.00619>
46. *Shoji T.* Analysis of the intracellular localization of transiently expressed and fluorescently labeled copper-containing amine oxidases, diamine oxidase and N-methylputrescine oxidase in tobacco, using an agrobacterium infiltration protocol // *Methods Mol. Biol.* 2018. V. 1694. P. 215. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7398-9_20
47. *Harris N.N., Luczo J.M., Robinson S.P., Walker A.R.* Transcriptional regulation of the three grapevine chalcone synthase genes and their role in flavonoid synthesis in Shiraz // *Aust. J. Grape Wine Res.* 2013. V. 19. P. 221. <https://doi.org/10.1111/AJGW.12026>
48. *Walker A.R., Lee E., Bogs J., McDavid D.A.J., Thomas M.R., Robinson S.P.* White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes // *Plant J.* 2007. V. 49. P. 772. <https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2006.02997.X>
49. *Czemmel S., Stracke R., Weisshaar B., Cordon N., Harris N.N., Walker A.R., Robinson S.P., Bogs J.* The grapevine R2R3-MYB transcription factor VvMYB1 regulates flavonol synthesis in developing grape berries // *Plant Physiol.* 2009. V. 151. P. 1513. <https://doi.org/10.1104/PP.109.142059>
50. *Zhai R., Zhao Y., Wu M., Yang J., Li X., Liu H., Wu T., Liang F., Yang C., Wang Z., Ma F., Xu L.* The MYB transcription factor PbMYB12b positively regulates flavonol biosynthesis in pear fruit // *BMC Plant Biol.* 2019. V. 19. P. 1. <https://doi.org/10.1186/S12870-019-1687-0/FIGURES/8>
51. *Ji X.J., Mao X., Hao Q.T., Liu B.L., Xue J.A., Li R.Z.* Splice variants of the castor WRI1 gene upregulate fatty acid and oil biosynthesis when expressed in tobacco leaves // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. P. 146. <https://doi.org/10.3390/IJMS19010146>
52. *Nogueira M., Enfissi E.M.A., Welsch R., Beyer P., Zurbiggen M.D., Fraser P.D.* Construction of a fusion enzyme for astaxanthin formation and its characterisation in microbial and plant hosts: a new tool for engineering ketocarotenoids // *Metab. Eng.* 2019. V. 52. P. 243. <https://doi.org/10.1016/J.YMBEN.2018.12.006>
53. *Vasav A.P., Godbole R.C., Darshetkar A.M., Pable A.A., Barykar V.T.* Functional genomics-enabled characterization of CYP81B140 and CYP81B141 from *Plumbago zeylanica* L. substantiates their involvement in plumbagin biosynthesis // *Planta.* 2022. V. 256. P. 101. <https://doi.org/10.1007/S00425-022-04014-X>
54. *Liu T.Y., Chou W.C., Chen W.Y., Chu C.Y., Dai C.Y., Wu P.Y.* Detection of membrane protein-protein interaction in planta based on dual-intein-coupled tripartite split-GFP association // *Plant J.* 2018. V. 94. P. 426. <https://doi.org/10.1111/TPJ.13874>
55. *Kudla J., Bock R.* Lighting the way to protein-protein interactions: recommendations on best practices for bimolecular fluorescence complementation analyses // *Plant Cell.* 2016. V. 28. P. 1002. <https://doi.org/10.1105/TPC.16.00043>
56. *Kerppola T.K.* Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells // *Annu. Rev. Biophys.* 2008. V. 37. P. 465. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BIOPHYS.37.032807.125842>
57. *Nam J.C., Bhatt P.S., Kim S.I., Kang H.G.* Co-immunoprecipitation for assessing protein-protein interactions in agrobacterium-mediated transient expression system in *Nicotiana benthamiana* // *Methods Mol. Biol.* 2023. V. 2690. P. 101. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3327-4_9
58. *Zhang Z., Mao Y., Ha S., Liu W., Botella J.R., Zhu J.K.* A multiplex CRISPR/Cas9 platform for fast and efficient editing of multiple genes in *Arabidopsis* // *Plant Cell Rep.* 2016. V. 35. P. 1519. <https://doi.org/10.1007/S00299-015-1900-Z>
59. *Kościańska E., Kalantidis K., Wypijewski K., Sadowski J., Tabler M.* Analysis of RNA silencing in agroinfiltrated leaves of *Nicotiana benthamiana* and *Nicotiana tabacum* // *Plant Mol. Biol.* 2005. V. 59. P. 647. <https://doi.org/10.1007/S11103-005-0668-X>
60. *Norkunas K., Harding R., Dale J., Dugdale B.* Improving agroinfiltration-based transient gene expression in *Nicotiana benthamiana* // *Plant Methods.* 2018. V. 14. P. 1. <https://doi.org/10.1186/S13007-018-0343-2/FIGURES/7>
61. *Yamamoto T., Hoshikawa K., Ezura K., Okazawa R., Fujita S., Takaoka M., Mason H.S., Ezura H., Miura K.* Improvement of the transient expression system for production of recombinant proteins in plants // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. P. 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23024-y>
62. *Zheng L., Liu G., Meng X., Li Y., Wang Y.* A versatile *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for herbaceous plants and trees // *Biochem. Genet.* 2012. V. 50. P. 761. <https://doi.org/10.1007/S10528-012-9518-0>
63. *Li J.F., Norville J.E., Aach J., McCormack M., Zhang D., Bush J., Church G.M., Sheen J.* Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9 // *Nat. Biotechnol.* 2013. V. 31. P. 688. <https://doi.org/10.1038/nbt.2654>
64. *Osakabe Y., Osakabe K.* Genome editing to improve abiotic stress responses in plants // *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2017. V. 149. P. 99. <https://doi.org/10.1016/BS.PMBTS.2017.03.007>
65. *Huang X., Jia H., Xu J., Wang Y., Wen J., Wang N.* Efficient transgene-free genome editing in plants in the T0 generation based on a co-editing strategy // *bioRxiv.* 2023. P. 2023. <https://doi.org/10.1101/2023.03.02.530790>

66. Vyacheslavova A.O., Mustafaev O.N., Tyrin A.A., Shimshilashvili K.R., Berdichevets I.N., Shayakhmetova D.M., Goldenkov M.A., Fadeev V.S., Sheludko Y.V., Goldenkova-Pavlova I.V. Set of module vectors for stable or transient expression of heterologous genes in plants // Russ. J. Genet. 2012. V. 48. P. 892. <https://doi.org/10.1134/S1022795412090098>
67. Matsuo K., Fukuzawa N., Matsumura T. A simple agroinfiltration method for transient gene expression in plant leaf discs // J. Biosci. Bioeng. 2016. V. 122. P. 351. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOSC.2016.02.001>
68. Naji-Talakar S. Plant-derived biopharmaceuticals: overview and success of agroinfiltration // Trends Capstone. 2017. V. 2. P. 1.
69. Juranić M., Nagahatenna D.S.K., Salinas-Gamboa R., Hand M.L., Sánchez-León N., Leong W.H., How T., Bazanova N., Spriggs A., Vielle-Calzada J.P., Koltunow A.M.G., Koltunow A.M.G. A detached leaf assay for testing transient gene expression and gene editing in cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) // Plant Methods. 2020. V. 16. P. 1. <https://doi.org/10.1186/S13007-020-00630-4/FIGURES/5>
70. Vargas-Guevara C., Vargas-Segura C., Villalta-Villalobos J., Pereira L.F.P., Gatica-Arias A. A simple and efficient agroinfiltration method in coffee leaves (*Coffea arabica* L.): assessment of factors affecting transgene expression // 3 Biotech. 2018. V. 8. P. 471. <https://doi.org/10.1007/S13205-018-1495-5>
71. Wang W., Vinocur B., Shoseyov O., Altman A. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response // Trends Plant Sci. 2004. V. 9. P. 244. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2004.03.006>

УДК 581.1

РЕКОМБИНАНТНЫЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА, СИНТЕЗИРУЕМЫЕ В РАСТИТЕЛЬНЫХ СИСТЕМАХ ЭКСПРЕССИИ: ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

© 2024 г. А. А. Загорская^{a, *}, Е. В. Дейнеко^a

^aФедеральное государственное бюджетное научное учреждение
“Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук”, Новосибирск, Россия
*e-mail: zagorska@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 16.01.2024 г.

После доработки 15.03.2024 г.

Принята к публикации 25.03.2024 г.

В последнее десятилетие широкое распространение получили моноклональные антитела (МКА) в качестве диагностических и терапевтических препаратов. Их основное преимущество заключается в высокой специфичности, низкой токсичности и, соответственно, более высокой безопасности при лечении инфекционных и онкологических заболеваний. Широкие возможности использования МКА привели к активной разработке технологий их производства. В обзоре описываются преимущества растительных систем для наработки МКА по сравнению с традиционными системами экспрессии. Особое внимание уделяется исследованиям, направленным на увеличение уровня экспрессии рекомбинантных МКА, приближение профиля гликозилирования к белкам человека, а также на отработку технологических особенностей, позволяющих добиться конкурентоспособности МКА растительного происхождения. Отдельный раздел посвящен успехам, достигнутым в этой области. В заключительной части рассмотрены перспективы исследований, связанные с получением МКА растительного происхождения с улучшенными свойствами.

Ключевые слова: молекулярное фермерство — моноклональные антитела — растительные системы экспрессии — рекомбинантные белки.

DOI: 10.31857/S0015330324050037, EDN: MNAFWV

ВВЕДЕНИЕ

Моноклональные антитела (МКА) представляют собой белки, близкие по структуре к иммуноглобулинам — белкам крови, участвующим в защите организма от инфекционных заболеваний. Препараты на основе МКА являются наиболее дорогостоящими, высокотехнологичными и перспективными лекарственными средствами. По данным аналитической компании Fortune Business Insights, ожидается, что к 2028 г. объем рынка терапии МКА достигнет 451.89 млрд долларов США при среднегодовом темпе роста 14.1% в период 2021–2028 гг. (<https://www.fortunebusinessinsights.com/monoclonal-antibody-therapy-market-102734>) [1]. В основном МКА применяются для лечения онкологических и аутоиммунных заболеваний,

часто в комбинации со стандартным лечением для повышения его эффективности. Основное их преимущество заключается в низкой токсичности и, соответственно, более высокой безопасности применения. Российский рынок лекарственных препаратов на основе МКА интенсивно развивается, однако на 90% представлен импортными препаратами (например, Герцептин, Авастин, Мабтера производства La Roche, Франция).

Несмотря на значительный прогресс в получении МКА в растительных системах в последние годы, их мировое промышленное производство все еще находится в зачаточном состоянии. Потенциальная коммерциализация требует дальнейшей оптимизации производственных платформ, увеличения выхода продукции и улучшения последующей обработки для повышения конкурентоспособности по сравнению с другими системами [2].

Сокращения: МКА — моноклональные антитела.

Нормативные аспекты являются еще одним важным вопросом, поскольку рекомбинантные белки, полученные из растений, называются “биоаналогами”, т.е. они отличаются от исходного фармацевтического продукта с точки зрения организма-хозяина и процесса производства [3]. Следовательно, требуются дополнительные клинические исследования для рассмотрения некоторых конкретных аспектов, таких как иммуногенность, возникающая из-за присутствия белков из растения-хозяина в очищенных продуктах. Гликоинженерия клеточного аппарата растительного типа может обеспечить гуманизацию антител и таким образом снизить возможные иммуногенные ответы. Последние достижения в инструментах редактирования генома, таких как ZFN, TALEN или система CRISPR/Cas [4], позволили разработать методы наработки МКА растительного происхождения с улучшенными физико-химическими, фармакокинетическими и фармакодинамическими свойствами, получившие название “биоветтеры” (*англ.* biobetters) [5]. Целью данного обзора является анализ особенностей, проблем и преимуществ рекомбинантных МКА, синтезируемых в растительных системах. Будут рассмотрены практические успехи в этой области и пути их достижения.

СТРУКТУРА МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

Антитела — это гликопротеины, продуцируемые иммунной системой человека и других позвоночных. Они эффективно распознают и связывают антигены-мишени, к которым имеют сродство и специфичность. Эта способность делает антитела чрезвычайно полезными в биологических исследованиях, клинической диагностике, а также в иммунотерапии различных заболеваний, в том числе онкологических [6].

Антитела состоят из 4 субъединиц: двух идентичных легких (L) и двух идентичных тяжелых цепей (H), соединенных дисульфидными связями (рис. 1). Каждая из этих цепей имеет константные домены с постоянной структурой (C_L и C_H) и переменные домены, имеющие специфическое строение в зависимости от особенностей антигена (V_L и V_H). Переменные и константные домены предназначены для связывания антител со специфическими антигенами, предотвращения проникновения патогенов и их токсинов в клетки. Эти домены также участвуют в привлечении различных иммунных молекул и клеток для нарушения функций антигена и уничтожения опухолевых клеток или патогенов. Антитела расщепляются протеиназой папаином на два Fab-фрагмента и один Fc-фрагмент. Оба Fab-фрагмента (*англ.* antigen binding fragment — антигенсвязывающий фрагмент) состоят соот-

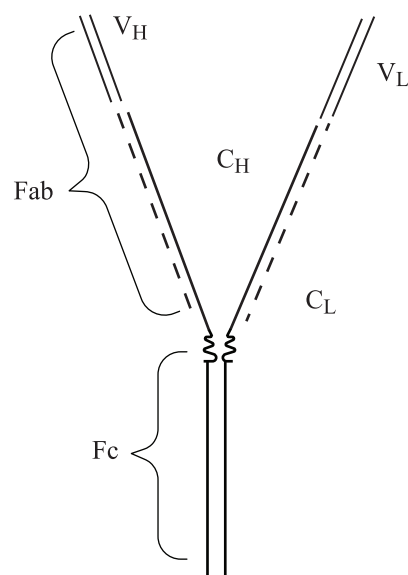


Рис. 1. Структура IgG: C_H , C_L — домены концевых аминокислотных последовательностей константных цепей; V_H , V_L — домены концевых аминокислотных последовательностей переменных цепей; Fab-фрагмент — антигенсвязывающий фрагмент; Fc — кристаллизуемый фрагмент.

ветственно из одной L-цепи и N-концевой части H-цепи. Изолированные Fab-фрагменты сохраняют способность связывать антиген. Fc-фрагмент (*англ.* fragment crystallizable — способный кристаллизоваться) состоит из C-концевой половины обеих H-цепей. Fc-области несут высококонсервативный сайт N-гликозилирования, который необходим для активности, опосредованной Fc-рецептором [7]. В каждой молекуле иммуноглобулина существует, по крайней мере, два идентичных антигенсвязывающих центра. Эта бивалентность позволяет антителам перекрестно связывать антигены с двумя или более антигенными детерминантами. Подвижность плеч молекулы дает ей возможность связываться одновременно с антигенными детерминантами, находящимися на разных расстояниях. Наличие шарнирной области в тяжелой цепи обеспечивает конформационную гибкость молекулы иммуноглобулина, позволяя обоим антигенсвязывающим центрам действовать независимо друг от друга при взаимодействии с антигенными детерминантами.

Антитела подразделяются на пять групп в соответствии с их структурой, физико-химическими и иммунологическими свойствами: IgM, IgG, IgA, IgD и IgE. Антитела этих пяти групп имеют различные Fc-области, а некоторые — более сложную, чем описанная выше, структуру. Для терапии, главным образом, используют IgG. Группы антител IgA и IgM играют важную роль в защите слизистых оболочек желудочно-ки-

шечного, мочеполового и дыхательного путей, а также присутствуют в слезной жидкости, слюне и молоке [8]. Растущие знания об антителах IgA и IgM открывают возможность их использования в качестве потенциальных биотерапевтических, иммунотерапевтических средств, а также для вакцинации через слизистые оболочки [9]. Помимо полноразмерных антител, в экспрессионных системах нарабатываются и более мелкие их фрагменты, способные связываться с антигеном, например, разнообразные одноцепочечные фрагменты scFv (*англ.* single-chain variable fragment), состоящие из вариабельных доменов тяжелых и легких цепей IgG и IgM, подобных человеческому VH-домену, а также мультимерные scFv – диатела, триатела и тетратела [10].

ИСТОРИЯ СОЗДАНИЯ И ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ В РАСТИТЕЛЬНЫХ СИСТЕМАХ

Исследования растительных вирусов, проведенные в Институте Макса Планка в Кельне в начале 1980 гг., вдохновили F. Kreuzaler на разработку концепции устойчивости растений к болезням посредством экспрессии специфических для патогенов антител. Поначалу сборка в растительной клетке полноразмерного антитела, состоящего из двух тяжелых и двух легких цепей, представлялась маловероятной в отсутствие шаперонов млекопитающих. Однако Kreuzaler с соавт. [11] провели эксперименты на модельном объекте *Acetabularia mediterranea* (*A. acetabulum* по современной классификации) и подтвердили образование полноразмерного антитела после инъекции в ядра *A. mediterranea* кДНК, кодирующих тяжелую и легкие цепи мышиного IgM. Из генов, кодирующих антитела, они удалили последовательности, кодирующие N-концевой сигнальный пептид, обеспечивающий закоривание пептида в эндоплазматическом ретикулуме, чтобы позволить рекомбинантным белкам накапливаться в цитозоле. Образование в клетке собранного антитела подтвердили с использованием антиидиотопного антитела, которое специфически связывается с собранной целой молекулой иммуноглобулина, но не с тяжелой и легкой цепями отдельно. Эта новаторская работа впервые продемонстрировала, что растительные клетки обладают способностью продуцировать сложные мультимерные белки млекопитающих [11]. В дальнейшем функциональное полноразмерное антитело IgG1 мыши было получено в трансгенных растениях табака [12]. Первоначальные успехи способствовали развитию дальнейших исследований по разработке производственных платформ, основанных на различных видах растений, целых растениях, тканевых и клеточных

культурах, а также стратегиях экспрессии, включая стабильную и транзистентную [13]. Несмотря на интерес со стороны фармацевтических компаний, лишь немногие из этих исследований способствовали получению коммерческих продуктов, однако использование растений для производства МКА по-прежнему представляется весьма перспективным.

Детально охарактеризованная структура МКА и молекулярные механизмы, лежащие в основе их огромного разнообразия, позволяют разрабатывать технологии получения рекомбинантных антител для применения в медицине, сельском хозяйстве и промышленности. В отличие от других рекомбинантных белков, продукция МКА требует одновременной экспрессии двух генов, кодирующих легкие и тяжелые цепи, и правильной сборки всех четырех цепей с помощью дисульфидных связей. Из-за автономной экспрессии существовали трудности в контроле относительного уровня экспрессии этих генов даже при условии использования идентичных регуляторных элементов [14]. Вариабельность в соотношении легких и тяжелых цепей затрудняет сборку функциональных МКА и влияет на уровень их синтеза и функциональность [15]. Разработаны несколько приемов выравнивания экспрессии двух или более трансгенов в одном и том же трансгенном растении. Для этого использовали скрещивание половым путем растений, каждое из которых несет разные трансгены [16], котрансформацию трансгенов одновременно или последовательно [17] и инсерцию тандемного массива из нескольких трансгенов, каждый со своим собственным промотором и терминатором в одном и том же векторе экспрессии [18, 19]. Общим недостатком этих стратегий является большой разброс уровней экспрессии разных трансгенов. Для преодоления этой проблемы была предложена экспрессия нескольких трансгенов под контролем одного промотора. Для соединения трансгенов были адаптированы несколько линкеров (в основном вирусного происхождения), таких как чувствительная к протеазе линкерная последовательность [20], последовательность внутреннего сайта входа в рибосомы (IRES) [21], последовательность, кодирующая NIa протеазу [22], и наиболее популярный в настоящее время саморасщепляющийся пептид 2A (F2A) из вируса ящура [23]. Предполагалось, что наличие дополнительных 18–21 аминокислот [24] в последовательности целевых белков могут нарушить их фолдинг и посттрансляционную модификацию [25]. Однако Chen с соавт. [26] показали, что при использовании линкера 2A осуществляется синтез биоактивных МКА бевацизумаба в трансгенном каллусе риса. Результаты Lin [23] демонстрируют, что линкер

2А, связывающий мультицистронные последовательности, стабильно наследуется при половом размножении, обеспечивая ожидаемо более высокий выход рекомбинантного белка в гомозиготных генерациях.

СУБКЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

Субклеточная локализация оказывает значительное влияние на структуру, стабильность и выход рекомбинантных белков, экспрессируемых в растениях. В частности, при изучении локализации рекомбинантного ЛТВ (термолabileный энтеротоксин В *E. coli*) в клетках кукурузы [27] продемонстрирована необходимость определения внутриклеточной локализации рекомбинантных белков. Это особенно важно для мультимерных белков, таких как МКА, которые для построения нативной конформации должны сначала сформировать трехмерную структуру, а затем собраться в комплексы. Стратегия, широко используемая при синтезе рекомбинантных МКА, заключается в их транспорте в эндоплазматический ретикулум (ЭПР), в котором локализовано большое количество молекулярных шаперонов. В ЭПР белки сворачиваются и собираются в мультимерные комплексы. Транспорт осуществляется с помощью транзитных сигнальных пептидов. В некоторых случаях сигналы содержат короткие общие пептидные метки, такие как KDEL и HDEL, связывающиеся со специфическими рецепторами и обеспечивающие закоривание белков в ЭПР [28]. Удерживание в ЭПР обычно позволяет увеличить накопление МКА, а также предотвращает их гликозилирование по растительному типу, которое может вызывать иммунный ответ при использовании МКА парентерально. С другой стороны, МКА, удерживаемые в ЭПР, имеют высокое содержание маннозы, что также нежелательно с фармакологической точки зрения.

Известно, что в отсутствии каких-либо дополнительных сигналов о сортировке, белки из ЭПР по умолчанию секретируются в апопласт [29]. Однако если белок содержит специфический сигнал, то он может быть направлен в альтернативные внутриклеточные компартменты, например, вакуоль. При изучении синтеза sIgA/G в растительных клетках установили, что секреция этого рекомбинантного антитела была медленной, и спустя 24 ч из клетки секретировалось лишь 10% вновь синтезированных молекул иммуноглобулинов. При этом основная часть sIgA/G и продукты его распада транспортировались в вакуоли [30]. Исследование механизма доставки и накопления sIgA/G в вакуолях обнаружило, что удаление 18 С-терминальных ами-

нокислот тяжелой цепи IgA/G-комплекса приводило к нарушению транспорта его в вакуоли. В “разобранном” виде легкая цепь эффективно транспортировалась из клетки в виде мономеров. Таким образом, был сделан вывод о локализации сигнала сортировки в вакуоль в хвостовой части гибридной γ/α цепи [31]. Зависимость внутриклеточного транспорта от конформации белка, олигомерного состояния и структуры любых присоединенных углеводов показана в работе Ellgaard с соавт. [32].

Субклеточную локализацию гетеромультимерных белковых комплексов и секреторного IgAGuy’s 13 изучали в клетках эндосперма трансгенного риса [33]. Показано, что не связанные в ансамбли тяжелые и легкие цепи аккумулируются в виде белковых телц в ЭПР или в белок-запасующих вакуолях, где их содержание значительно варьирует. МКА, имеющие правильный фолдинг, преимущественно накапливаются в белок-запасующих вакуолях.

Хлоропласты привлекают внимание исследователей как компартменты с альтернативной системой окислительных реакций для образования дисульфидных связей и приобретения правильной структуры сложных МКА. Кроме того, рекомбинантные МКА инкапсулируются мембранами хлоропластов и эффективно изолируются от цитозольных протеаз, которые более распространены и разнообразны, чем те, которые обнаружены в хлоропластах. Белки, которые кодируются ядром, синтезируются в цитозоле и должны быть локализованы в хлоропластах, содержат транзитные пептиды, состоящие из последовательных сигналов для входа в систему импорта TIC/ТОС внешней двойной мембраны хлоропласта и сигнал нацеливания на тилакоиды или строму. В работе Chin-Fatt с соавт. [34] разработана стратегия инкапсулирования IgA в хлоропластах кормовых растений как часть рецептуры корма, предназначенного для пассивной иммунизации скота против энтеротоксигенной *E. coli*. Показано, что направление рекомбинантных МКА в просвет тилакоидов может оказаться перспективной стратегией не только для повышения выхода рекомбинантных белков, но и способствовать альтернативным методам очистки. Неповрежденные хлоропласты можно легко выделить из неочищенных экстрактов с помощью низкоскоростного центрифугирования [35].

Синтез МКА непосредственно в хлоропластах имеет некоторые преимущества: это отсутствие эффекта положения, отсутствие замолкания генов, высокий уровень накопления продукта, а также минимизация экологических рисков при использовании целых трансгенных растений. В хлоропластах рекомбинантные антитела приобретают правильную конформа-

цию с образованием дисульфидных связей. Однако ограниченность посттранскрипционных модификаций не позволяет использовать хлоропласты для синтеза большей части МКА. В настоящее время разработана экспрессия в хлоропластах моноклональных больших одноцепочечных (Isc) антител против гликопротеина D вируса простого герпеса [36]. Транспластомная трансформация растений представляется многообещающей возможностью накопления рекомбинантных иммунотоксинов (РИТ) в компартменте, который отделяет продукт от потенциальных молекулярных мишеней. Однако этот способ получения связан с ограниченными посттрансляционными модификациями и более трудоемким процессом создания транспластомных линий растений [37].

ЗНАЧЕНИЕ ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ И ВОЗМОЖНОСТИ ГЛИКОИНЖЕНЕРИИ РАСТЕНИЙ

Особенности гликозилирования белка могут влиять на его фолдинг, агрегацию, устойчивость к протеолитической деградации, растворимость, транспорт, а также изменять его функциональную активность и иммуногенность. В настоящее время терапевтические МКА обычно получают в клеточных системах млекопитающих, которые генерируют смесь примерно 5–9 различных гликоформ [38]. Учитывая факт, что отдельные гликоформы имеют различную функциональную активность, такая смесь потенциально может содержать молекулы антител с ограниченной активностью или без нее. Однако если доля гипогликозилированных антител в препаратах, произведенных в НЕК-системе (Human Embryonic Kidney 293), довольно низка, то при производстве в растительной системе она может достигать 21–35%. В связи с этим требуется тщательный анализ профиля гликозилирования МКА для терапевтического использования.

Влияние определенного профиля гликозилирования на связывающую активность рекомбинантных антител анализировали в работе Stelter с соавт. [39]. VRC01, нейтрализующее антитело к ВИЧ, было экспрессировано в растениях в различных форматах гликозилирования. Установлено, что при гликозилировании по растительному типу антитела имели 30-кратное снижение аффинности с рецептором FcγRI по сравнению с аналогичными антителами, произведенными в клеточной культуре НЕК. Удаление Fc-гликанов путем мутагенеза привело к полному нарушению связывания. Однако инженерия растительных гликанов с удалением коровой фукозы и ксилозы существенно улучшила

аффинность антител растительного происхождения и восстановила связываемость с соответствующими рецепторами (FcγRIIa и FcγRIIb). Влияние удаления фукозы на связываемость с рецепторами антител, синтезированных в растительных системах или в системах клеток млекопитающих, наблюдалось и ранее и является, вероятно, результатом стерического изменения в гликанах в сайте связывания с рецепторами. Добавление концевых остатков β-1,4-галактозы к антителам с удаленными остатками фукозы и ксилозы не привело к дальнейшему улучшению их взаимодействия с рецепторами.

Известно также, что гликопротеины, продуцируемые другими организмами, могут действовать как эпитопы в организме человека и приводить к нежелательным иммунным реакциям [40]. Гликоинженерные подходы к настройке профилей гликозилирования предоставляют возможность минимизировать иммуногенный потенциал гликопротеинов, в частности МКА, растительного происхождения. В настоящее время основные усилия в гликоинженерии растений сосредоточены на сочетании приемов, обеспечивающих ингибирование биосинтеза растительных гликоэпитопов с последующим переносом в растительный геном генов гликозилтрансфераз млекопитающих. Это дает возможность максимально приблизить процесс гликозилирования рекомбинантных белков, синтезируемых в растительных системах экспрессии, к процессам, происходящим в клетках человека.

Попытки выделить одну гликоформу из гетерогенной смеси гликовариантов с помощью аффинной хроматографии имели ограниченный успех [41], а очистка одной гликоформы в настоящее время вообще не осуществима [42]. Для снижения гетерогенности гликозилирования МКА разрабатываются различные подходы, включая использование гликан-модифицирующих ферментов *in vitro* [43] и генетическую модификацию [44]. Растения представляют собой привлекательное решение для производства высокоомогенных МКА с определенным статусом гликозилирования [45]. Гликоинженерная линия растений обычно производит весьма однородные гликоформы [46]. Антитела VRC01, генерируемые в ΔXF *Nicotiana benthamiana*, синтезировались в виде единственной гликоформы. Как правило, инактивация эндогенных гликозилтрансфераз у растений приводит к более чем 80% чистоте гликоформ [47]. Разработанная платформа на основе гликоинженерных трансгенных растений способна продуцировать антитела без фукозы и ксилозы, в которых 90% молекул несут галактозилированные N-гликаны, включая 60% бигалактозилированных структур [48].

ЭКСТРАКЦИЯ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ИЗ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ И ИХ ОЧИСТКА

Большое внимание в разработке технологий получения МКА в растительных системах уделяется процедуре выделения и очистки рекомбинантных белков. В настоящее время технологии DSP (DSP — downstream processing) включают центрифугирование, фильтрацию, флокуляцию и различные интегрированные методы для разделения твердой и жидкой фаз, очистку и концентрацию белка. При масштабном производстве отдается предпочтение более общим и разработанным технологиям, таким как мембранная очистка, хроматография и осаждение при нагревании или изменении pH, уже применяемым в работах с микробными платформами и клетками млекопитающих. Эти технологии должны быть адаптированы к специфическим растительным сопутствующим загрязнениям (волокна, масла, полифенолы и органические кислоты) [49].

Очистка МКА может производиться с помощью их слияния с различными субстратами, например, с олеозином, эластиноподобными полипептидами, гидрофобинами и пр. Технология слияния была разработана для аффинного захвата рекомбинантных антител посредством экспрессии на поверхности липидных телец слитого олеозин-белок А. Данный метод был использован для очистки МКА трастузумаба, транзистентно экспрессируемого в *N. benthamiana*, с извлечением 70–75% [50]. Слияние белка L или белка G с целлюлозосвязывающим доменом использовали для очистки антител на целлюлозных носителях [51]. Благодаря уникальным поверхностно-активным свойствам, гидрофобины способны изменять гидрофобность своего партнера по слиянию, например, рекомбинантного МКА, что обеспечивает эффективную очистку с использованием водной двухфазной системы на основе поверхностно-активного вещества. При этом продемонстрировано, что слияние с гидрофобинами может увеличивать накопление целевых белков в растениях в связи со снижением токсичности данных соединений по сравнению со свободным рекомбинантным белком [52].

Необходимо отметить также, что основой образования функциональных МКА является правильная укладка отдельных цепей с последующей их точной сборкой. Это обеспечивает функциональность гетеротетрамерным гликопротеинам. МКА с неправильной конформацией разлагаются внутренней системой контроля качества белков клетки-хозяина, что приводит к низким выходам продукта. Кроме того, антитела с неправильной конформацией не способ-

ны эффективно взаимодействовать со своим антигеном-мишенью или опосредовать эффекторные функции. Они имеют неблагоприятную фармакокинетику и склонны к агрегации. Помимо этих биологических ограничений, очистка рекомбинантных МКА, загрязненных агрегированными или неправильно свернутыми МКА, создает серьезные препятствия для последующей обработки терапевтических молекул и в настоящее время является предметом многочисленных исследований [53].

Все описанные стратегии применимы также для синтеза МКА с использованием суспензионных культур растительных клеток, секретирующих целевые белки в питательную среду. В случае, если рекомбинантные МКА транспортируются во внутриклеточные компартменты для осуществления посттрансляционных модификаций или для повышения их стабильности, требуется экстракция рекомбинантных белков. Она заключается в разрушении растительной ткани и последующих очистках как от твердых частиц, так и от многочисленных сопутствующих загрязняющих растворимых веществ [54].

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПЛАТФОРМ ДЛЯ СИНТЕЗА МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

Для получения МКА в молекулярном фермерстве до последнего времени преимущественно использовались целые растения с применением либо транзистентной экспрессии с помощью вирусных или невирусных векторов, либо стабильной трансформации трансгенами, нацеленными на ядерный или хлоропластный геном. Преимущества стабильной ядерной трансформации заключаются в наследуемости трансгена, позволяющей создать посевной материал для будущего использования, и возможности выращивания трансгенных растений в полевых условиях с применением уже имеющихся агротехнических схем и приемов, а следовательно, с почти неограниченной масштабируемостью при минимальных затратах. Однако создание и характеристика стабильных трансгенных линий — дорогостоящий и трудоемкий процесс. Среди сопутствующих проблем наиболее серьезными являются замолкание генов, эффекты положения и экологические проблемы, связанные с ГМО.

Транзистентная экспрессия

N. benthamiana — наиболее распространенное растение, используемое для транзистентной экспрессии. Оно легко поддается генетической трансформации и быстро нарабатывает большие объемы биомассы для масштабного про-

изводства. Существуют две основные стратегии переноса трансгенов в клетки растений-хозяев для биопродукции: невирусные и вирусные. Экспрессия на основе невирусных векторов с использованием обычных векторов экспрессии растений обеспечивает быстрое накопление рекомбинантных белков в листьях, обычно через 2–4 дня после инфильтрации, с выходом белка 0.1–200 мкг/г [55]. Процесс вирусной экспрессии занимает около 2 недель, но обычно обеспечивает более высокие уровни рекомбинантного белка (до 5.0 мг/г на примере GFP) [56]. Некоторые эффективные платформы экспрессии на основе вирусных векторов – это Geneware® (Kentucky BioProcessing LLC) и magnICON® (Icon Genetics) (репликон РНК вируса табачной мозаики TMV) и система экспрессии геминивирусов (репликон ДНК вируса желтого карлика фасоли BeYDV) (Университет штата Аризона) [57–59]. Транзиентные системы обеспечивают также возможность одновременной коэкспрессии нескольких генов для выработки сложных белков, в частности МКА [60]. Многочисленные МКА, особенно те, которые предназначены для лечения внезапных вирусных эпидемий, например, вспышки лихорадки Эбола, тяжелого острого респираторного синдрома или пандемии коронавирусной инфекции и гриппа, были успешно получены в системах транзиентной экспрессии [61–63].

Культура бородатых корней

Культура бородатых корней (НР) обладает рядом достоинств, таких как генетическая стабильность, рост в стерильных условиях, быстрое накопление биомассы и возможность секретирования гетерологичных белков в культуральную среду. С другой стороны, низкие выходы белка (в диапазоне мг на литр культуры) и трудности в организации крупномасштабного производства в биореакторах являются основной проблемой для будущей эксплуатации этой платформы. Тем не менее, есть примеры различных классов гетерологичных белков, в частности МКА [64], которые были успешно продуцированы в НР. Первым биофармацевтическим белком, который был экспрессирован в НР в 1997 г., явилось МКА анти-*Streptococcus mutans* Guy's 13, успешно секретированное в культуральную среду [65]. В настоящее время описано получение противоракового МКА M12, экспрессируемого в культуре НР *N. tabacum* [66]. В этой работе разработан оптимизированный протокол культивирования, увеличивающий выход антител в 30 раз и обеспечивающий секрецию около 57% полученных антител M12 в культуральную среду. Анализ очищенных МКА показал, что они обладают типичным паттерном растительного гликозили-

рования, который может представлять серьезную проблему для использования таких МКА в терапии заболеваний человека. В последнее время для производства терапевтических МКА используются гликоинженерные культуры НР *N. benthamiana*, в которой гены $\beta(1,2)$ -ксилозилтрансферазы и $\alpha(1,3)$ -фукозилтрансферазы были отключены при использовании РНК-интерференции [67]. МКА CD20, анти-тенасцин С и иммуноцитокнины, нацеленные на опухоль, экспрессированные в гликоинженерной культуре НР, продемонстрировали возможность наработки полностью функциональных противораковых МКА с совместимым с человеком профилем гликозилирования. К тому же было показано, что очистку антител из культуральной среды НР можно проводить с использованием простой двухстадийной процедуры, состоящей из первого осветления среды фильтрованием и стадии аффинной хроматографии [67].

Культура мха

За последние два десятилетия мох *Physcomitrella patens* активно использовали в качестве модельного вида в фундаментальных исследованиях и объекта в биотехнологии. Ключевые достоинства данной биотехнологической платформы – это полностью секвенированный геном, возможности для точной геномной инженерии с помощью гомологичной рекомбинации, сертифицированное GMP-производство в биореакторах, успешное масштабирование до 500-литровых волновых реакторов, отличная гомогенность гликозилирования белка, высокая стабильность от партии к партии и безопасная криоконсервация для хранения элитных клеток. В этой системе производится несколько белков человека в качестве потенциальных биофармацевтических препаратов, в частности, противоопухолевые МКА [68]. В настоящее время разработаны линии *P. patens* для получения продуктов с паттернами N-гликозилирования, характерными для млекопитающих и человека [69]. Такие линии перспективны для фотобиореакторного производства фрагментов антител [70], а также терапевтических МКА с повышенной антителозависимой цитотоксичностью (ADCC) по сравнению с такими же продуктами, полученными в культурах млекопитающих. Некоторые рекомбинантные биофармацевтические препараты, произведенные в этих линиях, не только подобны тем, которые получают в системах млекопитающих, например, в клетках CHO, но и обладают более высоким качеством (biobetters). Гликооптимизированные МКА IgG1 IGN314 были разработаны для распознавания паттернов гликозилирования Lewis Y, связанных с опухолью. Они оказались в 40 раз более

эффективным в индукции лизиса трех разных линий опухолевых клеток, чем антитела, продуцируемые в клетках CHO [71]. В отличие от гликопротеинов млекопитающих, растительные образцы лишены α -1,6-связанного остатка фукозы в структуре N-гликана. Антитела, полученные в мхе и не имеющие этого углеводного фрагмента, оказались более эффективны в отношении ADCC, чем антитела, производимые в CHO: МКА IgN314 проявляют повышенную литическую активность и могут уменьшить терапевтические дозы или, при заданной концентрации, лизировать более широкий спектр опухолевых клеток, особенно клетки с низкой плотностью антигенов. Другое преимущество заключается в том, что глико-оптимизированные антитела показали более низкие значения эффективной концентрации на всех исследованных клеточных линиях и для обоих фенотипов рецепторов CD16₁₅₈, что указывает на более высокое сродство к обоим фенотипам CD16₁₅₈. Это взаимодействие позволяет снизить пороговую концентрацию, необходимую для инициации лизиса клеток-мишеней, и, вероятно, повысить терапевтический эффект у пациентов с фенотипом низкой аффинности к традиционным препаратам [72].

В сравнении с аналогичными МКА, произведенными в клетках млекопитающих, экспрессированные в мхе имеют правильную конфигурацию, сборку в ансамбли, а также не подвергаются деградации и не агрегируют. Производственная система на основе мха предлагает широкие возможности для получения глико-оптимизированных биофармацевтических препаратов, включая активные терапевтические МКА без какой-либо адаптации N-гликанов с помощью ферментативной постпроизводственной обработки *in vitro*.

Культуры микроводорослей и ряски

Биопроизводство рекомбинантных МКА на платформе микроводорослей привлекает все большее внимание из-за его преимуществ с точки зрения безопасности, метаболического разнообразия, масштабируемости и устойчивости. Первым белком млекопитающих, продуцируемым в микроводоросли, было МКА против гликопротеина D вируса простого герпеса (ВПГ). Это большое одноцепочечное антитело представляет собой слитый через гибкий линкер белок, состоящий из полной тяжелой цепи IgA и вариабельной области легкой цепи. Белок экспрессировали в хлоропластах *Chlamydomonas reinhardtii*. Хотя хлоропласты не обладают механизмом гликозилирования белков, работа группы Mayfield [36] показала, что агликозилированные антитела в хлоропластах водорослей способны правильно складываться и собираться с образованием

полноценного МКА, связывающего мишень. Диатомовая водоросль *Phaeodactylum tricornutum* была использована для экспрессии МКА против поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) как секретируемого, так и сохраняемого в эндоплазматической сети [73, 74]. Синтез МКА IgG1 против антигена сибирской язвы 83 (83K7C) явился первой демонстрацией того, что тяжелые и легкие цепи, синтезированные в одном и том же хлоропласте *C. reinhardtii*, собираются в полноразмерное функциональное МКА [75]. Среди наиболее перспективных разработок в области производства рекомбинантных белков на основе микроводорослей – иммунотоксины, продуцируемые в хлоропластах *C. reinhardtii*, способные оказывать цитотоксическое действие на В-клеточные лимфомы [76], а также антитела верблюда, направленные против ботулотоксина [77].

Компания Biolex Therapeutics (США) использовала свою запатентованную систему экспрессии белков LEX для производства растительной версии ритуксимаба в трансгенной *Lemna minor* Сох с соавт. [78] получили МКА без специфичного для растений гликозилирования путем нокаута эндогенных генов α -1,3-фукозилтрансферазы и β -1,2-ксилозилтрансферазы с помощью РНК-интерференции в растениях ряски *L. minor*. Это позволило получить N-гликаны одного основного вида с более высокой антителозависимой клеточной цитотоксичностью и активностью связывания с рецептором эффекторных клеток, чем те, которые были получены в культивируемых клетках яичника китайского хомячка (CHO). В доклинических исследованиях с использованием яванских макак [79] сравнили это оптимизированное МКА, названное BLX-300, с ритуксимабом, и показали, что оно обладает эквивалентной активностью связывания клеток-мишеней, индукцией апоптоза и усилением антителозависимой клеточной цитотоксичности против В-клеток, что позволяет предположить потенциальное улучшение его эффективности и действенности, а также снижение общей цитотоксичности. Система LEX была приобретена компанией Synthon (Нидерланды) [<http://www.marketwired.com/press-release/biolex-sells-lex-system-to-synthon-and-initiates-sale-of-locter-on-1653466.htm>].

Суспензионные культуры растительных клеток

Несмотря на низкую стоимость полученных рекомбинантных белков при использовании трансгенных растений, в настоящее время четко прослеживается тенденция переноса производства биофармацевтических препаратов в системы на основе биореакторов [80]. Куль-

тивирование в биореакторе полностью освобождает от проблем, связанных с изменениями погоды, почвы, наличием вредителей и дрейфом трансгенов в окружающую среду. Из-за коротких циклов роста клеток, культивируемых в суспензии, сроки, необходимые для производства рекомбинантных белков в культуре растительных клеток, сокращаются до недель по сравнению с месяцами, необходимыми для их производства в целых трансгенных растениях. Культивирование *in vitro* позволяет точно контролировать рост и производство белка, стабильность продукта от партии к партии и согласовывать производственный процесс с текущими надлежащими производственными методами (GMP) [81]. Дополнительным преимуществом производства в культуре растительных клеток является тот факт, что рекомбинантные белки могут секретироваться из клеток непосредственно в культуральные среды, и, следовательно, последующая обработка для извлечения и очистки белков становится намного дешевле, чем из целых растений. Эти преимущества значительно перевешивают недостаток, связанный с более низким выходом белка в системе растительных клеток по сравнению с другими платформами. Главные преимущества различных растительных платформ и успехи в разработке МКА растительного происхождения приведены в табл. 1.

Многочисленные примеры успешных разработок МКА растительного происхождения показывают потенциал растительных систем для производства полноценных функциональных МКА, хотя их производительность все еще остается невысокой и пока не может конкурировать с другими технологическими платформами.

ДОСТИЖЕНИЯ В СОЗДАНИИ
МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ
РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

*Пассивная иммунизация и противомикробные
моноклональные антитела*

Терапевтические МКА представляются весьма перспективным продуктом для молекулярного фермерства. На сегодняшний день ни одно из антител не было одобрено фармацевтическими регулирующими органами для применения в медицине, однако некоторые прошли клинические испытания на людях. Например, CaroRx™, секреторный IgA (SIgA), вырабатываемый Planet Biotechnology Inc., был первым в мире клинически протестированным антителом для предотвращения адгезии бактерий, вызывающих кариес, к поверхности зубов. Еще в 1999 г. CaroRx™ прошел фазу II клинических испытаний в США [82], однако испытания были

Таблица 1. Растительные платформы: преимущества и основные продукты

Платформа	Преимущества	Продукты	Ссылки
Стабильная экспрессия в целых растениях	Экономичность, масштабируемость	CaroRx™, микробициды, гепатит В, противоопухолевые МКА, ротавирусная инфекция, иммунотоксины	[46; 82; 83; 84]
Транзиентная экспрессия	Легкость трансформации, быстрый прирост биомассы	Лихорадка Эбола, тяжелый острый респираторный синдром, коронавирусная инфекция, грипп, противоопухолевые МКА	[46; 55, 62; 63; 85; 86]
Культура бородатых корней	Генетическая стабильность, секреция продукта в среду	Streptococcus mutans; противоопухолевые МКА	[64; 66]
Водоросли и ряска	Экономичность, метаболическое разнообразие	Иммунотоксины, противоопухолевые МКА, сибирская язва, гепатит В, ботулизм	[76; 78]
Physcomitrella patens	Масштабируемость, гомологичная рекомбинация, статус гликозилирования	Противоопухолевые МКА	[68]
Культура растительных клеток	Экономичность, короткий цикл культивирования, контролируемые условия	Противоопухолевые МКА	[87, 88]

прекращены в начале 2016 г. Следующими были гуманизированные МКА против гликопротеина В вируса генитального герпеса, экспрессированные в растениях сои [84]. Hull с соавт. [89] изучали МКА, полученные в трансгенных линиях табака, против возбудителя сибирской язвы *Bacillus anthracis* у мышей. Было показано эффективное связывание МКА с бактериальными клетками, в результате чего сделаны выводы о дешевой и надежной защите при использовании этих антител даже при высокой бактериальной нагрузке в условиях эпидемии.

Пассивная иммунизация и противомикробные препараты — это области, в которых создание новых технологий производства МКА может обеспечить существенный прогресс. В настоящее время применение МКА в этой сфере ограничено высокой стоимостью препаратов и сложностями в масштабируемости. Пандемия COVID-19 показала, что в чрезвычайных ситуациях мощности по наработке белка очень быстро становятся дефицитными, потому что производство других лекарств и диагностических средств невозможно остановить или отложить. Экспрессия в растительных системах обеспечивает быстрое устранение пробелов в производстве: растения можно выращивать в то время, пока изучается последовательность генома патогена, и начинать производство, как только становятся известными последовательности антигена. Поэтому многие академические и промышленные группы используют, например, транзientную экспрессию в растениях для получения диагностических и терапевтических МКА против SARS-CoV-2. В настоящее время создан финансируемый Евросоюзом проект Pharma-Factory, направленный на разработку транзientной экспрессии в растениях, включая создание новых векторов экспрессии, штаммов *Agrobacterium* и сортов растений, а также соответствующих методических процедур (<https://pharmafactory.org>). Это может сформировать новую стратегию коммерческого использования молекулярного земледелия, в которой уникальный IP будет назначаться продукту, а не платформе [90, 91].

В последние годы большие надежды исследователей связаны с использованием ВИЧ-нейтрализующих антител в качестве микробицидов, поскольку это дает возможность предотвратить передачу ВИЧ в отсутствие эффективной вакцины [92]. Современная технология производства МКА с использованием клеток СНО может удовлетворить спрос на нейтрализующие ВИЧ МКА в качестве микробицидов. Однако в долгосрочной перспективе для развивающихся стран использование биотехнологии растений будет, вероятно, более простой и надежной технологией [93]. В области профилактики у ВИЧ-нейтрализующих МКА есть много потенциальных

клинических применений, включая иммунопрофилактику, при которой МКА употребляют местно в качестве микробицидов в месте инфекции [92]. Для эффективной защиты требуются большие дозы (миллиграммы), и продукт необходимо использовать регулярно. Это означает, что производственная мощность для удовлетворения мирового спроса должна превышать 1000 кг в год. Поскольку затраты также должны быть низкими, маловероятно, что микробициды на основе МКА можно будет производить с использованием традиционных подходов к производству, особенно при том, что наибольшая потребность в них возникает в развивающихся странах. Таким образом, получение микробицидов на основе МКА в растительных системах экспрессии является привлекательной альтернативой традиционным технологиям благодаря сочетанию низкой стоимости и возможности масштабирования [94].

Для защиты людей от опасной для жизни ротавирусной инфекционной диареи был создан трансгенный рис, синтезирующий в семенах нейтрализующие МКА против ротавируса (MucoriseArp1) [95]. Антитела накапливались в достаточно высоких концентрациях (11.9% общего белка), чтобы быть эффективными в качестве профилактического лекарственного средства. Действительно, в экспериментах при кормлении семенами MucoriseArp1 мышей с иммунодефицитом была показана действенная защита животных от ротавирусных инфекций. Кроме того, нейтрализующие МКА были растворимы в воде, устойчивы как к кипячению, так и к длительному хранению (не менее 1 года) и не разрушались при транспортировке и в различных температурных условиях хранения. Эти качества делают рис весьма перспективным продуктом для последующего практического использования.

В работе Chen [87] разработано моноклональное антитело E16 растительного происхождения, которое распознает эпитоп в домене III белка оболочки вируса западного Нила (ВНЗ), и показано, что растения способны продуцировать комплексные варианты антител, в частности биспецифические антитела, обладающие способностью преодолевать гематоэнцефалический барьер. Преодоление гематоэнцефалического барьера осуществлялось благодаря объединению двух наборов Fab, один из которых способствовал их транспортировке в мозг, а другой сохранял свою терапевтическую активность против ВЗН в мозге [96]. Однократная доза данного МКА защищала мышей от летального заражения ВЗН даже через четыре дня после заражения, когда вирус проник в мозг.

ZMapp™, коктейль из трех МКА, произведенный в листьях *N. bethamiana* компанией

Mapp Biopharmaceutical Inc. (США) для борьбы со вспышкой вируса Эбола 2014 г. в Африке, прошел клинические испытания I и II фазы в 2015 г. в США, Либерии, Сьерра-Леоне и Гвинее [61]. В сентябре 2015 г. FDA США предоставило ZMapp™ статус ускоренного режима [<http://mappbio.com>]. Хотя он еще не получил окончательного одобрения FDA, на сегодняшний день ZMapp™ является единственным препаратом, который эффективно использовался для лечения пациентов, инфицированных вирусом Эбола [97]. Кроме того, антитело-нейтрализатор 2G12, полученное в табаке, произведенное в рамках проекта Pharma Planta, завершило фазу I клинического испытания [46].

Вирус SARS-CoV-2 является возбудителем коронавирусной болезни 2019 г. (COVID-19), инфицировавший 270 млн человек и вызвавший более 5.3 млн смертей во всем мире с момента его появления [<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>]. В то время как вакцины остаются предпочтительной стратегией для сдерживания нынешней пандемии COVID-19, постконтактная терапия также крайне востребована для лечения тяжелобольных пациентов. МКА, нацеленные на белок S, могут нейтрализовать вирус, нарушая его способность связываться и сливаться с клеткой-мишенью хозяина. С беспрецедентной скоростью в растениях *N. benthamiana* были получены и исследованы ряд нейтрализующих МКА против эпитопов рецептор-связывающего домена (RBD) белка S SARS-CoV-2, эффективность нейтрализации SARS-CoV-2 которых значительно различалась [91]. Также были разработаны растительные МКА против других вирусов, включая респираторно-синцитиальный вирус человека (RSV) [98], вирус чикунгунья (CHIKV) [96], вирус бешенства [62].

Моноклональные антитела растительного происхождения для онкологии

В последние годы особенно расширилось использование МКА в диагностике и лечении различных видов злокачественных новообразований. МКА против опухолевых антигенов доказали свою эффективность при лечении рака, особенно в сочетании с лучевой и химической терапией. При связывании с антигеном на поверхности раковых клеток, МКА вызывают антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) или комплемент-зависимую цитотоксичность, которая убивает аномальные клетки.

Обнадешающие результаты достигнуты в первых клинических испытаниях на людях произведенного в трансгенных растениях табака антитела 2G12 против Lewis Y-антигена,

обнаруживаемого на опухолевых клетках при колоректальном раке, раке молочной железы, легких и яичников [46]. Ранее Brodzik с соавт. [99] успешно синтезировали в трансгенных растениях табака с низким содержанием алкалоидов (*N. tabacum* cv. LAMD609) функциональные МКА BR55-2 (IgG_{2a}) также против Lewis Y-антигена. Эксперименты на лабораторных животных и клинические испытания показали, что данные антитела способствуют уничтожению раковых клеток, специфически связываясь с ними [99–101]. Полноразмерные рекомбинантные МКА CO17-1A синтезированы в растительной системе с использованием вектора вируса табачной мозаики [102]. Тяжелая и легкая цепи МКА CO17-1A были растительного происхождения и синтезированы для специфического связывания с клетками колоректальной карциномы человека SW948, экспрессирующими антиген GA733 [103]. Эти МКА эффективно ингибировали рост клеток опухоли колоректальной карциномы человека SW948 у ксенотрансплантированных мышей, а также были эффективны при лечении метастазов и предотвращении рецидива колоректального рака у пациентов с высоким риском [104].

Одним из самых широко применяемых в клинической практике препаратов является бевацизумаб, созданный на основе МКА и используемый для терапии метастатического колоректального рака, глиобластомы, немелкоклеточного рака легкого, метастатического рака почки, распространенного рака шейки матки, платинорезистентного рака яичников [105]. Одним из недостатков является дороговизна терапии бевацизумабом в связи с его производством в системах на основе клеток млекопитающих. Поэтому исследователями были предприняты попытки его синтеза в других экспрессионных системах. В 2016 г. Chen с соавт. [62] сообщили о первом получении бевацизумаба в растительной системе экспрессии с использованием каллуса трансгенного риса.

На основе культивируемых клеток риса созданы высокоэффективные системы трансформации, которые широко используются для производства многих фармацевтически ценных белков [88]. Уровень экспрессии МКА бевацизумаба в трансгенных каллусах риса достигает 200 мг/кг сырого веса — это самый высокий результат из имеющихся в литературе данных с использованием всех рекомбинантных систем [106]. Он был получен благодаря, во-первых, оптимизации кодонов, направленной на стабилизацию и эффективную трансляцию мРНК, во-вторых, введению сильного конститутивного убиквитинового промотора, повысившего уровень транскрипции, а также благодаря отбору однокопийных продуцентов для снижения

вероятности замолкания трансгенов. Иммуноферментный анализ показал, что бевацизумаб, синтезированный в каллусе риса, и коммерческий препарат Авастин имели сходное сродство к связыванию с рецепторами VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). С разработкой системы культивирования суспензии клеток риса и ее масштабирования стало возможным крупномасштабное производство данного МКА с использованием биореакторов [107].

Рекомбинантные иммунотоксины

Многообещающим и инновационным классом терапевтических противораковых соединений являются рекомбинантные иммунотоксины (РИТ). Данные вещества представляют собой трехкомпонентные молекулы, содержащие домен, определяющий специфичность связывания с опухолевой клеткой (чаще всего МКА), собственно токсин для уничтожения клеток-мишеней и линкер для обеспечения стабильной функциональной конформации всей молекулы [108].

В настоящее время не существует подходящей системы для рентабельного крупномасштабного производства РИТ, поскольку токсинные домены подавляют аппарат синтеза белка или разрушают специфические структуры митотического веретена. Следовательно, хозяин-продукцент должен быть устойчив к повреждениям, связанным с РИТ. Системы на основе растений могут восполнить этот пробел. Существование разнообразных растительных платформ, позволяющих быстро извлекать токсичный продукт из суспензионной или другой культуры, культивируемой в жидкой среде, а также возможность направления токсичных продуктов в изолированные клеточные компартменты открывает большие перспективы перед таким способом производства [109, 110].

В настоящее время растения используются для производства низкомолекулярных токсинов для лекарственных конъюгатов, содержащих антитела [111]. Например, растения табака использовали для транзientной экспрессии лектинов вискумина и рицина, применяемых при терапии рака [110, 112]. Наличие у растений естественных механизмов синтеза токсинов и специализированных клеточных компартментов для изоляции их от мишеней или протеаз [110] и возможность продуцировать как МКА, так и токсичные белки в одном процессе, делает растения идеальной платформой для экспрессии иммунотоксинов.

Несмотря на множество типов рекомбинантных белков, которые были продуцированы в растениях или растительных клетках, и все преимущества растительных систем, известно только четыре РИТ, которые были экспрессированы в растительных системах.

1. Токсичный РИТ, бриодин-1 (BD1), был слит с scFv, полученным из анти-CD40-антитела G28-5 [113]. Секретируемая версия BD1-G28-5 была продуцирована в суспензионных клетках табака *N. tabacum* cv. NT1. Данный продукт показал специфическую токсичность по отношению к клеткам неходжкинской лимфомы.

2. Анти-CD22 экзотоксин — иммунотоксин, продуцируемый в хлоропластах водоросли *C. reinhardtii* [76]. Он накапливался в хлоропластах водоросли в двух вариантах (мономер и двухвалентный аналог) в виде растворимых функциональных белков с уровнями экспрессии 0.2–0.4% от ОРБ в лизате. Сообщалось о значительном ингибировании роста опухоли у модельных ксенотрансплантатных мышей, причем двухвалентный вариант был в 22–33 раза более эффективным, возможно в связи с присутствием двух сайтов связывания антигена [76]. Данные исследования подтверждают эффективность рекомбинантных иммунотоксинов, продуцируемых на платформе экспрессии водорослей.

3. РИТ VGRNb-PE, содержащий нанотело анти-VEGFR2 (рецептор 2 фактора роста эндотелия сосудов), слитое с усеченной формой экзотоксина *A. Pseudomonas aeruginosa*. РИТ экспрессировался в хлоропластах трансгенного салата (*L. sativa*) и показал токсичность к опухолевым клеткам и отсутствие действия по отношению к контрольным [114].

4. Слитый белок scFv-RC-RNase состоит из scFv HAb25 человека и цитотоксической рибонуклеазы RC-RNase из американской лягушки-быка *Rana catesbeiana*. Слитый белок получают в трансгенных растениях табака с выходом до 2.0 мг/кг свежей биомассы листьев. Токсичность неочищенной ScFv-RC-RNase была испытана на линиях клеток гепатомы человека HepG2 и SMMC7721, и выявлена ее ингибирующая концентрация [115].

Отмечено, что МКА и токсины могут продуцироваться в растительных клетках одновременно как совместимые продукты. И хотя продуктивность РИТ в растениях в нескольких случаях превышала показатели, достигнутые при использовании других систем, требуется совершенствование данной платформы для достижения уровней накопления нетоксичных рекомбинантных белков. Уровень накопления РИТ растительного происхождения колеблется от 2 до 337 мг/кг, однако экспрессионный уровень, чистота продукта и содержание его после очистки часто не освещаются в работах. К тому же большая часть исследований являются единичными, с неизученной масштабируемостью и неясной совместимостью с принципами GMP. Повышение конкурентоспособности РИТ растительного происхождения связано, главным образом, с повышением уровня их накопления.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Производство МКА в растениях привлекает все больше внимания специалистов, поскольку растительные системы могут быть более дешевыми, безопасными и масштабируемыми, чем системы экспрессии клеток млекопитающих, дрожжей, бактерий и насекомых. Можно надеяться, что описанные в обзоре примеры усовершенствованных технологий, генно- и гликоинженерных приемов, позволяющие преодолеть существующие ограничения, в скором времени приведут к более широкому распространению и использованию растительных систем в качестве систем экспрессии для производства рекомбинантных белков и МКА, в частности. Последние достижения в редактировании растительного генома будут способствовать получению МКА растительного происхождения с улучшенными физико-химическими, фармакокинетическими и фармакодинамическими свойствами. Платформы на основе растений и растительных клеток могут быть развернуты для массового производства биофармацевтических препаратов в более короткие сроки, и они будут экономически более эффективными по сравнению с другими традиционными системами на основе клеточных культур. Это особенно важно в ситуациях быстрого реагирования, например, во время пандемий. Ожидаемое увеличение рыночного спроса на высокоэффективные и более доступные терапевтические МКА растительного происхождения повышают коммерческий интерес к платформам экспрессии на растительной основе, обеспечивая тем самым увеличение объемов инвестиций и активное привлечение крупных фармацевтических компаний к совместной разработке новых препаратов МКА.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования, грант № FWNR-2022-0022.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2018 // *Nat Biotechnol.* 2018. V. 36. P. 1136. <https://doi.org/10.1038/nbt.4305>
2. Fischer R., Vasilev N., Twyman R.M., Schillberg S. High-value products from plants: the challenges of process optimization // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2015. V. 32. P. 156. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.12.018>
3. Fischer R., Schillberg S., Hellwig S., Twyman R.M., Drossard J. GMP issues for recombinant plant-derived pharmaceutical proteins // *Biotechnol. Adv.* 2012. V. 30. P. 434. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.007>
4. Göritzer K., Strasser R. Glycosylation of Plant-Produced Immunoglobulins // *Antibody Glycosylation. Experientia Supplementum.* V. 112 / Ed. Pezer M. Springer, Cham., 2021. https://doi.org/10.1007/978-3-030-76912-3_16
5. Webster D.E., Thomas M.C. Post-translational modification of plant-made foreign proteins; glycosylation and beyond // *Biotechnol. Adv.* 2012. V. 30. P. 410. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.07.015>
6. DeMuynck B., Navarre C., Boutry M. Production of antibodies in plants: status after twenty years // *Plant Biotechnol. J.* 2010. V. 8. P. 529. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2009.00494>
7. Moussavou G., Ko K., Lee J. H., Choo Y. K. Production of monoclonal antibodies in plants for cancer immunotherapy // *Biomed. Res. Int.* 2015. Art. 2015:306164. <https://doi.org/10.1155/2015/306164>
8. Bakema J.E., van Egmond M. Immunoglobulin A: a next generation of therapeutic antibodies? // *MAbs.* 2011. V. 3. P. 352. <https://doi.org/10.4161/mabs.3.4.16092>
9. Longet S., Miled S., Lotscher M., Miescher S.M., Zuercher A.W., Corthesy B. Human plasma-derived polymeric IgA and IgM antibodies associate with secretory component to yield biologically active secretory-like antibodies // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. P. 4085. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.410811>
10. Lomonosoff G.P., D'Aoust M.-A. Plant-produced biopharmaceuticals: a case of technical developments driving clinical deployment // *Science.* 2016. V. 353. P. 1237. <https://doi.org/10.1126/science.aaf6638>
11. Stieger M., Neuhaus G., Momma T., Schell J., Kreuzaler F. Self assembly of immunoglobulins in the cytoplasm of alga *Acetabularia mediterranea* // *Plant Sci.* 1991. V. 73. P. 181. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(91\)90027-6](https://doi.org/10.1016/0168-9452(91)90027-6)
12. Hiatt A., Cafferkey R., Bowdick K. Production of antibodies in transgenic plants // *Nature.* 1989. V. 342. P. 76. <https://doi.org/10.1038/342076a0>
13. Twyman RM, Stoger E, Schillberg S, Christou P, Fischer R. Molecular farming in plants: host systems and expression technology // *Trends Biotechnol.* 2003. V. 21. P. 570. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2003.10.002>
14. Chng J., Wang T., Nian R., Lau A., Hoi K.M., Ho S.C., Gagnon P., Bi X., Yang Y. Cleavage efficient 2A peptides for high level monoclonal antibody expression in CHO cells // *MAbs.* 2015. V. 7. P. 403. <https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1008351>
15. Ho S.C., Koh E.Y., van Beers M., Mueller M., Wan C., Teo G., Song Z., Tong Y.W., Bardor M., Yang Y. Control of IgG LC:HC ratio in stably transfected CHO cells and study of the impact on expression, aggrega-

- tion, glycosylation and conformational stability // *J. Biotechnol.* 2013. V. 165. P. 157.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.03.019>
16. *Ma J.K.-C., Hiatt A., Hein M.* Generation and assembly of secretory antibodies in plants // *Science.* 1995. V. 268. P. 716.
<https://doi.org/10.1126/science.7732380>
 17. *Chen L., Marmey P., Taylor N.J., Brizard J.P., Espinoza C., D'Cruz P., Huet H., Zhang S., de Kochko A., Beachy R.N., Fauquet C.M.* Expression and inheritance of multiple transgenes in rice plants // *Nat. Biotechnol.* 1998. V. 16. P. 1060.
<https://doi.org/10.1038/3511>
 18. *De Muynck B., Navarre C., Boutry M.* Production of antibodies in plants: status after twenty years // *Plant Biotechnol. J.* 2010. V. 8. P. 529.
<https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2009.00494.x>
 19. *Luke G.A., Ryan M.D.* The protein coexpression problem in biotechnology and biomedicine: virus 2A and 2A-like sequences provide a solution // *Future Virol.* 2013. V. 8. P. 983.
<https://doi.org/10.2217/fvl.13.82>
 20. *Urwin P.E., McPherson M.J., Atkinson H.J.* Enhanced transgenic plant resistance to nematodes by dual proteinase inhibitor constructs // *Planta* 1998. V. 204. P. 472. <https://doi.org/10.1007/s004250050281>
 21. *Ho S.C., Bardor M., Li B., Lee J.J., Song Z., Tong Y.W., Goh L.-T., Yang Y.* Comparison of internal ribosome entry site (IRES) and Furin-2A (F2A) for monoclonal antibody expression level and quality in CHO cells // *PLOS One* 2013. V. 8. Art. e63247.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063247>
 22. *Marcos J.F., Beachy R.N.* In-vitro characterization of a cassette to accumulate multiple proteins through synthesis of a self-processing polypeptide // *Plant Mol. Biol.* 1994. V. 24. P. 495.
<https://doi.org/10.1007/BF00024117>
 23. *Lin Y., Hung Ch.-Y., Bhattacharya C., Nichols S., Rahimuddin H., Kittur F. S., Leung T.C., Xie J.* An effective way of producing fully assembled antibody in transgenic tobacco plants by linking heavy and light chains via a self-cleaving 2A peptide // *Front. Plant Sci.* 2018. V. 9. P. 1379.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01379>
 24. *Luke G., Roulston C., Tilsner J., Ryan M.* Growing uses of 2A in plant biotechnology // *Biotechnology / Eds. D. Ekinici. Rijek: InTech,* 2015. P. 165.
<https://doi.org/10.5772/59878>
 25. *Ko K.* Expression of recombinant vaccines and antibodies in plants // *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.* 2014. V. 33. P. 192.
<https://doi.org/10.1089/mab.2014.0049>
 26. *Chen L., Yang X., Luo D., Yu W.* Efficient production of a bioactive Bevacizumab monoclonal antibody using the 2A self-cleavage peptide in transgenic rice callus // *Front. Plant Sci.* 2016. V. 7. P. 1156.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01156>
 27. *Chikwamba R.K., Scott M.P., Mejia L.B., Mason H.S., Wang K.* Localization of a bacterial protein in starch granules of transgenic maize kernels // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. P. 11127.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1836901100>
 28. *Denecke J., De Rycke R., Botterman J.* Plant and mammalian sorting signals for protein retention in the endoplasmic reticulum contain a conserved epitope // *EMBO J.* 1992. V. 11. P. 2345.
<https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05294.x>
 29. *Denecke J., Botterman J., Deblaere R.* Protein secretion in plant cells can occur via a default pathway // *Plant Cell.* 1990. V. 2. P. 51.
<https://doi.org/10.1105/tpc.2.1.51>
 30. *Frigerio L., Vine N.D., Pedrazzini E., Hein M.B., Wang F., Ma J.K., Vitale A.* Assembly, secretion, and vacuolar delivery of a hybrid immunoglobulin in plants // *Plant Physiol.* 2000. V. 123. P. 1483.
<https://doi.org/10.1104/pp.123.4.1483>
 31. *Hadlington J.L., Santoro A., Nuttall J., Denecke J., Ma J.K.C., Vitale A., Frigerio L.* The C-terminal extension of a hybrid immunoglobulin A/G heavy chain is responsible for its Golgi-mediated sorting to the vacuole // *Mol. Biol. Cell.* 2003. V. 14. P. 2592.
<https://doi.org/10.1091/mbc.e02-11-0771>
 32. *Ellgaard L., Helenius A.* Quality control in the endoplasmic reticulum // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003. V. 4. P. 181. <https://doi.org/10.1038/nrm1052>
 33. *Nicholson L., Gonzalez-Melendi P., vanDolleweerd C., Tuck H., Perrin Y., Ma J.K.C., Fischer R., Christou P., Stoger E.* A recombinant multimeric immunoglobulin expressed in rice shows assembly dependent subcellular localization in endosperm cells // *Plant Biotechnol. J.* 2005. V. 3. P. 115.
<https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2004.00106.x>
 34. *Chin-Fatt A., Menassa R.A* VHH-Fc fusion targeted to the chloroplast thylakoid lumen assembles and neutralizes enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7 // *Front. Plant Sci.* 2021. V. 28. P. 686421.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.686421>
 35. *Kubis S.E., Lilley K.S., Jarvis P.* Isolation and preparation of chloroplasts from *Arabidopsis thaliana* plants // *2D PAGE: Sample Preparation and Fractionation. Methods in Molecular Biology.* V. 425. / Ed. A. Posch. Humana Press, 2008. P. 171.
https://doi.org/10.1007/978-1-60327-210-0_16
 36. *Mayfield S.P., Franklin S.E., Lerner R.A.* Expression and assembly of a fully active antibody in algae // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 21. P. 438.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0237108100>
 37. *Grabsztunowicz M., Koskela M.M., Mulo P.* Post-translational modifications in regulation of chloroplast function: recent advances // *Front. Plant Sci.* 2017. V. 8. P. 240. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00240>
 38. *Stadlmann J., Pabst M., Kolarich D., Kunert R., Altmann F.* Analysis of immunoglobulin glycosylation by LC-ESI-MS of glycopeptides and oligosaccharides // *Proteomics.* 2008. V. 8. P. 2858.
<https://doi.org/10.1002/pmic.200700968>
 39. *Stelter S., Paul M. J., Teh A.Y.-H., Grandits M., Altmann F., Vanier J., Bardor M., Castilho A., Allen L.*

- R., Ma J. K.-C.* Engineering the interactions between a plant-produced HIV antibody and human Fc receptors // *Plant Biotechnol. J.* 2020. V. 18. P. 402.
<https://doi.org/10.1111/pbi.13207>
40. *Yoo J.Y., Ko K.S., Lee S.Y., Lee K.O.* Glycoengineering in plants for the development of N-glycan structures compatible with biopharmaceuticals // *Plant Biotechnol. Rep.* 2014. V. 8. P. 357.
<https://doi.org/10.1007/s11816-014-0328-1>
41. *Bolton G.R., Ackerman M.E., Boesch A.W.* Separation of nonfucosylated antibodies with immobilized FcγRIII receptors // *Biotechnol. Prog.* 2013. V. 29. P. 825. <https://doi.org/10.1002/btpr.1717>
42. *Loos A., Steinkellner H.* IgG-Fc glycoengineering in non-mammalian expression hosts // *Arch. Biochem. Biophys.* 2012. V. 526. P. 167.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.05.011>
43. *Thomann M., Schlothauer T., Dashivets T., Malik S., Avenal C., Bulau P., Ruger P., Reusch D.* In vitro glycoengineering of IgG1 and its effect on Fc receptor binding and ADCC activity // *PLOS One*. 2015. V. 10. Art. e0134949.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134949>
44. *Piron R., Santens F., De Paepe A., Depicker A., Callewaert N.* Using GlycoDelete to produce proteins lacking plant-specific N-glycan modification in seeds // *Nat. Biotechnol.* 2015. V. 33. P. 1135.
<https://doi.org/10.1038/nbt.3359>
45. *Madeira L.M., Szeto T.H., Ma J.K., Drake P.M.W.* Rhizosecretion improves the production of Cyanovirin-N in *Nicotiana tabacum* through simplified downstream processing // *Biotechnol. J.* 2016. V. 11. P. 910.
<https://doi.org/10.1002/biot.201500371>
46. *Ma J.K., Drossard J., Lewis D., Altmann F., Boyle J., Christou P., Cole T., Dale P., van Dolleweerd C.J., Isitt V., Katinger D., Lobedan M., Mertens H., Paul M.J., Rademacher T. et al.* Regulatory approval and a first-in-human phase I clinical trial of a monoclonal antibody produced in transgenic tobacco plants // *Plant Biotechnol. J.* 2015. V. 13. P. 1106.
<https://doi.org/10.1111/pbi.12416>
47. *Castilho A., Gruber C., Thader A., Oostenbrink C., Pechlaner M., Steinkellner H., Altmann F.* Processing of complex N-glycans in IgG Fc-region is affected by core fucosylation // *MAbs*. 2015. V. 7. P. 863.
<https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1053683>
48. *Schneider J., Castilho A., Pabst M., Altmann F., Gruber C., Strasser R., Gattinger P., Seifert G.J., Steinkellner H.* Characterization of plants expressing the human β1,4-galactosyltransferase gene // *Plant Physiol. Biochem.* 2015. V. 92. P. 39.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.04.010>
49. *Buyel J.F., Fischer R.* A juice extractor can simplify the downstream processing of plant-derived biopharmaceutical proteins compared to blade-based homogenizers // *Process Biochem.* 2014. V. 50. P. 859.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.02.017>
50. *McLean M.D., Chen R.J., Yu D.Q., Mah K.Z., Teat J., Wang H.F., Zaplachinski S., Boothe J., Hall J.C.* Purification of the therapeutic antibody trastuzumab from genetically modified plants using safflower protein A-oleosin oilbody technology // *Transgenic Res.* 2012. V. 21. P. 1291.
<https://doi.org/10.1007/s11248-012-9603-5>
51. *Hussack G., Grohs B.M., Almquist K.C., McLean M.D., Ghosh R., Hall J.C.* Purification of plant-derived antibodies through direct immobilization of affinity ligands on cellulose // *J. Agric. Food Chem.* 2010. V. 58. P. 3451.
<https://doi.org/10.1021/jf9040657>
52. *Conley A.J., Joensuu J.J., Richman A., Menassa R.* Protein body-inducing fusions for high-level production and purification of recombinant proteins in plants // *Plant Biotechnol. J.* 2011. V. 9. P. 419.
<https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2011.00596.x>
53. *Li W., Prabakaran P., Chen, W., Zhu Z., Feng Y., Dimitrov D.S.* Antibody aggregation: insights from sequence and structure // *Antibodies*. 2016. V. 5. P. 19.
<https://doi.org/10.3390/antib5030019>
54. *Twyman R.M., Schillberg S., Fischer R.* Optimizing the yield of recombinant pharmaceutical proteins in plants // *Curr. Pharm. Des.* 2013. V. 19. P. 5486.
<https://doi.org/10.2174/1381612811319310004>
55. *Xu J., Towler M., Weathers P.J.* Platforms for plant-based protein production // *Bioprocessing of plant in vitro systems. Reference series in phytochemistry* / Eds. A. Pavlov, T. Bley. Springer, Cham. 2018. P. 509.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-54600-1_14
56. *Matoba N., Davis K.R., Palmer K.E.* Recombinant protein expression in *Nicotiana* // *Methods Mol. Biol.* 2011. V. 701. P. 199. DOI: 10.1007/978-1-61737-957-4_11
57. *Gleba Y., Klimyuk V., Marillonnet S.* Viral vectors for the expression of proteins in plants // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2007. V. 18. P. 134.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.03.002>
58. *Huang C., Xie Y., Zhou X.* Efficient virus-induced gene silencing in plants using a modified geminivirus DNA1 component // *Plant Biotechnol. J.* 2009. V. 7. P. 254.
<https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2008.00395.x>
59. *Gleba Y., Klimyuk V., Marillonnet S.* Magniffection — a new platform for expressing recombinant vaccines in plants // *Vaccine*. 2005. V. 23. P. 2042.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.01.006>
60. *Krenek P., Samajova O., Luptovciak I., Daskocilova A., Komis G., Samaj J.* Transient plant transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: principles, methods and applications // *Biotechnol. Adv.* 2015. V. 33. P. 1024. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.03.012>
61. *Yao J., Weng Y., Dickey A., Wang K.Y.* Plants as factories for human pharmaceuticals: applications and challenges // *Int. J. Mol. Sci.* 2015 V. 16. P. 28549.
<https://doi.org/10.3390/ijms161226122>
62. *Chen Q., Davis K.R.* The potential of plants as a system for the development and production of human biologics // *F1000Res*. 2016. V. 5. P. 912.
<https://doi.org/10.12688/f1000research.8010.1>

63. Holtz B.R., Berquist B.R., Bennett L.D., Kommineni V.J., Muniguntti R.K., White E.L., Wilkerson D.C., Wong K.Y., Ly L.H., Marcel S. Commercial-scale biopharmaceuticals manufacturing facility for plant-made pharmaceuticals // *Plant Biotechnol. J.* 2015. V. 13. P. 1180. <https://doi.org/10.1111/pbi.12469>
64. Xu J., Dolan M.C., Medrano G., Cramer C.L., Weathers P.J. Green factory: plants as bioproduction platforms for recombinant proteins // *Biotechnol. Adv.* 2012. V. 30. P. 1171. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.020>
65. Wongsamuth R., Doran P.M. Production of monoclonal antibodies by tobacco hairy roots // *Biotechnol. Bioeng.* 1997. V. 54. P. 401. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19970605\)54:5<401::AID-BIT1>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19970605)54:5<401::AID-BIT1>3.0.CO;2-I)
66. Häkkinen S.T., Raven N., Henquet M., Laukkanen M.-L., Anderlei T., Pitkänen J.P., Twyman R.M., Bosch D., Oksman-Caldentey K.M., Schillberg S., Ritala A. Molecular farming in tobacco hairy roots by triggering the secretion of a pharmaceutical antibody // *Biotechnol. Bioeng.* 2014. V. 111. P. 336. <https://doi.org/10.1002/bit.25113>
67. Lonoce C., Marusic C., Morrocchi E., Salzano A.M., Scaloni A., Novelli F., Pioli C., Feeney M., Frigerio L., Donini M. Enhancing the secretion of a glyco-engineered anti-CD20 scFv-Fc antibody in hairy root cultures // *Biotechnol. J.* 2019. V. 14: e1800081. <https://doi.org/10.1002/biot.201800081>
68. Kircheis R., Halanek N., Koller I., Jost W., Schuster M., Gorr G., Hajszan K., Nechansky A. Correlation of ADCC activity with cytokine release induced by the stably expressed, glyco-engineered humanized Lewis Y-specific monoclonal antibody MB314 // *MAbs.* 2012. V. 4. P. 532. <https://doi.org/10.4161/mabs.20577>
69. Reski R., Parsons J., Decker E.L. Moss-made pharmaceuticals: from bench to bedside // *Plant Biotechnol. J.* 2015. V. 13. P. 1191. <https://doi.org/10.1111/pbi.12401>
70. Decker E.L., Parsons J., Reski R. Glyco-engineering for biopharmaceutical production in moss bioreactors // *Front. Plant Sci.* 2014. V. 9. P. 346. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00346>
71. Schuster M., Jost W., Mudde G.C., Wiederkum S., Schwager C., Janzek E., Altmann F., Stadlmann J., Stemmer C., Gorr G. In vivo glyco-engineered antibody with improved lytic potential produced by an innovative non-mammalian expression system // *Biotechnol. J.* 2007. V. 2. P. 700. <https://doi.org/10.1002/biot.200600255>
72. Kircheis R., Halanek N., Koller I., Jost W., Schuster M., Gorr G., Hajszan K., Nechansky A. Correlation of ADCC activity with cytokine release induced by the stably expressed, glyco-engineered humanized Lewis Y-specific monoclonal antibody MB314 // *MAbs.* 2012. V. 4. P. 532. <https://doi.org/10.4161/mabs.20577>
73. Hempel F., Maier U. G. An engineered diatom acting like a plasma cell secreting human IgG antibodies with high efficiency // *Microb. Cell Fact.* 2012. V. 11. P. 126. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-126>
74. Vanier G., Hempel F., Chan P., Rodamer M., Vaudry D., Maier U. G., Lerouge P., Bardor M. Biochemical characterization of human anti-hepatitis B monoclonal antibody produced in the microalgae *Phaeodactylum tricornutum* // *PLOS One.* 2015. V. 10. Art. e0139282. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139282>
75. Tran M., Zhou B., Pettersson P.L., Gonzalez M.J., Mayfield S.P. Synthesis and assembly of a full-length human monoclonal antibody in algal chloroplasts // *Biotechnol. Bioeng.* 2009. V. 1. P. 663. <https://doi.org/10.1002/bit.22446>
76. Tran M., Van C., Barrera D.J., Peterson P.L., Peinado C.D., Bui J., Mayfield S.P. Production of unique immunotoxin cancer therapeutics in algal chloroplasts // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. V. 110. P. E15. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214638110>
77. Barrera D.J., Rosenberg J.N., Chiu J.G., Chang Y.N., Debatis M., Ngoi S.M., Chang J.T., Shoemaker C.B., Oyler G.A., Mayfield S.P. Algal chloroplast produced camelid VH H antitoxins are capable of neutralizing botulinum neurotoxin // *Plant Biotechnol. J.* 2015. V. 13. P. 117. <https://doi.org/10.1111/pbi.12244>
78. Cox K.M., Sterling J.D., Regan J.T., Gasdaska J.R., Frantz K.K., Peele C.G., Black A., Passmore D., Moldovan-Loomis C., Srinivasan M., Cuisson S., Cardarelli P.M., Dickey L.F. Glycan optimization of a human monoclonal antibody in the aquatic plant *Lemna minor* // *Nat. Biotechnol.* 2006. V. 24. P. 1591. <https://doi.org/10.1038/nbt1260>
79. Gasdaska J.R., Sherwood S., Regan J.T., Dickey L.F. An afucosylated anti-CD20 monoclonal antibody with greater antibody-dependent cellular cytotoxicity and B-cell depletion and lower complement-dependent cytotoxicity than rituximab // *Mol. Immunol.* 2012. V. 50. P. 134. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.01.001>
80. Donini M., Marusic C. Current state-of-the-art in plant-based antibody production systems // *Biotechnol. Lett.* 2019. V. 41. P. 335. <https://doi.org/10.1007/s10529-019-02651-z>
81. Xu J., Zhang N. On the way to commercializing plant cell culture platform for biopharmaceuticals: present status and prospect // *Pharm. Bioprocess.* 2014. V. 2. P. 499. <https://doi.org/10.4155/pbp.14.32>
82. Ma J.K., Lehner T. Prevention of colonization of *Streptococcus mutans* by topical application of monoclonal antibodies in human subjects // *Arch. Oral Biol.* 1990. V. 35 Suppl. P. 115S. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(90\)90140-6](https://doi.org/10.1016/0003-9969(90)90140-6)
83. Vamvaka E., Twyman R.M., Murad A.M., Melnik S., Teh A.Y., Arcalis E., Altmann F., Stoger E., Rech E., Ma J.K.C., Christou P., Capell T. Rice endosperm produces an underglycosylated and potent form of the hiv-neutralizing monoclonal antibody 2g12 // *Plant Biotechnol. J.* 2015. V. 14. P. 97. <https://doi.org/10.1111/pbi.12360>

84. Zeitlin L., Olmsted S.S., Moench T.R., Co M.S., Martinell B.J., Paradkar V.M., Russell D.R., Queen C., Cone R.A., Whaley K.J. A humanized monoclonal antibody produced in transgenic plants for immunoprotection of the vagina against genital herpes // *Nat Biotechnol.* 1998. V. 16. P. 1361. <https://doi.org/10.1038/4344>
85. Bulaon C.J.I., Khorattanakulchai N., Rattanapisit K., Sun H., Pisuttinusart N., Strasser R., Tanaka S., Soon-Shiong P., Phoolcharoen W. Antitumor effect of plant-produced anti-CTLA-4 monoclonal antibody in a murine model of colon cancer // *Front. Plant Sci.* 2023. V. 29. P. 1149455. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1149455>
86. Klimyuk V., Pogue G., Herz S., Butler J., Haydon H. Production of recombinant antigens and antibodies in *Nicotiana benthamiana* using 'magniffection' technology: GMP-compliant facilities for small- and large-scale manufacturing // *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 2014. V. 375. P. 127. https://doi.org/10.1007/82_2012_212
87. Chen Q. Development of plant-made monoclonal antibodies against viral infections // *Curr. Opin. Virol.* 2022. V. 52. P. 148. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.12.005>
88. Kuo Y.C., Tan C.C., Ku J.T., Hsu W.C., Su S.C., Lu C.A., Huang L.F. Improving pharmaceutical protein production in *Oryza sativa* // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. V. 14. P. 8719. <https://doi.org/10.3390/ijms14058719>
89. Hull A.K., Criscuolo C.J., Mett V., Groen H., Steeman W., Westra H., Chapman G., Legutki B., Baillie L., Yusibov V. Human-derived, plant-produced monoclonal antibody for the treatment of anthrax // *Vacc.* 2005. V. 23. P. 2082. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.01.013>
90. Capell T., Twyman R.M., Armario-Najera V., Ma K.C.M., Schillberg S., Christou P. Potential applications of plant biotechnology against SARS-CoV-2 // *Trends Plant Sci.* 2020. V. 25. P. 635. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.04.009>
91. Rosales-Mendoza S., Márquez-Escobar V.A., González-Ortega O., Nieto-Gómez R., Arevalo-Villalobos J.I. What does plant-based vaccine technology offer to the fight against COVID-19? // *Vaccines*. 2020. V. 14. P. 183. <https://doi.org/10.3390/vaccines8020183>
92. Ramessar K., Sabalza M., Miralpeix B., Capell T., Christou P. Can microbicides turn the tide against HIV? // *Curr. Pharm. Des.* 2010. V. 16. P. 468. <https://doi.org/10.2174/138161210790232202>
93. Ma J.K., Christou P., Chikwamba R., Haydon H., Paul M., Ferrer M.P., Ramalingam S., Rech E., Rybicki E., Wigdorowitz A., Yang D.C., Thangaraj H. Realising the value of plant molecular pharming to benefit the poor in developing countries and emerging economies // *Plant Biotechnol. J.* 2013. V. 11. P. 1029. <https://doi.org/10.1111/pbi.12127>
94. Kaplon H., Reichert J. M. Antibodies to watch in 2019 // *MAbs*. 2019. V. 11. P. 219. <https://doi.org/10.1080/19420862.2018.1556465>
95. Tokuhara D., Alvarez B., Mejima M., Hiroiwa T., Takahashi Y., Kurokawa S., Kuroda M., Oyama M., Kozuka-Hata H., Nochi T., Sagara H., Aladin F., Marcotte H., Frenken L.G., Iturriza-Gomara M. et al. Rice-based oral antibody fragment prophylaxis and therapy against rotavirus infection // *J. Clin. Invest.* 2013. V. 123. P. 3829. <https://doi.org/10.1172/JCI70266>
96. Esqueda A., Jugler C., Chen Q. Design and expression of a bispecific antibody against dengue and chikungunya virus in plants // *Methods Enzymol.* 2021. V. 660. P. 223. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2021.05.00>
97. Arntzen C. Plant-made pharmaceuticals: from 'Edible Vaccines' to Ebola therapeutics // *Plant Biotechnol. J.* 2015. V. 13. P. 1013. <https://doi.org/10.1111/pbi.12460>
98. Zeitlin L., Bohorov O., Bohorova N., Hiatt A., Kim D., Pauly M., Velasco J., Whaley K., Barnard D., Bates J., Crowe J., Piedra P., Gilbert B. Prophylactic and therapeutic testing of *Nicotiana*-derived RSV-neutralizing human monoclonal antibodies in the cotton rat model // *MAbs*. 2013. V. 5. P. 263. <https://doi.org/10.4161/mabs.23281>
99. Brodzik R., Glogowska M., Bandurska K., Okulicz M., Deka D., Ko K., van der Linden J., Leusen J.H.W., Pogrebnyak N., Golovkin M., Stepiewski Z., Koprowski H. Plant-derived Anti-Lewis Y mAb exhibits biological activities for efficient immunotherapy against human cancer cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 6. P. 8804. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603043103>
100. Buyel J.F., Twyman R.M., Fischer R. Very-large-scale production of antibodies in plants: the biologization of manufacturing // *Biotechnol. Adv.* 2017. V. 35. P. 458. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.03.011>
101. Oluwayelu D.O., Adebisi A.I. Plantibodies in human and animal health: a review // *Afr. Health Sci.* 2016. V. 16. P. 640. <https://doi.org/10.4314/ahs.v16i2.35>
102. Houdelet M., Galinski A., Holland T., Wenzel K., Schillberg S., Buyel J. F. Animal component-free *Agrobacterium tumefaciens* cultivation media for better GMP-compliance increases biomass yield and pharmaceutical protein expression in *Nicotiana benthamiana* // *Biotechnol. J.* 2017. V. 12. Art. 1600721. <https://doi.org/10.1002/biot.201600721>
103. Edgus G., Twyman R. M., Beiss V., Fischer R., Sack M. Antibodies from plants for bionanomaterials // *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 2017. V. 9. P. 11. <https://doi.org/10.1002/wnan.1462>
104. Kopertek L., Schiemann J. Transient production of recombinant pharmaceutical proteins in plants: evolution and perspectives // *Curr. Med. Chem.* 2019. V. 26. P. 365. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170718114724>
105. Mason W. P. Bevacizumab in recurrent glioblastoma: five informative patient scenarios // *Can. J. Neurol. Sci.* 2015. V. 42. P. 149. <https://doi.org/10.1017/cjn.2015.21>

106. Yang X., Li J., Chen L., Louzada E. S., He J., Yu W. Stable mitotic inheritance of rice minichromosomes in cell suspension cultures // *Plant Cell Rep.* 2015. V. 34. P. 929. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1755-3>
107. Corbin J. M., Hashimoto B. I., Karuppanan, K., Kyser Z. R., Wu L., Roberts B. A., Noe A.R., Rodriguez R.L., McDonald K.A., Nandi S. Semicontinuous bioreactor production of recombinant butyrylcholinesterase in transgenic rice cell suspension cultures // *Front. Plant Sci.* 2016. V. 7. P. 412. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00412>
108. Knödler M., Frank K., Kerpen L., Buyel J.F. Design, optimization, production and activity testing of recombinant immunotoxins expressed in plants and plant cells for the treatment of monocytic leukemia // *Bioengineered.* 2023. V. 14. Art. 2244235. <https://doi.org/10.1080/21655979.2023.2244235>
109. Rademacher T., Sack M., Blessing D., Fischer R., Holland T., Buyel J.F. Plant cell packs: a scalable platform for recombinant protein production and metabolic engineering // *Plant Biotechnol. J.* 2019. V. 17. P. 1560. <https://doi.org/10.1111/pbi.13081>
110. Gengenbach B.B., Keil L.L., Opdensteinen P., Müschen C.R., Melmer G., Lentzen H., Bührmann J., Buyel J.F. Comparison of microbial and transient expression (tobacco plants and plant-cell packs) for the production and purification of the anti-cancer mistletoe lectin viscumin // *Biotechnol. Bioeng.* 2019. V. 116. P. 2236. <https://doi.org/10.1002/bit.27076>
111. Ou J., Si Y., Goh K., Yasui N., Guo Y., Song J., Wang L., Jaskula-Sztul R., Fan J., Zhou L., Liu R., Liu X. Bioprocess development of antibody-drug conjugate production for cancer treatment // *PLOS One.* 2018. V. 13. Art. e0206246. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206246>
112. Buyel J.F. Plants as sources of natural and recombinant anti-cancer agents // *Biotechnol. Adv.* 2018. V. 36. P. 506. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.02.002>
113. Francisco J.A., Gawlak S.L., Miller M., Bathe J., Russell D., Chace D., Mixan B., Zhao L., Fell H. P., Sieggall C.B. Expression and characterization of bryodin 1 and a bryodin 1-based single-chain immunotoxin from tobacco cell culture // *Bioconjugate Chem.* 1997. V. 8. P. 708. <https://doi.org/10.1021/bc970107k>
114. Mirzaee M., Jalali-Javaran M., Moieni A., Zeinali S., Behdani M. Expression of VGRNb-PE immunotoxin in transplastomic lettuce (*Lactuca sativa* L.) // *Plant Mol. Biol.* 2018. V. 97. P. 103. <https://doi.org/10.1007/s11103-018-0726-9>
115. Cui L., Peng H., Zhang R., Chen Y., Zhao L., Tang K. Recombinant hHscFv-RC-RNase protein derived from transgenic tobacco acts as a bifunctional molecular complex against hepatocellular carcinoma // *Biotechnol. Appl. Biochem.* 59. 2012. P. 323. <https://doi.org/10.1002/bab.1039>

УДК 581.1

БИОСИНТЕЗ РЕКОМБИНАНТНЫХ ВАКЦИН В РАСТИТЕЛЬНЫХ СИСТЕМАХ ЭКСПРЕССИИ

© 2024 г. Е. А. Уварова^{а,*}, П. А. Белавин^а, Н. В. Пермязкова^а, Е. В. Дейнеко^а

^а Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
“Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук”, Новосибирск, Россия
*e-mail: uvarova@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 25.01.2024 г.

После доработки 13.03.2024 г.

Принята к публикации 18.03.2024 г.

Успехи генной инженерии способствовали возникновению нового раздела вакцинологии — создание рекомбинантных субъединичных вакцин, инициирующих формирование защитного иммунитета от различных заболеваний. Одной из перспективных и активно развивающихся систем экспрессии рекомбинантных белков медицинского назначения являются растения. В данном обзоре в общих чертах освещается формирование специфического и неспецифического иммунитета, функционирование гуморального и клеточного звеньев иммунитета, а также принципы создания рекомбинантных вакцинных препаратов. Более подробно рассматривается создание вакцинных препаратов для профилактики таких инфекций как грипп, коронавирусы, вирус папилломы человека, вирус гепатита В и норовирусы с примерами растительных рекомбинантных белков, профилирующих эти заболевания. Дана оценка рынка рекомбинантных вакцин растительного происхождения и приведены примеры наиболее успешных из них. В целом обзор призван подчеркнуть актуальность растительных систем экспрессии для наработки рекомбинантных вакцинных препаратов и их возможности для быстрого реагирования на возникающие вызовы в области профилактики инфекционных заболеваний.

Ключевые слова: субъединичные рекомбинантные вакцины, иммунитет, растительные системы экспрессии, съедобные вакцины

DOI: 10.31857/S0015330324050045, EDN: MMXZXD

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время диапазон практического применения растений для нужд человека трудно переоценить. Это не только “легкие” нашей планеты и сырьевой источник в повседневной жизни, но это еще и ресурс различных ценных лекарственных соединений, издавна используемых человечеством для борьбы с разнообразными недугами и заболеваниями. С развитием современных методов молекулярной биологии, позволяющих манипулировать геномами живых организмов, растения становятся весьма привлекательными для наработки различных фармацевтически ценных рекомбинантных белков медицинского назначения, являющихся аналогами природных соединений. Способность растительных клеток не только синтезировать,

но и правильно модифицировать рекомбинантные молекулы с сохранением их функциональных характеристик, а также обеспечивать защиту рекомбинантного белка от агрессивной среды желудочно-кишечного тракта за счет целлюлозной оболочки, послужила основой для формирования и развития идеи съедобной вакцины. Впервые на примере В-субъединицы термостабильного токсина *Escherichia coli*, синтезируемого в клубнях картофеля [1], а также HbsAg-антигена гепатита В, синтезируемого в трансгенных растениях табака [2], была показана возможность формирования системного мукозального иммунного ответа на съедобную вакцину.

Современные знания в области молекулярной биологии, иммунологии и вакцинологии дают возможность идентифицировать и изолировать биологические макромолекулы или их

фрагменты, которые можно было бы использовать в качестве иммуногенных компонентов для конструирования вакцин нового поколения, основу которых составляет антигенная структура патогена. Такими компонентами могут выступать иммунодоминантные белки возбудителей различных видов инфекций, например, белки оболочек вирусов или клеточных стенок бактерий. В настоящее время с применением генно-инженерных технологий успешно развивается направление создания рекомбинантных субъединичных вакцин — искусственно созданных белковых молекул, включающих протективные антигены, синтезируемые в различных системах экспрессии [3–5], в том числе и растительных [6–8].

Следует подчеркнуть вновь возросший в последние несколько лет интерес к съедобным растительным вакцинам, представляющим собой некоторые части растений (плоды, семена, клубни и т.д.), в генетически модифицированных тканях которых синтезируются иммунодоминантные белковые молекулы [9, 10]. Привлекательность перорального пути доставки таких вакцин особенно актуальна для стран с низким уровнем доходов населения, поскольку при получении съедобных растительных вакцин нет необходимости очистки иммуногена от других компонентов растительных тканей, употребляемых в пищу, что существенно снижает затраты на их производство. Немаловажное значение в этом случае имеет и отсутствие необходимости холодовой цепи при проведении иммунизации [11]. Перспективы использования съедобных растительных вакцин с акцентом на индукцию мукозального иммунитета с примерами различных видов растений, употребляемых в пищу, и с обсуждением путей формирования ответных иммунных реакций на различные патогены, подробно рассмотрены в обзорах [12, 13].

Учитывая достаточно большой опыт работ по созданию вакцин растительного происхождения в отечественных и зарубежных лабораториях, а также необходимость быстрого реагирования при распространении вирусных заболеваний, становится актуальным суммирование и критический обзор накопленных в этом направлении знаний. В предлагаемом обзоре представлены наиболее важные сведения о разработке стратегий повышения иммуногенности искусственно создаваемой белковой молекулы, нацеленной на активацию защитных возможностей организма не только от проникновения патогена (профилактические вакцины), но и на его уничтожение в организме, уже колонизированном патогеном (терапевтические вакцины). В связи с тем, что успешность разработки и создания вакцины, в особенности в условиях быстрого реагирования на распространение возбудителя инфекции, определяется в том числе и наличием надежных

систем экспрессии, мы считаем необходимым привлечь внимание к простым, но достаточно перспективным системам для наработки рекомбинантных белков, в том числе и вакциногенных, — растительным клеткам. Краткое представление об общих принципах формирования защитных реакций организма на внедрение патогенов, включенное в данный обзор, нацелено на анализ поиска “подсказок” при создании кандидатных вакцин в растительных системах экспрессии с акцентом на разработку подходов слияния антигенов с другими белками, усиливающими их иммуногенность и выполняющими роль адъювантов. В обзоре суммированы данные о состоянии рынка рекомбинантных вакциногенных белков растительного происхождения, находящихся на различных стадиях клинических испытаний, а также уже выведенных на рынок для коммерческого использования.

ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ФОРМИРОВАНИЯ ЗАЩИТНЫХ РЕАКЦИЙ ОРГАНИЗМА НА ВВЕДЕНИЕ ПАТОГЕНОВ

Одним из наиболее эффективных методов борьбы с инфекционными заболеваниями является вакцинация, основанная на программировании специфических иммунологических механизмов на защиту от возбудителей инфекций. Активирование иммунитета осуществляется путем введения вакцины, представляющей препарат, специфически стимулирующий организм на формирование защитной реакции против инфекционного агента. С помощью вакцинопрофилактики полностью прекращено распространение в человеческой популяции натуральной оспы, снижена до минимального уровня заболеваемость чумой и полиомиелитом. В настоящее время вакцинопрофилактика, как и прежде, остается основным инструментом не только предупреждения, но и прекращения вспышек и эпидемий различных инфекционных заболеваний [14, 15].

Хотя человечеству и удалось избежать распространения многих опасных инфекций, все еще остается актуальным вопрос о низкой эффективности и отрицательных эффектах, возникающих при использовании традиционных вакцин. Вакцины, используемые в настоящее время в виде аттенуированных (ослабленных) или инактивированных (убитых) патогенов, основаны на представлениях Р. Коха и его ближайших последователей о прочной связи между патогеном в ослабленной форме и приобретением защитной реакции организма. Такие вакцины далеки от “идеальных”, поскольку предоставление иммунной системе большого числа различных компонентов патогена связано с сенсibilизацией организма, большой нагрузкой на иммунную систему, реактогенностью, ток-

сичностью и др. С аттенуированным или инактивированным патогеном в организм, кроме белков, вызывающих формирование защитного иммунитета, попадает также и масса других белков, каждый из которых может вызвать и нежелательную иммунную реакцию [16].

Создание “идеальных вакцин”, лишенных вышеперечисленных недостатков, становится реальным благодаря возможности идентифицировать и изолировать биологические макромолекулы патогена или их фрагменты, участвующие в формировании иммунных ответных реакций организма на патоген. Разработка методов, позволяющих использовать макромолекулы или их фрагменты для конструирования искусственных белковых молекул, открывает новые перспективы в вакцинологии. Создание искусственных молекул в качестве рекомбинантных вакцин нацелено на имитацию проникновения в организм патогена, а также запуск каскада не только защитных механизмов на конкретный патоген, но и формирование памяти о нем.

Важным этапом при разработке искусственных молекул, предназначенных для индукции защитных механизмов на внедрение того или иного типа патогена, является четкое понимание основных принципов формирования защитных реакций в организме для оптимального нацеливания создаваемых искусственных молекул на наиболее важные из них. Рассмотрим в самом общем виде системы неспецифической и специфической защиты, в процессе эволюции сформировавшиеся на вторжение в организм различных чужеродных агентов, делая акцент на важность того или иного звена, имеющего принципиальное значение именно при выборе особенностей конструирования искусственных молекул. Необходимо подчеркнуть, что в организмах с развитой иммунной системой обе защиты функционируют как единое целое, используя гуморальные и клеточные механизмы. При гуморальном механизме защиты в организме нарабатываются специализированные белковые молекулы – антитела, которые перемещаются с током крови и лимфы и инактивируют инфекционный агент. Клеточный механизм защиты основан на активации целого ряда специализированных клеток, нацеленных на уничтожение патогена.

Система неспецифической защиты. Данная система является эволюционно более древней и обеспечивает врожденный иммунитет. Это означает, что сформировавшиеся в процессе эволюции факторы, нацеленные на распознавание и обезвреживание чужеродного агента, передаются из поколения в поколение и представляют собой первую линию защиты от внедрения “чужого”. Первая линия защиты представлена двумя мощными системами, включающими гуморальные и клеточные факторы. Важная осо-

бенность этой линии защиты состоит в том, что в данном случае нет необходимости в индукции реакции на патоген, поскольку постоянно присутствующие в организме факторы защиты сразу же могут отреагировать на внедрение чужеродного агента. Важно отметить, что факторы неспецифической защиты включаются в ответные реакции на патоген не как единое целое, а действуют независимо друг от друга и не формируют иммунологической памяти.

Реакции врожденного иммунитета запускаются на первом этапе взаимодействия организма с патогеном. Молекулярный механизм такого взаимодействия основан на способности системы врожденного иммунитета опознавать не отдельные патогены, а инфекцию в целом, т.е. распознавать некоторые стандартные “молекулярные метки” или патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (ПАМП). Такие метки имеются на ряде молекул бактериального происхождения и являются консервативными для огромного числа микроорганизмов [17]. ПАМП распознаются рецепторами фагоцитирующих клеток и натуральных киллеров, при взаимодействии которых с ПАМП инфицирующего агента запускаются каскады Т-клеточного иммунного ответа и координируется устранение патогенов и инфицированных клеток. Группу рецепторов при развитии неспецифической защиты состав-

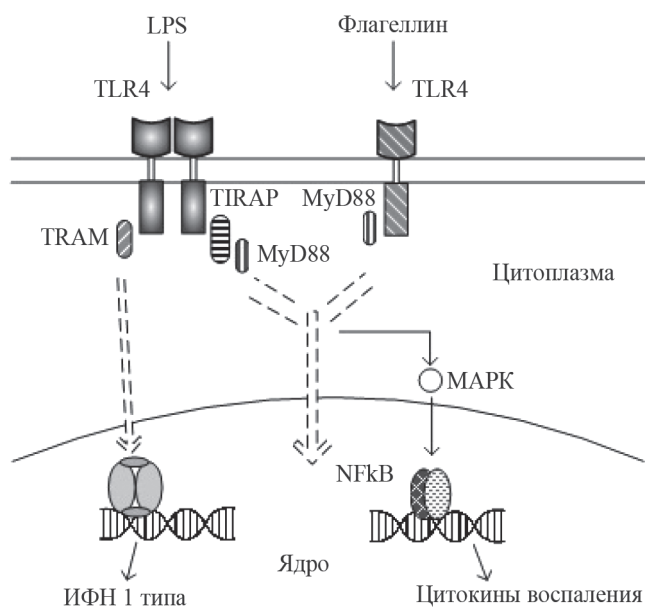


Рис. 1. Каскады иммунных реакций неспецифической системы защиты. LPS — липополисахариды; TLR4 и TLR5 — трансмембранные рецепторы; MyD88, TIRAP, TRAM, TRIF — молекулы-адаптеры; NFκB — универсальный фактор транскрипции; MAPK — митоген-активируемая протеинкиназа; ИФН-1 типа — интерферон первого типа.

ляют Toll-like рецепторы (TLRs), NOD-like рецепторы (NLRs), лектиновые рецепторы С-типа (CLRs), RIG-I-like рецепторы (RLRs) и ДНК сенсоры [18–20].

На рисунке 1 представлена общая схема каскада ответных реакций организма первой линии защиты путем распознавания Toll-like рецепторами дендритных клеток молекулярных меток инфицирующего агента (ПАМП) на примере связывания TLR4 и TLR5 с лигандами — липополисахаридом (LPS) и флагеллином, соответственно. Находящиеся в мономерном состоянии неактивные Toll-like рецепторы при взаимодействии с соответствующими лигандами активируются и принимают форму подковы, которая наиболее эффективна в прямом распознавании ПАМП [18, 21]. Активированные Toll-like рецепторы связываются с TIR-доменом молекул-адаптеров (MyD88, TIRAP, TRAM и TRIF), которые передают сигнал опасности и активируют MAPK и транскрипционные факторы NF- κ B, запускающие каскад генов воспалительного ответа клетки. Воспаление является неспецифической иммунной ответной реакцией в области проникновения патогена. Синтез цитокинов (интерлейкинов, хемокинов и интерферона) в очаге воспаления привлекает в этот район специализированные иммунные клетки. Цитокины не только активируют эти клетки, но и обеспечивают координированное взаимодействие между ними, их пролиферацию и дифференцировку, а макрофаги и дендритные клетки представляют презентированные на их поверхности антигены, обеспечивая таким образом развитие иммунного ответа [14]. Следовательно, рецепторы, связывающиеся с ПАМП, играют ключевую роль в функционировании врожденного иммунитета через активацию клеточного и гуморального иммунных ответов путем распознавания консервативных структур инфицирующих агентов [18, 19].

Следует отметить, что рецепторы неспецифической системы защиты (врожденного иммунитета) высоко специфичны в распознавании компонентов бактериальной клеточной стенки. Так, например, TLR2 и TLR4 в качестве лигандов используют липополисахариды и липотейхоевые кислоты, TLR9 — CpG DNA, TLR5 — флагеллин и т.д. [17]. NOD-like рецепторы (семейство цитоплазматических белков-сенсоров) опознают бактериальные пептидогликаны патогенов [22]. Лектиновые рецепторы С-типа (CLRs) — семейство трансмембранных рецепторов с характерными углевод-связывающими доменами — способны опознавать полисахариды вирусов, бактерий и грибов, тогда как семейство RLR-рецепторов опознают геномную РНК и дцРНК вирусов [20].

Дендритные клетки и макрофаги способны поглощать патоген (это явление известно как фа-

гоцитоз) и представлять его антигены на поверхности мембраны, активируя систему специфической иммунной защиты. Важно подчеркнуть, что группа клеток, принимающая участие в реализации первой линии защиты от внедрения в организм патогенов, весьма многочисленна. Помимо вышеупомянутых, к этой группе относятся также моноциты, нейтрофиллы, базофиллы, эозинофиллы, тучные клетки и натуральные киллеры. Многие из этих клеток способны к фагоцитозу и таким образом уничтожают чужеродные агенты, тогда как натуральные киллеры (NK-клетки) способны уничтожать клетки организма, инфицированные вирусом или внутриклеточной бактерией.

Описанные в общем виде механизмы, запускающие каскады реакций неспецифической защиты, являющиеся первой линией обороны организма от внедрения инфекции, дают представление о передаче сигналов опасности, запуске каскадов иммунных реакций в клетке и модуляции иммунного ответа. Следовательно, при разработке и создании субъединичных вакцин молекулы, включающие молекулярные метки в виде ПАМП, а также молекулы цитокинов, могут служить потенциальными источниками в качестве компонентов, усиливающих ответ на специфический антиген.

Система специфической иммунной защиты эволюционно является более молодой. Эта система нацелена на развитие приобретенного или адаптивного иммунитета и ее особенность состоит в высокоспецифичном распознавании чужеродных агентов, т.е. специфических антигенов, а не инфекции в целом, а также способности формировать “депо памяти” о них, которое может быть активировано при повторном инфицировании соответствующим патогеном. В отличие от неспецифической защиты данная система сохраняется только в течение онтогенеза организма и не наследуется.

Основными “игроками”, обеспечивающими формирование второй линии защиты организма от вторжения чужеродных агентов, является группа высокоспециализированных клеток под общим названием лимфоциты. Эта группа клеток включает Т-лимфоциты, формирующиеся в тканях тимуса из незрелых Т-0 клеток, поступающих в тимус из костного мозга, и В-лимфоциты, созревающие в костном мозге из клеток В-0 (рис. 2). Благодаря чрезвычайно высокой степени вариабельности рецепторов, расположенных на их поверхности, реализуется уникальная особенность системы специфической иммунной защиты в распознавании огромного множества представляемых ей антигенов. Т- и В-лимфоциты различаются между собой как по механизмам активации и созревания, так и по выполняемым функциям, что послужило причиной условно-

го разделения реакций адаптивного иммунитета на два звена — клеточное и гуморальное. Каскады клеточного звена иммунитета активируют макрофаги, натуральные киллеры, антиген-специфичные цитотоксические Т-лимфоциты, т.е. защитные функции иммунной системы реализуются субпопуляциями специфических клеток. Гуморальное звено иммунитета связано с формированием антител, защитные функции которых реализуются в плазме крови, т.е. во внеклеточном пространстве. Антигены, как правило, содержат как клеточные, так и гуморальные эпитопы (антигенные детерминанты) — участки антигена, которые распознаются иммунной системой.

На рис. 2 представлены основные этапы формирования клеточного и гуморального звеньев системы специфической иммунной защиты. Следует подчеркнуть, что несмотря на то, что оба звена этой системы тесно связаны между собой, они способны распознавать “свои” (условно клеточные или гуморальные) специфические участки антигена или антигенные детерминанты (эпитопы) и формировать специфические от-

ветные реакции. Антигены распознаются антигенпрезентирующими клетками, которые процессируют антиген и представляют его в виде пептидов на своей поверхности Т-клеткам (рис. 2а). Процессинг антигена осуществляется в комплексе с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС I или МНС II). С МНС I взаимодействуют эндогенные пептиды белков, синтезируемых внутри клетки, например, при ее заражении вирусом. С МНС II связываются экзогенные антигены, которые попадают в клетку с помощью опосредованного рецепторами эндоцитоза. Представленные на поверхности антигенпрезентирующих клеток комплексы распознаются Т-клетками, которые связываются с ними посредством Т-клеточного рецептора (TCR). Последующая антиген-специфическая активация Т-клеток происходит через стабилизацию ко-рецепторами CD4+ \ CD8+. Т-клетки, несущие корецептор T-CD4+, пролиферируют и дифференцируются в Т-хелперы, а T-CD8+ — в цитотоксические лимфоциты (Т-киллеры). Т-киллеры способны узнавать клетки мишени

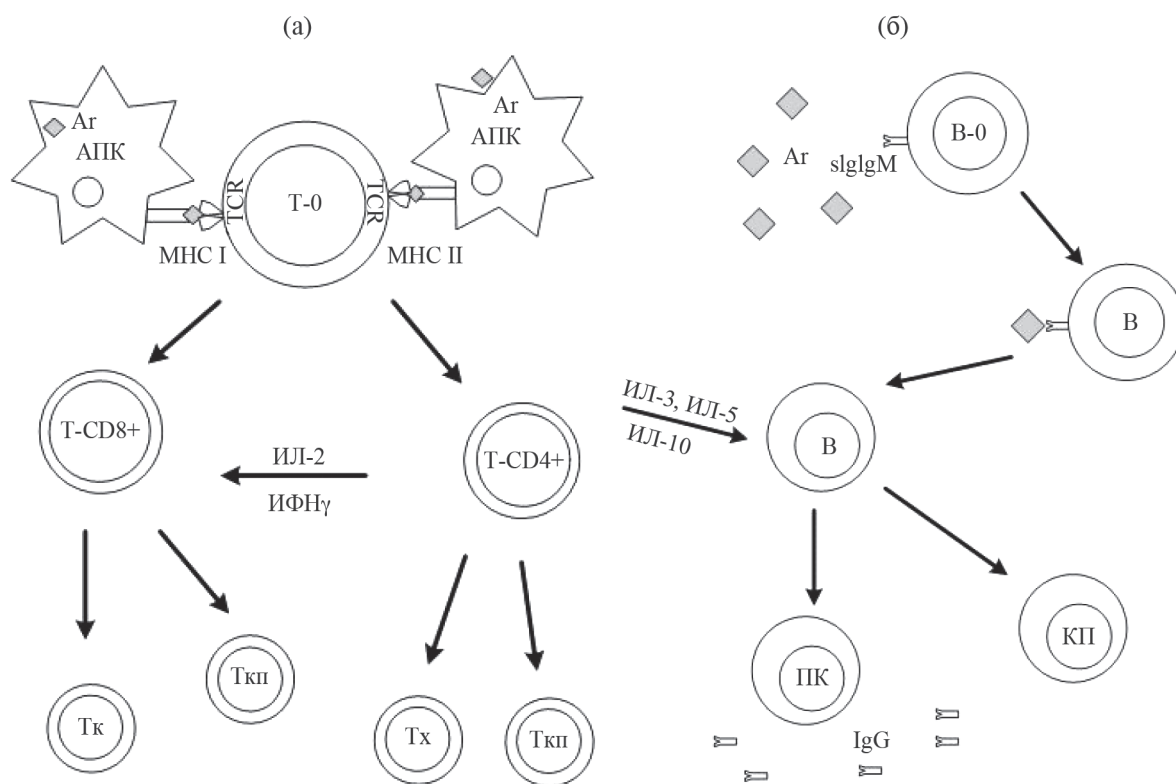


Рис. 2. Инициация и развитие клеточного и гуморального звеньев специфической системы защиты: а — реакции клеточного иммунитета; б — реакции гуморального иммунитета. Ag — антиген; АПК — антигенпрезентирующая клетка; МНС I/II — главный комплекс гистосовместимости типов I или II; TCR — Т-клеточный рецептор; T-0 — незрелая Т-клетка; T-CD4+ — Т-клетка с корецептором CD4; T-CD8+ — Т-клетка с корецептором CD8; Тк — Т-киллер; Тх — Т-хелпер; Ткп — Т-клетка памяти; B-0 — незрелая В-клетка; slgIgM — мембранная форма IgM; В — активированная В-клетка; ПК — плазматическая клетка; Кп — клетка памяти; IgG — антитела G в растворимой форме; ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-5, ИЛ-10, ИФНγ — цитокины, влияющие на каскады клеточного и гуморального иммунитета.

и осуществлять их лизис [23]. Цитокины, синтезируемые Т-хелперами, активируют и запускают дифференцировку В-лимфоцитов (ИЛ-3, ИЛ-5, ИЛ-10), обеспечивая связь между обоими звеньями специфической иммунной защиты, а также регулируют цитотоксические ответы (ИЛ-2, ИНФγ). Для обеспечения долговременной защиты организма и быстрого развертывания иммунного ответа на вторичное инфицирование формируются Т-клетки памяти (Ткп), которые способны долгое время сохраняться в организме и передавать информацию об антигене другим клеткам [24].

Реакции гуморального иммунитета инициируются при встрече незрелого В-лимфоцита (В-0) с антигеном, эпитоп которого связывается с мембранной формой IgM - sIgM на клеточной поверхности (рис. 26). В-0 клетка после связывания с антигеном активируется при участии Т-хелперов и дифференцируется в плазматические клетки (ПК), способные синтезировать антитела. Важно отметить, что синтез антител В-клетками может быть усилен цитокинами, что подчеркивает влияние клеточного звена на гуморальное [23]. Продолжительность жизни каждой зрелой В-клетки (ПК) составляет всего несколько дней, в течение которых ею синтезируются антитела уникальной специфичности. Антитела являются рецепторами В-клеточных эпитопов. Некоторые активированные В-клетки способны переходить в стадию малых лимфоцитов, являющихся долгоживущими клонами В-клеток и получивших название клеток памяти (КП). Эти клетки обеспечивают быстрый синтез большого количества антител при повторном введении того же антигена.

Итак, при реализации системы специфической иммунной защиты организма важную роль играет ее способность к распознаванию огромного числа антигенных детерминант (эпитопов). Следовательно, эффективность рекомбинантной вакцины для индукции и формирования ответных защитных реакций организма в значительной мере будет определяться представлением наиболее эффективных эпитопов на поверхности искусственно созданной молекулы, имитирующей патоген. Таким образом, при создании субъединичных вакцин для формирования надежного иммунитета необходимо подбирать антигены, которые бы включали как Т-, так и В-клеточные эпитопы.

ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ КОНСТРУИРОВАНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ВАКЦИН

Создание искусственных рекомбинантных молекул, способных имитировать патоген, базируется на четких представлениях об особен-

ностях строения и организации того или иного патогена, а также ответных реакций на его внедрение со стороны иммунной системы организма. Так, например, при создании противовирусных вакцин учитываются особенности строения вирусного капсида, поскольку именно капсидные белки контактируют непосредственно с клетками организма. Именно к отдельным участкам поверхностных белков (эпитопам) эволюционно сформированы рецепторы на поверхности клеток организма, контактирующих с вирусом. Наличие в арсенале современных исследователей мощных возможностей секвенирования геномов патогенов и создания биоинформатических баз данных их нуклеотидных последовательностей позволяет получать сведения о белках, способных к индукции иммунных ответных реакций организма. С другой стороны, развитие современных методов молекулярной биологии обеспечивает исследователей инструментами не только для клонирования нуклеотидных последовательностей из геномов любых организмов, но и для сборки из них сложных рекомбинантных молекул, включающих, в том числе, последовательности, обеспечивающие сворачивание кодируемых рекомбинантных белков в вирусоподобные частицы. Такие вирусоподобные частицы представляют собой “искусственные вирусы”, лишенные генетического аппарата (РНК или ДНК). При попадании в клетку они лишь только имитируют вирус, но не способны реплицироваться. Этот принцип конструирования рекомбинантных вакцин представляется как наиболее перспективный для усиления их иммуногенности [25]. Более полную информацию о перспективах создания рекомбинантных вакцин в виде вирусоподобных частиц, синтезируемых, в том числе, и в растительных системах экспрессии, можно найти в обзоре [26].

Рассмотрим в качестве примеров особенности создания рекомбинантных вакцин, синтезируемых на основе растительных платформ экспрессии, нацеленных на индукцию ответных иммунных реакций организма при его заражении различными типами патогенов.

Вирусы гриппа. Вирусы гриппа относятся к роду *Orthomyxoviridae* и способны инфицировать и вызывать заболевания у птиц, рыб и млекопитающих. Геном этих вирусов представлен одноцепочечной фрагментированной “минус”-цепью РНК. С точки зрения здравоохранения, наиболее агрессивными считаются вирусы гриппа серотипов А и В. Именно они вызывают крупные вспышки заболеваний в популяциях человека. Гемагглютинин (НА) и нейраминидаза (N) как поверхностные белки вирусного капсида являются его антигенами, индуцирующими продукцию специфических защитных антител, а также определяют подтип ви-

руса. Антигенными свойствами обладает и внеклеточный домен трансмембранного белка M2 (M2e-пептид).

Наиболее успешным способом предотвращения вспышек заболеваний, вызываемых вирусом гриппа, несомненно, служит вакцинация. Поскольку вирусы гриппа подвержены непрерывным генетическим и антигенным изменениям, ВОЗ проводит постоянный мониторинг циркулирующих штаммов и дважды в год публикует рекомендации по составу вакцин (для Северного и для Южного полушария). Таким образом, производители вакцин стоят перед проблемой корректировки антигенного состава вакцин практически ежегодно. Для решения этой проблемы многие исследовательские коллективы и фармакологические компании ведут разработку универсальных противогриппозных вакцин [27, 28].

В настоящее время для профилактики гриппа доступны лицензированные инактивированные (убитые), аттенуированные (ослабленные) трех- и четырехвалентные вакцины, включающие вирусные компоненты из двух штаммов вируса гриппа А и одного штамма гриппа В, либо дополнительный вирус В, а также рекомбинантные вакцины. Для получения субъединичных вакцин используются вирусные белки, гемагглютинин и нейраминидаза, которые частично очищаются после химической обработки или расщепления детергентами [29]. В связи с тем, что получение рекомбинантных вакцин против гриппа представляется перспективным направлением, обеспечивающим мобильность в ответных реакциях на вирусную изменчивость, актуальной становится и проблема наработки отдельных вирусных компонентов в альтернативных системах экспрессии. Так, например, рекомбинантная субъединичная вакцина на основе гемагглютинина была получена в клетках насекомых [30].

Применение растительных систем экспрессии в качестве альтернативных для наработки отдельных компонентов генома вируса гриппа, кодирующих поверхностные белки-иммуногены, стало весьма привлекательным после разработки транзientной системы экспрессии рекомбинантных белков [31]. Подтверждением перспективности данной системы экспрессии для обеспечения быстрой вакцинации населения и защиты от вспышек заболеваний послужили работы D'Aoust с соавт. [32], когда в растениях *N. benthamiana* были наработаны большие количества (50 мг/кг) антигенов из штаммов вируса гриппа H5N1 (AIV) и H1N1 (человек) менее чем за 3 недели с момента выделения вирусной последовательности. Именно сжатые сроки производства белков и быстрое масштабирование открывают большие возможности для производ-

ства крупных партий вакцин, особенно при необходимости экстренного реагирования.

При разработке кандидатных противогриппозных вакцин, получаемых в растительных системах экспрессии, в качестве антигенов применяют гемагглютинин и консервативный M2e-пептид [33]. Для усиления иммуногенного ответа используют прием представления иммунной системе антигена в виде вирусоподобных частиц [34], в т.ч. химерных. В состав таких химерных вирусоподобных частиц могут быть включены гемагглютенины сразу нескольких штаммов вируса гриппа, что значительно расширяет спектр действия вакцины [35]. Именно такая квадριвалентная рекомбинантная вакцина (QVLP) против сезонного гриппа, включающая гемагглютенины диких штаммов, синтезируемые в растительных клетках (*N. benthamiana*) и собирающиеся в иммуногенные вирусоподобные частицы, была создана компанией "Medicago Inc." (Канада). В ходе клинических испытаний этой вакцины выявлена высокая иммуногенность и сильный гуморальный и клеточный иммунный ответ [36].

Для усиления иммуногенного ответа может быть использован флагеллин жгутиков простейших, способный к самосборке в вирусоподобную частицу. Рекомбинантные антигены вируса гриппа А, слитые с флагеллином на С-конце белковой молекулы и наработанные в транзientной системе экспрессии *N. benthamiana*, формировали сильный антительный иммунный ответ [33].

Коронавирусы. Вспышка нового варианта коронавирусной инфекции, известной как COVID-19, произошла в конце 2019 г. в Китае, в г. Ухань, и была вызвана вирусом SARS-CoV-2. Данный вариант вируса характеризуется высокой степенью изменчивости и, как показывает сложившаяся ситуация по различным регионам Земного шара, способен приводить к прогрессирующему распространению инфекции в человеческой популяции и становится причиной возникновения эпидемий. На данный момент времени на сайте ВОЗ можно найти информацию о состоянии завершенных разработок по созданию вакцин против SARS-CoV-2 [37]. В большей части работ по созданию этих вакцин разработчиками в качестве основы был использован иммуногенный белок S-1 коронавируса, представляемый иммунной системе разными путями [38]. Представляют интерес вакцины на основе рекомбинантных белков или пептидов. В качестве кандидатов на антигены при создании вакцин против SARS-CoV-2 рассматриваются полноразмерные белки или домены белков S, M и N. Для повышения иммуногенности таких белков дополнительно используют включение эпитопов, распознаваемых Т- и В-клетками иммунной системы [39]. Наиболее полно

стратегии создания вакцин против SARS-CoV-2 и современное состояние исследований в этой области представлено в обзоре [40].

Следует отметить привлекательность растительных систем экспрессии для биотехнологического производства вакциногенных белков против COVID-19, прежде всего, по причине мобильности организации такого производства [41, 42]. Всесторонне обсуждаются возможности приложения уже существующих биотехнологических разработок для создания субъединичных вакцин на основе растительных систем экспрессии [43, 44]. Имеющиеся разработки по созданию растительных вакцин против гриппа на основе вирусоподобных частиц также легли в основу разработки вакцин против COVID-19 [45, 46]. Разработчики вакцин “Medicago Inc.” (Канада) использовали подход заякоревания рекомбинантного белка S-1 в липидной оболочке вирусоподобной частицы, сформированной из клеточной мембраны *N. benthamiana* [47]. Кандидатная вакцина, полученная на основе растительной системы экспрессии, успешно прошла две фазы клинических испытаний на добровольцах [48, 47] и находится в третьей фазе; более того, компанией заявлено формирование высоких титров антител у испытуемых.

В основу другой вакцины (KBP-201) против SARS-CoV-2, разработанной компанией “Kentucky Bioprocessing” (США), положено два компонента – вирусоподобная частица, образуемая белком вируса табачной мозаики, и рецептор-связывающий домен (receptor-binding domain, RBD) S-белка. Оба эти компонента были совместно синтезированы в транзientной системе *N. benthamiana* и затем химически сшиты в процессе очистки. Для повышения стабильности вакцины KBD-201 последовательность RBD белка S была слита с Fc-доменом IgG1 человека, а также с пептидом экстенсина *N. benthamiana*, обеспечивающим секрецию рекомбинантного белка в апопласт [49].

Вирус папилломы человека. Вирус папилломы человека (ВПЧ) является безоболочечным ДНК-вирусом семейства *Papillomaviridae* [50]. Выделено несколько десятков типов ВПЧ, которые условно разделены на три группы – с высокой, средней и низкой степенями риска развития онкологических заболеваний. ВПЧ относится к строго эпителиотропным типам, поскольку при проникновении в организм поражает базальный слой эпителия, тогда как в других слоях он способен только персистировать. Как и большинство ДНК-содержащих вирусов, ВПЧ также интегрирует часть своего генома в геном человека. Жизненный цикл вируса в организме хозяина при его заражении ВПЧ протекает в два этапа. Наиболее важным моментом первого эта-

па является активация генов, кодирующих белки Е6 и Е7, которые блокируют ключевые этапы деления клеток эпителия в месте проникновения вируса, иницируя их неконтролируемое деление с образованием папиллом. Второй этап жизненного цикла ВПЧ связан с экспрессией генов L1 и L2, кодирующих белки, отвечающие за сборку капсида. Вирусы папилломы человека разработали стратегии, позволяющие уклоняться от иммунной системы и создавать оптимальные условия для сохранения в организме хозяина в течение многих лет. Установлено, что доля онкологических заболеваний, связанных с ВПЧ, составляет около 5% [51].

Современные вакцины против ВПЧ являются профилактическими, они достаточно эффективны для предотвращения инфекций и неопластических заболеваний, однако не способны устранять ВПЧ, персистирующие в организме инфицированного человека. Именно это обстоятельство обуславливает разработку не только профилактических, но и терапевтических вакцин против ВПЧ. Основное назначение терапевтических вакцин состоит в запуске клеточного звена иммунитета, нацеленного на лечение уже имеющихся в организме ВПЧ и злокачественных новообразований [52]. В связи с этим особое значение имеет разработка противораковых вакцин, вызванных ВПЧ [53, 54].

В настоящее время существует три коммерчески доступные вакцины для профилактики ВПЧ: Cervarix® (“GlaxoSmithKline”, Великобритания), Gardasil®4 и Gardasil®9 (“Merck & Co”, США). Все они поливалентны и являются смесью очищенных капсидных белков L1, полученных от ВПЧ различных типов с использованием технологии рекомбинантных ДНК. Белок L1 наиболее консервативен из всех белков ВПЧ; более того, он способен формировать вирусоподобные частицы [52]. Именно поэтому он был выбран в качестве иммуногена при разработке рекомбинантных профилактических вакцин, представляющих собой вирусоподобные частицы, каждая из которых содержит белки L1 из разных типов вирусов. В результате вакцинации в организме образуются нейтрализующие антитела к белку L1, которые связываются с вирусными частицами и блокируют их проникновение в эпителиальные клетки организма. Установлено, что даже однократной вакцинации профилактическими вакцинами вполне достаточно для защиты от тех типов ВПЧ, против которых они были разработаны [55, 56]. Следует подчеркнуть, что ген, кодирующий белок L1, не экспрессируется на первой стадии жизненного цикла ВПЧ, поэтому профилактические вакцины, в основе которых использован белок L1, не способны устранять уже существующие инфекции [57, 58].

Разработки профилактических вакцин продолжают, и на различных стадиях клинических испытаний сейчас находятся не менее пяти вакцин против ВПЧ [59]. Однако профилактические вакцины, нацеленные на гуморальные ответы иммунной системы, не приносят пользы людям, в организме которых персистирует ВПЧ. Для таких пациентов необходимо развивать другие подходы вакцинирования, нацеленные на формирование клеточного иммунитета, связанного с формированием Т-хелперов первого типа и цитотоксических Т-клеток, образующихся из CD4 + и CD8 + Т-клеток, соответственно [60]. Для разработки терапевтических вакцин используются белки Е6 и Е7, которые относятся к онкобелкам [61], а также белки Е1 и Е2, синтезируемые на первой стадии жизненного цикла вируса до его интеграции в геном клетки-хозяина [62, 63].

Необходимо отметить, что существующие методы наработки вакцин сопряжены с получением дорогостоящих продуктов [64], которые могут быть недоступными для стран с низкими доходами населения и высокой степенью его инфицирования ВПЧ. В качестве одного из путей решения данной проблемы может быть использование растительных систем экспрессии для наработки рекомбинантных белков, используемых для производства вакцин против ВПЧ [54]. Установлено, что L1-белок, нарабатываемый в транзientной системе экспрессии (*N. benthamiana*), а также в хлоропластах транспластомных растений табака, образовывал вирусоподобные частицы, способные нейтрализовать гомологичные псевдовирioны ВПЧ [65, 66]. Наиболее полный список экспериментальных кандидатных вакцин против ВПЧ, синтезируемых в растительных системах экспрессии, приведен в обзоре В. Shanmugaraj с соавт. [54]. Другой многообещающей стратегией является разработка с использованием иммуноинформационных инструментов и вычислительных подходов мультиэпитопных или пептидных вакцин, способных стимулировать как гуморальный, так и клеточный иммунитет. Установлено, что такие искусственно созданные мультиэпитопные рекомбинантные молекулы, синтезируемые в растительной системе экспрессии и рассматриваемые в качестве кандидатов против ВПЧ, способны подавлять рост опухолей у животных [67].

Вирус гепатита В. Вирус гепатита В (ВГВ), вызывающий при заражении человека острые воспалительные поражения печени, которые могут перейти в хроническую форму вплоть до летального исхода, относится к семейству *Hepadnaviridae*. Несмотря на то, что около 257 млн человек в настоящее время заражены ВГВ [68], это заболевание поддается профилак-

тике посредством безопасных, доступных и эффективных вакцин. Разработанные вакцины имеют в основе три иммуногенных белка, являющихся компонентами белковой оболочки вируса: короткий (S или HBsAg), средний (М или preS2-HBsAg) и большой (L или preS1-preS2-HBsAg). Эти вакцины, демонстрирующие хорошие результаты по формированию клеточного и гуморального иммунитета, применяются не только как профилактические, но и как терапевтические для лечения носителей ВГВ [69]. Для получения рекомбинантных вакцин против ВГВ используют системы экспрессии на основе дрожжей [70], клеток яичника китайского хомячка (СНО) [71].

Первым антигеном, полученным в растительной системе экспрессии для вакцинации человека в виде инъекций, а также для пероральной иммунизации, был S-антиген вируса гепатита В [2, 72, 73]. Установлено, что HBsAg, синтезируемый в растительных клетках, способен собираться в вирусоподобные частицы [74], при введении которых в организме формировались ответные иммунные реакции [75, 76]. История развития работ по созданию вакцин против ВГВ с использованием растительных систем экспрессии подробно представлена в обзоре [77].

Перспективной стратегией в области создания рекомбинантных вакцин против ВГВ является получение рекомбинантных химерных (слитых) белков, состоящих из фрагментов S, М и L вариантов HBsAg. Химерный белок, в котором preS1 из L варианта был встроен в антигенную петлю S HBsAg, сохранял способность к формированию вирусоподобных частиц и проявлял более высокую иммуногенность при иммунизации мышей по сравнению с S вариантом [78, 79]. Таким образом, высоко эффективная иммунизация препаратами растительного происхождения, включающими рекомбинантные HBsAg антигены, является толчком к развитию альтернативного источника получения простых в производстве и удобных для доставки в организм теплокровных растительных рекомбинантных вакцин.

Норовирусы. Причиной желудочно-кишечных заболеваний небактериальной природы в большинстве случаев являются норовирусы, принадлежащие к семейству *Caliciviridae*. На данный момент не существует коммерчески доступной эффективной вакцины, с помощью которой можно было бы защититься от этой вирусной инфекции, однако над созданием такой вакцины исследователи активно работают с использованием в качестве систем экспрессии клетки животных [80] и растений [81–83].

Для разработчиков вакцин наибольший интерес представляют самые распространенные

штаммы норовируса GI и GII, выявляющиеся у подавляющего числа заболевших [83]. Вирион норовируса состоит из 90 димеров основного капсидного белка VP1, способного спонтанно формировать вирусоподобные частицы. При создании рекомбинантных вакцин именно этот белок используется в качестве основного иммуногена, тогда как для усиления степени защиты от разных штаммов норовируса применяют подход включения в вирусоподобную частицу разных мономеров и формирования смеси вирусоподобных частиц (например, NoV GI.1 + GII) [83]. Такая бивалентная кандидатная вакцина, наработанная в клетках животных, в целом оказалась хорошо переносимой и иммуногенной в различных группах людей [80].

Первые попытки экспрессии VP1 норовирусов в растительных системах были связаны с появлением идеи “съедобных вакцин”. Поскольку норовирусы размножаются в клетках желудочно-кишечного тракта и сталкиваются там с мукозальной иммунной системой, при пероральном введении иммуногена ожидается формирование наиболее адекватного иммунного ответа организма. Гены капсидных белков норовирусов были экспрессированы в табаке и клубнях картофеля [81], а также в плодах томатов [82]. Эти исследования подтвердили концепцию использования трансгенных растений в качестве растительных вакцин как безопасной и дешевой системы производства и доставки для развивающихся стран. Наибольшего успеха в создании кандидатной вакцины против норовирусов в растительных системах к настоящему времени достигли D.Tuse с соавт. [83]. Эта вакцина производится в транзientной системе экспрессии *N. bentamiana* на платформе magnICON (“Icon Genetics”, Германия) и представляет собой неадьювантную, рекомбинантную двухвалентную композицию антигенов GI.4 + GII.4, формирующих вирусоподобные частицы, обозначенные как “rNV-2v”. Показано, что этот препарат не токсичен, безопасен для людей, а также способен формировать надежный иммунный ответ [84].

РЫНОК СОВРЕМЕННЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ ВАКЦИН РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Растущий в последние десятилетия спрос на фармацевтически ценные рекомбинантные белки послужил мощным стимулом для развития различных экспрессионных систем, включая системы на основе растений. Достижения последнего десятилетия в их разработке обеспечили привлекательную альтернативную платформу для получения рекомбинантных белков, в т.ч. в промышленных масштабах.

Первой одобренной растительной вакциной стала вакцина против вируса ньюкаслской болезни птиц (NDV) (“Dow Agrosiences”, США). Вакцина на 90% предотвращала заражение NDV [85] и была одобрена Министерством сельского хозяйства США в 2006 г. Компания не стала продолжать развитие своего продукта, но это событие открыло путь для коммерческого производства растительных вакцин. В настоящее время разработкой и испытанием рекомбинантных вакцин занимается ряд биотехнологических компаний. Большая часть перспективных для промышленности вакцин растительного происхождения получены в виде вирусоподобных частиц [86]. В таблице 1 приведены компании, которые в последние годы создали наиболее коммерчески перспективные кандидатные или уже одобренные вакцины растительного происхождения.

Наибольших успехов в продвижении вакцин на рынке достигла “Bioapp” (Южная Корея). Их инъекционная вакцина против чумы свиней “HERBAVAC™ CSF Green Marker” прошла все фазы клинических испытаний. Было показано, что привитые свиноматки и поросята имели высокий титр антител в течение 100 дней, а при их заражении вирусом не проявляли клинических симптомов заболевания. Эта вакцина доступна на южнокорейском рынке [89, 90].

На данный момент две вакцины ждут регистрации от национальных регуляторов. Компания “Medicago Inc.” на платформе VLPExpress™ system создала вакцину QVLP против сезонного гриппа, которая успешно прошла все фазы клинических испытаний в Канаде. В испытаниях третьей фазы участвовали 10160 человек (5077 человек получили вакцину, 5083 человек получили плацебо), на данный момент это самые широкомасштабные испытания на людях вакцин растительного происхождения. Показано, что вакцина QVLP может обеспечить существенную защиту от симптомов, вызываемых вирусами гриппа у взрослых. Также QVLP оказалась достаточно безопасной, т.к. хорошо переносилась участниками испытаний. Вакцина против чумы свиней “IBIO-400” компании “iBio Biotherapeutics” (США), созданная на платформе FastPharming® System’s, также прошла все испытания, и ждет регистрации Министерством сельского хозяйства США. Эта вакцина эффективно предотвращает заражение животных и при этом формирует мощный гуморальный ответ [88].

Пандемия COVID-19 стала вызовом для всех производителей вакцин. Биотехнологические компании, занимающиеся разработкой вакцин растительного происхождения, также отреагировали на этот вызов. В настоящее время на разных стадиях испытаний находятся 4 таких вакцины против SARS-CoV-2: кандидатная вак-

цина компании “Kentucky BioProcessing Inc.” находится на первой стадии клинических испытаний, вакцины “IBIO-201” и “IBIO-202” (“iBio Biotherapeutics”) только готовятся к первой фазе, кандидатная вакцина SARS-CoV-2 (“Medicago Inc.”) находится в третьей фазе клинических испытаний (табл. 1) [91].

Ранее так же сообщалось о том, что первые фазы клинически испытаний проходят ряд кандидатных рекомбинантных вакцин растительного происхождения [92]. Среди них, например, съедобная вакцина против гепатита В, синтези-

руемая в тканях латука [73] и клубнях картофеля [93], съедобная вакцина против холеры, накапливаемая в зернах риса [94, 95], и съедобная вакцина против бешенства в шпинате [96]. Следует отметить, что часть из вышеперечисленных работ не получила дальнейшего развития.

Консалтинговая фирма Coherent Market Insights оценивает мировой рынок вакцин на растительной основе в 43.7 млн долларов США в 2021 г. Кроме того, этой фирмой прогнозируется среднегодовой темп роста 49.9% в период 2021–2028 гг. (<https://www.globenewswire.com/>

Таблица 1. Биотехнологические компании, разрабатывающие рекомбинантные вакцины растительного происхождения

Компания	Платформа	Кандидатные вакцины/вакцины	Фаза клинических испытаний	Ссылки
“Kentucky BioProcessing Inc.”, США (https://kbio.com/)	Транзиентная экспрессия, <i>N. benthamiana</i>	Вакцина против сезонного гриппа	1	[87]
		Вакцина против SARS-CoV-2	1	
“Medicago Inc.”, Канада (https://www.medicago.com/en/)	VLPEXpress™ system Транзиентная экспрессия в <i>N. benthamiana</i>	Вакцина против пандемического гриппа	Доклинические испытания	[31, 36, 47, 48]
		Вакцина против сезонного гриппа QVLP	Регистрация	
		Вакцина против SARS-CoV-2	3	
		Вакцина против пандемического гриппа	2	
		Комбинированная вакцина против сезонного и пандемического гриппа	1	
		Вакцина против ротавируса	1	
“Icon Genetics”, Германия подразделение “Denka Co., Ltd.”, Япония (https://www.icongenetics.com/)	magnICON® Агроинфильтрация <i>N. benthamiana</i>	Вакцина против норовируса	1*	[84]
“iBio Biotherapeutics” (ранее “Caliber Biotherapeutics”), США www.ibioinc.com	FastPharming® System’s Агроинфильтрация <i>N. benthamiana</i>	Вакцина против чумы свиней “IBIO-400”	регистрация в Министерстве сельского хозяйства США	[88]
		Вакцина против SARS-CoV-2 “IBIO-201”	доклинические и токсикологические испытания завершены	
		Вакцина против SARS-CoV-2 “IBIO-202”	доклинические испытания	
“Bioapp”, Южная Корея (http://bioapp.co.kr/)	Трансгенные <i>N. benthamiana</i>	Вакцина против чумы свиней “HERBAVACTM CSF Green Marker”	одобрена для применения в Корее	[89, 90]

* – <https://www.icongenetics.com/icon-genetics-clinical-development-of-its-novel-norovirus-vaccine-reaches-milestone-of-complete-dosing-of-the-first-cohort/>

news-release/20291/06/04/2242076/0/en/Global-Plant-based-Vaccines-Market-to-Surpass-US-584-1-Million-by-2028-Says-Coherent-Market-Insights-CMI.html). Необходимо подчеркнуть, что вакцины растительного происхождения, нацеленные для профилактики вируса гриппа и коронавируса, продемонстрировали более высокую безопасность и эффективность по сравнению с традиционными [8, 36]. Разработка нановакцин — вакцин, в которых компоненты могут иметь гетерологическое происхождение и которые объединяются на одной из стадии производства, — позволит расширить и рынок растительных рекомбинантных компонентов для создания вакцин [97]. Кроме того, по разным оценкам стоимость, выходящих на рынок фармацевтических препаратов, полученных из растительных систем экспрессии, ниже, как минимум, на десятки процентов, чем полученных в других системах экспрессии [98, 99]. Таким образом, рынок рекомбинантных вакцин растительного происхождения находится в начальной точке своего развития и, по-видимому, в ближайшие годы следует ожидать появления новых компаний и препаратов на этом рынке.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Привлекательность растительных систем экспрессии для наработки рекомбинантных белков, в т.ч. антигенов, выделенных из различных типов возбудителей заболеваний, обеспечивается низкой стоимостью по сравнению с другими системами экспрессии. Растительные системы рассматриваются в настоящее время не только как биофабрики для наработки сложных биологических молекул, сконструированных с применением методов генной инженерии, но и отдельных их частей, которые могут быть соединены впоследствии в полноценную активную молекулу с применением более простых химических методов. Важным преимуществом растений в получении биологически активных рекомбинантных белковых молекул является наличие разработанных условий круглогодичного их культивирования в помещениях закрытого типа с применением искусственного освещения, а также мобильность технологий получения желаемого количества биологического материала в условиях начала пандемии. Особенно это важно при производстве достаточного количества вакцин в случае надвигающихся эпидемий, связанных с такими часто мутирующими возбудителями как вирусы гриппа или коронавирусы. Транскрипционно-трансляционная машина растений способна обеспечивать правильную сборку созданной разработчиками вакцин рекомбинантной молекулы, которая, в случае необходимости, способна собираться в вирусоподобную частицу,

обеспечивая при этом концентрацию иммуногенов на ее поверхности, предоставляемых иммунной системе. При рассмотрении особенностей конструирования рекомбинантных молекул, нацеленных на защиту человека и животных от различных инфекционных заболеваний вирусного происхождения на примере различных типов вирусов (гриппа, коронавирусов, вируса папилломы человека, вируса гепатита В и норовирусов), наше внимание было направлено на перспективность разработки и использования растительных систем экспрессии для производства рекомбинантных вакцин.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования (грант № FWNR-2022-0022).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Авторы Уварова Е.А. и Белавин П.А. внесли одинаковый вклад в эту работу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tacket C.O., Mason H.S., Losonsky G., Clements J.D., Levine M.M., Arntzen C.J. Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato // *Nat. Med.* 1998. V. 4. P. 607. <https://doi.org/10.1038/nm0598-607>
2. Mason H.S., Lam D.M., Arntzen C.J. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992. V. 89. P. 11745. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.24.1174>
3. Lai T., Yang Y., Ng S.K. Advances in mammalian cell line development technologies for recombinant protein production // *Pharmaceuticals*. 2013. V. 26. P. 579. <https://doi.org/10.3390/ph6050579>
4. Nielsen J. Production of biopharmaceutical proteins by yeast: advances through metabolic engineering // *Bioengineered*. 2013. V. 4. P. 207. <https://doi.org/10.4161/bioe.22856>
5. Tripathi N.K., Shrivastava A. Recent developments in bioprocessing of recombinant proteins: Expression hosts and process development // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2019. V. 20. P. 420. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00420>
6. Kumar M., Kumari N., Thakur N., Bhatia S.K., Saratale G.D., Ghodake G., Mistry B.M., Alavilli H., Kishor D.S., Du X., Chung S.M. A Comprehensive overview on the production of vaccines in plant-based expression systems and the scope of plant biotechnology to combat against SARS-CoV-2 virus pandemics // *Plants*. 2021. V.15. P. 1213. <https://doi.org/10.3390/plants10061213>
7. Gerszberg A., Hnatuszko-Konka K. Compendium on food crop plants as a platform for pharmaceutical

- protein production // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 17. P. 3236. <https://doi.org/10.3390/ijms23063236>
8. Hager K.J., Pérez Marc G., Gobeil P., Diaz R.S., Heizer G., Llapur C., Makarkov A.I., Vasconcellos E., Pillet S., Riera F., Saxena P., Geller Wolff P., Bhutada K., Wallace G., Aazami H., et al. CoVLP study team. Efficacy and safety of a recombinant plant-based adjuvanted Covid-19 vaccine // *N. Engl. J. Med.* 2022. V. 2. P. 2084. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2201300>
 9. Kurup V.M., Thomas J. Edible vaccines: Promises and challenges // *Mol. Biotechnol.* 2020. V. 62. P. 79. DOI: 10.1007/s12033-019-00222-1
 10. Paradia P.K., Bhavale R., Agnihotri T., Jain A. A review on edible vaccines and biopharmaceutical products from plants // *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2023. V. 24. P. 495. <https://doi.org/10.1007/s12033-019-00222-1>
 11. Sahoo A., Mandal A.K., Dwivedi K., Kumar V. A cross talk between the immunization and edible vaccine: Current challenges and future prospects // *Life Sci.* 2020. V. 15. P. 118343. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118343>
 12. Debnath N., Thakur M., Khushboo, Negi N.P., Gautam V., Kumar Yadav A., Kumar D. Insight of oral vaccines as an alternative approach to health and disease management: An innovative intuition and challenges // *Biotechnol. Bioeng.* 2022. V. 119. P. 327. <https://doi.org/10.1002/bit.27987>
 13. Singhal D., Mishra R. Edible vaccine – an effective way for immunization // *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets.* 2023. V. 23. P. 458. <https://doi.org/10.2174/1871530322666220621102818>
 14. Global vaccine action plan 2011–2020. <https://www.who.int/publications/i/item/global-vaccine-action-plan-2011-2020>
 15. Kennedy J. Should childhood vaccinations be mandatory? // *Perspect. Public Health.* 2020. V. 140. P. 23. <https://doi.org/10.1177/1757913919883303>
 16. Moyle P.M. Biotechnology approaches to produce potent, self-adjuvanting antigen-adjuvant fusion protein subunit vaccines // *Biotechnol. Adv.* 2017. V. 35. P. 375. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.03.005>
 17. Silva-Gomes S., Decout A., Nigou J. Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) // *Encyclopedia of Inflammatory Diseases*/ Eds. M. Parnham. Basel: Birkhauser, 2014. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0620-6_35-1
 18. Akira S., Uematsu S., Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity // *Cell.* 2006. V. 124. P. 783. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>
 19. Iwasaki A., Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system // *Science.* 2010. V. 15. P. 291. DOI: 10.1126/science.1183021
 20. Takeuchi O., Akira S. Pattern recognition Receptors and Inflammation // *Cell.* 2010. V. 140. P. 805. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>
 21. Liew F.Y., Xu D., Brint E.K., O'Neill L.A. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses // *Nat. Rev. Immunol.* 2005. V. 5. P. 446. DOI: 10.1038/nri1630
 22. Inohara, Chamaillard, McDonald C., Nuñez G. NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease // *Annu. Rev. Biochem.* 2005. V. 74. P. 355. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133347>
 23. Upasani V., Rodenhuis-Zybert I., Cantaert T. Antibody-independent functions of B cells during viral infections // *PLOS Pathog.* 2021. V. 22. e1009708. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009708>
 24. Rahimi R.A., Luster A.D. Chemokines: critical regulators of memory T cell development, maintenance, and function // *Adv. Immunol.* 2018. V. 138. P. 71. <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2018.02.002>
 25. Rybicki E.P. Plant molecular farming of virus-like nanoparticles as vaccines and reagents // *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 2020. V. 12. e1587. <https://doi.org/10.1002/wnan.1587>
 26. Rozov S.M., Deineko E.V. Recombinant VLP vaccines synthesized in plant expression systems: current updates and prospects // *Molecular Biology.* 2024. V. 58. P. 402. <https://doi.org/10.1134/S0026893324700043>
 27. Krammer F., Palese P. Universal influenza virus vaccines that target the conserved hemagglutinin stalk and conserved sites in the head domain // *J. Infect. Dis.* 2019. V. 8. P. 62. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy711>
 28. Sautto G. A., Kirchenbaum G. A., Ross T. M. Towards a universal influenza vaccine: Different approaches for one goal // *Virol. J.* 2018. V. 15. P. 17. <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0918-y>
 29. Soema P.C., Kompier R., Amorij J.P., Kersten G.F.A. Current and next generation influenza vaccines: Formulation and production strategies // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2015. V. 94. P. 251. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.05.023>
 30. Dunkle L.M., Izikson R., Patriarca P., Goldenthal K.L., Muse D., Callahan J., Cox M.M.J. Efficacy of recombinant influenza vaccine in adults 50 years of age or older // *N. Engl. J. Med.* 2017. V. 376. P. 2427. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1608862>
 31. Ward B.J., Makarkov A., Séguin A., Pillet S., Trépanier S., Dhaliwall J., Libman M.D., Vesikari T., Landry N. Efficacy, immunogenicity, and safety of a plant-derived, quadrivalent, virus-like particle influenza vaccine in adults (18–64 years) and older adults (≥65 years): two Multicentre, randomised phase 3 trials // *Lancet.* 2020. V. 396. P. 1491. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32014-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32014-6)
 32. D'Aoust M.A., Couture M.M., Charland N., Trépanier S., Landry N., Ors F., Vézina L.P. The production of hemagglutinin-based virus-like particles in plants: A rapid, efficient and safe response to pandemic influenza // *Plant Biotechnol. J.* 2010. V. 8. P. 607. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2009.00496.x>
 33. Blokhina E.A., Mardanov E.S., Stepanova L.A., Tsybalova L.M., Ravin N.V. Plant-produced recombinant influenza A virus candidate vaccine based on flagellin linked to conservative fragments of M2 protein and hemagglutinin // *Plants.* 2020. V. 9. P. 162. <https://doi.org/10.3390/plants9020162>

34. *Sohrab S.S., Suhail M., Kamal M.A., Husen A., Azhar E.I.* Recent development and future prospects of plant-based vaccines // *Curr. Drug Metab.* 2017. V. 18. P. 831. <https://doi.org/10.2174/1389200218666170711121810>
35. *Eidenberger L., Kogelmann B., Steinkellner H.* Plant-based biopharmaceutical engineering // *Nat. Rev. Bioeng.* 2023. V. 1. P. 426. <https://doi.org/10.1038/s44222-023-00044-6>
36. *Ward B.J., Séguin A., Couillard J., Trépanier S., Landry N.* Phase III: randomized observer-blind trial to evaluate lot-to-lot consistency of a new plant-derived quadrivalent virus like particle influenza vaccine in adults 18–49 years of age // *Lancet.* 2021. V. 396. P. 1491. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.01.004>
37. Status of COVID-19 vaccines within WHO EUL/PQ evaluation process https://extranet.who.int/prequal/sites/default/files/document_files/Status_COVID_VAX_08August2023.pdf
38. *Mamedov T., Yuksel D., Gurbuzaslan I., Gulec B., Mammadova G., Ozdarendeli A., Pavel S.T.I., Yetiskin H., Kaplan B., Uygut M.A., Hasanova G.* SARS-CoV-2 spike protein S1 subunit induces potent neutralizing responses in mice and is effective against Delta and Omicron variants // *Fron. Plant Sci.* 2023. V. 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1290042>
39. *Marian A.J.* Current state of vaccine development and targeted therapies for COVID-19: impact of basic science discoveries // *Cardiovasc. Pathol.* 2021. V. 50. P. 107278. <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2020.107278>
40. *Mathew D.S., Pandya T., Pandya H., Vaghela Y., Subbian S.* An overview of SARS-CoV-2 etiopathogenesis and recent developments in COVID-19 vaccines // *Biomolecules.* 2023. V. 24. P. 1565. <https://doi.org/10.3390/biom13111565>
41. *Chattopadhyay A., Jailani A.A.K., Mandal B.* Exigency of plant-based vaccine against COVID-19 emergence as pandemic preparedness // *Vaccines.* 2023. V. 11. P. 1347. <https://doi.org/10.3390/vaccines11081347>
42. *Abou Baker D.H., Hassan E.M., El Gengaihi S.* An overview on medicinal plants used for combating coronavirus: Current potentials and challenges // *J. Agricult. Food Res.* 2023. V. 13. P. 100632. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2023.100632>
43. *Capell T., Twyman R.M., Armario-Najera V., Ma J.K., Schillberg S., Christou P.* Potential applications of plant biotechnology against SARS-CoV-2 // *Trends Plant Sci.* 2020. V. 25. P. 635. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.04.009>
44. *Ma C., Su S., Wang J., Wei L., Du L., Jiang S.* From SARS-CoV to SARS-CoV-2: safety and broad-spectrum are important for coronavirus vaccine development // *Microbes Infect.* 2020. V. 22. P. 245. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2020.05.004>
45. *Hodgins B., Pillet S., Landry N., Ward B.J.* Prime-pull vaccination with a plant-derived virus-like particle influenza vaccine elicits a broad immune response and protects aged mice from death and frailty after challenge // *Immun. Ageing.* 2019. V. 16. P. 27. <https://doi.org/10.1186/s12979-019-0167-6>
46. *Makarkov A.I., Golizeh M., Ruiz-Lancheros E., Gopal A., Costas-Cancelas I.N., Chierzi S., Pillet S., Charland N., Landry N., Rouiller I., Wiseman P.W., Ndao M., Ward B.J.* Plant-derived virus-like particle vaccines drive cross-presentation of influenza A hemagglutinin peptides by human monocyte-derived macrophages // *NPJ Vaccines.* 2019. V. 4. P. 17. <https://doi.org/10.1038/s41541-019-0111-y>
47. *Ward B.J., Gobeil P., Séguin A., Atkins J., Boulay I., Charbonneau P.Y., Couture M., D'Aoust M.A., Dhaliwall J., Finkle C., Hager K., Mahmood A., Makarkov A., Cheng M.P., Pillet S. et al.* Phase 1 randomized trial of a plant-derived virus-like particle vaccine for COVID-19 // *Nat. Med.* 2021. V. 27. P. 1071. <https://doi.org/10.3390/life13030617>
48. *Pillet S., Couillard J., Trépanier S., Poulin J.F., Yassine-Diab B., Guy B., Ward B.J., Landry N.* Immunogenicity and safety of a quadrivalent plant-derived virus like particle influenza vaccine candidate—Two randomized Phase II clinical trials in 18 to 49 and 50 years old adults // *PLOS One.* 2019. V. 14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216533>
49. *Royal J.M., Simpson C.A., McCormick A.A., Phillips A., Hume S., Morton J., Shepherd J., Oh Y., Swope K., De Beauchamp J.L., Webby R.J., Cross R.W., Borisevich V., Geisbert T.W., Demarco J.K. et al.* Development of a SARS-CoV-2 vaccine candidate using plant-based manufacturing and a tobacco mosaic virus-like nano-particle // *Vaccines.* 2021. V. 9. P. 1347. <https://doi.org/10.3390/vaccines9111347>
50. *Van Doorslaer K., Chen Z., Bernard H.U., Chan P.K.S., DeSalle R., Dillner J., Forslund O., Haga T., McBride A.A., Villa L.L., Burk R.D.* Ictv report consortium. ICTV virus taxonomy profile: *Papillomaviridae* // *J. Gen. Virol.* 2018. V. 99. P. 989. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001105>
51. *Chabeda A., Yanez R.J.R., Lamprecht R., Meyers A.E., Rybicki E.P., Hitzeroth I.I.* Therapeutic vaccines for high-risk HPV-associated diseases // *Papillomavirus Res.* 2018. V. 5. P. 46–58. <https://doi.org/10.1016/j.pvr.2017.12.006>
52. *Kirnbauer R., Booy F., Cheng N., Lowy D.R., Schiller J.T.* Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992. V. 15. P. 12180. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.24.12180>
53. *Wong-Arce A., González-Ortega O., Rosales-Mendoza S.* Plant-made vaccines in the fight against cancer // *Trends Biotechnol.* 2017. V. 35. P. 241. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.12.002>
54. *Shanmugaraj B., Malla A., Bulaon C.J.I., Phoolcharoen W., Phoolcharoen N.* Harnessing the potential of plant expression system towards the production of vaccines for the prevention of human papillomavirus and cervical cancer // *Vaccines.* 2022. V. 10. P. 2064. <https://doi.org/10.3390/vaccines10122064>
55. *Barnabas R.V., Brown E.R., Onono M.A., Bukusi E.A., Njoroge B., Winer R.L., Galloway D.A., Pinder L.F., Donnell D., Wakhungu I., Congo O., Bi-*

- wott C., Kimanthi S., Oluoch L., Heller K.B. et al. Efficacy of single-dose HPV vaccination among young African women // *NEJM Evid.* 2022. V. 1. EVIDoa2100056.
<https://doi.org/10.1056/EVIDoa2100056>
56. Reyburn R., Tuivaga E., Ratu T., Young S., Garland S.M., Murray G., Cornall A., Tabrizi S., Nguyen C.D., Jenkins K., Tikoduadua L., Kado J., Kama M., Rafai E., Devi R. et al. A single dose of quadrivalent HPV vaccine is highly effective against HPV genotypes 16 and 18 detection in young pregnant women eight years following vaccination: a retrospective cohort study in Fiji // *Lancet Reg. Health West. Pac.* 2023. V. 14. P. 100798.
<https://doi.org/10.1016/j.lanwpc.2023.100798>
 57. Hildesheim A., Gonzalez P., Kreimer A.R., Wacholder S., Schussler J., Rodriguez A.C., Porras C., Schiffman M., Sidawy M., Schiller J.T., Lowy D.R., Herrero R. Costa Rica HPV Vaccine Trial (CVT) Group. Impact of human papillomavirus (HPV) 16 and 18 vaccination on prevalent infections and rates of cervical lesions after excisional treatment // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2016. V. 215. P. 212.
<https://doi.org/10.1016/j.ajog.2016.02.021>
 58. Hung C.F., Ma B., Monie A., Tsen S.W., Wu T.C. Therapeutic human papillomavirus vaccines: current clinical trials and future directions // *Expert Opin. Biol. Ther.* 2008. V. 8. P. 421.
<https://doi.org/10.1517/14712598.8.4.421>
 59. de Oliveira C.M., Fregnani J.H.T.G., Villa L.L. HPV vaccine: updates and highlights // *Acta Cytol.* 2019. V. 63. P. 159. <https://doi.org/10.1159/000497617>
 60. van der Burg S.H., Melief C.J. Therapeutic vaccination against human papilloma virus induced malignancies // *Curr. Opin. Immunol.* 2011. V. 23. P. 252.
<https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.12.010>
 61. Morrow MP, Yan J, Sardesai NY. Human papilloma-virus therapeutic vaccines: targeting viral antigens as immunotherapy for precancerous disease and cancer // *Expert Rev. Vaccines.* 2013. V. 12. P. 271.
<https://doi.org/10.1586/erv.13.23>
 62. Šmídková M., Holá M., Brouzdová J., Angelis K. J. Plant production of vaccine against HPV: a new perspectives // *Human Papillomavirus and Related Diseases-From Bench to Bedside-A Clinical Perspective* / Eds. D. Vanden. Broeck. InTech, 2012. P. 7.
<http://dx.doi.org/10.5772/28948>
 63. Rosales R., López-Contreras M., Rosales C., Magallanes-Molina J.R., Gonzalez-Vergara R., Arroyo-Cazarez J.M., Ricardez-Arenas A., Del Follo-Valencia A., Padilla-Arriaga S., Guerrero M.V., Pirez M.A., Arellano-Fiore C., Villarreal F. Regression of human papillomavirus intraepithelial lesions is induced by MVA E2 therapeutic vaccine // *Hum. Gene Ther.* 2014. V. 25. P. 1035.
<https://doi.org/10.1089/hum.2014.024>
 64. Rybicki E.P. Plant-based vaccines against viruses // *Virol. J.* 2014. V. 3. P. 205.
<https://doi.org/10.1186/s12985-014-0205-0>
 65. Naupu P.N., van Zyl A.R., Rybicki E.P., Hitzeroth I.I. Immunogenicity of Plant-Produced Human Papillomavirus (HPV) Virus-Like Particles (VLPs) // *Vaccines.* 2020. V. 8. P. 740.
<https://doi.org/10.3390/vaccines8040740>
 66. Muthamilselvan T., Khan M.R.I., Hwang I. Assembly of human papillomavirus 16 L1 protein in *Nicotiana benthamiana* chloroplasts into highly immunogenic virus-like particles // *J. Plant Biol.* 2023. V. 6. P. 1.
<https://doi.org/10.1007/s12374-023-09393-6>
 67. Hancock G., Blight J., Lopez-Camacho C., Kopycinski J., Pocock M., Byrne W., Price M.J., Kemlo P., Evans R.I., Bloss A., Saunders K., Kirton R., Andersson M., Hellner K., Reyes-Sandoval A. et al. A multi-genotype therapeutic human papillomavirus vaccine elicits potent T cell responses to conserved regions of early proteins // *Sci. Rep.* 2019. V. 10. P. 18713.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-55014-z>
 68. Revill P.A., Chisari F.V., Block J.M., Dandri M., Gehring A.J., Guo H., Hu J., Kramvis A., Lampertico P., Janssen H.L.A., Levrero M., Li W., Liang T.J., Lim S.G., Lu F., et al. Members of the ICE-HBV Working Groups; ICE-HBV Stakeholders Group Chairs; ICE-HBV Senior Advisors; Zoulim F. A global scientific strategy to cure hepatitis B // *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* 2019. V. 4. P. 545.
[https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(19\)30119-0](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(19)30119-0)
 69. Joung Y.H., Park S.H., Moon K.B., Jeon J.H., Cho H.S., Kim H.S. The last ten years of advancements in plant-derived recombinant vaccines against hepatitis B // *Int. J. Mol. Sci.* 2016. V. 13. P. 1715.
<https://doi.org/10.3390/ijms17101715>
 70. Brocke P., Schaefer S., Melber K., Jenzelewski V., Müller F., Dahlems U., Bartelsen O., Park K.-N., Janowicz Z.A., Gellissen G. Recombinant Hepatitis B Vaccines: Disease Characterization and Vaccine Production // *Production of Recombinant Proteins: Novel Microbial and Eukaryotic Expression Systems* / Eds. G. Gellissen Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2004. P. 319.
 71. Shouval D., Ilan Y., Adler R., Deepen R., Panet A., Even-Chen Z., Gorecki M., Gerlich W.H. Improved immunogenicity in mice of a mammalian cell-derived recombinant hepatitis B vaccine containing pre-S1 and pre-S2 antigens as compared with conventional yeast-derived vaccines // *Vaccine.* 1994. V. 12. P. 1453.
[https://doi.org/10.1016/0264-410X\(94\)90155-4](https://doi.org/10.1016/0264-410X(94)90155-4)
 72. Thanavala Y., Yang Y.F., Lyons P., Mason H.S., Arntzen C. Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995. V. 11. P. 3358.
<https://doi.org/10.1073/pnas.92.8.3358>
 73. Kapusta J., Modelska A., Figlerowicz M., Pniewski T., Letellier M., Lisowa O., Yusibov V., Koprowski H., Plucienniczak A., Legocki A.B. A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus // *FASEB J.* 1999. V. 13. P. 1796 <https://doi.org/10.1096/fasebj.13.13.1796>
 74. Bruss V. Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid // *Virus Res.* 2004. V. 106. P. 199.
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2004.08.016>

75. Mechtcheriakova I.A., Eldarov M.A., Nicholson L., Shanks M., Skryabin K.G. Lomonosoff GP. The use of viral vectors to produce hepatitis B virus core particles in plants // *J. Virol. Methods*. 2006. V. 131. P. 10. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.06.020>
76. Pumpens P., Grens E. HBV core particles as a carrier for B cell/T cell epitopes // *Intervirology*. 2001. V. 44. P. 98. <https://doi.org/10.1159/000050037>
77. Pniewski T. The twenty-year story of a plant-based vaccine against hepatitis B: stagnation or promising prospects? // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. V. 21. P. 1978. <https://doi.org/10.3390/ijms14011978>
78. Dobrica M.O., Lazar C., Paruch L., Skomedal H., Steen H., Haugslie S., Tucureanu C., Caras I., Onu A., Ciulean S., Branzan A., Clarke J.L., Stavaru C., Branza-Nichita N. A novel chimeric Hepatitis B virus S/preS1 antigen produced in mammalian and plant cells elicits stronger humoral and cellular immune response than the standard vaccine-constituent, S protein // *Antiviral Res.* 2017. V. 144. P. 256. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.06.017>
79. Pantazica A.M., Dobrica M.O., Lazar C., Scurtu C., Tucureanu C., Caras I., Ionescu I., Costache A., Onu A., Clarke J.L., Stavaru C., Branza-Nichita N. Efficient cellular and humoral immune response and production of virus-neutralizing antibodies by the Hepatitis B Virus S/preS1¹⁶⁻⁴² antigen // *Front. Immunol.* 2022. V. 22. P. 941243. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.941243>
80. Sherwood J., Mendelman P.M., Lloyd E., Liu M., Boslego J., Borkowski A., Jackson A., Faix D., US Navy study team. Efficacy of an intramuscular bivalent norovirus GI.1/GII.4 virus-like particle vaccine candidate in healthy US adults // *Vaccine*. 2020. V. 22. P. 6442. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.07.069>
81. Mason H.S., Ball J.M., Shi J.J., Jiang X., Estes M.K., Arntzen C.J. Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996. V. 28. P. 5335. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.11.5335>
82. Zhang X., Buehner N.A., Hutson A.M., Estes M.K., Mason H.S. Tomato is a highly effective vehicle for expression and oral immunization with Norwalk virus capsid protein // *Plant Biotechnol. J.* 2006. V. 4. P. 419. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2006.00191.x>
83. Tusé D., Malm M., Tamminen K., Diessner A., Thieme F., Jarczowski F., Blazevic V., Klimyuk V. Safety and immunogenicity studies in animal models support clinical development of a bivalent norovirus-like particle vaccine produced in plants // *Vaccine*. 2022. V. 11. P. 977. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.01.009>
84. Klimyuk V., Pogue G., Herz S., Butler J., Haydon H. Production of recombinant antigens and antibodies in *Nicotiana benthamiana* using 'magniffection' technology: GMP-compliant facilities for small- and large-scale manufacturing // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2014. V. 375. P. 127. https://doi.org/10.1007/82_2012_212
85. Shahid N., Daniell H. Plant-based oral vaccines against zoonotic and non-zoonotic diseases // *Plant Biotechnol. J.* 2016. V. 14. P. 2079. <https://doi.org/10.1111/pbi.12604>
86. Hadj Hassine I., Ben M'hadheb M., Almalki M.A., Gharbi J. Virus-like particles as powerful vaccination strategy against human viruses // *Rev. Med. Virol.* 2024. V. 34. P. e2498. <https://doi.org/10.1002/rmv.2498>
87. Mallajosyula V.V., Citron M., Ferrara F., Lu X., Callahan C., Heidecker G.J., Sarma S.P., Flynn J.A., Temperton N.J., Liang X., Varadarajan R. Influenza hemagglutinin stem-fragment immunogen elicits broadly neutralizing antibodies and confers heterologous protection // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2014. V. 24. P. E2514. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402766111>
88. Laughlin R.C., Madera R., Peres Y., Berquist B.R., Wang L., Buist S., Burakova Y., Palle S., Chung C.J., Rasmussen M.V., Martel E., Brake D.A., Neilan J.G., Lawhon S.D., Adams L.G. et al. Plant-made E2 glycoprotein single-dose vaccine protects pigs against classical swine fever // *Plant Biotechnol. J.* 2019. V. 17. P. 410. <https://doi.org/10.1111/pbi.12986>
89. Park Y., An D.J., Choe S., Lee Y., Park M., Park S., Gu S., Min K., Kim N.H., Lee S., Kim J.K., Kim H.Y., Sohn E.J., Hwang I. Development of recombinant protein-based vaccine against classical swine fever virus in pigs using transgenic *Nicotiana benthamiana* // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 16. P. 624. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00624>
90. Oh Y., Park Y., Choi B.H., Park S., Gu S., Park J., Kim J.K., Sohn E.J. Field application of a new CSF vaccine based on plant-produced recombinant E2 marker proteins on pigs in areas with two different control strategies // *Vaccines*. 2021. V. 21. P. 537. <https://doi.org/10.3390/vaccines9060537>
91. Shohag M.J.I., Khan F.Z., Tang L., Wei Y., He Z., Yang X. COVID-19 crisis: How can plant biotechnology help? // *Plants*. 2021. V. 12. P. 352. <https://doi.org/10.3390/plants10020352>
92. Takeyama N., Kiyono H., Yuki Y. Plant-based vaccines for animals and humans: recent advances in technology and clinical trials // *Ther. Adv. Vaccines*. 2015. V. 3. P. 139. <https://doi.org/10.1177/2051013615613272>
93. Thanavala Y., Mahoney M., Pal S., Scott A., Richter L., Natarajan N., Goodwin P., Arntzen C.J., Mason H.S. Immunogenicity in humans of an edible vaccine for hepatitis B // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005. V. 1. P. 3378. <https://doi.org/10.1073/pnas.040989910>
94. Nochi T., Takagi H., Yuki Y., Yang L., Masumura T., Mejima M., Nakanishi U., Matsumura A., Uozumi A., Hiroi T., Morita S., Tanaka K., Takaiwa F., Kiyono H. Rice-based mucosal vaccine as a global strategy for cold-chain- and needle-free vaccination // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007. V. 26. P. 10986. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703766104>
95. Yuki Y., Mejima M., Kurokawa S., Hiroiwa T., Takahashi Y., Tokuhara D., Nochi T., Katakai Y., Kuroda M., Takeyama

- N., Kashima K., Abe M., Chen Y., Nakanishi U., Masumura T. et al.* Induction of toxin-specific neutralizing immunity by molecularly uniform rice-based oral cholera toxin B subunit vaccine without plant-associated sugar modification // *Plant Biotechnol J.* 2013. V. 11. P. 799. <https://doi.org/10.1111/pbi.12071>
96. *Yusibov V., Hooper D.C., Spitsin S.V., Fleysh N., Kean R.B., Mikheeva T., Deka D., Karasev A., Cox S., Randall J., Koprowski H.* Expression in plants and immunogenicity of plant virus-based experimental rabies vaccine // *Vaccine.* 2002. V. 19 P. 3155. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00260-8](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00260-8)
97. *Lu L., Duong V.T., Shalash A.O., Skwarczynski M., Toth I.* Chemical conjugation strategies for the development of protein-based subunit nanovaccines // *Vaccines.* 2021. V. 28. P. 563. <https://doi.org/10.3390/vaccines9060563>
98. *Rybicki E.P.* Plant-produced vaccines: promise and reality // *Drug Discov. Today.* 2009. V. 14. P. 16. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2008.10.002>
99. *Eidenberger L, Kogelmann B, Steinkellner H* Plant-based biopharmaceutical engineering // *Nat. Rev. Bioeng.* 2023. V 1 P. 426. <https://doi.org/10.1038/s44222-023-00044-6>

УДК 581.1

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ КАК МЕТОДОЛОГИЧЕСКАЯ ОСНОВА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ГЕНОМИКИ РАСТЕНИЙ

© 2024 г. В. С. Фадеев^{а, *}

^аФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений
им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия
*e-mail: fadееvvs@gmail.com

Поступила в редакцию 26.06.2024 г.

После доработки 15.07.2024 г.

Принята к публикации 15.07.2024 г

Функциональная геномика изучает динамические аспекты экспрессии генов и геномов, тонкие механизмы транскрипции и трансляции, а также межбелковые взаимодействия компонентов, участников этих процессов. Генетическая инженерия включает в себя комплекс знаний и разработанных методик, позволяющих экспериментально исследовать физиологическую роль генных продуктов, что является одной из задач функциональной геномики. Комплексные исследования, связанные с изучением функционирования генома, требуют анализа большого объема данных. В данном случае используют алгоритмы биоинформатики — междисциплинарной области, объединяющей комплекс наук и компьютерных технологий. В настоящем обзоре рассмотрены комбинированные методологические приемы, используемые в современной генной инженерии по изучению физиологической роли генов на моделях стабильных трансформантов растений. Наибольшее внимание уделено инсерционному мутагенезу и РНК-интерференции, а также их применению в свете изучения тонких механизмов ключевых биологических процессов.

Ключевые слова: генетическая инженерия, инсерционный мутагенез, РНК-интерференция, функциональная геномика, эффективность трансляции

DOI: 10.31857/S0015330324050051, EDN: MMXBEC

ВВЕДЕНИЕ

Проблема структурной организации и определение функциональной значимости белкового продукта конкретного гена является центральной задачей функциональной геномики. За прошедшие полвека генетической инженерии, в начале бактериальной, а затем и растительной, достигнут прогресс принципов динамического взаимодействия в генах и геномах. Открытие РНК-интерференции, транскрипционного и пост-транскрипционного замолкания гетерологичных генов, создание библиотек инсерционных мутантов различных видов растений значительно расширили нашу парадигму знаний. Все перечисленные достижения были бы невозможны без развития мощной методо-

логической основы, включающей в себя как молекулярно-биологические методы, так и биоинформатические инструменты анализа данных.

Один из основных объектов исследования функциональной геномики — транскриптом — совокупность всех мРНК, соответствующих окружающим условиям, в которых находился организм на момент исследования. И в тоже время транскриптом — это динамически изменяемый набор мРНК, который зависит от множества факторов. Секвенирование транскриптома — современный метод получения информации об транскрипции генов в конкретных тканях организма в определенный момент времени. Анализ транскриптома осуществляется с использованием высокоточных приборов и современных платформ, таких как Illumina, Genolab M, SMARTer v4 и Nextera XT. Установление набора дифференциально экспрессируемых генов, соответствующих различным процессам (в ответ на стресс, адаптации к стрессам, этапам онтогенеза) — одна

Сокращения: TRAP — методика трансляции аффинной очистки рибосом; дцРНК — двухцепочечная РНК; миРНК — малые интерферирующие РНК; РНК-инт — РНК-интерференция.

из задач функциональной геномики. Дифференциальный анализ транскрипции генов-кандидатов может быть выполнен на различных образцах материала как от разных видов растений, так и от мутантных линий одного вида. Понимание молекулярных механизмов биологических процессов требует поиска и изучения генов, белковые продукты которых вовлечены напрямую или косвенно в реализацию сложных клеточных процессов. Методы поиска и исследования таких генов основаны на различных экспериментальных подходах. Так, достижения в развитии технологий секвенирования нового поколения, биоинформатики и синтетической биологии позволили идентифицировать и оценить изменения экспрессии многих генов [1-5].

Актуальная методологическая основа — один из залогов оптимальных и воспроизводимых экспериментов. Большой объем накопленных коллекций генотипов требует подробной аннотации каждого из них. Так, например, в исследовании [6] создали подробную карту 1135 вариаций из естественных инбредных линий с помощью секвенирования. Представленная выборка практически полностью покрывает все мировое разнообразие *Arabidopsis thaliana* и условно названа “1001 геном”. За последние 10-15 лет существенно снизилась стоимость и доступность секвенирования: как связанного с сайтами рестрикции (RAD-seq), так и полногеномного секвенирования [7, 8].

Параллельно происходит разработка удобных инструментов биоинформатического анализа данных секвенирования. В исследовании [9] представлен программный продукт SNPmatch на основе программного кода Python — инструмент для эффективной идентификации вариаций генотипов при сравнении их с определенными базами данных. Принцип действия SNPmatch реализует модель вероятной идентификации сходных генотипов с заданным набором (Single Nucleotide Polymorphism, SNP). Так, при анализе “1001 генома” определены 930 генотипов с 2000 случайных маркеров SNP. Другие 205 линий *A. thaliana* отличались менее чем на 6000 SNP, для их определения потребуется секвенирование сайтов сегрегации. Также SNPmatch может эффективно использоваться для проверки качества коллекций зародышевой плазмы. Так, при анализе качества имеющегося коллекционного семенного материала разработчиками SNPmatch было установлено, что 10% материала идентифицировано неверно. К сожалению, загрязнение проб является неизбежной проблемой при проведении крупномасштабных экспериментов. SNPmatch — это удобный и надежный инструмент для генотипирования образцов с минимальным количеством SNP. SNPmatch ограничен диплоидными видами с двуаллельными маркерами, для полиплоидных

видов необходима адаптация изменением модели правдоподобия в алгоритме программы. Для работы с *A. thaliana* SNPmatch реализован веб-инструмент AraGeno [9].

В последнее время было разработано множество вычислительных программ, которые способствуют идентификации растущего числа предсказанных кластеров генов растений, тем самым ускоряя открытие путей биосинтеза растительных натуральных продуктов и создание синтетических кластеров гетерологичных хозяев [10, 11]. К таким инструментам относятся plantiSMASH, PhytoClust, PlantClusterFinder и MIBiG [12-14].

Тем не менее, верификация физиологической роли генов требует дополнительных экспериментальных подходов. Многочисленные исследования убедительно продемонстрировали эффективность стратегии получения модельных трансгенных растений для характеристики функций генов, по-разному представленных в разных тканях и в разных исследуемых процессах. Физиолого-биохимическая оценка количественного и качественного состава клеточных компонентов трансгенных растений, экспрессирующих целевой ген, не только позволяет идентифицировать соединения, участвующие в тех или иных процессах жизнедеятельности растений, но также изучить их взаимодействие. На рис. 1 представлены основные задачи функциональной геномики растений.

ОСНОВНЫЕ ПОДХОДЫ К ПОЛУЧЕНИЮ СТАБИЛЬНЫХ ТРАНСФОРМАНТОВ РАСТЕНИЙ

В настоящее время для ядерной трансформации растений исследователи в основном используют: а) агробактериальную трансформацию; б) биобаллистическую трансформацию; в) трансформацию протопластов. В обзоре кратко рассмотрим два первых метода, как наиболее распространенные в генетической инженерии растений.

Агробактериальная трансформация — способ переноса гетерологичного генетического материала с помощью векторов, созданных на базе грамотрицательных почвенных бактерий (*Agrobacterium tumefaciens* и *A. rhizogenes*), в основном в клетки двудольных растений. Впервые на практике методика применена в 1979 г. под руководством Marton [15]. В 1983 г. под руководством Schell впервые осуществлена трансформация растений с модифицированной Ti-плазмидой (от англ., “tumor inducing” — вызывающая опухоль), что послужило стимулом для множества исследований [16]. Прогресс в создании векторов был достигнут после установления эффективной работы системы в транс-положении, когда



Рис. 1. Задачи функциональной геномики растений.

переносимые гены расположены на небольшой (5-10 т.п.н.) плазмиде, реплицирующейся как в агробактерии, так и в *Escherichia coli*, в *vir*-области Ti-плазмиды с делегированной T-ДНК. Эта система, получившая название “бинарная”, открыла новые возможности для переноса генетического материала в геном растений и получения широкого спектра трансгенных растений.

Многочисленные исследования последних лет позволили получить высокоэффективные штаммы *Agrobacterium*, создать новые экспрессионные векторы и разработать протоколы трансформации для различных видов растений [17–19].

Доставка ДНК в клетки растений, плохо поддающихся агробактериальной трансформации, может быть осуществлена путем физического проникновения через стенку растительной клетки с помощью баллистического метода.

Методика биобаллистической (biolistic) трансформации тканей разработана Klein и Sanford в 1987 году [20]. Общий принцип данного метода трансформации состоит в бомбардировке ткани-мишени металлическими микрочастицами-носителями ДНК в вакуумной камере. Этим способом получены трансгенные растения, относящиеся к различным семействам растительного царства.

Биологическая баллистика с целью получения трансгенных растений имеет ряд особенностей и условий, оптимизация которых крайне

важна. Факторы, влияющие на эффективность биологической баллистики, можно разделить на три группы: физические, химические и биологические. Также, важным фактором является состояние клеточной популяции в момент воздействия – соотношение клеток в стадии синтеза ДНК и деления [21, 22]. На рис. 2 приведена общая схема получения трансгенных растений с заданными свойствами, а также создание библиотек инсерционных мутантов.

РНК-интерференция. До понимания сути процесса РНК-интерференция определялась как посттранскрипционный сайленсинг гена. Fire и Mello в 1998 г. провели комплексное исследование по изучению РНК-интерференции у нематоды *Caenorhabditis elegans* [23], а в 2006 г. стали лауреатами Нобелевской премии.

РНК-интерференция (РНК-инт) – важный регуляторный механизм врожденного иммунитета эукариот и адаптации генетического аппарата в ответ на абиотические и биотические стрессы. Понимание РНК-инт позволило исследователям получить представление о функции генов, устойчивости к вредителям и многих физиологических процессах в растениях. Механизм РНК-инт определяет способность двухцепочечной РНК (дцРНК) индуцировать специфичный для конкретной последовательности мРНК процесс системного молчания.

Общий принцип РНК-инт состоит в следующем: инициируется дцРНК, которая преоб-

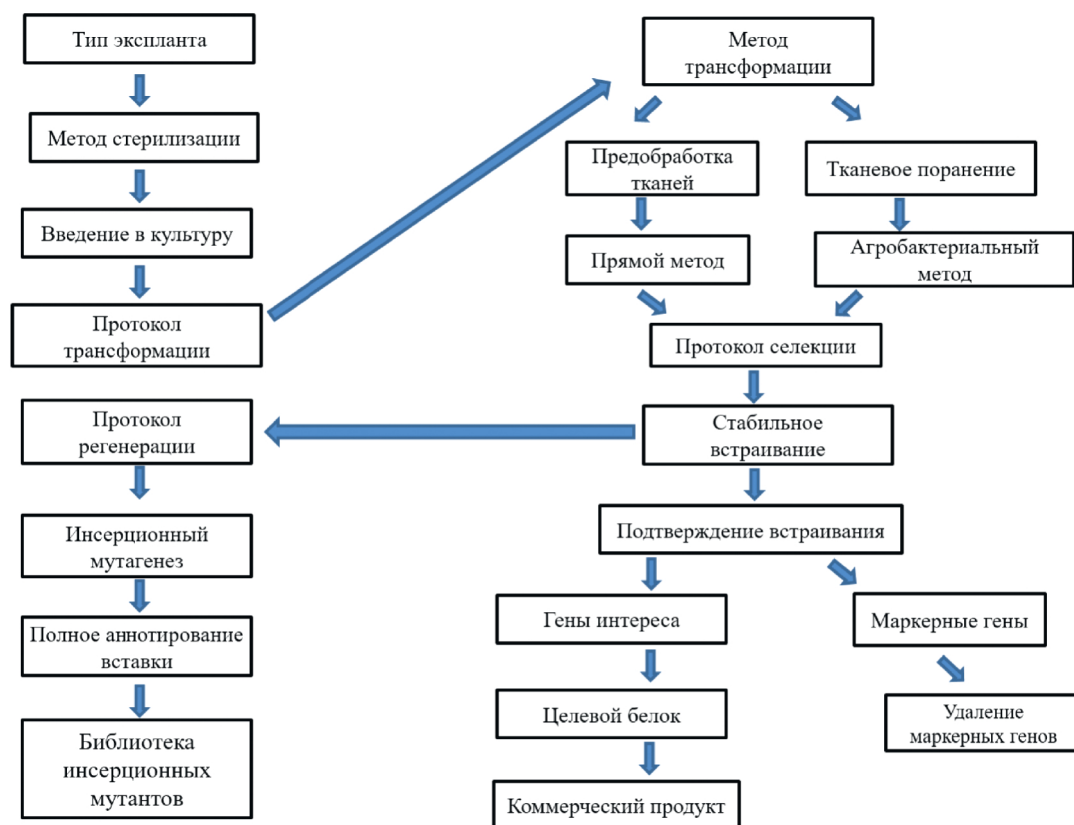


Рис. 2. Схема получения трансгенных растений с заданными свойствами, а также создания библиотек инсерционных мутантов.

разуется в дуплексы малых интерферирующих РНК (миРНК) длиной от 21 до 24 нуклеотидов с помощью фермента РНКазы III из семейства Dicer-подобных белков (DCL). Дуплексы миРНК встраиваются в РНК-индуцированный комплекс замолкания (RNA-induced silencing complex, RISC), который содержит РНКазы-подобный фермент Argonaute (AGO); одна из цепей дуплекса миРНК специфически направляет деградацию последовательности комплементарной РНК или репрессирует трансляцию мРНК. В случае заражения растений, в зависимости от типа вируса, образуются различные типы дцРНК, которые специфически подавляют вирусные транскрипты. Для преодоления, сформированного таким образом иммунитета вирусы используют супрессоры подавления РНК (virus suppressor RNA, VSR). VSR часто выполняют сразу несколько функций в вирусе: белок оболочки, протеаза, вспомогательный вирусный компонент. Принципы их работы различны: связывание дуплексов дцРНК или миРНК, предотвращение встраивания дуплексов в комплекс RISC и другие [24, 25].

Система РНК-инт не полностью “выключает” экспрессию гена, ее действие называется “нокдаун гена” [26, 27]. В отличие от полной деактивации гена, нокаут гена может происходить

в случае инсерционного мутагенеза (принцип инсерционного мутагенеза будет рассмотрен ниже).

Для создания библиотек специфических миРНК, а также прогнозирования их эффективности для нокдауна генов, применяют искусственные нейронные сети [28, 29].

Библиотеки на основе интерферирующих РНК для масштабных скрининговых исследований также могут быть созданы на основе лентивирусных векторов [30].

Установлено, что растения могут распространять миРНК, входящие в систему РНК-инт, с помощью плазмодесм. Плазмодесмы могут динамически изменять свой размер и селективность, обеспечивая прохождение крупных молекул [31].

В контексте изучения сельскохозяйственных культур РНК-инт стала мощным инструментом для понимания функций генов, который доказал свою эффективность в расшифровке роли генов, связанных с устойчивостью к стрессам и участвующих в различных метаболических путях. Для идентификации белков, участвующих в перемещении сигналов замолкания, разработаны методики генетического скрининга. Так, в исследовании Smith [32] определение распространения системного замолкания проводили

с помощью создания трансгенных растений с прямой и инвертированной последовательностью гена *PHYTOENE DESATURASE (PDS)* в качестве источника замолкания (антисмысловой РНК). Ген *PDS* экспрессировался в мезофильных клетках флоэмы под контролем тканеспецифичного промотора гена *SUC2*. Определено, что в механизме передачи сигналов замолкания участвуют РНК-зависимая РНК-полимераза 2 (*RDR2*) и субъединица РНК-полимеразы IVa (*NRPD1a*). Фенотип полученных трансгенных растений был подвержен хлорозу различной степени, что определялось замолканием гена. В ходе исследования был идентифицирован белок, содержащий домен *SNF2 (CLASSY1)*, который действует вместе с *RDR2* и *NRPD1a* в распространении замолкания, а также участвует в производстве эндогенных 24-нуклеотидных мРНК. Проявление хлорозисного фенотипа замолкания у трансгенных линий *A. thaliana* под контролем флоэмно-специфического промотора в разной степени наблюдалось вокруг жилок листа. Гены, соответствующие мутантным фенотипам, были картированы и идентифицированы [32].

Следует упомянуть еще об одном механизме замолкания за счет метилирования промоторов, когда наследование обеспечивается в результате деления и дочерним клеткам достается измененный паттерн метилирования. В данном обзоре не будет рассматриваться данный вид замолкания, он подробно описан в обзоре Melnyk [33].

Ниже приведено несколько наглядных примеров применения РНК-инт для изучения физиологической роли генов у разных видов растений.

Ханфу (Hanfu) – элитный сорт яблони *Malus domestica*, выведенный в Shenyang Agricultural University (Shenyang, China), был успешно модифицирован с помощью применения РНК-инт [34]. Был использован ген *MdGA20-ox* (GenBank accession numbers EB128368, EB132114, AB037114, EB126424, EB127719), кодирующий GA20-оксидазу – ключевой фермент, участвующий в биосинтезе гиббереллиновой кислоты (ГК). Часть последовательности гена длиной 466 п.н. в прямом и обратном положении интегрировали в конструкцию для агробактериальной трансформации. Через 20 недель развития в теплице трансгенные растения уступали дикому типу в размере на 20–45% и имели больше междоузлий. Экспрессия *MdGA20-ox* в трансгенных растениях была ниже в 20 раз, а содержание активной ГК было в два раза меньше, чем в контрольных растениях дикого типа. На основе полученных данных определили, что ген *MdGA20-ox* играет важную функциональную роль в вегетативном росте растения. Таким образом, с использованием РНК-инт для подавле-

ния гена *MdGA20-ox* возможно создание карликовых разновидностей яблонь сорта Ханфу [34].

В другом исследовании с помощью РНК-инт установлено, что ген *SICAND1* (*Solyc01g103010.3.1*) томата (*Solanum lycopersicum*) участвует в регуляции процессов развития, прорастания семян, цветения, а также функционально определяет рост растения и развитие корневой системы [35]. Белок *CAND1* играет важную роль в реактивации Cullin-RING E3 ligases-зависимой убиквитиновой протеасомной системы, которая определяет деградацию белков, контролирующей широкий спектр онтогенетических и физиологических процессов эукариот. С помощью агробактериальной трансформации получены растения томата сорта MicroTom со специфическим фрагментом (437 п.н.) гена *SICAND1*. Эффективность замолкания мРНК гена *SICAND1* определяли с помощью количественного метода ПЦР с обратной транскрипцией (qRT-PCR).

С применением экзогенных фитогормонов гиббереллина и ауксина возможно частично поддерживать некоторые фенотипы с подавленным РНК-инт геном *SICAND1*. Уровни экспрессии генов, связанных с гиббереллином/ауксином, были существенно изменены в трансгенных линиях *SICAND1-RNAi*. Проведенное исследование открывает новый взгляд на возможные функциональные роли гена *CAND1* в растениях и подтверждает гипотезу, что ген *CAND1* убиквитиновой протеасомной системы имеет важное функциональное значение для вегетативного роста растений [35].

Гексаплоидная пшеница *Triticum aestivum* имеет большой геном (16000 Мб), состоящий из трех близкородственных (до 80% гомологии) гомеологичных геномов (A, B и D) [36].

Благодаря гексаплоидной природе генома, мягкая пшеница имеет три копии большинства генов. Следовательно, существует высокая степень функциональной избыточности генов *T. aestivum*, что необходимо учесть в случае экспериментов по генетической инженерии. Для разработки технологии РНК-инт пшеницы необходимо подробно охарактеризовать молекулярный принцип замолкания гомеологичных генов, а также наследование РНК-инт индуцированных фенотипов.

С применением биобаллистики в исследовании Travella с соавт. [37] получены трансгенные растения пшеницы, содержащие ген фитоендесатуразы (*PDS*) и ген *EIN2* с различной степенью проявления РНК-инт. Уровни эндогенной целевой мРНК всех трех гомеологичных генов в различных геномах пшеницы были снижены в трансгенных линиях вследствие РНК-инт, следовательно, продукция мРНК, как и предполагалось, зависит от дозировки гена и пloidности

генома [37]. Опосредованное РНК-инт замолкание обоих генов привело к сокращению до 93% количества транскриптов для гена *PDS* у 78% полученных трансформантов пшеницы. Для гена *EIN2*, который кодирует трансмембранный белок сигнального пути этилена, количество транскриптов сокращалось до 99% для 33% полученных трансгенных линий *EIN2-RNAi*. Следовательно, дцРНК, соответствующие двум генам, вызывают сильные и специфичные реакции генетической интерференции.

Фитоендесатураза (*PDS*) — фермент пути биосинтеза каротиноидов, снижение экспрессии которого приводит к ингибированию биосинтеза каротиноидов и последующему фотообесцвечиванию фенотипа вследствие фотоокисления хлорофилла [38].

Экспрессия *wPDS* и *wEIN2* стабильно наблюдалась в течение двух исследованных поколений. Трансгенные линии растений с геном *PDS-RNAi* в гомозиготном состоянии были нежизнеспособны [37].

В заключение раздела нужно отметить, что технология РНК-инт в основном применяется к белок-кодирующим генам, которые являются лишь частью всего разнообразия функциональных элементов генома.

Инсерционный мутагенез. Исследования РНК-инт и инсерционного мутагенеза существенно расширяют понимание функциональных основ взаимодействия генетических структур растительных клеток, а также являются методологическими подходами исследования функции отдельных генов и их сочетаний. При этом в качестве инсерций используют экзогенные Т-ДНК агробактериальных плазмид или векторы для баллистической трансформации. Баллистическая и агробактериальная трансформация являются методами доставки генетических конструкций в ядро растительной клетки. Фрагменты ДНК попадают в открытые петли хроматина и встраиваются в ДНК хозяина по механизму негомологичной рекомбинации [39, 40].

Наличие расшифрованной полной нуклеотидной последовательности генома позволяет использовать принципы прямой и обратной генетики. В случае интеграции фрагментов в районе интронов или экзонов часто происходит инактивация гена, что приводит к формированию инсерционного мутанта с соответствующим фенотипом. Для растений *A. thaliana* и *Oryza sativa* созданы обширные библиотеки инсерционных мутантов, насчитывающих десятки тысяч линий Т-ДНК, что существенно ускорило исследование функций генов с помощью обратной генетики. Однако размеры геномов *A. thaliana* и *O. sativa* отличаются в 4 раза, тогда как общее количество генов в гаплоидном состоянии у этих двух растений приблизительно одинаковое; следовательно,

эффективность использования инсерционного мутагенеза для *O. sativa* ниже [41–45].

Однако, важное экономическое и сельскохозяйственное значение риса определило обширность исследований полученных библиотек растений. Анализ инсерционных мутантов Т-ДНК риса позволил идентифицировать множество генов, участвующих в различных метаболических путях. Например, установлено, что активное поглощение марганца рисом *O. sativa* опосредовано белком *Nramp* (Natural Resistance-Associated Macrophage Protein), который локализован в плазматической мембране клеток экзодермы и эндодермы корня. Мутация *OsNRAMP5* локализована в гене основного переносчика марганца (Mn) и кадмия (Cd) в растениях риса, характеризуется низкой урожайностью при недостатке Mn в почве. Содержание Mn и Cd в органах мутантных растений при этом было значительно ниже, чем в растениях дикого типа [46]. При исследовании двух мутантов *O. sativa* по гену *JMJ706* автор Sun в 2008 г. установил, что белки, содержащие домен Jumonji C (*jmjC*), участвуют в предотвращении ди- и триметилирования лизина 9 гистона H3 (*H3K9*) [47]. Анализ инсерционных изменений выявил, что нокаут гена *JMJ706* активирует метилирование гистона H3K9, что в свою очередь влияет на морфологию цветков риса и развитие колоса. Таким образом, определено, что ген *JMJ706* риса кодирует связанную с гетерохроматином деметилазу H3K9, участвующую в регуляции развития цветков [47].

На основе анализа энхансеров и супрессоров мутантных растений *A. thaliana* были определены механизмы регуляции многих метаболических путей. Мутантный фенотип подавляется в присутствии экстрагенного супрессора; деактивация или удаление супрессора может восстановить мутантный фенотип. Однако бывают и другие варианты эпигенетической деактивации супрессора, определяющего мутантный фенотип: например, в работе Gao и Zhao 2013 г. было определено, что фенотип инсерционного мутанта Т-ДНК частично подавляется встройкой другой Т-ДНК в другом локусе хромосомы [48]. В исследовании провели скрещивание двух инсерционных мутантов *A. thaliana yuc1-1* и *ag-TD*. В поколении F_2 область Т-ДНК *ag-TD* была деактивирована в *ag-TD**, что нарушает правила менделевской генетики. Функционально активная область Т-ДНК *ag-TD* определяла устойчивость к канамицину, а фенотип *ag-TD** был чувствителен к антибиотику. Оба скрещиваемых мутанта имели встройки в интронной области гена; по-видимому, конформационные изменения структуры ДНК при скрещивании мутантов определяются транс-взаимодействием вставок Т-ДНК и деактивируют участок ДНК *ag-TD*.

При этом деактивация *ag-TD** закрепляется в геноме и наследуется в ряду поколений [48].

Определение функции генов и их роли в метаболических сетях является одной из основных задач трансгенеза и функциональной геномики растений. В работе Xin с соавт. [49] изучали влияние экспрессии генов, кодирующих биосинтез антоцианидинредуктазы (*ANR*) и лейкоантоцианидинредуктазы (*LAR*), участвующих в образовании проантоцианидина (катехин и эпикатехин), на устойчивость растений шелковицы *Morus nigra* к грибному заражению *B. cinerea*. Флавоноиды — вторичные метаболиты растений, проявляющие металлохелатирующую активность и сдерживающие рост бактерий, при окислении до хинонов проявляют также сильную антибиотическую активность. Биосинтез проантоцианидина определен для некоторых растений *A. thaliana*, *Vitis vinifera*, *Populus trichocarpa* [50–52].

Гены *ANR* и *LAR* шелковицы *M. nigra* были функционально охарактеризованы с помощью эктопической экспрессии в растениях табака *N. tabacum*. Экстракты листьев трансгенного табака подавляли рост грибных гиф *B. cinerea in vitro*, в то время как экстракты контрольных нетрансгенных растений табака не проявляли такого действия. В ходе эксперимента определено, что высокий уровень экспрессии генов шелковицы *MnANR* и *MnLAR* ингибировал экспрессию гомологов *N. tabacum NtANR* и *NtLAR* в трансгенном табаке; предположительно это определяется механизмом замолкания РНК [49]. При высоком уровне экспрессии *MnANR* или *MnLAR* цветки трансгенного табака накапливали достоверно больше катехинов и эпикатехинов, по сравнению с растениями дикого типа [49]. Подобный эффект РНК-инт обнаружен при сверхэкспрессии дополнительно введенного гена халконсинтазы с целью синтеза розового и фиолетового пигментов околоцветника петунии *Petunia nymphaeiflora*. В результате РНК-инт и подавления экспрессии гена гомолога петунии пигментация околоцветников вместо темной стала более светлой, и даже белой [53].

В растительных геномах выявлено множество дублирующих генов в сравнении с другими эукариотами. Часть из них функционально дивергированы; некоторые дублированные гены сохраняют избыточные функции по сравнению с паралогами. В случае дивергированных генов нокаут одного не может быть компенсирован копией другой гена. Функционально о расхождении дублей генов можно судить на основе фенотипов нокаутных мутантов [54, 55].

Чтобы узнать степень дивергенции исследователи сравнили белковые последовательности и сравнили экспрессию изучаемых генов [56]. Takeda с соавт. [57] исследовали две

дублированные пары генов, одну из которых определили как сильно дивергированную, вторую слабо дивергированную, и, соответственно, слабо отличающуюся от своего паралога. Проверку гипотезы проводили с помощью модельных трансгенных растений, в которых один ген из пары был нокаутирован. Исследование проводили на тандемно дублированной паре (AT3G26270, AT3G26280) дивергированных и паре (AT1G18970, AT1G18980) слабо различающихся генов. Оба гена каждой пары имели идентичность более 90% в нуклеотидной и белковой последовательности. Фенотипические изменения функционально определялись в разнице длины гипокотили и размера корня на стадии проростков (до 14 дней) между трансгенными растениями и растениями дикого типа. Как и предполагалось, в сильно дивергированных копиях нокаут гена приводил к существенным фенотипическим изменениям по причине большего функционального различия генов. Однако двойной нокаут в слабо дивергированных копиях проявлялся так же, как и одиночный нокаут для сильно дивергированных копий гена. Функционально гены с высокой дивергентностью определяют специфические реакции к стрессам. Установлено, что данные гены не консервативны [57]. Дубликаты генов с низкой дивергентностью обычно участвуют в основных метаболических путях и высоко консервативны для многих видов растений [56].

Для подтверждения фенотипических изменений был проведен комплексный анализ транскриптома. Число выявленных дифференциально экспрессирующихся генов не отличалось между парами — значит, функциональная компенсация для слабо диверсифицированных генов встречается не чаще, чем для высоко диверсифицированных пар генов. Высказано предположение, что разница в экспрессионном статусе между сильно и слабо дивергентными парами генов определяется эффектом дозы гена [56]. Гены, связанные с “повседневными” функциями в основных метаболических путях, имеют тенденцию высокой экспрессии и большой дозировки генов и, по-видимому, однократный нокаут не оказывает влияния на их функциональность [58].

Следует отметить, что для создания коллекций инсерционных мутантов желательно иметь не только последовательность полного генома, но также и воспроизводимую методику создания трансгенных растений. Так, например, первые сообщения исследования генома огурца (*Cucumis sativus*) появились в 2009 году [59]. Молекулярное картирование, клонирование генов и характеристика локусов количественных признаков (QTL) огурца проведена совсем недавно [60–65], что и определяет небольшое количество полученных

Т-ДНК мутантов и их исследований [66]. Для создания Т-ДНК инсерционных мутантов с помощью агробактериального или биобаллистического метода требуется ведение культуры клеток и тканей растения, что является длительным процессом. Нахождение в культуре клеток растений может привести к соматической изменчивости под воздействием фитогормонов и других факторов среды. Так, для растений риса (*O. sativa*) выявлена высокая частота соматических мутаций, менее 5% наблюдаемых фенотипических изменений на самом деле определяются встройкой Т-ДНК. Оставшаяся часть изменений – это соматическая изменчивость [67].

Следует отметить, что первоначально технология генетической инженерии растений использовалась для решения практических задач, связанных с получением растений с ценными признаками. Согласно современным экспериментальным данным, эта технология позволила получить уникальные экспериментальные модели для изучения физиологической роли генов и ключевых механизмов жизнедеятельности растительных организмов. Одним из этапов понимания функционирования генов и их регуляторных элементов стали комплексные сложные исследования, затрагивающие изучение влияния продуктов гетерологичных генов на дифференциальную активацию генетического аппарата. Так, в исследовании Ну с соавт. [68] по оценке устойчивости к засолению и засухоустойчивости трансгенных растений сои (*Glycine max*), экспрессирующих ген *GmCOL1a*, выявлены два потенциальных гена-мишени. Параллельно в работе исследовали мутантный генотип сои со-9 с выключенным геном *GmCOL1a* с помощью методики CRISPR/Cas9. Сам ген CONSTANS-подобный (*COL*) впервые охарактеризован в растении *A. thaliana* [69]. Белок COL содержит два гомологичных домена: В-box (домен цинковых пальцев) [69] и домен белка циркадных часов CCT - circadian clock protein (CO, CO-like и TOC1), определенный как ДНК-связывающийся транскрипционный фактор. Продукт гена *GmCOL1a* непосредственно связывается с *Myb(bHLH)* мотивом CACGTG и *Che* мотивом GGATTCTC в промоторах генов *GmLEA* и *GmP5CS*, соответственно, для активации экспрессии мРНК. Гены *LEA* активны на этапе позднего эмбриогенеза, белки участвуют в механизмах стрессоустойчивости растений [70]. Определено, что в растениях *A. thaliana* ген *P5CS*, кодирующий $\Delta 1$ -пирролин-5-карбоксилат синтазу, активируется в условиях засухи, засоления или наличия АБК [71]. Ранее было установлено, что образующийся $\Delta 1$ -пирролин-5-карбоксилат (P5C) восстанавливается ферментом $\Delta 1$ -пирролин-5-карбоксилат редуктазой (P5CR) до пролина [72]. Трансфор-

манты табака (*N. tabacum*), экспрессирующие ген *P5CS* из фасоли мотыльковой (*Vigna acnifolia*) под контролем конститутивного CaMV 35S промотора, значительно увеличивали уровень пролина, что позволило сохранить осмотический потенциал растений при засухе [73]. В результате работы установлено, что супрессор *GmCOL1a* участвует в регуляции стрессовых реакций в растениях сои. Трансгенные растения сои 35S:*GmCOL1a* за счет увеличения поглощения воды обладали повышенной устойчивостью к засолению и засухе. Растения накапливали Na^+ в корневой системе, а в листьях и стебле соотношение Na^+/K^+ оставалось относительно низким. Высокое содержание пролина способствовало деактивации АФК и поддержанию стабильного статуса растений в условиях стресса. Растения дикого типа и деактивированные *co-9* мутанты были чувствительны к воздействию засухи и засоления. Таким образом, функционально определен статус белка *GmCOL1a* как положительного регулятора при конститутивном синтезе, способного поддерживать устойчивость растений к соли и засухе [68].

Трансгенные растения в изучении процесса эффективности трансляции. Экспрессия генов динамична и строго регулируется на нескольких уровнях, включая транскрипционную, посттранскрипционную и трансляционную регуляцию. Разработка новых методов полногеномного анализа дифференциальной трансляции необходима для решения задач функциональной геномики растений.

Методы изучения трансляции включают профилирование полисом, профилирование полноразмерных транслирующих мРНК (RNC-seq), профилирование рибосом (Ribo-seq), а также протеомные подходы, которые подробно описаны в обзоре [74].

В 2005 г. в лаборатории Bailey-Serres приступили к разработке новой методики трансляции аффинной очистки рибосом (TRAP) [75]. В основе TRAP лежит использование трансгенных линий растений, экспрессирующих меченый эпитопом вариант рибосомального белка L18 (RPL18). Как правило, используют эпитоп FLAG в N-концевой области [76, 77]. После лизиса клеток полисомы стабилизируют, чтобы блокировать трансляцию. Транскрипты, связанные с рибосомами, несущими меченый RPL18, избирательно очищают с помощью абсорбции на агарозе с анти-FLAG-M2.

Методика TRAP широко применяется для исследования транслятомоов органов или определенных типов клеток различных видов растений: *A. thaliana* [78, 79] *S. lycopersicum* [80], *Medicago truncatula* [81], *G. max* [82] и *O. sativa* [83]. Преимуществом TRAP по сравнению с традиционными полисомным профилирова-

нием является возможность экспрессии *RPL18* с использованием различных тканеспецифичных промоторов. С помощью TRAP можно эффективно определить профиль активно транслируемых РНК в различных растительных клетках: эпидермис, кора или эндодерма; клетки флоэмы, меристематические клетки мезофилла листа; микроспоры и пыльца [84]. Метод TRAP фиксирует результаты предшествующей регуляции трансляции и показывает состав белков клетки на момент анализа. Так, использование промоторов *APETALA1*, *APETALA3* и *AGAMOUS* для экспрессии FLAG-RPL18 позволило открыть новые уровни контроля развития цветков, связанные с дифференциальной трансляцией [85]. При экспрессии эпитопа *RPL18* под контролем промотора *ProLAT52* идентифицированы транскрипты, регулирующие поздние стадии опыления цветковых растений [83].

В исследовании Liu с соавт. [86] для изучения регуляции трансляции термочувствительных линий с мужской стерильностью (thermo-sensitive genic male sterile) TGMS риса *O. sativa* объединили стратегию TRAP с секвенированием РНК, чтобы сравнить транслатом и транскриптом метелок риса на полногеномном уровне. В работе использовали две линии трансгенных растений, экспрессирующих FLAG-меченный *RPL18* под контролем специфичного промотора для зародышевой линии *MEL1* [86]. Многие днРНК действуют как предшественники мРНК, которые регулируют мужскую стерильность риса [87]. В результате работы идентифицированы пять днРНК в репродуктивной ткани трансгенной линии риса ZhulS, которые соответствуют РНК-инт последовательностям, опубликованным в общедоступных базах данных. Возможно, что специфичные для ZhulS днРНК могут играть регуляторную роль в мужской стерильности. Более того, ассоциированные с рибосомами днРНК, идентифицированные в исследовании, являются потенциальными новыми риборегуляторами. Результаты исследования открывают новый взгляд на экспрессию генов, специфичных для определенного типа клеток, в термочувствительных линиях с генной мужской стерильностью TGMS риса *O. sativa* [86].

В другом исследовании метод TRAP применяется для изучения развития боковых корней растений *A. thaliana*, что очень важно для их адаптации к различным стрессовым условиям [88]. Установлено, что эндодерма корня активно способствует пролиферации перидикла, из которого развивается ткань боковых корней; однако генетический механизм этого явления не изучен. Для стимуляции развития латеральных корней в эксперименте применяли экзогенный гормональный триггер — ауксин (1-нафталинуксусная кислота, NAA), ко-

торый запускал начальную фазу формирования бокового корня. У *A. thaliana* боковые корни формируются из ткани перидикла полюса ксилемы (xylem pole pericycle, XPP), который расположен рядом с сосудами ксилемы. Предварительно были созданы трансгенные растения *A. thaliana*, экспрессирующие репортерный ген *GFP*. Первоначально планировалось использовать убиквитиновый промотор *UBQ10*, однако в трансгенных растениях обнаружилось снижение сигнала флюоресценции во внешних слоях ткани корня, тогда как центральная часть ткани корня демонстрировала эффективную экспрессию *GFP*. В результате для создания растений использовали две конструкции: *pELTP::GFP-RPL18* под контролем специфичного для эндодермы промотора EMBRYO LIPID TRANSFER PROTEIN, и *pXPP::GFP-RPL18* под контролем перидикл-специфичного промотора. Также в исследовании стандартный подход с использованием набора Illumina TruSeq был отклонен (требуется от 100 нг исходного материала), как нечувствительный для построения библиотек достаточного качества. Были выбраны для использования методики со сверхнизкими затратами РНК: SMARTer v4 и Nextera XT. Высококачественные результаты секвенирования были получены при использовании 1.5 нг исходного материала. С комплектом SMARTer допускается использование 200 пг, также есть возможность оптимизации.

В ходе анализа полученных данных выявлена характерная корреляция экспрессии двух пар генов: *GPAT5* и *HORST*; *PHO1* и *SKOR*. Гены *GPAT5* (глицерин-3-фосфат-2-О-ацилтрансфераза) и *HORST* (гидроксилаза корневой пробковой ткани) связаны с биосинтезом суберина — это пробковый компонент клеточной стенки ряда сосудистых растений. Экспрессия генов *GPAT5* и *HORST* присутствуют во всех образцах эндодермы, при этом они не активны в тканях перидикла XPP. Напротив, гены, экспрессируемые перидиклом, — *PHO1* (фосфат 1) и *SKOR* (калиевый разгибатель центральной части корня) — практически не активны в эндодерме. Определено, что в зонах экспрессии генов *PHO1* и *SKOR* присутствуют множественные участки перидикла XPP, в которых происходит формирование боковых корней *A. thaliana*.

Таким образом, с помощью методики TRAP и экспрессии *RPL18* с использованием различных тканеспецифичных промоторов определена и функционально охарактеризована связь пар генов *PHO1* и *SKOR*; *GPAT5* и *HORST* и их роль в развитии боковых корней растений арабидопсиса. При этом точность метода позволила определить фактическую “территориальную” тканевую принадлежность экспрессии каждого гена в корневой системе *A. thaliana* [88].

Главным преимуществом протокола TRAP является отсутствие дорогостоящего специального оборудования. Наиболее затратными этапами являются подготовка библиотеки и последующее секвенирование. При этом следует подчеркнуть ограничения: технология TRAP захватывает лишь часть клеточных РНК; также невозможно определить посттрансляционные модификации РНК. Определено, что методика TRAP применима в комбинации со многими промоторами различных тканей растений, однако не все маркеры регуляторных элементов охарактеризованы. На данный момент ведется активный поиск элементов, управляющих тканеспецифичной и время-специфичной регуляцией транскрипции и трансляции. Например, выявлены так называемые “пассажные” специализированные клетки в эндодерме корня, которые покрывают зрелые клетки эндодермы. Последующий анализ с использованием репортерных генов, возможно, поможет идентифицировать маркерные гены и регуляторные элементы, характерные пассажным клеткам растений [89].

Таким образом, за последние 30 лет базы данных, соответствующие генетическим последовательностям геномов различных видов растений, многократно возросли. Биоинформатические технологии стали эффективным и мощным средством исследования широкого спектра биологических систем. Крупномасштабные исследования биологического разнообразия, эволюционного развития, а также определения функциональной значимости, требуют совершенствования существующих программных комплексов сравнительного анализа молекулярных последовательностей для обнаружения функциональных и адаптивных различий в генах и геномах.

Генетическая инженерия позволила добиться быстрого прогресса в исследовании растений, однако эффективность методов трансформации многих видов все еще низка. Аннотация геномов растений расширяет наше понимание функционирования генетического аппарата и дает возможность использовать сочетание методик трансформации и системы редактирования генома CRISPR/Cas9 в заданной точке.

Геномное редактирование — один из мощных прогрессивных инструментов, однако его эффективное использование требует знаний о конкретном виде, к которому применима методика: например, ограничено применение для растений, у которых отсутствуют геномные данные или они слабо аннотированы.

Применение методов секвенирования нового поколения выводит развитие биологии на совершенно новый уровень. Современные исследования направлены на установление функционирования отдельных органов или даже

определения регуляции организма на клеточном уровне [90–93].

Определение принципов активации транскрипции и трансляции в процессе онтогенеза растений, дифференциальной транскрипционной активности в ответ на стрессовые воздействия и в нормальных условиях — важнейшие задачи функциональной геномики, решение которых существенно расширит наше понимание работы генетического аппарата.

Комплексное понимание взаимодействий геномов разных компартментов растительных клеток, макромолекулярных белок-белковых докинг взаимодействий в ферментативных комплексах и на мембранах, ДНК-белковых взаимодействий при транскрипции и РНК-белковых при трансляции существенно расширит наше понимание основных биологических процессов в тканях растений. Все перечисленное со временем будет установлено исследователями с помощью развивающихся современных методов функциональной геномики. Полученные знания позволят решить множество проблем, встающих перед человечеством в XXI веке.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 122042700043-9).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang Z., Gerstein M., Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics // *Nat. Rev. Genet. J.* 2009. V. 1. P. 5763. <https://doi.org/10.1038/nrg2484>
2. Anders S., Huber W. Differential expression analysis for sequence count data // *BioMed Central J.* 2010. V. 11: R106. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-10-r106>
3. Quail M.A., Smith M., Coupland P., Otto T.D., Harris S.R., Connor T.R., Bertoni A., Swerdlow H.P., Gu Y. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of ion torrent, pacific biosciences and illumina MiSeq sequencers // *BMC Genom.* 2012. V.13. № 341. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-341>
4. Stander E.A., Sepulveda L.J., Duge de Bernonville T., Carqueijeiro I., Koudounas K., Lemos Cruz P., Besseau S., Lanoue A., Papon N., Giglioli-Guivarch N., Dirks R., O'Connor S.E., Atehortua L., Oudin A., Courdavault V. Identifying genes involved in alkaloid biosynthesis in *Vinca minor* through transcriptomic and gene co-expression analysis // *Biomolecules.* 2020. V. 10: 1595. <https://doi.org/10.3390/biom10121595>
5. Medema M.H., Osbourn A. Computational genomic identification and functional reconstitu-

- tion of plant natural product biosynthetic pathways // *Nat. Prod. Rep.* 2016. V. 33. P. 951. <https://doi.org/10.1039/c6np00035e>
6. *Alonso-Blanco C., Andrade J., Becker C., Bemm F., Bergelson J., Borgwardt K.M., Cao J., Chae E., Dezaan T.M., Ding W., Ecker J.R., Exposito-Alonso M., Farlow A., Fitz J., Gan X. et al.* The 1001 Genomes Consortium. 1,135 genomes reveal the global pattern of polymorphism in *Arabidopsis thaliana* // *Cell*. 2016. V. 166. P. 481. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.063>
 7. *Baird N.A., Etter P.D., Atwood T.S., Currey M.C., Shiver A.L., Lewis Z.A., Selker E.U., Cresko W.A., Johnson E.A.* Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers // *PLoS ONE*. 2008. V. 3: e3376. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003376>
 8. *Rowan B.A., Patel V., Weigel D., Schneeberger K.* Rapid and inexpensive whole-genome genotyping-by-sequencing for crossover localization and fine-scale genetic mapping // *G3: Genes, Genomes, Genetics*. 2015. V. 5. P. 385. <https://doi.org/10.1534/g3.114.016501>
 9. *Pisupati R., Reichardt I., Seren Ü., Korte P., Nizhynska V., Kerdaffrec E., Uzunova K., Rabanal F.A., Filiault D.L., Nordborg M.* Verification of *Arabidopsis* stock collections using SNPmatch, a tool for genotyping high-plexed samples // *Nature*. 2017. V. 19: 170184. <https://doi.org/10.1038/sdata.2017.184>
 10. *Chavali A.K., Rhee S.Y.* Bioinformatics tools for the identification of gene clusters that biosynthesize specialized metabolites // *Brief. Bioinform.* 2018. V. 19. P. 1022. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx020>
 11. *Medema M.H., Kottmann R., Yilmaz P., Cummings M., Biggins J.B., Blin K., de Bruijn I., Chooi Y.H., Claesen J., Coates R.C., Cruz-Morales P., Duddela S., Dusterhus S., Edwards D.J., Fewer D.P. et al.* Minimum information about a biosynthetic gene cluster // *Nat. Chem. Biol.* 2015. V. 11. P. 625. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1890>
 12. *Kautsar S.A., Duran H.G.S., Blin K., Osbourn A., Medema M.H.* PlantSMASH: automated identification, annotation and expression analysis of plant biosynthetic gene clusters // *Nucleic Acids Res.* 2017. V. 45. P. 55. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx305>
 13. *Schlapfer P., Zhang P., Wang C., Kim T., Banf M., Chae L., Dreher K., Chavali A.K., Nilo-Poyanco R., Bernard T., Kahn D., Rheal S.Y.* Genome-wide prediction of metabolic enzymes, pathways, and gene clusters in plants // *Plant Physiol.* 2017. V. 173. P. 2041. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01942>
 14. *Topfer N., Fuchs L. M., Aharoni A.* The PhytoClust tool for metabolic gene clusters discovery in plant genomes // *Nucleic Acids Res.* 2017. V. 45. P. 7049. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx404>
 15. *Marton L., Wullems G. J., Molendijk L., Schilperoort R. A.* *In vitro* transformation of cultured cells from *Nicotiana tabacum* by *Agrobacterium tumefaciens* // *Nature*. 1979. V. 277. P. 129. <https://doi.org/10.1038/277129a0>
 16. *Herrera-Estrella L., Depicker A., Van Montagu M., Schell J.* Expression of chimeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector // *Nature*. 1983. V. 303. P. 209. <https://doi.org/10.1038/303209a0>. S2CID 4330119
 17. *Azria D., Bhalla P.L.* *Agrobacterium* mediated transformation of Australian rice varieties and promoter analysis of major pollen allergen gene Orysl // *Plant Cell Rep.* 2011. V. 30. P. 1673. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1076-0>
 18. *Liu H., Xie X., Sun S., Zhu W., Ji J., Wang G.* Optimization of *Agrobacterium* mediated transformation of sunflower *Helianthus annuus* L. immature embryos // *AJCS*. 2011. V. 5. P. 1616.
 19. *Ziemienowicz A., Shim Y.S., Matsuoka A., Eudes F., Kovalchuk I.* A novel method of transgene delivery into triticale plants using the *Agrobacterium* T-DNA derived nanocomplex // *ASPB*. 2012. P. 111. <https://doi.org/10.1104/pp.111.192856>
 20. *Klein T.M., Wolf B.D., Wu R., Sanford J.C.* High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells // *Nature*. 1987. V. 327. P. 70.
 21. *Fadeev V.S., Blinkova O.V., Gaponenko A.K.* Optimization of biological and physical parameters for biolistic genetic transformation of common wheat (*Triticum aestivum* L.) using a particle inflow gun // *Russ. J. Genet.* 2006. V. 42. P. 402.
 22. *Fadeev V.S., Shimshilashvili Kh.R., Gaponenko A.K.* Induction, regeneration, and biolistic sensitivity of different genotypes of common wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Russ. J. Genet.* 2008. V. 44. P. 1257.
 23. *Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* // *Nature*. 1998. V. 391. P. 806. <https://doi.org/10.1038/35888>
 24. *Jackson A.L., Bartz S.R., Schelter J., Kobayashi S.V., Burchard J., Mao M., Li B., Cavet G., Linsley P.S.* Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi // *Nat. Biotechnol.* 2003. V. 21. P. 635. <https://doi.org/10.1038/nbt831>
 25. *Birmingham A., Anderson E.M., Reynolds A., Ilsley-Tyree D., Leake D., Fedorov Y., Baskerville S., Maksimova E., Robinson K., Karpilow J., Marshall W.S., Khvorova A.* 3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets // *Nat. Methods*. 2006. V. 3. P. 199. <https://doi.org/10.1038/nmeth854>
 26. *Huesken D., Lange J., Mickanin C., Weiler J., Asselbergs F., Warner J., Meloan B., Engel S., Rosenberg A., Cohen D., Labow M., Reinhardt M., Natt F., Hall J.* Design of a genome-wide siRNA library using an artificial neural network // *Nat. Biotechnol.* 2005. V. 23. P. 995. <https://doi.org/10.1038/nbt1118>
 27. *Ge G., Wong G., Luo B.* Prediction of siRNA knockdown efficiency using artificial neural network models // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005. V. 336. P. 723. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.147>

28. Moffat J., Grueneberg D.A., Yang X., Kim S.Y., Kloefer A.M., Hinkle G., Piqani B., Eisenhaure T.M., Luo B., Grenier J.K., Carpenter A.E., Foo S.Y., Stewart S.A., Stockwell B.R., Hacohen N. et al. A lentiviral RNAi library for human and mouse genes applied to an arrayed viral high-content screen // *Cell*. 2006. V. 124. P. 1283.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.040>
29. Waterhouse P.M., Wang M.B., Lough T. Gene silencing as an adaptive defense against viruses // *Nature*. 2001. V. 411. P. 834.
<https://doi.org/10.1038/35081168>
30. Voinnet O., Baulcombe D.C. Systemic signaling in gene silencing // *Nature*. 1997. V. 389. P. 553.
<https://doi.org/10.1038/39215>
31. Imlau A., Truernit E., Sauer N. Cell-to-cell and long distance trafficking of the green fluorescent protein in the phloem and symplastic unloading of the protein into sink tissues // *Plant Cell*. 1999. V. 11. P. 309.
<https://doi.org/10.1105/tpc.11.3.309>
32. Smith L.M., Pontes O., Searle L., Yelina N., Yousafzai F.K., Herr A.J., Pikaard C.S., Baulcombe D.C. An SNF2 protein associated with nuclear RNA silencing and the spread of a silencing signal between cells in *Arabidopsis* // *Plant Cell*. 2007. V. 19. P. 1507.
<https://doi.org/10.1105/tpc.107.051540>
33. Melnyk C.W., Molnar A., Baulcombe D.C. Intercellular and systemic movement of RNA silencing signals // *EMBO J*. 2011. V. 30. P. 3553.
<https://doi.org/10.1038/emboj.2011.274>
34. Zhao K., Zhang F., Yang Y., Ma Y., Liu Y., Li H., Zhang Z. Modification of plant height via RNAi suppression of MdGA20-ox gene expression in apple // *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 2016. V. 141. P. 242.
<https://doi.org/10.21273/JASHS.141.3.242>
35. Wenjing C., Shuangqin Y., Yun T., Hu M., Yongzhong W., Yingwu Y. SICAND1, encoding cullin-associated Nedd8-dissociated protein 1, regulates plant height, flowering time, seed germination, and root architecture in tomato // *Plant Mol. Biol.* 2020. V. 102. P. 537.
<https://doi.org/10.1007/s11103-020-00963-7>
36. Flavell R.B., Bennett M.D., Smith J.B., Smith D.B. Genome size and proportion of repeated nucleotide sequence DNA in plants // *Biochem. Genet.* 1974. V. 12. P. 257.
<https://doi.org/10.1007/BF00485947>
37. Travella S., Klimm T., Keller B. RNA interference-based gene silencing as an efficient tool for functional genomics in hexaploid bread wheat // *Plant Physiol.* 2006. V. 142. P. 6.
<https://doi.org/10.1104/pp.106.084517>
38. Bartley G.E., Scolnik P.A. Plant carotenoids: pigments for photo-protection, visual attraction, and human health // *Plant Cell*. 1995. V. 7. P. 1027.
<https://doi.org/10.1105/tpc.7.7.1027>
39. Shimatani Z., Nishizawa-Yokoi A., Endo M., Toki S., Terada R. Positive-negative-selection-mediated gene targeting in rice // *Front. Plant Sci.* 2015. V. 5. P. 748.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00748>
40. Nester E.W. *Agrobacterium*: nature's genetic engineer // *Front. Plant Sci.* 2015. V. 5. P. 730.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00730>
41. Jeon J.S., Lee S., Jung K.H., Jun S.H., Jeong D.H., Lee J., Kim C., Jang S., Lee S., Yang K. T-DNA insertion mutagenesis for functional genomics in rice // *Plant J.* 2000. V. 22. P. 561.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00767.x>
42. Sallaud C., Meynard D., Boxtel J., Gay C., Bes M., Brizard J.P., Larmande P., Ortega D., Raynal M., Portefaix M., Ouwerkerk P.B.F., Rueb S., Delseny M., Guiderdoni E. Highly efficient production and characterization of T-DNA plants for rice (*Oryza sativa* L.) functional genomics // *Theor. Appl. Genet.* 2003. V. 106. P. 1396.
<https://doi.org/10.1007/s00122-002-1184-x>
43. Sallaud C., Gay C., Larmande P., Bès M., Piffanelli P., Piégu B., Droc G., Regad F., Bourgeois E., Meynard D. High throughput T-DNA insertion mutagenesis in rice: a first step towards *in silico* reverse genetics // *Plant J.* 2004. V. 39. P. 450.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02145.x>
44. O'Malley R.C., Barragan C.C., Ecker J.R. A user's guide to the Arabidopsis T-DNA insertion mutant collections // *Methods Mol. Biol.* 2015. V. 1284. P. 323.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2444-8_16
45. Pucker B., Kleinbölting N., Weisshaar B. Large scale genomic rearrangements in selected *Arabidopsis thaliana* T-DNA lines are caused by T-DNA insertion mutagenesis // *BMC Genom.* 2021. V. 22. P. 599.
<https://doi.org/10.1186/s12864-021-07877-8>
46. Sasaki A., Yamaji N., Yokosho K., Ma J.F. Nramp5 Is a major transporter responsible for manganese and cadmium uptake in rice // *Plant Cell*. 2012. V. 24. P. 2155.
<https://doi.org/10.1105/tpc.112.096925>
47. Sun Q., Zhou D.X. Rice jmjC domain-containing gene JM1706 encodes H3K9 demethylase required for floral organ development // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105. P. 13679.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0805901105>
48. Gao Y., Zhao Y. Epigenetic suppression of T-DNA insertion mutants in Arabidopsis // *Mol. Plant*. 2013. V. 6. P. 539. <https://doi.org/10.1093/mp/sss093>
49. Xin Y., Meng S., Ma B., He W., He N. Mulberry genes MnANR and MnLAR confer transgenic plants with resistance to *Botrytis cinerea* // *Plant Sci.* 2020. V. 296: 110473. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110473>
50. Nesi N., Jond C., Debeaujon I., Caboche M., Lepiniec L. The *Arabidopsis* TT2 gene encodes an R2R3 MYB domain protein that acts as a key determinant for proanthocyanidin accumulation in developing seed // *Plant Cell*. 2001. V. 13. P. 2099.
<https://doi.org/10.1105/tpc.010098>
51. Zhu Y., Peng Q.Z., Li K.G., Xie D.Y. Molecular cloning and functional characterization of the anthocyanidin reductase gene from *Vitis bellula* // *Planta*. 2014. V. 240. P. 381.
<https://doi.org/10.1007/s00425-014-2094-2>

52. Wang L., Jiang Y., Yuan L., Lu W., Yang L., Karim A., Luo K. Isolation and characterization of cDNAs encoding leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase from *Populus trichocarpa* // PLoS One. 2013. V. 8: e64664. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064664>
53. Baulcombe D. RNA silencing in plants // Nature. 2004. V. 431. P. 356. <https://doi.org/10.1038/nature02874>
54. Hanada K., Kuromori T., Myouga F., Toyoda T., Li W.H., Shinozaki K. Evolutionary persistence of functional compensation by duplicate genes in Arabidopsis // Genome Biol. Evol. 2009. V. 1. P. 409. <https://doi.org/10.1093/gbe/evp043>
55. Hanada K., Sawada Y., Kuromori T., Klausnitzer R., Saito K., Toyoda T., Shinozaki K., Li W.H., Hirai M.Y. Functional compensation of primary and secondary metabolites by duplicate genes in *Arabidopsis thaliana* // Mol. Biol. Evol. 2011. V. 28. P. 377. <https://doi.org/10.1093/molbev/msq204>
56. Ezoe A., Shirai K., Hanada K. Degree of functional divergence in duplicates is associated with distinct roles in plant evolution // Mol. Biol. Evol. 2021. V. 38. P. 1447. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa302>
57. Takeda T., Ezoe A., Hanada K. Expression profiles in knock-down transgenic plants of high and low diversified duplicate genes in *Arabidopsis thaliana* // Genes Genet. Syst. 2023. V. 98. P. 283. <https://doi.org/10.1266/ggs.23-00019>
58. Gout J.F., Kahn D., Duret L., & Paramecium Post-Genomics Consortium. The relationship among gene expression, the evolution of gene dosage, and the rate of protein evolution // PLoS Genet. 2010. V. 6: e1000944. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000944>
59. Huang S., Li R., Zhang Z., Li L., Gu X., Fan W., Lucas W.J., Wang X., Xie B., Ni P., Ren Y., Zhu H., Li J., Lin K., Jin W. et al. The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. // Nat. Genet. 2009. V. 41. P. 1275. <https://doi.org/10.1038/ng.475>
60. Chai L., Fan H.F., Liu C., Du C.X. Progress of transgenic cucumber mediated by *Agrobacterium tumefaciens* // Trends Hortic. 2020. V. 3. P. 93. <https://doi.org/10.24294/th.v3i1.1791>
61. Pan Y., Wang Y., McGregor C., Liu S., Luan F., Gao M., Weng Y. Genetic architecture of fruit size and shape variation in cucurbits: a comparative perspective // Theor. Appl. Genet. 2020. V. 133. P. 1. <https://doi.org/10.1007/s00122-019-03481-3>
62. Pan Y., Wen C., Han Y., Wang Y., Li Y., Li S., Cheng X., Weng Y. QTL for horticulturally important traits associated with pleiotropic andromonoecy and carpel number loci, and a paracentric inversion in cucumber // Theor. Appl. Genet. 2020. V. 133. P. 2271. <https://doi.org/10.1007/s00122-020-03596-y>
63. Wang Y., Bo K., Gu X., Pan J., Li Y., Chen J., Wen C., Ren Z., Ren H., Chen X. Molecularly tagged genes and quantitative trait loci in cucumber with recommendations for QTL nomenclature // Hortic. Res. 2020. V. 7: 3. <https://doi.org/10.1038/s41438-019-0226-3>
64. Gebretsadik K., Qiu X., Dong S., Miao H., Bo K. Molecular research progress and improvement approach of fruit quality traits in cucumber // Theor. Appl. Genet. 2021. V. 134. P. 3535. <https://doi.org/10.1007/s00122-021-03895-y>
65. Ma L., Wang Q., Zheng Y., Guo J., Yuan S., Fu A., Bai C., Zhao X., Zheng S., Wen C. Cucurbitaceae genome evolution, gene function, and molecular breeding // Hortic. Res. 2022. V. 9: uhab057. <https://doi.org/10.1093/hr/uhab057>
66. Feng L.L., Wang X.Y., Xia L., Wang T.T., Li J., Chen J.F. Construction and rapid identification of cucumber T-DNA insertion mutants using GFP gene // J. Nucl. Agric. Sci. 2021. V. 35 P. 1540. <https://doi.org/10.11869/j.issn.100-8551.2021.07.1540>
67. Miyao A., Nakagome M., Ohnuma T., Yamagata H., Kanamori H., Katayose Y., Takahashi A., Matsumoto T., Hirochika H. Molecular spectrum of somaclonal variation in regenerated rice revealed by whole-genome sequencing // Plant Cell Physiol. 2012. V. 53. P. 256. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr172>
68. Hu C.A., Delauney A.J., Verma D.P. A bifunctional enzyme (Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. V. 89. P. 9354. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.19.9354>
69. Dahal P., Kwon E., Pathak D., Kim D.Y. Crystal structure of a tandem B-box domain from Arabidopsis CONSTANS // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2022. V. 599. P. 38. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.02.025>
70. Aziz M.A., Sabeem M., Mullath S.K., Brini F., Mas-moudi K. Plant group II LEA proteins: intrinsically disordered structure for multiple functions in response to environmental stresses // Biomolecules. 2021. V. 11. P. 1662. <https://doi.org/10.3390/biom11111662>
71. Liu J., Shen J., Xu Y., Li X., Xiao J., Xiong L. Gh2, A CONSTANS-like gene, confers drought sensitivity through regulation of senescence in rice // J. Exp. Bot. 2016. V. 67. P. 5785. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw344>
72. Kishor P., Hong Z., Miao G.H., Hu C., Verma D. Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants // Plant Physiol. 1995. V. 108. P. 1387. <https://doi.org/10.1104/pp.108.4.1387>
73. Xu C., Shan J., Liu T., Wang Q., Ji Y., Zhang Y., Wang M., Xia N., Zhao L. CONSTANS-LIKE 1a positively regulates salt and drought tolerance in soybean // Plant Physiol. 2023. V. 191. P. 2427. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac573p>
74. Zhao J., Qin B., Nikolay R., Spahn C.M.T., Zhang G. Translatomics: the global view of translation // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. P. 212. <https://doi.org/10.3390/ijms20010212>
75. Zanetti M.E., Chang I.F., Gong F., Galbraith D.W., Bailey-Serres J. Immunopurification of polyribosom-

- al complexes of Arabidopsis for global analysis of gene expression // *Plant Physiol.* 2005. V. 138. P. 624. <https://doi.org/10.1104/pp.105.059477>
76. *Mustroph A., Juntawong P., Bailey-Serres J.* Isolation of plant polysomal mRNA by differential centrifugation and ribosome immunopurification methods // *Methods Mol. Biol.* 2009. V. 553. P. 109. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-563-7_6
 77. *Mustroph A., Zanetti M.E., Girke T., Bailey-Serres J.* Isolation and analysis of mRNAs from specific cell types of plants by ribosome immunopurification // *Methods Mol. Biol.* 2013. V. 959. P. 277. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-221-6_19
 78. *Lin S.Y., Chen P.W., Chuang M.H., Juntawong P., Bailey-Serres J., Jauh G.Y.* Profiling of translomes of in vivo-grown pollen tubes reveals genes with roles in micropylar guidance during pollination in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* 2014. V. 26. P. 602. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.121335>
 79. *Tian C.H., Zhang X.N., He J., Yu H.P., Wang Y., Shi B.H., Han Y.Y., Wang G.X., Feng X.M., Zhang C., Wang J., Qi J., Yu R., Jiao Y.* An organ boundary-enriched gene regulatory network uncovers regulatory hierarchies underlying axillary meristem initiation // *Mol. Syst. Biol.* 2014. V. 10. P. 755. <https://doi.org/10.15252/msb.20145470>
 80. *Ron M., Kajala K., Pauluzzi G., Wang D., Reynoso M.A., Zumstein K., Garcha J., Winte S., Masson H., Inagaki S., Garcha J., Winte S., Federici F., Sinha N., Deal R.B., et al.* Hairy root transformation using *Agrobacterium rhizogenes* as a tool for exploring cell type-specific gene expression and function using tomato as a model // *Plant Physiol.* 2014. V. 166. P. 455. <https://doi.org/10.1104/pp.114.239392>
 81. *Reynoso M.A., Blanco F.A., Bailey-Serres J., Crespi M., Zanetti M.E.* Selective recruitment of mRNAs and miRNAs to polyribosomes in response to rhizobia infection in *Medicago truncatula* // *Plant J.* V. 73. 2013. P. 289. <https://doi.org/10.1111/tpj.12033>
 82. *Castro-Guerrero N.A., Cui Y.Y., Mendoza-Cozatl D.G.* Purification of translating ribosomes and associated mRNAs from soybean (*Glycine max*) // *Curr. Protoc. Plant Biol.* 2016. V. 1. P. 185. <https://doi.org/10.1002/cppb.20011>
 83. *Zhao D.Y., Hamilton J.P., Hardigan M., Yin D.M., He T., Vaillancourt B., Reynoso M., Pauluzzi G., Funkhouser S., Cui Y.H., Bailey-Serres J., Jiang J., Buell C.R., Jiang N.* Analysis of ribosome-associated mRNAs in rice reveals the importance of transcript size and GC content in translation // *G3: Genes, Genomes, Genetics.* 2017. V. 7. P. 203. <https://doi.org/10.1534/g3.116.036020>
 84. *Jiao Y., Meyerowitz E.M.* Cell-type specific analysis of translating RNAs in developing flowers reveals new levels of control // *Mol. Syst. Biol.* 2010. V. 6. P. 419. <https://doi.org/10.1038/msb.2010.76>
 85. *Lin S.Y., Chen P.W., Chuang M.H., Juntawong P., Bailey-Serres J., Jauh G.Y.* Profiling of translomes of in vivo-grown pollen tubes reveals genes with roles in micropylar guidance during pollination in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* 2014. V. 26. P. 602. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.121335>
 86. *Liu W., Sun J., Li J., Liu C., Si F., Yan B., Wang Z., Song X., Yang Y., Zhu Y., Cao X.* Reproductive tissue-specific translome of a rice thermo-sensitive genic male sterile line // *J. Genet. Genomics.* 2022. V. 49. P. 624. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2022.01.002>
 87. *Ding J.H., Lu Q., Ouyang Y.D., Mao H.L., Zhang P.B., Yao J.L., Xu C.G., Li X.H., Xiao J.H., Zhang Q.F.* A long noncoding RNA regulates photoperiod-sensitive male sterility, an essential component of hybrid rice // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. P. 2654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1121374109>
 88. *Thellmann M., Andersen T.G., Vermeer J.E.* Translating ribosome affinity purification (TRAP) to investigate *Arabidopsis thaliana* root development at a cell type-specific scale // *J. Vis. Exp.* 2020. V. 159: e60919 <https://doi.org/10.3791/60919>
 89. *Andersen T.G., Naseer S., Ursache R., Wybouw B., Smet W., De Rybel B., Vermeer J.E. M., Geldne N.* Diffusible repression of cytokinin signalling produces endodermal symmetry and passage cells // *Nature.* 2018. V. 555. P. 529. <https://doi.org/10.1038/nature25976>
 90. *Van Verk M.C., Hickman R., Corne M.J., Pieterse M., Van Wees S.C.* RNA-Seq: revelation of the messengers // *Trends Plant Sci.* 2013. V. 18. P. 175. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.02.001>
 91. *Libault M., Pingault L., Zogli P., Schiefelbein J.* Plant systems biology at the single-cell level // *Trends Plant Sci.* 2017. V. 22. P. 949. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.08.006>
 92. *Mustroph A., Zanetti M.E., Jang C.J.H., Holtan H.E., Repetti P.P., Galbraith D.W., Girke T., Bailey-Serres J.* Profiling translomes of discrete cell populations resolves altered cellular priorities during hypoxia in *Arabidopsis* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. P. 18843. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906131106>
 93. *Karve R., Iyer-Pascuzzi A.S.* Digging deeper: high-resolution genome-scale data yields new insights into root biology // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2015. V. 24. P. 24. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.01.007>

УДК 581.1;577.19

СВЕРХЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *AtOPR3* В ПШЕНИЦЕ СТИМУЛИРУЕТ ОБРАЗОВАНИЕ ЛЕТУЧИХ МЕТАБОЛИТОВ ГИДРОПЕРОКСИДЛИАЗНОЙ ВЕТВИ БИОСИНТЕЗА ОКСИЛИПИНОВ

© 2024 г. В. И. Дегтярёва^{а,б}, Д. Н. Мирошниченко^{а,б}, А. В. Пиголев^а, Е. А. Дегтярёв^а,
Е. М. Тебина^а, П. С. Стрельцова^{а,в}, С. В. Долгов^б, Т. В. Савченко^{а,*}

^аИнститут фундаментальных проблем биологии, Федеральный исследовательский центр
“Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук”, Пушкино, Россия

^бФилиал Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Пушкино, Россия

^вФедеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
“Тульский государственный университет”, Тула, Россия

*e-mail: savchenko_t@rambler.ru

Поступила в редакцию 06. 03. 2024 г.

После доработки 18. 04. 2024 г.

Принята к публикации 19. 04. 2024 г.

Алленоксидсинтазная (AOS) и гидропероксидлиазная (HPL) ветви пути биосинтеза оксипинов ведут к образованию разных продуктов из одного субстрата — 13-гидроперокси-(9,11,15)-октадекатриеновой кислоты (13-ГПОТ). До сих пор остается неизвестным, как у растений регулируется распределение 13-ГПОТ субстрата между этими ветвями, как метаболиты каждой ветви влияют на активность параллельной ветви. В данной работе была исследована активность HPL ветви в листьях мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Саратовская-60, а также полученных на ее основе трансгенных растений со сверхэкспрессией гена биосинтеза жасмонатов из *Arabidopsis thaliana* *AtOPR3* (12-ОХОФУТОДИЕНОАТ РЕДУКТАЗА 3). В ходе исследований выявлено высокое содержание метаболитов HPL ветви в листьях, что свидетельствует о высокой активности HPL пути биосинтеза оксипинов у пшеницы. Показано, что сверхэкспрессия гена *AtOPR3* приводит к повышению содержания метаболитов HPL ветви в листьях, в первую очередь *цис*-3-гексенала, а также к изменению профиля летучих соединений HPL ветви, выделяемых поврежденными растениями. После механического повреждения листа трансгенной пшеницы со сверхэкспрессией *AtOPR3* выделяют больше *цис*-3-гексенала и *цис*-3-гексенил ацетата, но меньше *транс*-2-гексенала в сравнении с не-трансгенными растениями. Изменения содержания метаболитов HPL ветви в листовых тканях и в смеси выделяемых летучих соединений проявляются ярче в трансгенных линиях с более высоким уровнем экспрессии *AtOPR3*. Таким образом, впервые показано, что генетическая модификация AOS ветви биосинтеза оксипинов приводит к изменению активности HPL ветви в растениях пшеницы.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*, гидропероксидлиаза, жасмонаты, пшеница, 12-оксофитодиеноатредуктаза.

DOI: 10.31857/S0015330324050063, EDN: MMWLYH

ВВЕДЕНИЕ

При механических повреждениях или атаках насекомых растения выделяют смесь летучих со-

единений, и важным компонентом этой смеси являются метаболиты, образующиеся в гидропероксидлиазной (HPL) ветви пути биосинтеза оксипинов [1]. Известны несколько десятков выделяемых растениями летучих органических соединений, а сам процесс выделения летучих соединений имеет глобальное экологическое значение, так как их суммарное количество, выделяемое растениями планеты в год, измеряет-

Сокращения: ЖАК — жасмоновая кислота, OPR — 12-оксофитодиеноатредуктаза, AOS — алленоксидсинтаза, HPL — гидропероксидлиаза, 13-ГПОТ — 13-гидроперокси-(9,11,15)-октадекатриеновая кислота.

ся в тераграммах углерода [2]. Единого мнения по поводу биологических функций метаболитов HPL ветви до сих пор нет. Показано, что активность HPL ветви при повреждении клеток помогает избавиться от образовавшихся токсичных гидропероксидов жирных кислот [3]. Также предполагается, что летучие альдегиды, спирты и их производные обеспечивают не прямые защитные ответы, опосредуя взаимодействие растений с другими организмами, в том числе с другими растениями [4, 5]. Отдельные исследования показывают, что эти соединения могут выполнять защитные функции, проявляя антимикробные и антигрибковые свойства [6, 7]. Современные данные свидетельствуют о защитной роли метаболитов HPL ветви при абиотических стрессах, в частности, в условиях низких температур и засухи [8–11].

В алленоксидсинтазной (AOS) ветви пути биосинтеза оксипинов, параллельной HPL ветви, образуются фитогормоны жасмонаты [12]. HPL и AOS ветви ведут к образованию разных продуктов из одного субстрата – 13-гидроперокси-(9,11,15)-октадекатриеновой кислоты (13-ГПОТ) [13]. Начальные стадии биосинтеза оксипинов HPL и AOS ветвей, протекающие в хлоропластах, являются общими для обеих ветвей и связаны с образованием 13-ГПОТ с уча-

стием 13-специфичных липоксигеназ (рис. 1). Показано, что в растениях *Arabidopsis thaliana* и *Oryza sativa* одна и та же липоксигеназа обеспечивает субстрат как для образования HPL метаболитов, так и для жасмонатов (производных ветви AOS) [14, 15]. Оба фермента, и гидропероксидлиаза HPL, и алленоксидсинтаза AOS, относятся к группе ферментов CYP74, неклассическим цитохромам P450, которые не нуждаются в присутствии молекулярного кислорода для осуществления ферментативных реакций. Аминокислотные последовательности HPL и AOS могут отличаться лишь несколькими аминокислотами, более того, заменой одной или нескольких аминокислот можно превратить один фермент в другой, а в некоторых случаях один фермент способен одновременно проявлять как HPL, так и AOS активность [16, 17].

В AOS ветви в результате совместного действия AOS и алленоксидциклазы образуется 12-оксофитодиеновая кислота, которая далее превращается в жасмоновую кислоту в пероксиомах в результате действия 12-оксофитодиеноатредуктазы (OPR) и трех циклов β -окисления. Гидропероксидлиазы катализируют изомеризацию гидропероксидов жирных кислот в нестабильные промежуточные продукты – полуацетали, которые далее спонтанно распадаются на два

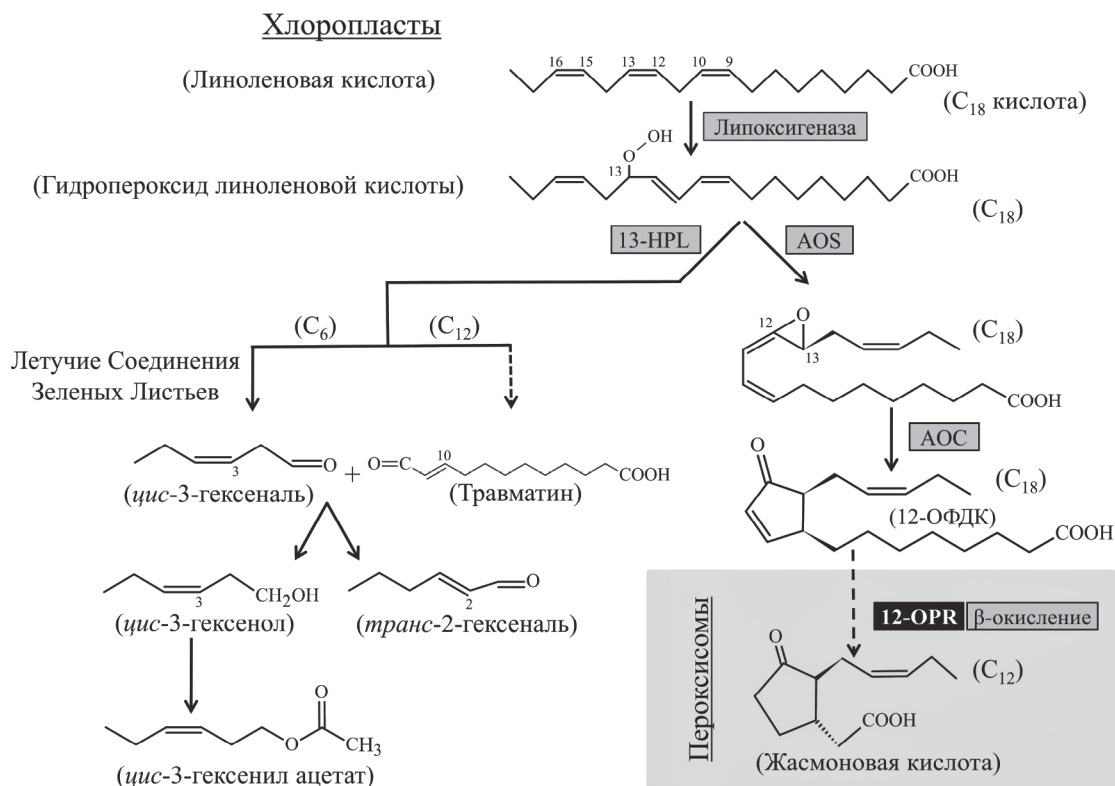


Рис. 1. Схема биосинтеза метаболитов AOS и HPL ветвей из α -линоленовой кислоты. Пунктирными линиями обозначено наличие нескольких промежуточных этапов превращений метаболитов. Черным фоном выделен фермент оксофитодиеноатредуктаза (OPR), ген которого сверхэкспрессирован в исследуемых трансгенных линиях пшеницы.

фрагмента. При участии 13-HPL из 13-ГПОТ образуются 12-углеродная альдокислота и шестиуглеродные альдегиды и их производные, такие как *цис*-3-гексеналь, *транс*-2-гексеналь, *цис*-3-гексенол и *цис*-3-гексенил ацетат [18]. Нестабильное 12-углеродное соединение ветви HPL, 12-оксо-9(Z)-додеценонная кислота, изомеризуется в более стабильную 12-оксо-10(E)-додеценонную кислоту, называемую травматином, а дальнейшее окисление альдегидной группы травматина приводит к образованию 2(E)-додецен-1,12-дикарбоновой кислоты (травматиновой кислоты) [19]. Первый шестиуглеродный продукт ветви, *цис*-3-гексеналь, превращается в *транс*-2-гексеналь с участием изомеразы [20]. Альдегиды могут быть восстановлены до спирта [21], а спирты далее ацетилированы [22]. Существует мнение, что альдегиды формируются в поврежденных тканях, а затем диффундируют в интактные клетки, поэтому для образования соответствующих спиртов и ацилпроизводных необходимо присутствие интактных клеток рядом с поврежденным участком [23]. Метаболиты HPL и AOS ветвей, имеющие общие начальные стадии биосинтеза и образующиеся из одного субстрата, выполняют разные биологические функции [24].

Ранее нами были выявлены некоторые особенности функционирования AOS ветви пшеницы, заметно отличающие ее от жасмонатной системы *A. thaliana*, изученной в настоящий момент достаточно подробно [25]. К примеру, общее содержание жасмонатов в листьях пшеницы намного ниже. Их уровень в ответ на механическое поранение тканей пшеницы увеличивается незначительно, тогда как в модельном растении *A. thaliana* содержание жасмонатов возрастает в десятки раз. Ферменты HPL ветви были изучены у *A. thaliana* и ряда других растений [1], однако, насколько нам известно, функционирование HPL ветви в пшенице до сих пор не исследовано.

Цель данной работы — исследовать активность HPL ветви в растениях пшеницы в условиях стресса (механическое повреждение листа) и без него, а также проследить возможное влияние жасмонатов на активность этой ветви. Полученные нами ранее трансгенные растения пшеницы со сверхэкспрессией гена *AtOPR3* из *Arabidopsis thaliana*, кодирующего 12-оксофитодиеноатредуктазу 3 AOS-ветви пути биосинтеза жасмонатов [26], представляют собой удобный инструмент для изучения влияния метаболитов AOS ветви на активность HPL ветви.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. В исследованиях использовали растения мягкой пшеницы сорта Саратовская-60 (Sar-60), а также три трансгенные линии, сверхэкспрессирующие ген *AtOPR3*

из *Arabidopsis thaliana*, Tr-3, Tr-18, Tr-20 (гомозиготные поколения T_3 - T_4), полученные в результате генетической трансформации Sar-60 вектором pBAR-GFP.UbiOPR3 [26]. Растения выращивали в 3-литровых горшках, наполненных универсальным грунтом, до стадии четырех листьев (25–30 сут. после посева), для исследований использовали третий лист. Условия выращивания: зимняя теплица, фотопериод 16/8 ч, интенсивность света до $150 \text{ мкмоль} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$, температура воздуха $25^\circ \pm 2^\circ\text{C}$ днем и $20^\circ \pm 2^\circ\text{C}$ ночью; раз в неделю в почву вносили раствор Хогланда. В исследовании использовали интактные и механически поврежденные листья.

Экстракция метаболитов HPL ветви из растительных тканей. Метаболиты гидропероксидазной ветви выделяли из листьев пшеницы методом парофазной экстракции. Собранные образцы немедленно замораживали в жидком азоте, материал тщательно измельчали, не давая разморозиться, взвешивали 100 мг образца и переносили в охлажденную стеклянную вialу с завинчивающейся крышкой. Для экстракции метаболитов HPL ветви к образцу добавляли 1 мл 10% NaCl, 50 нг *цис*-2-ноненаля в качестве внутреннего стандарта, затем в вialу вставляли миниколонку, наполненную адсорбирующей смолой МТО-Porapak PS 50/80 (“SUPELCO”, США), подсоединенную к вакуумному насосу. Быстрое замораживание образцов и последующее добавление к ним раствора с высокими концентрациями NaCl, способными ингибировать активность ферментов биосинтеза оксипинов, позволяет исключить возможное образование оксипинов в образцах после сбора тканей. Экстракцию летучих соединений проводили в течение заданного промежутка времени при постоянном перемешивании. Связавшиеся со смолой метаболиты элюировали с колонки дихлорметаном (400 мкл), образцы анализировали с помощью газохромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС). Для количественного определения метаболитов применяли калибровочные кривые, построенные с использованием коммерческих веществ, *цис*-3-гексенала, *транс*-2-гексенала, *цис*-3-гексенола, *цис*-3-гексенил ацетата и *цис*-2-ноненаля (“Sigma-Aldrich”, США).

Сбор летучих соединений HPL ветви. Для сбора летучих соединений, выделяемых механически поврежденными листьями, третий лист растений (массой около 200 мг) несколько раз зажимали пинцетом в поперечном направлении с интервалом 10 см по всей длине листовой пластинки. После этого листья сразу же помещали в десикатор с крышкой, в отверстие крышки вставляли миниколонку, наполненную адсорбирующей смолой МТО-Porapak PS 50/80. В десикатор помещали кусок фильтровальной бумаги, на который наносили 50 нг *цис*-2-ноненаля, используемого в ка-

честве внутреннего стандарта. Воздух отсасывали через миниколонку с помощью вакуумного насоса со скоростью 2 л/час. Связавшиеся со смолой метаболиты элюировали дихлорметаном (400 мкл), образцы анализировали с помощью ГХ-МС. Абсолютное содержание метаболитов в образце определяли с помощью калибровочных кривых, построенных с использованием коммерческих веществ. Динамику изменения скорости выделения летучих соединений изучали на индивидуальных пораненных листьях, помещенных в камеру для сбора летучих соединений. Выделяющиеся летучие соединения собирали один час, и в течение этого времени миниколонки, наполненные адсорбирующей смолой, меняли пять раз. Так как использование внутреннего стандарта при таком дизайне эксперимента затруднено, результаты измерений представлены в относительных единицах, рассчитанных как площадь хроматографического пика вещества, разделенная на время, в течение которого вещества улавливались на смоле миниколонки.

ГХ-МС анализ метаболитов HPL ветви. Содержание метаболитов гидропероксидазной ветви определяли методом ГХ-МС, как описано ранее [24, 27] с использованием аппаратно-программного комплекса на базе газового хроматографа “Хроматэк – Кристалл 5000” и масс-спектрометрического детектора (“Хроматэк”, Россия). Для разделения веществ использовали колонку CR-5M (30 м × 0.25 мм, толщина пленки 0.25 мкм), гелий использовали в качестве газа-носителя. Один мкл образца вводили в режиме ввода пробы без деления потока, температура испарителя составляла 200°C. Параметры работы термостата колонки, следующие: 5 мин 40°C, затем повышение до 225°C при 15°C/мин, в завершение температура 225°C поддерживалась в течение 10 мин. Первоначально соединения идентифицировали путем сравнения времени удерживания и масс-спектров веществ образца с эталонными соединениями, далее анализ проводили в режиме мониторинга выбранных ионов (selected ion monitoring, SIM). Ионные фрагменты анализировали, используя следующие значения отношения массы к заряду (m/z): m/z 69 для *цис*-3-гексеналя и *транс*-2-гексеналя, m/z 67 для *цис*-3-гексенола и *цис*-3-гексенилацетата, и m/z 57 для внутреннего стандарта *транс*-2-ноненола.

Анализ жирнокислотного состава. Экстракцию жирных кислот из листьев пшеницы проводили с помощью модифицированного метода Блай и Дайер [28]. Метилловые эфиры жирных кислот получали путем инкубации выделенных жирных кислот в 1 мл 8% серной кислоты в метаноле. Образцы выдерживали при 90 °C в течение 90 мин, затем охлаждали до комнатной температуры. В пробирку добавляли 1 мл 10% хлорида натрия в воде и 250 мкл гексана, а через 10 мин

верхнюю фазу, содержащую метилловые эфиры, переносили в пробирку для ГХ-МС анализа. Условия ГХ-МС анализа подробно описаны в предыдущем исследовании [29].

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку данных проводили в программе Origin (“OriginLab Corporation”, США) и Microsoft Excel (“Microsoft”, США). Для определения статистически значимых различий между трансгенными линиями проводили однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). В случае обнаружения значимых различий ($P \leq 0.05$) применяли пост-хок тест Тьюки (для множественных сравнений), используя онлайн ресурс (<https://www.statskingdom.com/180Anova1way.html>, One-Way ANOVA Calculator and Tukey HSD). На рисунках статистически значимые различия обозначены разными буквами над столбцами.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ содержания жирных кислот в не-трансгенных и трансгенных растениях пшеницы. Прежде всего мы проанализировали жирнокислотный состав тканей листьев исследуемых линий пшеницы, чтобы оценить содержание α -линоленовой кислоты – основного субстрата для образования исследуемых оксипинов. На рис. 2 представлены результаты анализа содержания основных жирных кислот, которые показывают, что α -линоленовая кислота является пре-

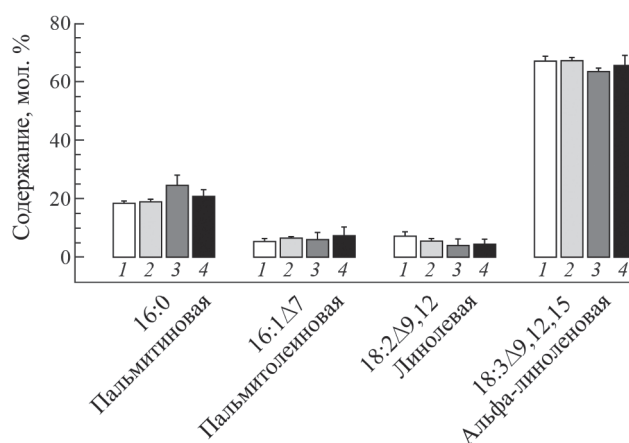


Рис. 2. Жирнокислотный состав листьев мягкой пшеницы Саратовская-60 и трансгенных линий с конститутивной экспрессией гена *AtOPR3* (1 – Sar-60, 2 – Tr-3, 3 – Tr-18, 4 – Tr-20). Жирные кислоты обозначены с использованием тривиальных названий и дельта-номенклатуры, указывающей число углеродных атомов в жирнокислотной цепи, число двойных связей после двоеточия и положение этих двойных связей после знака “Δ”. Данные представляют собой средние значения ± стандартное отклонение.

обладающей во всех анализируемых образцах. Ее содержание составляет более 65% от общего содержания жирных кислот в тканях листьев как трансгенных, так и нетрансгенных растений. Содержание пальмитиновой кислоты составляет около 20%, пальмитолеиновой и линолевой — около 5% каждой. Существенных отличий в жирнокислотном составе у трансгенных растений не обнаружено, лишь в одной из трансгенных линий Tr-18 уровень линоленовой кислоты оказался немного понижен, хотя это отличие не является статистически достоверным (рис. 2).

Анализ содержания метаболитов HPL ветви. Исследования позволили выявить присутствие ряда метаболитов HPL ветви, включая *цис*-3-гексеналь, *цис*-3-гексенол, *транс*-2-гексеналь и *цис*-3-гексенил ацетат в исследуемых образцах (рис. 3). Среди обнаруженных метаболитов, содержание 3-гексенала оказалось выше других, составляя 10–30 мкмоль/г сырого веса. Содержание остальных соединений было на несколько порядков ниже: 3-гексенола — около 0.2 мкмоль/г сырого веса, 2-гексенала и 3-гексенил ацетата — от 0.01 до 0.065 мкмоль/г сырого веса. В тканях трансгенных растений содержание метаболитов HPL ветви отличалось от нетрансгенного контроля. В двух трансгенных линиях (Tr-3 и Tr-18) наблюдали значительное превышение

содержания 3-гексенала. Наиболее заметное увеличение содержания HPL метаболитов наблюдалось в растениях линии Tr-3, листья которой содержали в три раза больше 3-гексенала и почти в два раза больше 2-гексенала и 3-гексенил ацетата в сравнении с нетрансгенными растениями. При этом, растения линии Tr-20 не отличались от нетрансгенных Sar-60 содержанием метаболитов HPL ветви (рис. 3).

Влияние механического повреждения на содержание метаболитов HPL ветви в пшенице. Известно, что накопление в тканях и выделение метаболитов HPL ветви индуцируются механическим повреждением листьев. Мы проверили, как изменяется профиль этих соединений у нетрансгенных растений пшеницы после механического повреждения листовой пластины, а также как изменяется скорость выделения этих метаболитов через промежутки времени после повреждения. Динамика изменения эндогенного содержания 3-гексенала, 2-гексенала и 3-гексенола имеет схожий характер. Содержание метаболитов в тканях повышается в ответ на механическое повреждение и достигает максимума через 30 мин (рис. 4). Уровень 3-гексенил ацетата заметно не изменяется.

Далее мы проверили, как изменяется скорость выделения летучих соединений в течение

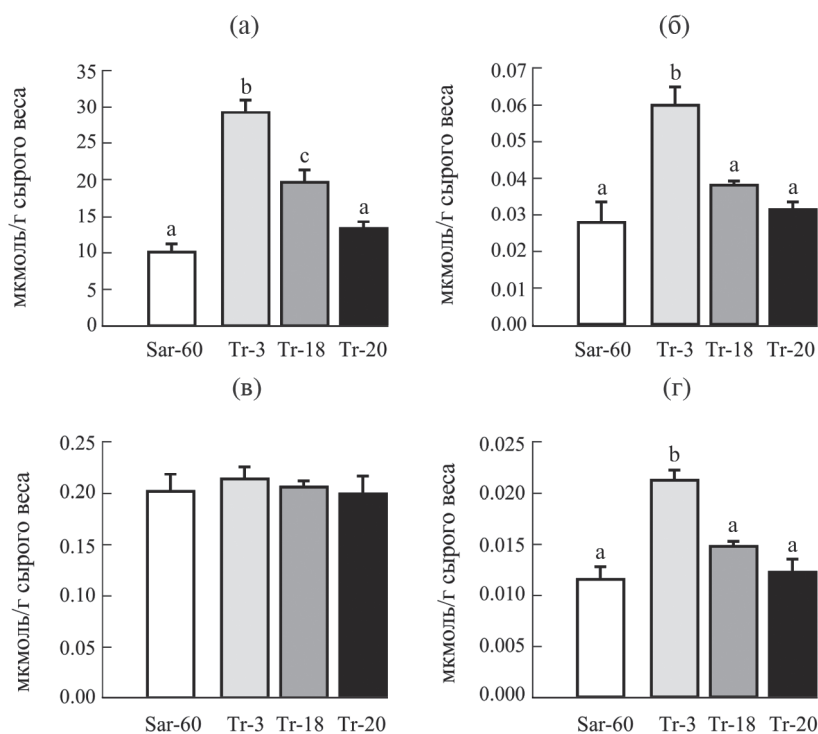


Рис. 3. Содержание индивидуальных оксипинов HPL ветви, *цис*-3-гексенала (а), *транс*-2-гексенала (б), *цис*-3-гексенола (в) и *цис*-3-гексенил ацетата (г), в интактных листьях мягкой пшеницы Саратовская-60 (Sar-60, белые столбцы) и листьях трансгенных линий с конститутивной экспрессией гена *AtOPR3* (Tr-3, Tr-18 и Tr-20, закрашенные столбцы). Буквы обозначают статистически значимые различия между линиями, согласно оценке однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим пост-хок тестом Тьюки ($P \leq 0.05$).

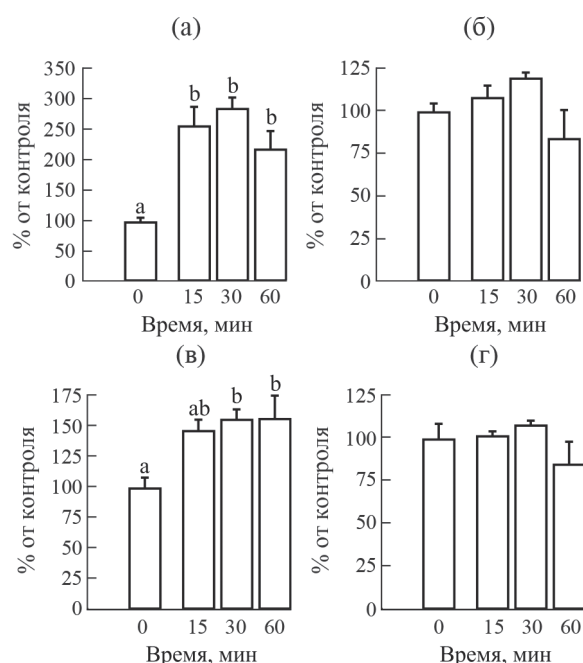


Рис. 4. Изменение содержания индивидуальных оксипинов HPL ветви, *цис*-3-гексенала (а), *транс*-2-гексенала (б), *цис*-3-гексенола (в) и *цис*-3-гексенил ацетата (г), в пораненных листьях мягкой пшеницы Саратовская-60 в течение часа после повреждения. Эндogenous содержание метаболита до повреждения листа принято за 100%. Буквы обозначают статистически значимые различия между линиями, согласно оценке однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим пост-хок тестом Тьюки ($P \leq 0.05$).

часа после механического повреждения листа. В предварительных экспериментах мы провели анализ летучих соединений, выделяемых неповрежденными тканями срезанного листа пшеницы, при этом срезанный край был плотно заклеен клейкой канцелярской лентой. Эти эксперименты подтвердили, что интактные листья растений пшеницы в течение 30 мин не выделяют детектируемых количеств летучих соединений HPL ветви. Динамика изменения скорости выделения индивидуальных метаболитов HPL ветви в течение часа после механического повреждения показана на рис. 5. Исследование показало, что скорость выделения трех из четырех исследуемых соединений, 3-гексенала, 2-гексенала и 3-гексенола достигает максимальных или близких к максимальным значений в течение первых 5 мин после поранения листа, а скорость выделения 3-гексенил ацетата нарастает постепенно в течение 15 мин. Скорость выделения всех анализируемых соединений заметно падает в промежутке времени от 15 до 30 мин, и в дальнейшем мало изменяется.

Анализ соединений HPL ветви, выделенных механически поврежденными листьями трансгенной пшеницы со сверхэкспрессией *AtOPR3*. Основываясь на результатах анализа динамики выделения летучих соединений поврежденными листьями трансгенной пшеницы, для дальнейшего сравнения профилей летучих соединений HPL ветви, выделяемых растениями трансгенных линий, сбор летучих соединений проводили в течение 30 мин. Результаты анализа летучих соединений HPL ветви, выделяемых поврежденными листьями нетрансгенных и трансгенных растений в течение 30 мин после повреждения показаны на рисунке 6. У всех растений преобладающими метаболитами в смеси летучих соединений являются 3-гексеналь и 3-гексенол, которые выделяются приблизительно в равных количествах. Профиль летучих соединений, выделяемых поврежденными трансгенными растениями, заметно отличается от смеси летучих соединений, выделяемой нетрансгенным контролем Sar-60. Все трансгенные растения выделяют больше 3-гексенола и 3-гексенил ацетата и меньше 2-гексенала по сравнению с нетрансгенными растениями Sar-60.

ОБСУЖДЕНИЕ

Высокий спрос в промышленности на ароматические соединения обуславливает постоянный интерес к исследованию метаболитов HPL ветви. Особое внимание уделяется изучению HPL ветви у сельскохозяйственных культур, так как метаболиты HPL ветви влияют на качество продукции растениеводства [30]. В листьях пшеницы HPL ветвь исследована очень мало. Было лишь показано, что метаболиты HPL ветви выделяются молодыми растениями пшеницы озимого сорта "Топася" после механического повреждения пинцетом и насекомым Пьявицей красногрудой (*Oulema melanopus*) [31].

Анализ жирнокислотного состава листьев пшеницы подтвердил, что три четверти от общего содержания жирных кислот составляют 18-углеродные соединения, и α -линоленовая кислота, субстрат для биосинтеза исследуемых оксипинов, является преобладающей жирной кислотой. Более того, стало понятно, что содержание этой жирной кислоты в листьях молодых растений пшеницы очень высоко (более 65% от общего содержания жирных кислот) (рис. 2). Уровень содержания линоленовой кислоты в листьях российского сорта мягкой пшеницы Саратовская-60, обнаруженный в нашем исследовании, оказался выше, чем в листьях одного из сортов пшеницы азиатского происхождения (около 55%) [32]. Таким образом, листья молодых растений пшеницы можно рассматривать как полезный источник α -линоленовой кислоты.

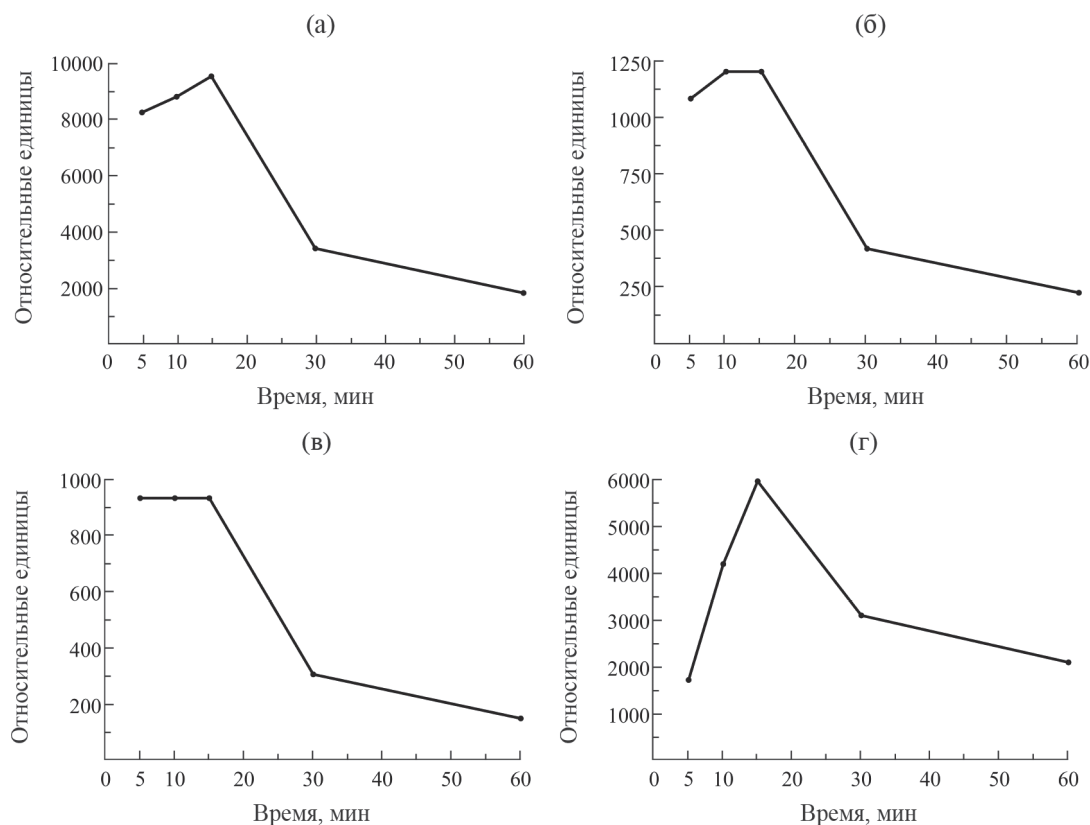


Рис. 5. Относительная скорость выделения оксипинов HPL ветви, *цис*-3-гексеналь (а), *транс*-2-гексеналь (б), *цис*-3-гексенол (в) и *цис*-3-гексенил ацетат (г), механически поврежденным листом мягкой пшеницы Саратовская-60 в течение часа после повреждения. Данные репрезентативного эксперимента представлены как площадь хроматографического пика соответствующего метаболита, разделенная на время улавливания метаболитов, выделяемых поврежденным листом.

Например, листья оливковых деревьев, содержащие до 41% этого вещества, оцениваются как ценная кормовая добавка [33]. В целом, листья пшеницы являются хорошим источником полиненасыщенных жирных кислот, так как их содержание составляет около 75%, большую часть которых представляет ω -3 ненасыщенная α -линоленовая жирная кислота, при этом индекс ненасыщенности составляет 2.2. Таким образом, субстрат для липоксигеназ в листьях пшеницы находится в избытке, и сверхэкспрессия гена биосинтеза жасмонатов не приводит к заметному его уменьшению.

Количество метаболитов HPL ветви, выделяемое листьями растений, может варьировать в широких пределах. Одновременное исследование 50 видов растений показало, что у некоторых видов, например, *Tillandsia recurvata* они едва детектируются, тогда как у бобового растения *Vigna radiata* их уровень может достигать 100 мкг/г сырого веса [34]. Количество летучих соединений, выделяемых поврежденными листьями пшеницы (рис. 6) близко к максимальными значениями, выявленным в упомянутом выше исследовании. У растений *Vigna radiata* и ряда представителей семейства *Cucurbitacea*,

охарактеризованных как виды с высоким уровнем выброса летучих соединений, *транс*-2-гексеналь преобладал как основной HPL метаболит [34]. Наши исследования показывают, что в листьях пшеницы преобладает *цис*-3-гексеналь, поскольку на него приходится около 98% от общего содержания летучих соединений HPL ветви (рис. 3). При механическом повреждении листьев *цис*-3-гексеналь составляет около половины смеси летучих метаболитов HPL ветви, выделяемых тканями (рис. 6). В отличие от других видов растений, характеризующихся высоким уровнем выброса летучих соединений, содержание *транс*-2-гексеналь в тканях пшеницы в сотни раз ниже, а в смеси метаболитов, выделяемых поврежденными листьями — в десятки раз ниже, чем *цис*-3-гексеналь. Относительное содержание *цис*-3-гексенола, наоборот, в смеси выделяемых метаболитов значительно выше, чем в тканях листа. В листьях пшеницы его содержание в десятки раз меньше, чем *цис*-3-гексеналь, тогда как в смеси выделившихся летучих соединений содержание *цис*-3-гексенола сравнимо или несколько превышает уровень *цис*-3-гексеналь (рис. 3 и 6). Увеличение относительного содержания *цис*-3-гексенола и уменьшение *цис*-3-гек-

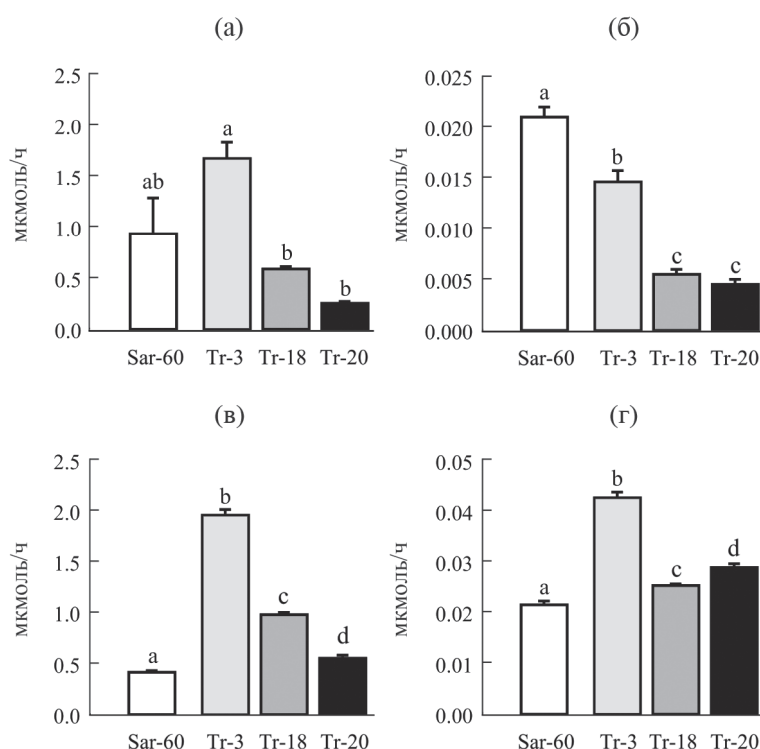


Рис. 6. Количество индивидуальных оксипинов HPL ветви, *цис*-3-гексеналя (а), *транс*-2-гексеналя (б), *цис*-3-гексенола (в) и *цис*-3-гексенил ацетата (г), выделяемых поврежденными листьями мягкой пшеницы Саратовская-60 (Sar-60, белые столбцы) и трансгенных растений (Tr-3, Tr-18 и Tr-20, закрашенные столбцы) с конститутивной экспрессией гена *AtOPR3*. Буквы обозначают статистически значимые различия между линиями, согласно оценке однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим пост-хок тестом Тьюки ($P \leq 0.05$).

сеналя в смеси летучих соединений, выделяемых поврежденными растениями, относительно эндогенного содержания было показано ранее [23, 27].

Подтверждение присутствия больших количеств метаболитов HPL ветви в интактных листьях позволяет объяснить, каким образом механическое повреждение приводит к быстрому, почти мгновенному, выделению летучих соединений. Мы установили, что в ответ на механическое повреждение содержание шестиуглеродных альдегидов и 3-гексенола в листе растет, достигая максимума через 30 мин, при этом содержание 3-гексенил ацетата не изменяется, а 2-гексеналя к 30 мин увеличивается незначительно (рис. 4). Уровень метаболитов, детектируемых в тканях, представляет собой сумму процессов их образования, превращения в другие метаболиты (для альдегидов и 3-гексенола) и улетучивания. Скорость выделения *цис*-3-гексенил ацетата нарастает постепенно, тогда как для *цис*-3-гексеналя, *транс*-2-гексеналя и *цис*-3-гексенола максимальная скорость выделения достигается быстро (рис. 5). В целом, согласно нашим исследованиям, пик выделения всех летучих соединений HPL вет-

ви наблюдается у пшеницы через 15 мин после поранения.

Сверхэкспрессия гена биосинтеза жасмонов *AtOPR3* в пшенице существенно повлияла на содержание метаболитов HPL ветви, как в интактных, так и поврежденных тканях. В двух изучаемых трансгенных линиях (Tr-3 и Tr-18) конститутивная экспрессия *AtOPR3* привела к повышению общего содержания метаболитов HPL ветви, представленных, главным образом, *цис*-3-гексеналем (рис. 3). Генетическая модификация также привела к изменению профиля летучих соединений HPL ветви, выделяемых поврежденными растениями. После механического повреждения, листья трансгенных линий пшеницы со сверхэкспрессией *AtOPR3* выделяют больше *цис*-3-гексенола и *цис*-3-гексенил ацетата, но меньше *транс*-2-гексеналя, в сравнении с нетрансгенными растениями. Обращает на себя внимание отсутствие разницы в содержании 3-гексенола в интактных листьях трансгенных линий и нетрансгенных растений (рис. 3), в то время как механически поврежденные листья трансгенных растений выделяют значительно большие количества этого метаболита (рис. 6). При этом, чем выше уровень

экспрессии *AtOPR3* в тканях трансгенной линии (Tr-20 < Tr-18 < Tr-3) [26], тем больше выделялось 3-гексенола (рис. 6). Полученные данные могут свидетельствовать о том, что стресс-индуцируемое образование и выделение 3-гексенола регулируется жасмонатами.

Максимальное увеличение содержания эндогенных метаболитов HPL ветви наблюдали в листьях растений трансгенной линии Tr-3. Ранее мы показали, что эти растения характеризуются наиболее высоким уровнем экспрессии привнесенного гена *AtOPR3* [26]. Количество *цис*-3-гексенола и *цис*-3-гексенил ацетата, выделяемого пораненными листьями растений Tr-3, также было больше, чем у других трансгенных линий. Растения Tr-3 характеризуются торможением роста, более ранним цветением и повышенной устойчивостью к промораживанию, тогда как растения линии Tr-20 демонстрировали противоположные тенденции [26]. В текущем исследовании выявлены различия и в содержании продуктов HPL ветви у анализируемых линий. Можно предположить, что повышенная активность HPL ветви в Tr-3 в какой-то степени определяет повышение их общей стрессоустойчивости и изменения в скорости роста. Влияние активности HPL ветви на рост и развитие растений было описано ранее, например, на молодых проростках генетически модифицированных растений оливы европейской *Olea europaea* [30].

Остается также открытым вопрос о том, каким образом активация AOS ветви в пшенице приводит к стимулированию HPL ветви. До сих пор не ясно, как регулируется распределение субстрата между этими ветвями, и в целом, очень мало данных о регуляции HPL ветви. Информация о взаимном влиянии доминирующих ветвей биосинтеза оксипинов по-прежнему весьма противоречива, свидетельствуя как о негативном влиянии, так и о стимулирующем воздействии метаболитов на параллельную ветвь [35–38]. Ранее было показано, что мутация в гене *OsHPL3* риса *Oryza sativa* ведет к значительному уменьшению продуцирования метаболитов HPL ветви и, вследствие этого, к усилению биосинтеза жасмоновой кислоты, что свидетельствует о конкурирующих взаимодействиях двух ветвей биосинтеза оксипинов в листьях риса [35]. Растения *A. thaliana* характеризуются тем, что в их хлоропластах накапливаются значительные количества гликолипидов, включающих в свой состав 12-оксофитодиеновую кислоту или ее укороченную форму динор-оксофитодиеновую кислоту, которые формируют особые клеточные включения, так называемые “арабидопсиды”. Сравнение разных экотипов *A. thaliana*, различающихся размерами арабидопсидов, показало, что более высокая активность гена *HPL1* сопровождается более низким содержанием гликоли-

пидов, включающих в свой состав 12-оксофитодиеновую кислоту и динор-оксофитодиеновую кислоту, подтверждая негативное влияние ветви HPL на активность жасмонатной (AOS) ветви [36]. Напротив, мутант *hpl1*, лишенный функциональной гидропероксидлиазы, созданный на основе экотипа *Landsberg erecta*, характеризуется пониженным содержанием жасмоновой кислоты и более низким уровнем экспрессии жасмонат-зависимых генов [4]. В то же время сообщается, что метаболиты HPL ветви могут стимулировать активность AOS ветви. Например, обработка растений кукурузы (*Zea mays*) *цис*-3-гексенил ацетатом индуцирует экспрессию генов биосинтеза жасмонатов, включая три гена *OPR*, что ведет к краткосрочному повышению уровня жасмоновой кислоты, при этом уровень 12-ОФДК не изменяется [38]. Схожим образом *цис*-3-гексенол индуцировал экспрессию генов биосинтеза жасмонатов растений томата (*Solanum lycopersicum*) [5]. Сверхэкспрессия в растениях *A. thaliana* измененного гена, кодирующего фермент HPL, лишенный транзитного пептида, направляющего белок в хлоропласты, приводила к накоплению функционального белка за пределами хлоропластов, таким образом исключала конкуренцию за общий образующийся в хлоропластах субстрат, приводя к повышению стресс-индуцируемого уровня 12-ОФДК [37]. В литературе также есть данные, показывающие стимулирование HPL ветви жасмонатами [39, 40]. Стимулирование образования метаболитов HPL ветви жасмонатами может быть также связано с так называемой “положительной обратной связью” пути биосинтеза жасмонатов, характеризующейся активацией ферментов биосинтетического пути продуктами этого же пути. В частности, положительная регуляция жасмонатами характерна для липоксигеназ, поставляющих субстрат как для AOS, так и для HPL ветвей пути биосинтеза оксипинов [39]. В совокупности эти факты свидетельствуют о возможной активации каждой из двух ветвей метаболитами параллельной ветви и не исключают конкуренции за субстрат, возможно, в условиях его ограниченного образования. По-видимому, в трансгенных растениях с интенсивной транскрипцией гена *AtOPR3* активация ветви HPL может происходить как в результате стимулирующего действия жасмонатов, так и в результате посттранскрипционного замалчивания экспрессии генов жасмонатной ветви.

Работа поддержана Российским Научным Фондом (грант № 22-16-00047). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая работа не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Matsui K. Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2006. V. 9. P. 274.
2. Sarang K., Rudziński K.J., Szmigielski R. Green leaf volatiles in the atmosphere – properties, transformation, and significance // *Atmosphere*. 2021. V. 12. P. 1655.
<https://www.mdpi.com/2073-4433/12/12/1655>
3. Savchenko T., Yanykin D., Khorobrykh A., Terentyev V., Klimov V., Dehesh K. The hydroperoxide lyase branch of the oxylipin pathway protects against photoinhibition of photosynthesis // *Planta*. 2017. V. 245. P. 1179.
<https://doi.org/10.1007/s00425-017-2674-z>
4. Scala A., Mirabella R., Mugo C., Matsui K., Haring M.A., Schuurink R.C. E-2-hexenal promotes susceptibility to *Pseudomonas syringae* by activating jasmonic acid pathways in *Arabidopsis* // *Front. Plant Sci.* 2013. V. 4. P. 74.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00074>
5. Su Q., Yang F., Zhang Q., Tong H., Hu Y., Zhang X., Xie W., Wang S., Wu Q., Zhang Y. Defence priming in tomato by the green leaf volatile (Z)-3-hexenol reduces whitefly transmission of a plant virus // *Plant Cell Environ.* 2020. V. 43. P. 2797.
<https://doi.org/10.1111/pce.13885>
6. Ameye M., Allmann S., Verwaeren J., Smagghe G., Haesaert G., Schuurink R.C., Audenaert K. Green leaf volatile production by plants: a meta-analysis // *New Phytol.* 2018. V. 220. P. 666.
<https://doi.org/10.1111/nph.14671>
7. Hamilton-Kemp T.R., McCracken C.T.Jr., Loughrin J.H., Andersen R.A., Hildebrand D.F. Effects of some natural volatile compounds on the pathogenic fungi *Alternaria alternata* and *Botrytis cinerea* // *J. Chem. Ecol.* 1992. V. 18. P. 1083.
8. Savchenko T.V., Zastrijnaja O.M., Klimov V.V. Oxylipins and plant abiotic stress resistance // *Biochem. (Moscow)*. 2014. V. 79. P. 362.
9. Engelberth M., Selman S.M., Engelberth J. In-cold exposure to z-3-hexenal provides protection against ongoing cold stress in *Zea mays* // *Plants*. 2019. V. 8. P. 165. <https://www.mdpi.com/2223-7747/8/6/165>
10. Yamauchi Y., Kunishima M., Mizutani M., Sugimoto Y. Reactive short-chain leaf volatiles act as powerful inducers of abiotic stress-related gene expression // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. P. 8030.
11. Tian S., Guo R., Zou X., Zhang X., Yu X., Zhan Y., Ci D., Wang M., Wang Y., Si T. Priming with the green leaf volatile (Z)-3-hexenyl-1-yl acetate enhances salinity stress tolerance in peanut (*Arachis hypogaea* L.) seedlings // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 10. P. 785.
12. Wasternack C., Song S. Jasmonates: biosynthesis, metabolism, and signaling by proteins activating and repressing transcription // *J. Exp. Bot.* 2017. V. 68. P. 1303. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw443>
13. Rustgi S., Springer A., Kang C., Von Wettstein D., Reinbothe C., Reinbothe S., Pollmann S. Allene oxide synthase and hydroperoxide lyase, two non-canonical cytochrome P450s in *Arabidopsis thaliana* and their different roles in plant defense // *Inter. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. P. 3064.
<https://doi.org/10.3390/ijms20123064>
14. Wang R., Shen W., Liu L., Jiang L., Liu Y., Su N., Wan J. A novel lipoxygenase gene from developing rice seeds confers dual position specificity and responds to wounding and insect attack // *Plant Mol. Biol.* 2008. V. 66. P. 401. <https://doi.org/10.1007/s11013-007-9278-0>
15. Mochizuki S., Sugimoto K., Koeduka T., Matsui K. *Arabidopsis* lipoxygenase 2 is essential for formation of green leaf volatiles and five-carbon volatiles // *FEBS Letters*. 2016. V. 590. P. 1017.
<https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1873-3468.12133>
16. Toporkova Y.Y., Askarova E.K., Gorina S.S., Mukhtarova L.S., Grechkin A.N. Oxylipin biosynthesis in spikemoss *Selaginella moellendorffii*: Identification of allene oxide synthase (CYP74L2) and hydroperoxide lyase (CYP74L1) // *Phytochem.* 2022. V. 195. P. 113051.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.113051>
17. Lee D.S., Nioche P., Hamberg M., Raman C.S. Structural insights into the evolutionary paths of oxylipin biosynthetic enzymes // *Nature*. 2008. V. 455. P. 363. <https://doi.org/10.1038/nature07307>
18. Grechkin A.N., Hamberg M. The “heterolytic hydroperoxide lyase” is an isomerase producing a short-lived fatty acid hemiacetal // *Biochim. Biophys. Acta*. 2004. V. 1636. P. 47.
<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2003.12.003>
19. Zimmerman D.C., Coudron C.A. Identification of traumatin, a wound hormone, as 12-oxo-trans-10-dodecenoic acid // *Plant Physiol.* 1979. V. 63. P. 536.
20. Kunishima M., Yamauchi Y., Mizutani M., Kuse M., Takikawa H., Sugimoto Y. Identification of (Z)-3:(E)-2-hexenal isomerases essential to the production of the leaf aldehyde in plants // *J. Biolog. Chem.* 2016. V. 291. P. 14023.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M116.726687>
21. Tanaka T., Ikeda A., Shiojiri K., Ozawa R., Shiki K., Nagai-Kunihiro N., Fujita K., Sugimoto K., Yamato K.T., Dohra H. Identification of a hexenal reductase that modulates the composition of green leaf volatiles // *Plant Physiol.* 2018. V. 178. P. 552.
<https://doi.org/10.1104/pp.18.00632>
22. D'Auria J.C., Pichersky E., Schaub A., Hansel A., Gershenzon J. Characterization of a BAHD acyltransferase responsible for producing the green leaf volatile (Z)-3-hexenyl-1-yl acetate in *Arabidopsis thaliana* // *Plant J.* 2007. V. 49. P. 194.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2006.02946.x>
23. Matsui K., Sugimoto K., Mano J.i., Ozawa R., Takabayashi J. Differential metabolisms of green leaf volatiles in injured and intact parts of a wounded leaf meet distinct ecophysiological requirements // *PloS One*. 2012. V. 7. P. e36433.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036433>

24. Chehab E.W., Kaspi R., Savchenko T., Rowe H., Negre-Zakharov F., Kliebenstein D., Dehesh K. Distinct roles of jasmonates and aldehydes in plant-defense responses // PLoS One. 2008. V. 3. P. e1904. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001904>
25. Degtyaryov E., Pigolev A., Miroshnichenko D., Frolov A., Basnet A.T., Gorbach D., Leonova T., Pushin A.S., Alekseeva V., Dolgov S., Savchenko T. 12-Oxophytodienoate reductase overexpression compromises tolerance to *Botrytis cinerea* in hexaploid and tetraploid wheat // Plants. 2023. V. 12. P. 2050. <https://www.mdpi.com/2223-7747/12/10/2050>
26. Pigolev A.V., Miroshnichenko D.N., Pushin A.S., Terentyev V.V., Boutanayev A.M., Dolgov S.V., Savchenko T.V. Overexpression of Arabidopsis OPR3 in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) alters plant development and freezing tolerance // Inter. J. Mol. Sci. 2018. V. 19. P. 3989. <https://www.mdpi.com/1422-0067/19/12/3989>
27. Savchenko T., Pearse I.S., Ignatia L., Karban R., Dehesh K. Insect herbivores selectively suppress the HPL branch of the oxylipin pathway in host plants // Plant J. 2013. V. 73. P. 653. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/tpl.12064>
28. Bligh E., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification // J. Biochem. Physiol. 1959. V. 37. P. 911.
29. Krivina E.S., Savchenko T.V., Tebina E.M., Shatilovich A.V., Temraleeva A.D. Morphology, phylogeny and fatty acid profiles of *Meyerella similis* from freshwater ponds and *Meyerella krienitzii* sp. nov. from soil (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) // J. Appl. Phycol. 2023. V. 35. P. 2295. <https://doi.org/10.1007/s10811-023-03038-4>
30. Cerezo S., Hernández M.L., Palomo-Ríos E., Gouffi N., García-Vico L., Sicardo M.D., Sanz C., Mercado J.A., Pliego-Alfaro F., Martínez-Rivas J.M. Modification of 13-hydroperoxide lyase expression in olive affects plant growth and results in altered volatile profile // Plant Sci. 2021. V. 313. P. 111083. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2021.111083>
31. Piesik D., Wenda-Piesik A., Lamparski R., Tabaka P., Ligor T., Buszewski B. Effects of mechanical injury and insect feeding on volatiles emitted by wheat plants // Entomologica Fennica. 2010. V. 21. P. 117. <https://doi.org/10.33338/ef.84521>
32. Ullah S., Khan M.N., Lodhi S.S., Ahmed I., Tayyab M., Mehmood T., Din I.U., Khan M., Sohail Q., Akram M. Targeted metabolomics reveals fatty acid abundance adjustments as playing a crucial role in drought-stress response and post-drought recovery in wheat // Front. Genetics. 2022. V. 13. P. 972696. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.972696>
33. Cavaleiro C.V., Picoloto R.S., Cichoski A.J., Wagner R., de Menezes C.R., Zepka L.Q., Da Croce D.M., Barin J.S. Olive leaves offer more than phenolic compounds – Fatty acids and mineral composition of varieties from Southern Brazil // Industrial Crops and Products. 2015. V. 71. P. 122. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669015002447>
34. Engelberth J., Engelberth M. Variability in the capacity to produce damage-induced aldehyde green leaf volatiles among different plant species provides novel insights into biosynthetic diversity // Plants. 2020. V. 9. P. 213. <https://www.mdpi.com/2223-7747/9/2/213>
35. Tong X., Qi J., Zhu X., Mao B., Zeng L., Wang B., Li Q., Zhou G., Xu X., Lou Y., He Z. The rice hydroperoxide lyase *OsHPL3* functions in defense responses by modulating the oxylipin pathway // Plant J.: For Cell Mol. Biol. 2012. V. 71. P. 763. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.05027.x>
36. Nilsson A.K., Fahlberg P., Johansson O.N., Hamberg M., Andersson M.X., Ellerström M. The activity of HYDROPEROXIDE LYASE 1 regulates accumulation of galactolipids containing 12-oxo-phytodienoic acid in Arabidopsis // J. Exp. Bot. 2016. V. 67. P. 5133. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw278>
37. Savchenko T., Kolla V.A., Wang C.Q., Nasafi Z., Hicks D.R., Phadungchob B., Chehab W.E., Brandizzi F., Froehlich J., Dehesh K. Functional convergence of oxylipin and abscisic acid pathways controls stomatal closure in response to drought // Plant Physiol. 2014. V. 164. P. 1151. <https://doi.org/10.1104/pp.113.234310>
38. Engelberth J., Seidl-Adams I., Schultz J.C., Tumlinson J.H. Insect elicitors and exposure to green leafy volatiles differentially upregulate major octadecanoids and transcripts of 12-oxo-phytodienoic acid reductases in *Zea mays* // Mol. Plant-Microbe Interact. 2007. V. 20. P. 707. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-6-0707>
39. Jiang Y., Ye J., Li S., Niinemets Ü. Methyl jasmonate-induced emission of biogenic volatiles is biphasic in cucumber: a high-resolution analysis of dose dependence // J. Exp. Bot. 2017. V. 20. P. 4679. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx244>
40. Wang Y., Liu M., Ge D., Akhter Bhat J., Li Y., Kong J., Liu K., Zhao T. Hydroperoxide lyase modulates defense response and confers lesion-mimic leaf phenotype in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) // Plant J. 2020. V. 104. P. 1315. <https://doi.org/10.1111/tpl.15002>

УДК 581.1

РОСТ И СОЛЕУСТОЙЧИВОСТЬ ВОЛОСОВИДНЫХ КОРНЕЙ ТАБАКА С КОНСТИТУТИВНОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ ГЕНА TaNAC69

© 2024 г. З. А. Ибрагимова^{а, б}, А. А. Галимова^а, Х. Г. Мусин^а, А. А. Ямалеева^б,
Е. А. Заикина^а, Б. Р. Кулуев^{а, б}

^аИнститут биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение
Федерального государственного бюджетного научного учреждения

Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

^бУфимский университет науки и технологий, Уфа, Россия

e-mail: i.zibragimova@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.02.2024 г.

После доработки 06.04.2024 г.

Принята к публикации 27.05.2024 г.

Пшеница мягкая (*Triticum aestivum* L.) — одна из самых важных зерновых и основных продовольственных культур во всем мире, выращиваемая довольно часто в засушливых регионах мира, где нехватка воды и засоление вызывают серьезные потери урожая. Ген *TaNAC69* мягкой пшеницы кодирует один из важнейших транскрипционных факторов, который участвует в регуляции устойчивости к дефициту влаги, вызванной засухой и гипотермией, однако роль этого гена при засолении малоизучена. Целью данной работы было клонирование гена *TaNAC69* мягкой пшеницы в бинарном векторе с 35S CaMV промотором и создание волосовидных корней (ВК) *Nicotiana tabacum* L. с конститутивной экспрессией гена *TaNAC69* для оценки эффективности целевой генно-инженерной конструкции в условиях засоления. В ходе агробактериальной трансформации листовых дисков табака при помощи *Agrobacterium rhizogenes* были получены 15 линий культур ВК, в шести из которых было доказано наличие и высокий уровень экспрессии целевого гена. ВК табака с конститутивной экспрессией гена *TaNAC69* характеризовались более быстрыми темпами роста, большей разветвленностью и большей сырой и сухой массой при действии 150 мМ NaCl, чем контрольные ВК табака без целевого гена. Анализ антиоксидантной системы выявил повышенную активность ферментов гваяколпероксидазы и глутатион-S-трансферазы, большее содержание пролина и водорастворимых сахаров, а также более высокую общую антиоксидантную способность в ВК с геном *TaNAC69* по сравнению с нетрансформированным контролем. Генно-инженерная конструкция *TaNAC69* с 35S CaMV промотором может быть рекомендована для генетической трансформации культурных растений с целью увеличения их устойчивости к абиотическому стрессу.

Ключевые слова: *Nicotiana tabacum*, волосовидные корни, стрессоустойчивость, транскрипционный фактор, *Agrobacterium rhizogenes*

DOI: 10.31857/S0015330324050073, EDN: MMUPCL

ВВЕДЕНИЕ

Растения испытывают множество абиотических и биотических стрессов на разных этапах жизненного цикла. Наряду с засухой и гипотермией, к основным абиотическим факторам стресса относится засоление почвы, которое затрагивает от четверти до трети производства всех сельскохозяйственных культур в мире [1, 2]. Засоленность почвы влияет не только на рост, развитие растения и снижение его урожайности [3],

но и на физико-химический и экологический баланс затрагиваемых территорий [4]. Площади засоления продолжают увеличиваться из-за недостаточного количества осадков, нерациональных методов ведения сельского хозяйства, а также из-за применения оросительной воды с высоким содержанием солей [2, 5], особенно в засушливых и полузасушливых районах с более высоким суммарным испарением, чем осадками [7, 8].

Пшеница мягкая (*Triticum aestivum* L.) — одна из самых важных зерновых и основных продо-

вольственных культур во всем мире, выращиваемая довольно часто в полувсасушливых и засушливых регионах мира, где нехватка воды и засоление вызывает серьезные потери урожая [9]. В этой связи возрастает актуальность увеличения стрессоустойчивости пшеницы путем её генетической трансформации различными защитными генами, число которых у пшеницы, ввиду большого размера генома, вероятно исчисляется сотнями или даже тысячами. В этой связи представляет трудность выбора одного эффективного целевого гена для генной инженерии мягкой пшеницы. Можно предположить, что эффективным окажется использование некоторых генов транскрипционных факторов, число которых на порядок меньше, чем защитных генов [10]. К тому же транскрипционные факторы обычно регулируют экспрессию множества защитных генов. Одними из наиболее значимых регуляторов реакций стрессоустойчивости являются факторы транскрипции семейства NAC [11]. К примеру, ген *TaNAC69* преимущественно экспрессируется в корне при нормальных условиях, но заметно активируется засухой как в листе, так и в корне [12]. Также была изучена сверхэкспрессия *TaNAC69* в листьях и корнях трансгенной пшеницы с промотором ячменя *HvDhn4s*. Такие трансгенные растения имели большую длину корней, а также продуцировали большую биомассу побегов в условиях обезвоживания, вызванного ПЭГ [13]. В нашем более раннем исследовании для гена *TaNAC69* было характерно повышение экспрессии при засухе во всех изучаемых сортаобразцах пшеницы [11]. Исходя из этих данных, можно предполагать, что ген *TaNAC69* может быть использован в качестве целевого в генной инженерии как мягкой пшеницы, так и других видов растений с целью получения засухоустойчивых форм. Однако остается неясным, насколько эффективным будет этот ген при засолении. В связи с тем, что получение полноценных трансгенных растений мягкой пшеницы является весьма трудоемкой и долгой [14], целевая конструкция с геном *TaNAC69* может быть предварительно испытана в культуре генетически трансформированных (волосовидных) корней (ВК) табака [15]. ВК образуются в результате переноса Т-ДНК клеток *Agrobacterium rhizogenes* (*Rhizobium rhizogenes*) в клетку растения-хозяина [16]. Полученные ВК генетически стабильны, а также быстро растут на безгормональной питательной среде [17] и уже ранее нами использовались в качестве удобного модельного объекта для быстрой оценки эффективности генно-инженерных конструкций в условиях засоления [15].

Целью данной работы было клонирование гена *TaNAC69* мягкой пшеницы в бинарном векторе с 35S CaMV промотором и создание ВК табака с конститутивной экспрессией гена

TaNAC69 для оценки эффективности целевой генно-инженерной конструкции в условиях засоления.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Создание генно-инженерной конструкции, несущей целевой ген TaNAC69

Геномную ДНК пшеницы мягкой сорта Московская 39 выделяли методом солевой экстракции [18]. С использованием геномной ДНК и при помощи праймеров *TaNAC69F* 5'-ATCACATCATCCAGCAGCCCACAC-3' и *TaNAC69R* 5'-CGTTCTTATCGGTCGGTCGTTTCAC-3' был амплифицирован полноразмерный ген *TaNAC69* (AY625682.1). Размер ампликона составил 1365 п.н., что соответствует открытой рамке считывания мРНК гена *TaNAC69* 1065 п.н., а также 5'-НТО (68 п.н.) и 3'-НТО (138 п.н.). Внутри гена был обнаружен только один интрон размером 94 п.н. Для "тупления" концов цепей ДНК была использована Т4 ДНК-полимераза ("NEB", США). Клонирование осуществляли по сайту рестрикции *SmaI*, который при рестрикции образует "тупые" концы. Для поиска целевых клонов с геном *TaNAC69* в смысловой ориентации при лигировании в модифицированном векторе pCambia 1301 [15] использовали праймеры 35SCambF 5'-AGAGGACCTAACAGAACTCG-3' и 1301R 5'-TGCTCTAGCATTCGCCATTTC-3'. Из целевых генно-инженерных конструкций нарабатывали специфичные ампликоны при ПЦР только в случае сочетания следующих пар праймеров: 35SCambF/*TaNAC69R*, *TaNAC69F*/1301R, а при сочетании пар 35SCambF/*TaNAC69F* и *TaNAC69R*/1301R амплификация проходила лишь в случае антисмысловой ориентации гена *TaNAC69*. После проверки полученной конструкции плазмиды pCambia 1301 с геном *TaNAC69*, находящегося под контролем 35S CaMV промотора, была выделена методом щелочного лизиса. Наличие целевого гена и промоторной последовательности также была подтверждена методом секвенирования при помощи генетического анализатора Нанофор 05 ("Синтол", Россия). Полученную плазмиду использовали для электропорации клеток *A. rhizogenes* при помощи прибора модели Micropulser ("BioRad", США).

Создание ВК табака с конститутивной экспрессией гена TaNAC69

Для генетической трансформации были использованы растения табака *Nicotiana tabacum* L. сорта Petit Havana линии SR1. При создании трансгенных ВК табака был использован стандартный метод агробактериальной трансформации

ции листовых дисков и бинарный вектор pCambia 1301, содержащий ген гигромицинфосфотрансферазы (*HPT*) и целевой ген *TaNAC69* под контролем 35S CaMV промотора. Культуры ВК табака были получены из листовых эксплантов двухмесячных растений при помощи *A. rhizogenes* штамма А4. Агробактерии предварительно выращивали на жидкой среде LB с добавлением селективных антибиотиков рифампицина (100 мг/л) и канамицина (100 мг/л). Экспланты листьев табака, растущих на почве, стерилизовали с использованием 75% раствора этилового спирта (~1 мин) и 2% раствора гипохлорита натрия (~8 мин), затем экспланты промывали стерильной дистиллированной водой 5 раз. Совместное культивирование листовых эксплантов и агробактерий проводили на стандартной твердой среде Мурасиге-Скуга (МС) (100% концентрация минеральной основы МС-среды, 14 г/л сахарозы, 60 мг/л инозитола, 2 мг/л глицина, 1 мг/л тиамина и 1 мг/л никотиновой кислоты, 7 г/л агара) в течение трех сут. при температуре +25°C, после чего листовые экспланты были промыты в жидкой МС-среде, содержащей 100 мг/л цефотаксима. Экспланты переносили на твердую МС-среду без регуляторов роста, содержащую антибиотик цефотаксим (100 мг/л) и селективный антибиотик гигромицин В (20 мг/л). Все образованные ВК отделяли от первичного экспланта фрагментами длиной 1.5–2 см и культивировали в отдельных чашках Петри с МС-средой в камере роста KBW240 (“Binder”, Германия) при температуре +25°C, в темноте. ДНК из ВК выделяли стандартным методом ЦТАБ [19]. Трансгенный статус полученных ВК доказывали при помощи ПЦР-анализа на наличие целевого гена *TaNAC69*, селективного гена *HPT* с использованием праймеров HPTF5’-GCTTCTGCGGGCGATTTGTG-3’ и HPTR 5’-GCTGCGCCGATGGTTTCTAC-3’, а также репортерного гена *uidA* с помощью праймеров GUSF 5’-TGTGGAATTGATCAGCGTTGGTG-3’ и GUSR 5’-AAGCCGACAGCAGCAAGTTTCATC-3’. Для исключения агробактериальной контаминации использовали праймеры ArhizF 5’-CCCGCACCCGATCCAAGACAAAC-TCA-3’ и ArhizR 5’-CGCCCGAAGCCTCACCC-ACGAAC-3’, которые подобраны к неаннотированному хромосомному гену *A. rhizogenes* под номером WP_034523040.

Определение содержания транскриптов целевого гена в ВК табака

Тотальную РНК из ВК выделяли при помощи ЦТАБ, первая цепь кДНК была синтезирована с использованием олиго(dT) праймера и M-MuLV обратной транскриптазы (“NEB”, США). Полуколичественную ОТ-ПЦР проводили при следующих условиях: 94°C — 1 мин,

94°C — 30 сек, 53°C — 30 сек, 72°C — 1 мин, 30 циклов и финальная элонгация 72°C — 5 мин. Для ОТ-ПЦР была использована пара праймеров TaNAC69F 5’-GATCGCCAAGTCGTGCTC-3’ и TaNAC69R 5’-ATCTCTTCCTCTTCATGC-CGTTAT-3’. В качестве референса использовали ген фактора элонгации *EF-1α* (AF120093.1), для ОТ-ПЦР применяли праймеры 5’-GAATTG-GTACTGTCCCTGTT-3’ и 5’-TTGCCAATCT-GTCCCTGAAT-3’. Фотографии агарозных гелей обрабатывали при помощи компьютерной программы TotalLab (<http://totallab.com>). Для каждого эксперимента использовали по три контрольных и опытных растения ($n = 3$).

Морфометрический анализ ВК при действии засоления

Морфометрический анализ заключался в измерении среднего прироста длины культур ВК каждые 10 сут. в течение 30 сут. при культивировании на стандартной агаризованной МС-среде. Средний прирост рассчитывали, как отношение удлинения всех корней к числу корней в выборке. Также определяли среднюю сырую и сухую массу для каждой линии ВК после 30 сут. культивирования в нормальных условиях и при действии NaCl. Для обеспечения условий засоления добавляли в питательную среду NaCl до достижения концентрации 150 мМ. Концентрация NaCl была подобрана в ходе более ранних исследований по отношению к культурам волосовидных корней табака, таким образом, чтобы она значительно (до 10 раз) замедляла рост, но вызывала гибель не более 10% образцов корней после 30 дней культивации в данной среде [15]. В качестве контроля использовали ВК табака, полученные ранее без использования бинарных векторов [15]. Для каждой линии растений было использовано по две чашки Петри, то есть выборка для каждой линии составила 10 корней ($n = 10$).

Анализ антиоксидантной системы культур ВК

Для проведения анализа изменений антиоксидантной системы в условиях засоления культуры ВК выращивали в течение 30 сут. в нормальных условиях и затем 2 сут. в условиях стрессового воздействия (150 мМ NaCl). Активность всех ферментативных систем была пересчитана на мг общего растворимого белка (ОРБ). Остальные показатели пересчитывали на 1 г сырой массы ВК. Все биохимические исследования проводили в 3 биологических повторностях ($n = 3$).

Для определения активности супероксиддисмутазы (СОД) применяли метод, основанный на способности СОД конкурировать с нитросиним тетразолием за супероксид-анионы [20].

Активность аскорбатпероксидазы (АПОК) определяли методом, основанным на определении скорости разложения перекиси водорода аскорбатпероксидазой с образованием воды и дегидроаскорбата [21]. Активность гваяколпероксидазы (ГПОК) определяли по способности полимеризации гваякола до тетрагваякола [22]. Активность каталазы (КАТ) проверяли по скорости деградации молекул перекиси водорода [23]. Количество малонового диальдегида (МДА) в навеске определяли с помощью тиобарбитуровой кислоты [24]. Метод определения пролина был основан на работе Khedr с соавт. [25]. Скорость образования супероксид-аниона (СА) определяли акцепторным методом, основанным на определении окрашенного продукта окисления адреналина – аденохрома [26]. Экстракцию перекиси водорода проводили по Chaouch с соавт. [27], измерение его содержания по Bindschedler с соавт. [28]. Общая антиоксидантная способность (ОАС) оценивалась на метанольных (80%) экстрактах по восстановлению Mo(VI) до Mo(V) при кислотном pH [29]. Активность глутатион-S-трансферазы (GST) определяли по скорости образования конъюгатов между восстановленным глутатионом и 1-хлор-2,4-динитробензолом [30]. Активность глутатионредуктазы (GR) определяли по восстановлению глутатиона в присутствии НАДФН, описанному Верлан [31]. В качестве контроля использовали ВК табака, полученные ранее без использования бинарных векторов [15].

Результаты всех исследований представлены в виде гистограмм со средними значениями выборки. Планками погрешности обозначали стандартную ошибку среднего ($M \pm \text{SEM}$). Достоверность различий во всех экспериментах оценивали при помощи *U*-критерия Манна-Уитни ($P \leq 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Клонирование гена *TaNAC69*, получение ВК табака и определение содержания в них транскриптов целевого гена

Участок ДНК *T. aestivum* сорта Московская 39, содержащий ген *TaNAC69* с небольшими участками нетранслируемых областей, был амплифицирован на матрице геномной ДНК и его размер составил 1365 п.н. Данный ампликон был клонирован в бинарном векторе pCambia 1301 под контролем конститутивного 35S CaMV промотора. По результатам секвенирования клонированного гена *TaNAC69* нуклеотидных замен в его кодирующей части не обнаружено.

Для получения ВК табака *N. tabacum* был использован метод агробактериальной трансформации. ВК индуцировали на листовых эксплантах на 10 сут. после инокуляции агробактериями. Для селекции трансгенных ВК добавляли в МС-сре-

ду гигромицин В. При прорастании на 1.5–2 см, ВК отделяли от первичного экспланта и пересаживали на МС-среду без добавления фитогормонов. Биомассу корней наращивали в течение 2 нед., после чего проводили ПЦР-анализ на наличие целевого (*TaNAC69*), селективного (*HPT*) и репортерного (*uidA*) генов. Также с использованием метода ПЦР с праймерами ArhizF/ArhizR исключали ВК, несущие агробактериальную контаминацию. В результате было отобрано 6 линий трансгенных корней, содержащих все три анализируемых гена, которые получили номера 10, 17, 18, 20, 21 и 22. Далее в этих линиях корней было определено содержание транскриптов гена *TaNAC69* по отношению к содержанию транскриптов гена *EF-1α*. По содержанию транскриптов целевого гена линии ВК табака составили следующий ряд: Л17 > Л18 > Л22 > Л21 > Л20 > Л10 (рис. 1), в котором наибольший уровень экспрессии целевого гена был характерен для линии 17, а наименьший для линии 10.

Морфометрический анализ ВК табака, несущих ген *TaNAC69* при норме и засолении

Для морфометрического анализа в каждую чашку Петри диаметром 10 см со МС-средой раскладывали отрезки ВК длиной 1 см по 5 штук и проводили измерения их прироста через каждые 10 сут. (рис. 2).

При нормальных условиях в первые 10 сут. большинство линий трансгенных ВК опережали в росте контрольные ВК (рис. 3а). Через 20 сут. лишь у линий 17, 21, 22 корни опережали в росте контроль (рис. 3б). При третьем измерении уже лишь у линий 21 и 22 корни опережали в росте контроль (рис. 3в). Корни линий 10, 18, 20 наоборот достоверно уступали в приросте контрольным ВК как при втором, так и при третьем измерениях (рис. 3г, в). При засолении в первые 10 сут. все трансгенные ВК, кроме линии 20,

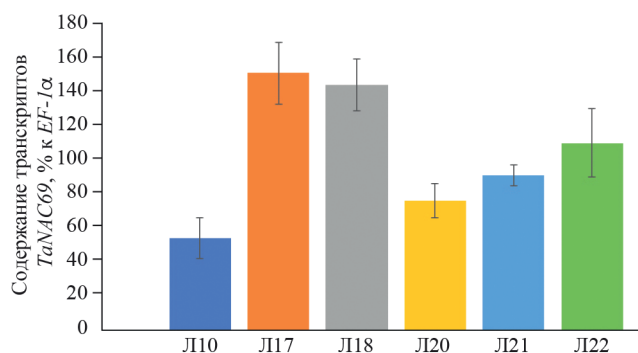


Рис. 1. Содержание транскриптов гена *TaNAC69* в волосовидных корнях табака в % к референсному гену *EF-1α*. Л10–Л22 – линии волосовидных корней, несущих ген *TaNAC69*.

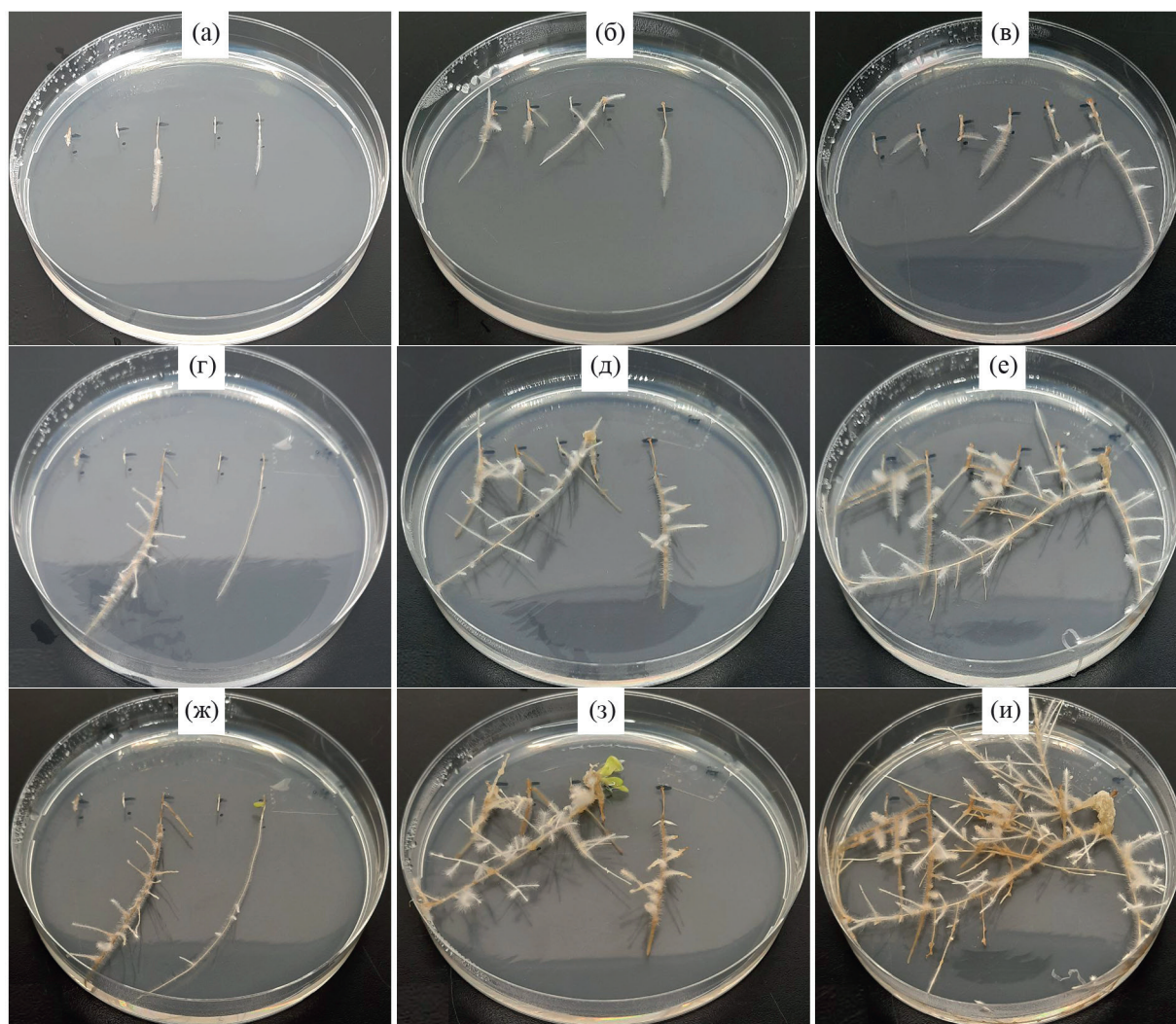


Рис. 2. Внешний вид исследуемых ВК при действии 150 мМ NaCl: контрольные ВК без гена *TaNAC69* через 10 (а), 20 (г) и 30 (ж) сут. после начала опыта; трансгенные ВК с геном *TaNAC69* линии 21 через 10 (б), 20 (д) и 30 (з) сут. после начала опыта; трансгенные ВК с геном *TaNAC69* линии 22 через 10 (в), 20 (е) и 30 (и) сут. после начала опыта. В работе использованы чашки Петри диаметром 10 см.

опережали в росте контрольные ВК (рис. 2а, б, в; рис. 3а). При втором измерении все линии трансгенных ВК росли быстрее контрольных ВК (рис. 2г, д, е; рис. 3б). Через 30 сут. также все линии трансгенных ВК опережали в росте контрольные ВК (рис. 2ж, з, и; рис. 3в).

Наиболее интенсивный рост был характерен для линий 17, 18, 21 и 22. Наименьшие темпы роста показали ВК линий 10 и 20. Необходимо отметить, что во всех трех измерениях также наблюдали гораздо большую разветвленность трансгенных ВК по сравнению с контролем (рис. 2). Далее у тех же линий корней измеряли финальную сырую (рис. 4а) и сухую (рис. 4б) массы через 30 сут. культивирования при норме и действии стрессового фактора. Наибольшая сырая и сухая масса при нормальных условиях была характерна для линий 17, 21 и 22 (рис. 4а, б). Наименьшая сырая и сухая масса корней при норме

обнаруживалась у линий 10 и 20 (рис. 4а, б). При засолении наибольшая сырая и сухая масса также были характерны для линий 17, 21 и 22 (рис. 4а, б).

Анализ компонентов антиоксидантной системы культур ВК

Для проведения анализа антиоксидантной системы культур ВК, отобранные линии наращивали на орбитальном шейкере-инкубаторе в жидкой МС-среде в течение 30 сут. 1 раз в 2 нед. обновляли МС-среду с добавлением антибиотика цефотоксима (250 мг/л). После чего ВК были помещены в жидкую МС-среду со 150 мМ NaCl на 2 сут. Контрольные ВК культивировали 2 сут. в стандартной жидкой МС-среде без добавлений NaCl. После этого проводили биохимический анализ ВК. Выбор этого времени экспозиции обусловлен с предположением, что в первые

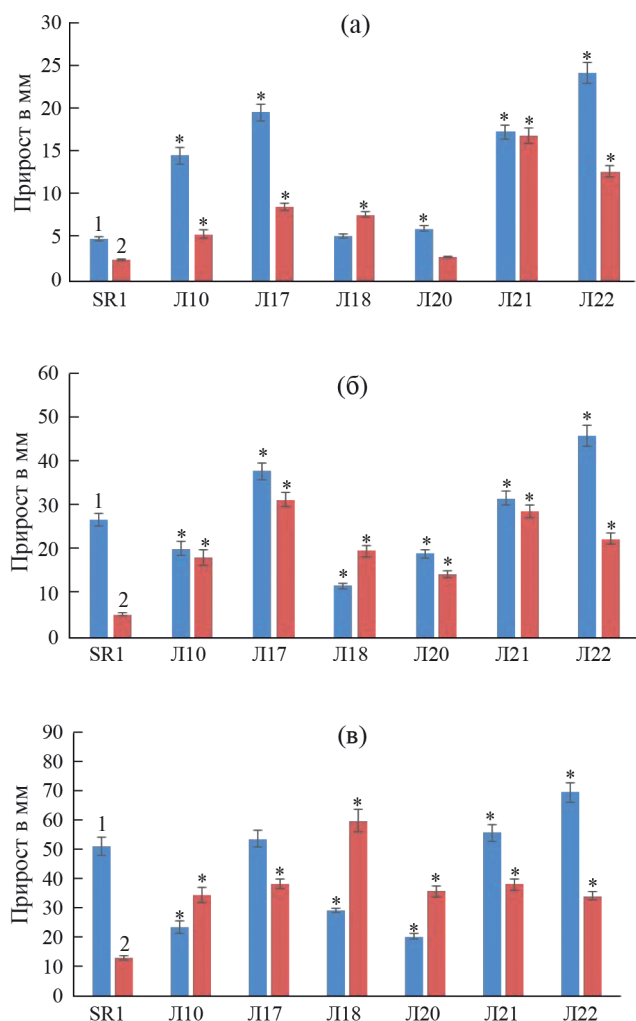


Рис. 3. Средний прирост ВК табака при норме и действии 150 мМ NaCl: (а) — через 10 сут. после начала опыта; (б) — через 20 сут. после начала опыта; (в) — через 30 сут. после начала опыта. 1 — при нормальных условиях, 2 — при действии 150 мМ NaCl. Звездочки (*) указывают на достоверное различие данных между трансгенными и контрольной линиями ВК ($P \leq 0.05$).

сутки ВК испытывают довольно сильный стресс, тогда как на вторые сутки должны включиться адаптивные механизмы, в том числе, путем активации антиоксидантной системы, основные параметры которого и были изучены.

При нормальных условиях активность каталазы была выше контроля у линий 17, 18 и 22, а ниже — у линии 10 (рис. 5а). При засолении активность каталазы у трансгенных ВК была ниже, чем у контрольных ВК (рис. 5а). Активность ГПОК при нормальных условиях была выше, чем у контроля только в линиях 17 и 18 (рис. 5б). При засолении у большинства линий трансгенных ВК активность ГПОК была выше, чем в контроле (рис. 5б). Наибольшая активность ГПОК при засолении была характерна для линий 17, 21, 22. Содержание перекиси водорода у трансгенных ВК было существенно ниже, чем в контроле, причем как при нормальных условиях, так и при засолении (рис. 5в).

Активность СОД у большинства линий трансгенных ВК была ниже, чем в контроле как при нормальных условиях, так и при действии засоления (рис. 5г). У всех трансгенных ВК при норме была выше активность GST (рис. 5д). При засолении также почти у всех линий трансгенных ВК (кроме линии 18) была увеличена активность GST (рис. 5д). Общая антиоксидантная способность у трансгенных ВК была выше, чем у контрольных ВК как при норме, так и при засолении (рис. 5е). По содержанию пролина при нормальных условиях лишь линии 18 и 22 достоверно превышали значения контроля (рис. 5ж). При засолении во всех линиях трансгенных ВК было обнаружено гораздо большее содержание пролина, чем в контрольных ВК (рис. 5ж). Больше всего пролина содержали ВК линий 21 и 22. При нормальных условиях в трансгенных ВК наблюдали большее содержание водорастворимых сахаров (ВРС) (рис. 5з). При действии засоления лишь у линий 18 и 22 было большее содержание ВРС

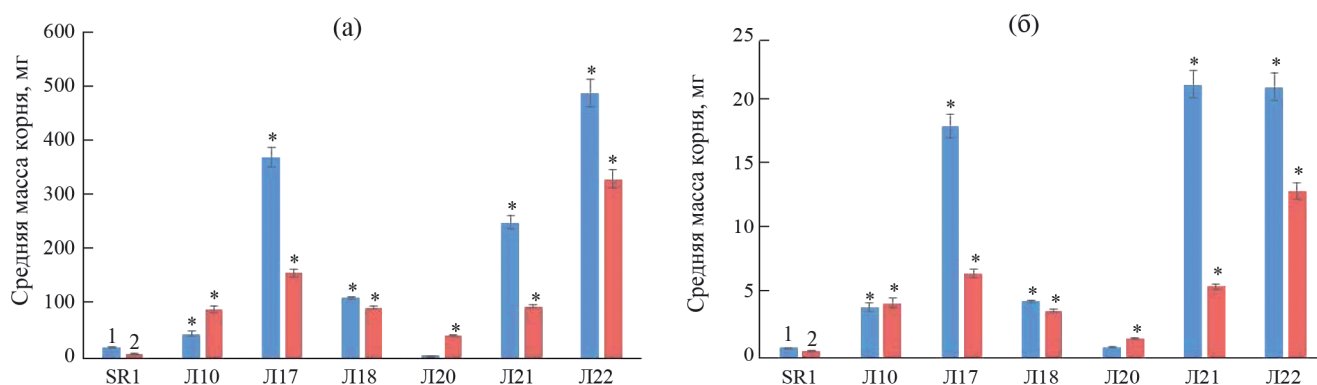


Рис. 4. Сырая (а) и сухая (б) масса волосовидных корней при норме и действии 150 мМ NaCl. 1 — при нормальных условиях, 2 — при действии 150 мМ NaCl. Звездочки (*) указывают на достоверное различие данных между трансгенными и контрольными линиями ВК ($P \leq 0.05$).

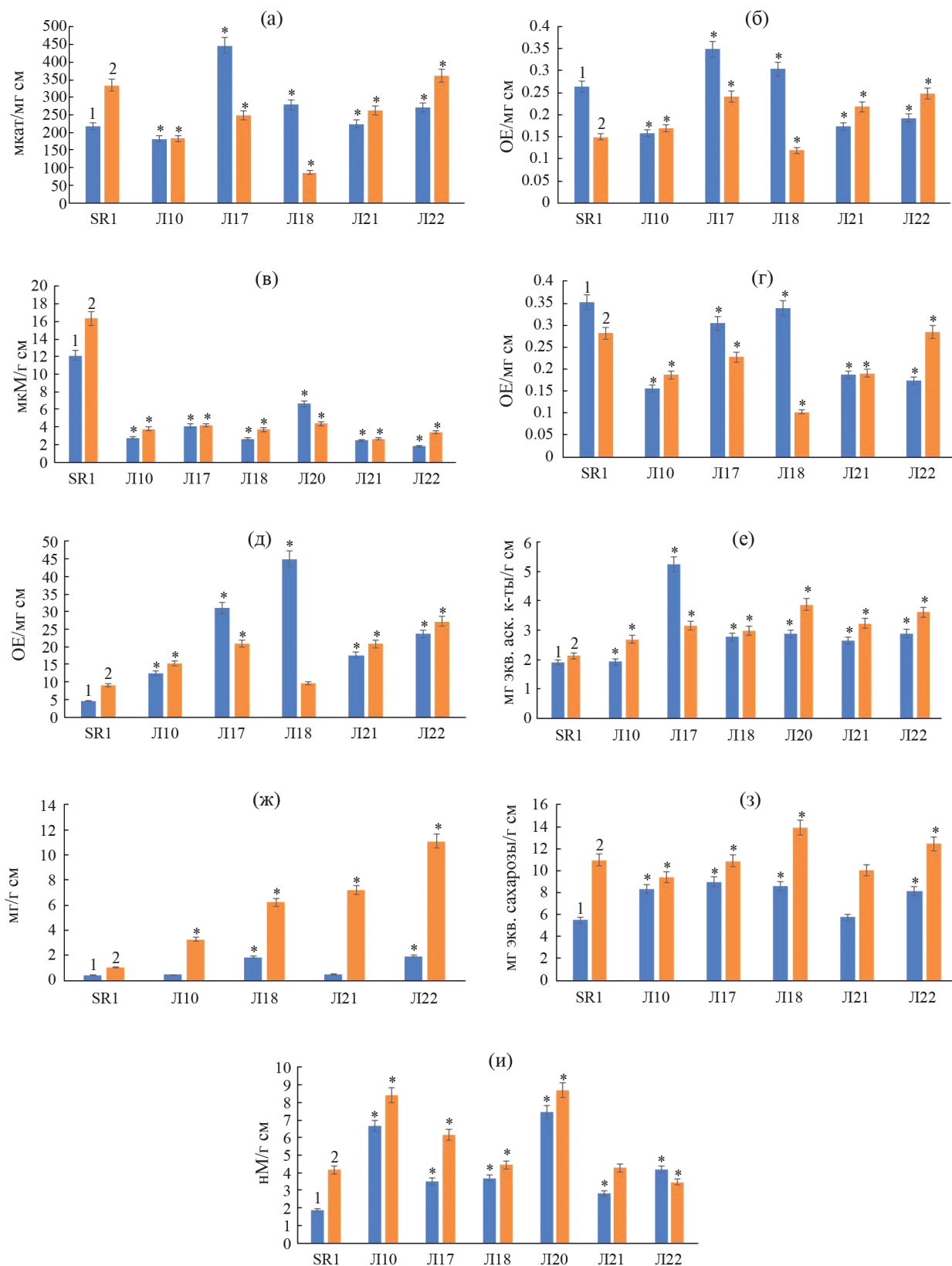


Рис. 5. Состояние антиоксидантной системы анализируемых ВК: (а) – активность каталазы, (б) – активность гваяколпероксидазы, (в) – содержание перекиси водорода, (г) – активность супероксиддисмутазы, (д) – активность глутатион-S-трансферазы, (е) – общая антиоксидантная способность, (ж) – содержание пролина, (з) – содержание водорастворимых сахаров, (и) – содержание малонового диальдегида. SR1 – контроль, Л10–Л22 – линии трансгенных ВК с геном *TaNAC69*, 1 – нормальные условия, 2 – при действии 150 мМ NaCl. Звездочки (*) указывают на достоверное различие данных между трансгенными и контрольной линиями ВК ($P \leq 0.05$).

по сравнению с контролем (рис. 5з). Наибольшее содержание ВРС при засолении было зафиксировано для линий 18 и 22. Вопреки ожиданиям нам не удалось зафиксировать меньшее содержание МДА в трансгенных ВК. Наоборот, как при норме, так и при засолении большинство линий трансгенных ВК содержали больше МДА, чем контрольные ВК (рис. 5и). Наибольшее содержание МДА было характерно для линий 10 и 20, причем как при норме, так и при засолении. Наименьшее содержание МДА при засолении было зафиксировано для линий 18 и 22 трансгенных ВК.

ОБСУЖДЕНИЕ

Ген *TaNAC69* кодирует один из важнейших транскрипционных факторов семейства NAC, запускающих каскад реакций стрессоустойчивости через активацию многих защитных генов [11]. Выбор для генно-инженерных манипуляций гена *TaNAC69* обусловлен тем, что его продукт позитивно влияет на устойчивость как к засухе, так и к холоду [12]. Наши предыдущие исследования также показали, что уровень экспрессии этого гена повышается как при засухе, так и при гипотермии [11]. Как известно, эти два стрессовых фактора являются наиболее актуальными не только для России, но и для всего мира. Ранее ген *TaNAC69* был использован для генетической трансформации пшеницы, причем была применена генная конструкция специфичная для однодольных с ячменным промотором [13]. Трансгенные растения пшеницы характеризовались повышением устойчивости к обезвоживанию, а также были зафиксированы лучшие, чем у контроля, параметры роста побега при умеренном засолении. В настоящей работе нами была создана более универсальная генная конструкция с вирусным 35S CaMV промотором, которая может быть использована как при трансформации двудольных, так и однодольных растений. В то же время было неизвестно, будет ли проявлять свою специфическую активность продукт гена *TaNAC69* в клетках двудольных растений. Исходя из вышесказанного, целью настоящего исследования было как создание целевой генной конструкции, так и его испытание на модельной системе ВК табака. При выращивании ВК в качестве стресс-фактора использовали засоление, так как ранее о позитивном влиянии на рост корней продукта гена *TaNAC69* при засолении не сообщалось.

Наиболее высокий уровень экспрессии гена *TaNAC69* был характерен для ВК линий 17, 18, 21 и 22 (рис. 1). Исходя из этого, можно было предполагать, что в этих линиях функция целевого гена будет выражена в большей степени, чем в линиях 10 и 20. Морфометрический анализ показал, что наиболее высокие темпы роста

как при норме, так и при засолении имели корни линий 17, 18, 21 и 22 (рис. 3, 4). То есть обнаруживалась явная зависимость параметров роста и стрессоустойчивости ВК от уровня экспрессии целевого гена. В то же время необходимо отметить, что лидером по уровню экспрессии гена *TaNAC69* была линия 17, а по результатам морфометрического анализа – линия 22. То есть точной корреляции между уровнем экспрессии и параметрами роста не наблюдалось, что вполне ожидаемо в связи с тем, что каждая линия ВК отличается друг от друга местом встройки, а также нередко и количеством копий Т-ДНК в геноме и потому каждая из этих линий отличается друг от друга по многим параметрам.

Ранее было показано, что сверхэкспрессия *TaNAC2* способствует повышению устойчивости к засолению у трансгенных растений *A. thaliana*, что было доказано в результате их морфометрического анализа при действии NaCl [32]. Ген *TaNAC69* также ранее использовался для генетической трансформации, но мягкой пшеницы [13] и полученные растения характеризовались улучшением роста побега при умеренном засолении. Новизна нашей работы заключается в том, что ген *TaNAC69* испытывается в гетерологической системе при засолении в корнях и впервые исследуется его влияние на компоненты антиоксидантной системы. Результаты проведенного исследования показывают, что пшеничный ген *TaNAC69* может быть использован для повышения стрессоустойчивости не только у однодольных, но и двудольных растений.

Явным отличием трансгенных ВК от контрольных было гораздо более низкое содержание перекиси водорода как при норме, так и при засолении (рис. 5в). Одним из вероятных механизмов снижения содержания перекиси водорода может быть выявленное увеличение активности ГПОК (рис. 5б), в то время как у трансгенных ВК не фиксировалось повышение активности каталазы (рис. 5а). Но при нормальных условиях в отличие от условий засоления у трансгенных ВК активность ГПОК не была выше, чем у контрольной линии. Это означает, что в снижении содержания перекиси водорода у трансгенных ВК вероятнее всего задействованы и другие механизмы. Конститутивная экспрессия гена *TaNAC69* не оказывала существенного влияния на активность СОД при нормальных условиях. При засолении трансген оказывал негативный эффект на активность СОД (рис. 5г). Почти у всех линий трансгенных ВК была повышена активность GST, причем как при норме, так и при засолении (рис. 5д). ОАС тоже почти во всех линиях трансгенных ВК была выше, чем в контроле как при норме, так и при засолении (рис. 5е). Наиболее ярким отличием трансгенных ВК было существенно большее содержание пролина при засо-

лении (рис. 5ж). Многие трансгенные ВК также характеризовались более высоким содержанием ВРС, по сравнению с контролем как при норме, так и при засолении (рис. 5з). Вопреки ожиданиям, в трансгенных ВК не удалось зафиксировать уменьшения содержания МДА по сравнению с контролем (рис. 5и). Наоборот, в трансгенных ВК как при норме, так и при засолении содержание МДА было больше, чем в контроле. Большее накопление МДА в данном случае может объясняться более высокими темпами роста трансгенных ВК, по сравнению с контрольной линией. То есть можно предположить, что более быстрые темпы роста при засолении могут быть сопряжены также большей степенью окислительного повреждения мембран. Похожие данные были ранее получены на примере трансгенных растений с генами ксилоглюканэндотрансгликозилаз, у которых корни также росли быстрее в условиях засоления, но характеризовались большим накоплением МДА, чем контрольные растения [33].

Сравнение результатов биохимического анализа разных линий показывает, что наибольшая активность ГПОК и GST, а также наибольшее содержание пролина и ВРС при засолении было характерно для линий 17, 21 и 22 (рис. 5б, д, ж, з). Наиболее высокая ОАС также была характерна для линий 17, 21 и 22 (рис. 5е). Любопытно отметить, что хотя содержание МДА было больше у трансгенных ВК, чем у контрольных, наименьшее его содержание при засолении было характерно для линий 18, 21 и 22. Причем для линий 21 и 22 были характерны и другие позитивные изменения в состоянии антиоксидантной системы. Линия 18 также показывала высокие значения по результатам морфометрии и ряд позитивных изменений в антиоксидантной системе.

Таким образом, для линий ВК 17, 21 и 22, у которых был наиболее высокий уровень экспрессии гена *TaNAC69* также наблюдали наиболее высокие темпы роста, большую солеустойчивость, а также ряд позитивных изменений в компонентах антиоксидантной системы. Исходя из наших данных можно полагать, что продукт гена *TaNAC69* оказывает позитивный эффект на рост и солеустойчивость ВК, в том числе, через позитивное влияние на активности ферментов ГПОК и GST, на содержание пролина и ВРС, а также через повышение ОАС. Ранее также была обнаружена взаимосвязь накопления пролина в листьях пшеницы с повышением уровня экспрессии гена *TaNAC69* [11]. Полученные нами данные говорят о функциональной активности продукта гена *TaNAC69* в клетках двудольных растений.

Таким образом, конструкция гена *TaNAC69* с 35S CaMV промотором может быть рекомендована для генетической трансформации культурных растений с целью увеличения их продуктивности и устойчивости к абиотиче-

ским стресс-факторам. С учетом наших и литературных данных можно предположить, что у трансгенных растений с конститутивной экспрессией гена *TaNAC69* может быть повышена устойчивость к засухе, холоду и засолению.

Работа выполнена при поддержке Государственного задания (№ 122030200143-8 для Ибрагимовой З.А., Мусина Х.Г. и Заикиной Е.А.), и при поддержке гранта Министерства Образования и Науки РФ (№ 075-15-2021-1066, для Галимовой А.А. и Кулуева Б.Р.).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием животных и людей в качестве объектов исследований. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abbasi G.H., Akhtar J., Ahmad R., Jamil M., Anwar-Ul-Haq M., Ali S., Ijaz M. Potassium application mitigates salt stress differentially at different growth stages in tolerant and sensitive maize hybrids // Plant Growth Regul. 2015. V. 76. P. 111. <https://doi.org/10.1007/s10725-015-0050-1>
2. Zhang X., Liu P., Qing C., Yang C., Shen Y., Ma L. Comparative transcriptome analyses of maize seedling root responses to salt stress // Peer J. 2021. V. 9. e10765. <https://doi.org/10.7717/peerj>
3. Wang M., Wang Y., Zhang Y., Li C., Gong S., Yan S., Li G., Hu G., Ren H., Yang J., Yu T., Yang K. Comparative transcriptome analysis of salt-sensitive and salt-tolerant maize reveals potential mechanisms to enhance salt resistance // Genes Genomics. 2019. V. 41. P. 781. <https://doi.org/10.1007/s13258-019-00793-y>
4. Liu B., Soundararajan P., Manivannan A. Mechanisms of silicon-mediated amelioration of salt stress in plants // Plants. 2019. V. 8. P. 307. <https://doi.org/10.3390/plants8090307>
5. Luo M., Zhao Y., Wang Y., Shi Z., Zhang P., Zhang Y., Song W., Zhao J. Comparative proteomics of contrasting maize genotypes provides insights into salt-stress tolerance mechanisms // J. Proteome Res. 2018. V. 17. P. 141.
6. Zhang Z., Zhang J., Chen Y., Li R., Wang H., Wei J. Genome-wide analysis and identification of HAK potassium transporter gene family in maize (*Zea mays* L.) // Mol. Biol. Rep. 2012. V. 39. P. 8465. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-1700-2>
7. Jha U.C., Bohra A., Jha R., Parida S.K. Salinity stress response and 'omics' approaches for improving salinity stress tolerance in major grain legumes // Plant Cell Rep. 2019. V. 38. P. 255. <https://doi.org/10.1007/s00299-019-02374-5>
8. Kashyap M., Ford R., Bohra A., Kuvalekar A., Mantri N. Improving salt tolerance of chickpea using modern genomics tools and molecular breeding // Curr. Genom. 2017. V. 18. P. 557. <https://doi.org/10.2174/1389202918666170705155252>

9. Senapati N., Stratonovitch P., Paul M.J., Semenov M.A. Drought tolerance during reproductive development is important for increasing wheat yield potential under climate change in Europe // J. Exp. Bot. 2018. V. 70. P. 2549. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery226>
10. Заикина Е.А., Румянцев С.Д., Сарварова Е.Р., Кулуев Б.Р. Гены транскрипционных факторов, задействованных в ответе растений на абиотические стрессовые факторы // Экологическая генетика. 2019. Т. 17. № 3. С. 47. <https://doi.org/10.17816/ecogen17347-58>
11. Заикина Е.А., Мусин Х.Г., Кулуев А.Р., Никонов В.И., Дмитриев А.М., Кулуев Б.Р. Изменение активности генов транскрипционных факторов *TANAC69*, *TADREB1*, *TABZIP60* у растений мягкой пшеницы при водном дефиците и гипотермии // Физиология растений. 2022. Т. 69. С. 327. <https://doi.org/10.31857/S0015330322030186>
12. Xue G.G., Bower N.N., McIntyre C.C., Riding G.G., Kazan K., Shorter R. TaNAC69 from the NAC superfamily of transcription factors is up-regulated by abiotic stresses in wheat and recognizes two consensus DNA-binding sequences // Funct. Plant Biol. 2006. V. 33. P. 43. <https://doi.org/10.1071/FP05161>
13. Xue G.G., Way H., Richardson T., Drenth J., Joyce P.A., McIntyre C.L. Over expression of *TaNAC69* leads to enhanced transcript levels of stress up-regulated genes and dehydration tolerance in bread wheat // Mol. Plant. 2011. V. 4. P. 697. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr013>
14. Вербицкая А.А., Иванова А.С., Царькова Е.А., Мишуткина Я.В., Гапоненко А.К. Агробактериальная трансформация продуктивных сортов яровой мягкой пшеницы российской селекции // Естественные и технические науки. 2022. № 1. С. 63. <https://doi.org/10.25633/ETN.2022.01.04>
15. Мусин Х.Г., Гумерова Г.Р., Баймухаметова Э.А., Кулуев Б.Р. Рост и стрессоустойчивость волосовидных корней табака с конститутивной экспрессией гена *ARGOS-LIKE* // Физиология растений. 2022. Т. 69. С. 490. <https://doi.org/10.31857/S0015330322050153>
16. Bahramnejad B., Naji M., Bose R., Jha S. A critical review on use of *Agrobacterium rhizogenes* and their associated binary vectors for plant transformation // Biotechnol. Adv. 2019. V. 37. P. 107405. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.06.004>
17. Sun J., Ma L., San K.Y., Peebles C.A. Still stable after 11 years: A *Catharanthus roseus* hairy root line maintains inducible expression of anthranilate synthase // Biotechnol. Progr. 2017. V. 33. P. 66. <https://doi.org/10.1002/btpr.2403>
18. Aljanabi S.M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high-quality genomic DNA for PCR-based techniques // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. P. 4692. <https://doi.org/10.1093/nar/25.22.4692>
19. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // Phytochem. Bull. 1987. V. 19. P. 11.
20. Чевари С., Чаба И., Секей И. Роль супероксид-дисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах // Лабораторное дело. 1985. № 11. С. 578.
21. Verma S., Dubey R.S. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alter the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants // Plant Sci. 2003. V. 64. P. 645. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00022-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00022-0)
22. Ермаков А.И., Арисимович В. В., Ярош Н.П., Пегуански Ю.В., Луковникова Г.А. Иконникова М.И. Методы биохимического исследования растений // Ленинград: Агропромиздат. 1987. 430 с.
23. Panchuck I.I., Volkov R.A., Schoff F. Heat stress and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis* // Plant Physiol. 2002. V. 129. P. 838. <https://doi.org/10.1104/pp.001362>
24. Taylor N.L., Millar A.H. Oxidative stress and plant mitochondria // Meth. Mol. Biol. 2007. V. 372. P. 389. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-365-3_28
25. Khedr A.H.A., Abbas M.A., Abdel W.A.A., Quick W.P., Abogadallah G.M. Proline induces the expression of salt-stress responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancreaticum maritimum* L. to salt-stress // J. Exp. Bot. 2003. V. 54. P. 2553. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg277>
26. Minibayeva F.V., Kolesnikov O.P., Gordon L.K. Contribution of a plasma membrane redox system to the superoxide production by wheat root cells // Protoplasma. 1998. V. 205. P. 101. <https://doi.org/10.1007/BF01279299>
27. Chaouch S., Queval G., Vanderauwera S., Mhamdi A., Vandenborre M., Langlois-Meurinne M., Breusegem F., Saindrenan P., Noctor G. Peroxisomal hydrogen peroxide is coupled to biotic defense responses by ISOCHORISMATE SYNTHASE1 in a daylength-related manner // Plant Physiol. 2010. V. 153. P. 1692. <https://doi.org/10.1104/pp.110.153957>
28. Bindschedler L.V., Minibayeva F., Gardner S.L., Gerish C., Davies D.R., Bolwell G.P. Early signalling events in the apoplastic oxidative burst in suspension cultured French bean cells involve cAMP and Ca²⁺ // New Phytol. 2001. V. 151. P. 185. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2001.00170.x>
29. Boestfleisch C., Wagenseil N.B., Buhmann A.K., Seal C.E., Wade E.M., Muscolo A., Papenbrock J. Manipulating the antioxidant capacity of halophytes to increase their cultural and economic value through saline cultivation // AoB Plants. 2014. V. 13. P. 6. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plu046>
30. Habig W.H., Pabst M.S., Jakoby W.B. Glutathione-S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation // J. Biol. Chem. 1974. V. 246. P. 7130. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42083-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42083-8)
31. Верлан Н.В. Клинико-фармакологический анализ состояния системы глутатиона при церебральной ишемии. Дис. ... док. мед. наук. Москва: ЦНМБ ММА им. И.М. Сеченова 2008. 210 с.

32. Mao X., Zhang H., Qian X., Li A., Zhao G, Jing R. TaNAC2, a NAC-type wheat transcription factor conferring enhanced multiple abiotic stress tolerances in Arabidopsis // J. Exp. Bot. 2012. V. 63. P. 2933.
<https://doi.org/10.1093/jxb/err462>
33. Бережнева З.А., Мусин Х.Г., Кулуев Б.Р. Рост корней трансгенных растений табака со сверхэкспрессией генов экспансинов и ксилоглюканэндо-трансгликозилаз в условиях кадмиевого стресса // Физиология растений. 2022. Т. 69. С. 522.
<https://doi.org/10.31857/S0015330322050037>

Информация об авторах

Ибрагимова Зарина Азадовна, г. Уфа, ул. Проспект октября, 71, +7(347)235-61-00,
i.zibragimova@yandex.ru

Галимова Айзиля Айтугановна, г. Уфа, ул. Проспект октября, 71, +7(347)235-61-00,
aiz.galimova@yandex.ru

Мусин Халит Галеевич, г. Уфа, ул. Проспект Октября, 71, +7(347)2356100, mg@khalit.ru

Ямалеева Анна Александровна, г. Уфа, ул. Заки Валиди, 32, +7(347) 229-96-71,
biohim-biotekh@yandex.ru

Заикина Евгения Александровна, г. Уфа, ул. Проспект октября, 71, +7(347)235-61-00,
evisheva@yandex.ru

Кулуев Булат Разяпович, г. Уфа, ул. Проспект Октября, 71, +7(347)2356100, kuluev@bk.ru

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕТЕРОЛОГИЧНОЙ $\Delta 9$ -ДЕСАТУРАЗЫ НА ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ РАСТЕНИЙ ТОМАТОВ

© 2024 г. И. Г. Миловская^a, Н. В. Варламова^b, А. Ю. Стариков^a,
Д. В. Демиденко^b, О. С. Павленко^{a, b}, А. А. Тюрин^a, Д. С. Соболев^a,
Л. В. Куренина^b, И. В. Голденкова-Павлова^{a, *}, М. Р. Халилуев^{b, c}

^aФедеральное государственное бюджетное учреждение науки институт физиологии растений
им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

^bФедеральное государственное бюджетное научное учреждение “Всероссийский научно-исследовательский
институт сельскохозяйственной биотехнологии”, Москва, Россия

^cФедеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
“Российский государственный аграрный университет — МСХА им. К.А. Тимирязева”, Москва, Россия
*e-mail: irengold58@gmail.com

Поступила в редакцию 20.03.2024 г.

После доработки 06.04.2024 г.

Принята к публикации 15.04.2024 г.

В данной работе мы исследовали возможность модификации жирнокислотного (ЖК) состава листьев томата (*Solanum lycopersicum* L.) за счет введения в его геном гена $\Delta 9$ ацил-липидной десатуразы цианобактерии (*Synechococcus vulcanus* C.). Для получения трансгенных растений томата, экспрессирующих десатуразу цианобактерии (*desC*), и оценки влияния данной десатуразы на ЖК-состав суммарных липидов были сконструированы вектора, несущие ген *desC*. Последовательность гена была слита с лидерными последовательностями, обеспечивающими локализацию белкового продукта в хлоропластах, эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) или цитоплазматической мембране. Полученными векторами трансформировали штамм *A. tumefaciens* AGL0 для последующей агробактериальной трансформации растений томатов. ЖК анализ листьев показал, что для некоторых линий при локализации *desC* в цитоплазматической мембране или мембране ЭПР наблюдается увеличение содержания C16:1 и C16:2 жирных кислот. Для данных линий показано увеличение относительной представленности транскрипта *desC* по сравнению с трансгенными линиями, не показавшими изменения ЖК-состава. Полученные данные могут быть использованы для разработки стратегий направленной модификации жирнокислотного состава томатов.

Ключевые слова: *Solanum lycopersicum*, *Synechococcus vulcanus*, агробактериальная трансформация, $\Delta 9$ -десатураза, жирнокислотный состав.

DOI: 10.31857/S0015330324050089, EDN: MMENWN

ВВЕДЕНИЕ

Десатуразы жирных кислот (ЖК) — это ферменты, катализирующие превращение одинарной связи между атомами углерода в ацильных

цепях (C-C) в двойные связи (C=C). Десатуразы относятся к оксидазам со смешанной функцией, и для катализа им необходимы два электрона, донорами которых могут служить НАДФН или НАДН в зависимости от локализации десатуразы [1]. Все известные десатуразы в зависимости от формы, в которой находится ЖК, подвергающаяся окислению, делятся на три типа: ацилCoA- (используют ЖК, связанную с ацетил-CoA), ацил-АПБ- (используют ЖК, связанную с ацилпереносящим белком) и ацил-липидные десатуразы (используют ЖК в составе фосфолипидов). При этом первые два типа являются раствори-

Сокращения: АПБ — ацилпереносящий белок, ЖК — жирная кислота, ЖК-состав — жирнокислотный состав, Км — канамицин, НЖК — ненасыщенные жирные кислоты, ФК — фосфатидная кислота, ФХ — фосфатидилхолин, ЦПМ — цитоплазматическая мембрана, ЭПР — эндоплазматический ретикулум, ACBP — acyl-CoA binding protein, EGFP — enhanced green fluorescent protein, FAD — fatty acid desaturase, RIM — root inducing medium.

мыми ферментами, а ацил-липидные десатуразы — мембраносвязанными. У растений функционируют ацил-АПБ (располагаются только в пластидах, растворимые) и ацил-липидные (тип I — в ЭПР, тип II — в пластидах, мембраносвязанные) десатуразы [1]. В отличие от растворимых ацил-АПБ десатураз, ацил-липидные десатуразы расположены в мембране и имеют консервативные гидрофобные области. Второй важной особенностью мембранных десатураз, отличающих их от растворимых форм, является наличие трех консервативных гистидиновых кластеров, участвующих в формировании активного центра.

У высших растений процессы десатурации жирных кислот проходят в двух клеточных компартментах: пластидах и ЭПР. Путь, протекающий в пластидах, называют “прокариотическим”, в ЭПР — “эукариотическим”. Синтез жирных кислот начинается в пластидах и приводит к образованию пальмитиновой (C16:0) и стеариновой (C18:0) кислот. Далее образовавшиеся кислоты могут стать субстратом для десатураз, вводящих двойные связи и продуцирующие ненасыщенные жирные кислоты (НЖК). “Прокариотический” путь образования ненасыщенных ЖК осуществляется полностью в пластидах. C16:0 и C18:0 кислоты конъюгируют с глицерин-3-фосфатом, в результате чего образуется фосфатидная кислота (ФК). ФК является субстратом для действия ω -6 FAD6 и ω -3 FAD7 или FAD8 десатураз, которые синтезируют C18:2(Δ 9, 12) и C18:3(Δ 9, 12, 15) НЖК соответственно [2]. “Эукариотический” путь образования НЖК протекает со сменой компартментов, в которых находятся ЖК на различных этапах процессинга. Поскольку синтаза жирных кислот работает только в пластидах, а десатурация “эукариотического” типа происходит в ЭПР, стартовые вещества десатурации должны быть транспортированы из одного компартмента в другой. C16-кислота транспортируется в насыщенной форме, C18-кислота должна быть подвергнута десатурации по Δ 9-положению (с помощью фермента SSI2, являющегося растворимой ацил-АПБ-десатуразой и не задействованного в прокариотическом пути) и только потом может быть транспортирована из пластида. Предполагается, что ЖК могут самостоятельно диффундировать в межмембранное пространство, или могут быть транспортированы при участии переносчиков семейства FAX. Переносчиками из межмембранного пространства в цитоплазму предположительно могут являться длиноцепочечные ацил-СоА-синтазы, локализованные во внешней мембране пластида. Активированная ЖК, перенесенная в цитоплазму с помощью этих ферментов, транспортируется в ЭПР посредством ацил-СоА связывающего белка (ACBP — Acyl-CoA-binding protein). На мембране ЭПР остаток

ЖК из ацил-СоА, переносимый ACBP, участвует в синтезе фосфатидилхолина (ФХ) — основного транспортера ЖК в ЭПР. Помимо вышеописанного способа, C18:1 и C16:0 ЖК могут быть транспортированы из пластида в ЭПР напрямую, минуя цитоплазму, в местах контакта мембран двух органелл. Перенос при этом осуществляется через ФХ. Перенесенные в ЭПР ЖК подвергаются десатурации с помощью ω -6 FAD2 и ω -3 FAD3. Образованные ПНЖК могут транспортироваться посредством ФХ или ФК обратно в пластиды или к цитоплазматической мембране. При этом на мембране пластида в связывании и переносе ФК участвуют три белка: TGD1-3 (транспортер внешней мембраны хлоропласта), TGD4 (транспортер внутренней мембраны) и TGD5 (белок, расположенный в межмембранном пространстве и связывающий TGD1-3 и TGD5) [3]. Транспорт ЖК из ЭПР к плазматической мембране может осуществляться через прямой контакт мембран посредством везикул либо за счет белковых переносчиков. Так, ACBP1 и ACBP2 имеют домены связывания с ЭПР и плазмалеммой и выполняют функцию переносчиков. При этом, ACBP1 связывает C18-ацилСоА, ACBP2 специфичен в отношении C16-ацил-СоА. Таким образом, имеется согласованный обмен ЖК между тремя разными органеллами: пластидами, где начинается синтез, ЭПР и ЦПМ.

В отличие от высших растений, у которых обнаружены и растворимые и мембраносвязанные формы ферментов, для цианобактерий характерны только мембраносвязанные ацил-липидные десатуразы. Двойные связи в Δ 9-, Δ 12-, Δ 15- и Δ 6-положения цепи ЖК вводят четыре белка — DesC, DesA, DesB и DesD соответственно. В первой реакции фермент, кодируемый *desC* геном, превращает стеариновую кислоту (C18:0) в олеиновую (C18:1). Образование линолевой кислоты (C18:2) катализируется десатуразой *desA*. DesB вводит третью двойную связь, образуя линоленовую кислоту [4].

Изменения в уровнях экспрессии десатураз, приводящие к изменениям ЖК-состава мембран, могут оказывать существенные влияния на восприимчивость растений к различным стрессам, например, холодовому воздействию, чувствительности к патогенам и другим [5, 6]. Tsypurskaya с коллегами [7] показали, что экспрессия генов Δ 9- и Δ 12-ациллипидных десатураз в растениях картофеля повышала их устойчивость к *Phytophthora infestans* по сравнению с контрольными нетрансгенными растениями за счет накопления фенольных соединений в листьях. При введении двойной связи в цепи молекулы ЖК образуется изгиб. Данные изгибы приводят к менее плотной упаковке мембранных липидов, поскольку создается стерическое затруднение сближения молекул друг с другом.

Данный механизм важен для сохранения текучести мембран при пониженных температурах, и разработки на его основе используются в биотехнологии для получения холодоустойчивых сортов [8–11]. Таким образом, экспрессия собственных десатураз растения, а также введение гетерологичных генов десатураз является предметом активного изучения. Ряд работ в этом направлении сделан именно на растениях томатов.

Yu с соавт. [9] продемонстрировали, что избыточная экспрессия ЭПР-локализованной омега-3 десатуразы ЖК томатов (LeFAD3) приводила к повышенному содержанию линоленовой кислоты (18:3) и, как следствие, к толерантности трансгенных растений к холодовому стрессу. Похожие результаты при экспрессии LeFAD7 были получены Liu с соавт., которые показали толерантность трансгенных leFAD7-экспрессирующих томатов к низким температурам [12]. Другим похожим примером является работа Dominguez с коллегами, где авторы показали, что оверэкспрессия FAD3 и FAD7 десатураз в растениях томатов приводит к улучшению сопротивляемости к холодовому стрессу. Также авторы сделали интересное наблюдение, обнаружив, что трансгенные растения, экспрессирующие FAD7, в способности противостоять низким температурам превосходят растения, экспрессирующие FAD3. Причина этого состоит в локализации ферментов. FAD7 является десатуразой хлоропластов, тогда как FAD3 – ЭПР-локализованный фермент. Предполагается, что ненасыщенные ЖК в составе хлоропластной мембраны играют важную роль в защите белков фотосистемы II от воздействия низких температур. Поскольку FAD7 локализуется в хлоропластной мембране, его роль в защите от холодового стресса наиболее выражена. Стоит отметить, что при закаливании трансгенные FAD3-томаты демонстрировали устойчивость к холоду, сопоставимую с таковой для FAD7-растений, что может быть объяснено перемещением 18:3 ЖК от ЭПР к хлоропластам в процессе закаливания [13]. Таким образом, локализация фермента может играть важную роль в регуляции липидного метаболизма, и это необходимо учитывать, изучая десатуразы. Также в данной работе показано, что увеличенное соотношение 18:3/18:2 ЖК, контролируемое экспрессией перенесенной омега-3 десатуразой, приводило к улучшению качества плодов и усилению синтеза оксипинов, придающих томатам характерный аромат.

В нашем исследовании ген гетерологичной $\Delta 9$ -десатуразы (*desC*) цианобактерии *Synechococcus vulcanus*, продукт которого локализован в ЭПР, ЦПМ или хлоропласте, использован для получения трансгенных растений томатов с последующей оценкой изменения ЖК состава в листовой ткани. Ранее в нашей лаборатории были получены обнадеживающие результаты

схожего эксперимента на растениях табака [14]. В данной работе мы, изменяя дизайн эксперимента, пробуем экстраполировать полученные ранее данные на растения томатов. Особенность нашего исследования – направленная локализация продукта гена *desC* в трех разных компартментах растительной клетки: цитоплазме, ЭПР и хлоропластах. Это достигалось за счет использования трех типов векторов, в которых целевой ген слит в рамке считывания с соответствующими сигнальными последовательностями. Для оценки эффективности функционирования гетерологичной десатуразы проведен анализ содержания различных ЖК в листьях трансгенных растений томата разных линий. Причина выбора данной сельскохозяйственной культуры в качестве объекта исследования состоит в растущем спросе на данный вид сельскохозяйственных растений в мире. Томаты содержат большое количество ликопина, каротиноидного пигмента, защищающего растения от окислительного стресса и избыточного освещения, а также известного своими терапевтическими свойствами. Благодаря свойствам ликопина производство культуры продолжает расти и изучение активности и регуляции работы десатураз, как потенциальных регуляторов ответа на стрессы представляется важной задачей.

$\Delta 9$ -десатураза (*desC*) из *S. vulcanus* представляет собой фермент из термофильной бактерии, температурный оптимум роста которой составляет 55°C. Эта десатураза, как и все десатуразы цианобактерий, является ацил-липидной, мембраносвязанной. Диапазон температур, в рамках которого фермент сохраняет свою функциональную активность, исследован в ряде работ. Было продемонстрировано, что белок успешно десатурирует свои субстраты при температурах 45, 37 и 35°C [15]. Orlova с соавт. показали, что экспрессия данной десатуразы в листьях табака при 22°C приводит к увеличению количества C18:1 жирной кислоты в составе листьев, благодаря чему трансгенные растения табака приобретали повышенную устойчивость к холоду [16]. Ранее в нашей лаборатории было показано, что *desC*, экспрессируемый в двух видах табака (*N. benthamiana* и *N. excelsior*), проявляет свою активность в отношении C16:0 и C18:0 кислот [14] при 22°C. Таким образом, несмотря на то, что фермент *desC* представляет собой белок термофильной бактерии, обитающей при 55°C, в ряде работ доказана его функциональность при температуре 22°C.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Конструирование экспрессионных векторов. При конструировании экспрессионных векторов использовались стандартные процедуры молекулярного клонирования и протоколы полимеразной цепной реакции (ПЦР). Все

ферменты, используемые при конструировании векторов (эндонуклеазы рестрикции, Т4 ДНК-лигаза, Taq- и Pfu-ДНК-полимеразы, фосфатазы) использовались согласно протоколам фирм-изготовителей.

Первоначально последовательность гена *desC*, кодирующего ацил-липидную десатуразу Δ^9 *Synechococcus vulcanus*, была получена методом ПЦР с использованием плазмиды pQE-*desC* в качестве матрицы и праймеров *descF1* и *descR1* (прямой и обратный праймеры, содержащие сайты рестрикции *ApaI* и *EcoRI* GGGCCCACATCATCCTTAGAA и GAATTCGGACAACGCTTTGGG, соответственно). Полученный ПЦР продукт клонировали в вектор pFGG, гидролизированный по сайтам *ApaI* и *EcoRI*, с получением вектора pFGG-*desC*. Плазмида pFGG-*desC*, несущая ген *desC*, обеспечивающий локализацию белкового продукта в цитоплазме использована и для сборки двух других векторов – pFGG-Lch-*DesC* и pFGG-LeB4-*DesC*-ER.

Растительный вектор экспрессии, несущий ген *desC*, слитый с последовательностью транзитного пептида малой субъединицы Lch Rubisco *Arabidopsis thaliana*, обеспечивающей транспорт белкового продукта в хлоропласты, также получали в несколько этапов. Первоначально последовательность Lch, кодирующая этот транзитный пептид, была синтезирована методом ПЦР с использованием плазмиды pVIG-S2B [17] в качестве матрицы и праймеров *lchF3* и *lchR3* (прямой и обратный праймеры содержащие сайты рестрикции *KpnI* и *ApaI*, GGTACCATGGCTTCTATGATATC и GGGCCCCTGATATTCAACTATAT, соответственно). Далее, полученный ПЦР продукт клонировали в вектор pFGG-*DesC*, гидролизированный по сайтам *KpnI* и *ApaI*, с получением вектора pFGG-Lch-*DesC*.

Растительный вектор экспрессии, несущий ген *desC*, слитый с последовательностями, обеспечивающими транспорт и удержание белка в эндоплазматическом ретикулуле, получали в несколько этапов. Первоначально последовательность LeB4, кодирующая транспортный пептид, была синтезирована методом ПЦР с использованием плазмиды pVIG-T2D [17] в качестве матрицы и праймеров *LebF4* и *LebR4* (прямой и обратный праймеры содержащие сайты рестрикции *KpnI* и *ApaI*, GGTACCATGTCCAAACCTTTTCT и GGGCCCTGCTAAACATGTGCT, соответственно). Полученный продукт ПЦР клонировали в вектор pFGG-*DesC*, гидролизированный по сайтам *KpnI* и *ApaI*, с получением вектора pFGG-LeB4-*DesC*. Затем фрагмент *EcoRI*–*XbaI* плазмиды pVIG-T2D, несущий последовательность, кодирующую SRKDEL, сигнал удержания ЭР и сигнал полиаденилирования, клонировали в вектор pFGG-LeB4-*DesC*, гидролизированный

по сайтам *EcoRI* и *XbaI*, с получением вектора pF-GG-LeB4-*DesC*-ER.

Растительные экспрессионные векторы pVIG-*DesC*, pVIG-Lch-*DesC* и pVIG-LeB4-*DesC*-ER, используемые для дальнейшей трансформации растений томата были получены путем клонирования фрагментов *SpeI*–*XhoI* плазмид pFGG-*desC*, pFGG-Lch-*DesC* и pF-GG-LeB4-*DesC*-ER, соответственно, в вектор pVIG-S, гидролизированный эндонуклеазами рестрикции *SpeI* и *XhoI*.

Правильное слияние гибридных генов с соответствующими лидерными последовательностями в экспрессионных векторах растений pVIG-*DesC*, pVIG-Lch-*DesC* и pVIG-LeB4-*DesC*-ER было подтверждено секвенированием (“Евроген”, Россия).

Получение культур *Agrobacterium tumefaciens*, несущих целевые конструкции. Для трансформации растений томата использовали бактериальные культуры *Agrobacterium tumefaciens* штамма AGL0, несущие бинарные плазмидные векторы pVIG-*DesC*, pVIG-Lch-*DesC* и pVIG-LeB4-*DesC*-ER (рис. 1).

Вектора переносили в штамм AGL0 *A. tumefaciens* путем электропорации [18].

Выращивание растений. Растения *Solanum lycopersicum* L. линии ЯЛФ выращивали при +24°C, 18 ч день/6 ч ночь и освещенности 100 мкмоль квантов/(м²/с) на агаризованной среде Мурасиге-Скуга (МС-среда). Томаты ЯЛФ представляют собой чистую линию, используемую в качестве отцовской для получения гибрида F1 Юниор.

Трансформация растений. Эксперименты по получению трансгенных растений томата проводили методом со-культивирования семядольных эксплантов с разбавленной суспензией агробактерии. Ночную культуру агробактерии наращивали в 20 мл неагаризованной среды Лурия-Бертани, дополненной соответствующими селективными антибиотиками, на качалке (180 об/мин) в течение 24 ч при 28°C в темноте. Затем культуру ресуспендировали в жидкой МС-среде добиваясь, чтобы оптическая плотность при длине волны 600 нм была равной 0.6–0.7. В серии экспериментов по агробактериальной трансформации были использованы семядольные листья, включая черешки, полученные от 10–12 суточных асептических проростков. За 3 сут. до инфицирования экспланты прекультивировали на агаризованной МС-среде, дополненной 5 мг/л 6-бензиламинопурина (6-БАП) и 0.1 мг/л индолилуксусной кислоты (ИУК), обеспечивающей наибольшую частоту непрямого органогенеза побегов. Затем у семядолей отсекали небольшую часть у основания и верхушки, после чего переносили в подготовленную бактериальную суспензию. Инокуляцию

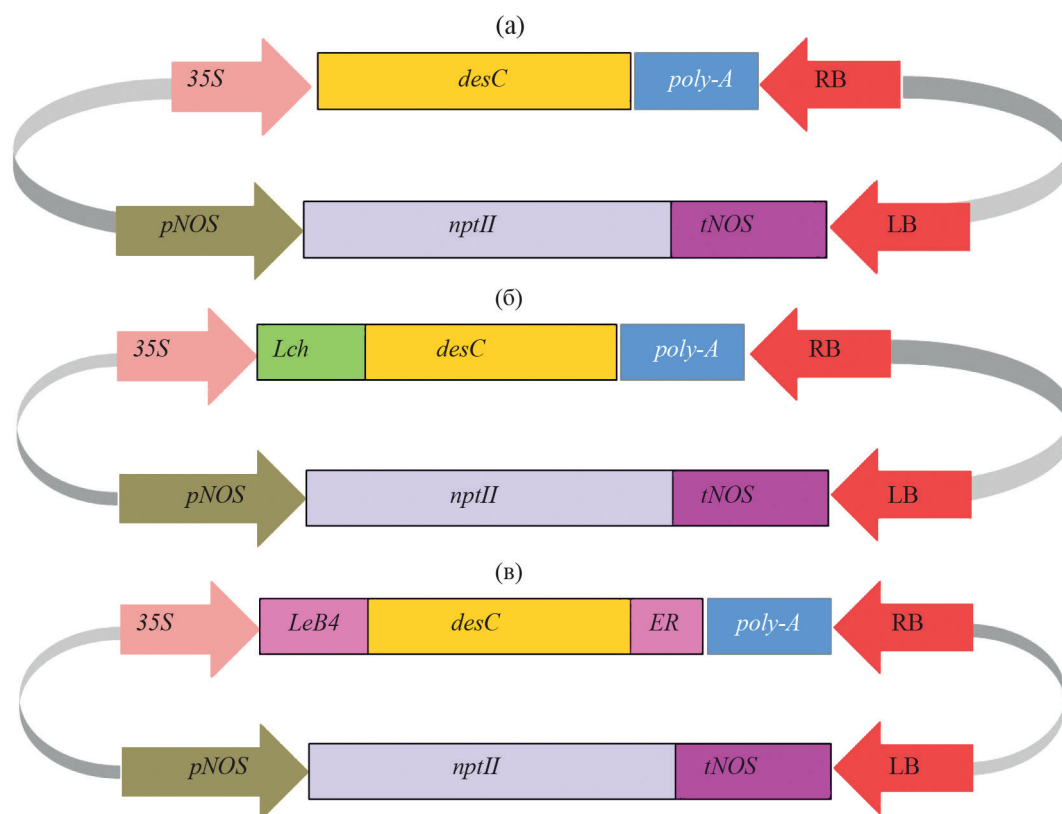


Рис. 1. Схематическое изображение участка Т-ДНК в плаزمиде pVIG-DesC (а), pVIG-Lch-DesC (б) и pVIG-LeB4-DesC-ER (в), используемых для агробактериальной трансформации томата. LB — левая граница; RB — правая граница; 35S — конститутивный промотор 35S РНК вируса мозаики цветной капусты; pNOS — промотор нопалинсинтазы; nptII — ген неомицинфосфотрансферазы II; tNOS — последовательность терминатора нопалинсинтазы; desC — ген, кодирующий $\Delta 9$ -десатуразу *Synechococcus vulcanus*; Lch — лидерная последовательность гена, кодирующего малую субъединицу рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы *Arabidopsis thaliana*, обеспечивающая доставку кодируемого белка в хлоропласты; LeB4 — лидерная последовательность гена LeB4 гороха (*Vicia faba*), кодирующая промотор легумина B4, который обеспечивает компартментализацию белкового продукта в эндоплазматический ретикулум (ЭПР); последовательность ER, SKRDEL в 3'-области гена-мишени, кодирующая С-концевые аминокислоты для удержания целевого белка в ЭПР; поли-А, сигнальная последовательность полиаденилирования.

семядольных эксплантов осуществляли в течение 20 мин при периодическом перемешивании. Впоследствии экспланты переносили на диски из фильтровальной бумаги, помещенные на поверхность чашки Петри со МС-средой, и сокультивировали в темноте при температуре 16°C в течение 48 ч. После этапа сокультивирования семядольные экспланты 5 раз промывали в жидкой МС-среде с добавлением антибиотика тиментина (300 мг/л) для элиминации *Agrobacterium*. Затем экспланты семядолей культивировали на агаризованной МС-среде, дополненной 5 мг/л 6-БАП, 0.1 мг/л ИУК и 300 мг/л тиментина. Субкультивирование на свежую питательную среду осуществляли каждые 20 сут. Со второго пассажа в состав питательной среды включали селективный антибиотик канамицин (Км) в концентрации 10 мг/л, на третьем его концентрацию увеличивали до 25 мг/л и далее продолжали культивировать при таких условиях. С увеличе-

нием периода культивирования концентрацию антибиотика для элиминации агробактерии постепенно снижали с 300 мг/л до 150 мг/л. Регенерирующие Км-устойчивые побеги отделяли от каллусной ткани и переносили на питательную среду для индукции ризогенеза следующего состава: ½ МС-среда с добавлением 0.2 мг/л индолил-3-масляной кислоты и 100 мг/л Км.

Отбор и условия культивирования трансгенных растений. Молекулярный анализ первичных трансформантов проводили с помощью ПЦР. Первичные трансформанты растений, показавшие наличие целевых генов и отсутствие агробактериальной контаминации, адаптировали к почве, затем проводили самоопыление для получения поколения T1. Отбор трансгенных растений поколения T1 проводили в два этапа. На первом этапе проводили проращивание семян трансгенных растений поколения T1 на селективной среде (агаризованная МС-среда, со-

держащая 100 мг/л Км). Перед проращиванием семена стерилизовали поочередной инкубацией в растворе 70% спирта (2 мин), 1% растворе гипохлорита натрия (5 мин) с последующей трехкратной отмывкой в воде (5, 10, 15 мин). На втором этапе проростки, полученные из семян, черенковали и вновь высаживали на селективную среду того же состава. Контрольные не трансформированные растения проращивали таким же образом, но в качестве среды использовали агаризованную МС-среду, не содержащую антибиотик. Банки с растениями помещали в климатическую камеру. Отобранные таким образом растения использовали для проведения ЖК-анализа и определения уровня экспрессии гетерологического гена методом ПЦР-РВ.

Экстракция ЖК и получение их метиловых эфиров. К навеске растительного материала (~50 мг) добавляли 5-кратный объем горячего (60°C) 96% этанола для фиксации. Для реакции омыления добавляли 5 М водный КОН до конечной концентрации 1 М с последующим растиранием тканей пестиком и инкубацией в течение 1 ч при 65°C с периодическим перемешиванием. Для количественного определения добавляли по 100 мкл стандарта – раствор гептадекановой кислоты в изопропанол (250 мкг/мл). Пробы от неомыленных компонентов промывали 500 мкл *n*-гексана. Свободные жирные кислоты получали, добавляя 50 мкл 20% H₂SO₄, и экстрагировали *n*-гексаном. Верхнюю фазу переносили в чистые пробирки и упаривали насухо на вакуумном концентраторе Eppendorf Concentrator plus (“Eppendorf”, Германия). Жирные кислоты метилировали, добавляя 200 мкл 1% H₂SO₄ в метаноле с последующей инкубацией 30 мин при 55°C. Метиловые эфиры жирных кислот (МЭЖК) экстрагировали 250 мкл гексана.

ГХ-МС анализ. МЭЖК анализировали на приборе Хроматэк Кристалл 5000.2 NP (ЗАО СКБ “Хроматэк”, РФ) с квадрупольным МС детектором. Колонка Restek Rtx-2330 (60 м, кат. № 10726 “Restek”, США). Условия разделения МЭЖК: линейная скорость газа-носителя в колонке 1 мл/мин; объем вводимого образца 1 мкл; делитель потока 1:20, температура испарителя 260°C. Температурная программа градиентного анализа: плато 60°C 8 мин; нагрев до 170°C со скоростью 10°C/мин и 5 мин удержание этой температуры; нагрев от 170°C до 245°C со скоростью 6.5°C/мин и сохранение этой температуры до конца анализа. Рабочая температура МС-детектора – 230°C, энергия ионизации – 70 эВ. Идентификацию МЭЖК и расчет их количественного содержания в пробах проводили с использованием программы “Хроматэк Аналитик 3” и библиотеки спектров NIST.

Выделение РНК и обратная транскрипция. Листья трансгенных растений томатов измель-

чали в жидком азоте. Выделение РНК для ряда образцов проводили с использованием набора GeneJET Plant RNAPurification Mini Kit (“Evrogen”, Россия), руководствуясь инструкцией производителя.

Обратную транскрипцию проводили с использованием MMLV ревертазы. Для получения первой цепи кДНК использовали протокол MMLV RT Kit (“Evrogen”, Россия). Кратко, готовили смесь, состоящую из РНК-матрицы (500 нг) и праймеров, которую прогревали 2 мин при 70°C, после чего добавляли заранее подготовленную смесь MMLV-ревертазы, буфера, dNTPs и DTT. Инкубировали 45 мин при 39°C. Для остановки реакции смесь прогревали 10 мин при 70°C. Полученные таким образом образцы кДНК использовали для постановки ПЦР-РВ.

ПЦР-РВ. Метод ПЦР-реального времени (ПЦР-РВ) использовали для сравнительной относительной оценки уровня экспрессии целевого гена *desC* в трансгенных растениях томатов. Подбор праймеров производили с помощью программы NCBI PrimerBlast (табл. 1). В качестве референсных генов (эндогенных контролей) использовали гены актина и тубулина. Для относительного количественного анализа использовали ΔΔСТ-метод. Амплификация выполнялась на приборе QuantStudio 5 (“Applied Biosystems”, США). Для приготовления проб использовали готовую смесь для ПЦР qPCRmix-HS SYBR (“Evrogen”, Россия). Реакционная смесь (20 мкл) содержала 4 мкл qPCRmix-HS SYBR, 5 μМ каждого праймера и 100 нг матрицы кДНК. Использовали следующие условия амплификации: 95°C – 10 мин, далее 40 двухстадийных циклов 95°C – 15 с, 60°C – 30 с. Для возможности анализа специфичности образовавшихся продуктов проводили плавление образовавшихся дуплексов при условиях: 95°C – 15 с, 60°C – 1 мин, 95°C – 1 с. Результаты, полученные в трех повторностях qPCR, были использованы для относительной количественной оценки уровня транскрипции. За единицу приняли количество целевой мРНК в растениях линии 94 с цитоплазматической

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных при проведении RT-qPCR.

Название праймера	5'-3' последовательность
qdecC-F	GCACTGGCTCTTTGGCAGTA
qdesC-R	CTGGGACTGCGGATAGACGA
qTubA_L-F	ACAACCTTTGCCCGTGGACAT
qTubA_L-R	TGCTCAAGAAGGGAGTGGGT
qAct_L_F	CCTCCTAACTGAAGCCCCTCT
qAct_L_R	CCTGCCAAGTCAAGACGGAG

локализацией трансгена. Отрицательный контроль для каждой пары праймеров содержал все компоненты, за исключением матрицы кДНК. Результаты амплификации обрабатывались с использованием программного обеспечения QuantStudio Design and Analysis Software v2.5.

Статистический анализ. Все эксперименты по анализу ЖК-состава листьев и анализу уровней экспрессии генов были проведены независимо не менее трех раз. Статистическую обработку результатов проводили в программе RStudio. Для определения достоверности различий использовали критерий Тьюки, предварительно убеждаясь, что анализируемые выборки имеют нормальное распределение. На графиках, построенных по полученным данным, представлены средние значения и стандартные отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Конструирование векторов

Для исследования вклада десатураз различных клеточных компартментов в формирование ЖК-профиля растительной клетки получены векторные конструкции трех типов: pVIG-DesC, pVIG-Lch-DesC и pVIG-LeB4-DesC-ER (рис. 1). Растительный экспрессионный вектор pVIG-DesC несет последовательность гена $\Delta 9$ ацил-липидной десатуразы *S. vulcanus*. Вектор pVIG-Lch-DesC несет ген этой же десатуразы, слитый с последовательностью пептида малой субъединицы рибулозобифосфаткарбоксилазы (RuBisCo) *A. thaliana*, обеспечивающей хлоропластную локализацию целевого белка. Вектор pVIG-LeB4-DesC-ER также несет последовательность десатуразы *S. vulcanus*, в 5'-область которого клонирована последовательность, соответствующая сигнальному пептиду легумина гороха LeB4 для локализации белкового продукта в ЭПР, а в 3'-области добавлен фрагмент, кодирующий сигнал удержания белков в ЭПР. Эффективность обеспечения целевой локализации белкового продукта *desC* была продемонстрирована в нашей группе ранее [14]. Verestovoy с соавт.

оценивали локализацию гетерологичного белка *desC*, слитого с флуоресцентным белком EGFP, на модели протопластов с помощью флуоресцентной микроскопии. В результате была убедительно продемонстрирована целевая локализация белка в ЭПР, хлоропластах и цитоплазме.

Агробактериальная трансформация и получение регенерантов томата с устойчивостью к канамицину (Км)

Для получения трансгенных растений томата проводили серию независимых агробактериальных трансформаций с использованием различных штаммов AGL0, несущих плазмиды pVIG-DesC, pVIG-Lch-DesC и pVIG-LeB4-DesC-ER. Всего в экспериментах было использовано 657 инокулированных семядольных эксплантов (табл. 2). В нашем исследовании применялась стратегия постепенной адаптации эксплантов к селективному антибиотику (без добавления Км на первом этапе культивирования, с добавлением Км до концентрации 10 и 25 мг/л на втором и третьем этапах, соответственно). Это было необходимо по причине того, что стрессовые условия, вызванные Км, могут приводить к значительному снижению каллусогенеза и регенерационного потенциала у семядольных эксплантов. Через 2–3 нед. после совместного культивирования семядольных эксплантов с суспензией *Agrobacterium* на срезе семядольного листа образовывался плотный светло-зеленый каллус. Экспланты, не образовавшие каллус, подвергались некрозу и становились коричневыми при культивировании на селективной среде. Частота некроза эксплантов варьировала от 29.4 до 77.2% в зависимости от плазмидных векторов. По прошествии 3 мес. культивирования были отобраны 20, 19 и 56 каллусных линий томата, устойчивых к Км, трансформированных плазмидами pVIG-DesC, pVIG-Lch-DesC и pVIG-LeB4-DesC-ER соответственно. Эффективность образования каллуса составила 9.5, 7.7 и 27.9% соответственно. Из плотных светло-зеленых каллусных тканей наблюдали массовую

Таблица 2. Характеристика трансгенных каллусов, полученных с помощью агробактериальной трансформации различными векторными конструкциями

Вектор	Количество семядольных эксплантов	Количество Км-устойчивых линий	Гены			Эффективность трансформации (%)
			npt II	VirB	desC	
pVIG-DesC	210	20	20	2	18	8.6
pVIG-Lch-DesC	246	19	19	6	8	3.3
pVIG-LeB4-DesC-ER	201	56	56	23	22	10.9

регенерацию побегов. Регенерированные побеги длиной 1.5 см отрезали от каллусной ткани и переносили на среду RIM (Root inducing medium), содержащую 100 мг/л Км. Канамицин-устойчивые побеги томата укореняли в течение 1–2 нед., клонально размножали *in vitro*, и затем были адаптированы к почвенным условиям.

ПЦР-анализ первичных трансформантов

Для ПЦР-анализа выделяли геномную ДНК из листьев проростков томата, укорененных на RIM, а также из листьев нетрансгенного контроля (линия ЯЛФ) (табл. 3). Для оценки пригодности выделенной ДНК для ПЦР-анализа амплифицировали последовательность гена *Tom52* (рис. 2а). Эффективность трансформации оценивали как процент независимых трансгенных линий томата, содержащих селективный (*nptII*) и целевой (*desC*) гены и не демонстрирующих признаки контаминации генами *Agrobacterium*, от общего количества трансформированных эксплантов. Также проводили определение наличия гена неомизин-фосфотрансферазы II (*nptII*). Фрагмент длиной 742 п.н. наблюдали у всех проанализированных предполагаемых трансформантов томата, тогда как в контроле соответствующей полосы не было обнаружено (рис. 2б). Чтобы исключить возможность контаминации генами *Agrobacterium* проводили ПЦР с использованием специфических праймеров, отжигающихся на последовательность гена *VirB*. Образцы ДНК, выделенные из 2, 6 и 23 линий томата, трансформированных плазмидными векторами pVIG-DesC, pVIG-Lch-DesC и pVIG-LeB4-DesC-ER, соответственно, содержали ген *VirB* (рис. 2в). Несколько трансгенных линий томата не содержали вставки целевого гена *desC* (рис. 2д). Таким образом, эффективность трансформации линии ЯЛФ с помощью векторных конструкций pVIG-DesC, pVIG-Lch-DesC и pVIG-LeB4-DesC-ER варьировала от 3.3 до 10.9% соответственно.

Получение трансгенных растений томата T1

Все независимые трансгенные линии томата были успешно адаптированы к почве и самоопылены для получения семенного потомства T1 в тепличных условиях. Однако только 50% всех трансгенных линий томата T0 образовали жизнеспособные семена. Так, у 4, 6 и 14 первичных трансгенных линий томата, трансформированных плазмидными векторами pVIG-DesC, pVIG-Lch-DesC и pVIG-LeB4-DesC-ER, соответственно, развитие плодов после самоопыления не произошло или были получены бессемянные плоды без оплодотворения (табл. 4).

Анализ наследования гена *nptII* в семенном потомстве трансгенных растений томата поколения T1

Для определения наследования трансгена в семенном потомстве, самоопыленные семена, собранные от различных первичных трансгенных линий томата, были оценены на устойчивость к Км (табл. 5). Для усиления надежности отбор трансформантов проводили в два этапа. Первоначально семена проращивали на селективной среде, и далее проводили черенкование растений, которые вновь помещали на селективную среду. Применение этого подхода позволяет избежать отбора “негативных” трансформантов растений. 4 нед. культивирования на МС-среде с летальной концентрацией Км (150 мг/л) позволяли достоверно различить Км-чувствительные и Км-устойчивые растения. В данных условиях нетрансгенные проростки томата демонстрировали признаки хлороза, постепенно становились коричневыми и в последствии погибали, в то время как трансформированные проростки формировали хорошо развитые корни и росли здоровыми. χ^2 -тест для большинства трансгенных линий показал значение расщепления наследования селективного гена равное 3:1, что свидетельствует о стабильном менделевском наследовании гена *nptII* и вставке функционального трансгена в единственный локус генома томата. Однако в 7 трансгенных линиях томата наблюдалась и неменделевская схема наследования – коэффициент сегрегации между проростками устойчивыми и чувствительными проростками превышал критическое значение χ^2 , равное 3.84 ($df = 1$, $P < 0.05$).

Отбор трансгенных растений поколения T1

Методом агробактериальной трансформации с использованием трех типов векторных конструкций были получены первичные трансформанты растений томатов линий трех типов в зависимости от использованной лидерной последовательности. Были введены следующие обозначения: “ER” – для линий с ЭПР-локализацией, “Cyt” – для линий с цитоплазматической локализацией и “Chl” – для линий с хлоропластной локализацией белкового продукта гена десатуразы *desC*.

Фенотип большинства линий первичных трансформантов растений, выращенных на селективной среде, в основном, не отличался от растений контрольной линии, выращенных в условиях *in vitro*. У растений отмечена хорошо развитая мочковатая корневая система и развитый гипокотиль. Тем не менее, две линии трансгенных растений (50Chl и 8ER) характеризовались необычными фенотипами. У них

Таблица 3. Эффективность агробактериальной трансформации томатов сорта ЯЛФ векторами pVIG-DesC, pVIG-Lch-DesC и pVIG-LeB4-DesC-ER

Вектор	Количество семядольных эксплантов (шт.)								Количество Км-устойчивых каллусов	
	Всего		Подверглось некрозу		Контаминация генами агробактерии		Отобрано			
	шт.	%	шт.	%	шт.	%	шт.	%	шт.	%
pVIG-DesC	210	100	83	39.5	103	49.1	24	11.4	20	9.5
pVIG-Lch-DesC	246	100	190	77.2	29	11.8	27	11.0	19	7.7
pVIG-LeB4-DesC-ER	201	100	59	29.4	78	38.8	64	31.8	56	27.9

Таблица 4. Частота образования нормальных и бессемянных плодов в популяции трансгенных линий томата поколения T0

Вектор	Количество линий томатов поколения T0					
	Адаптировано к почве		Нормальных плодов		Бессемянных плодов	
			шт.	%	шт.	%
pVIG-DesC	18		14	77.8	4	22.2
pVIG-Lch-DesC	8		2	25.0	6	75.0
pVIG-LeB4-DesC-ER	22		8	36.4	14	63.6

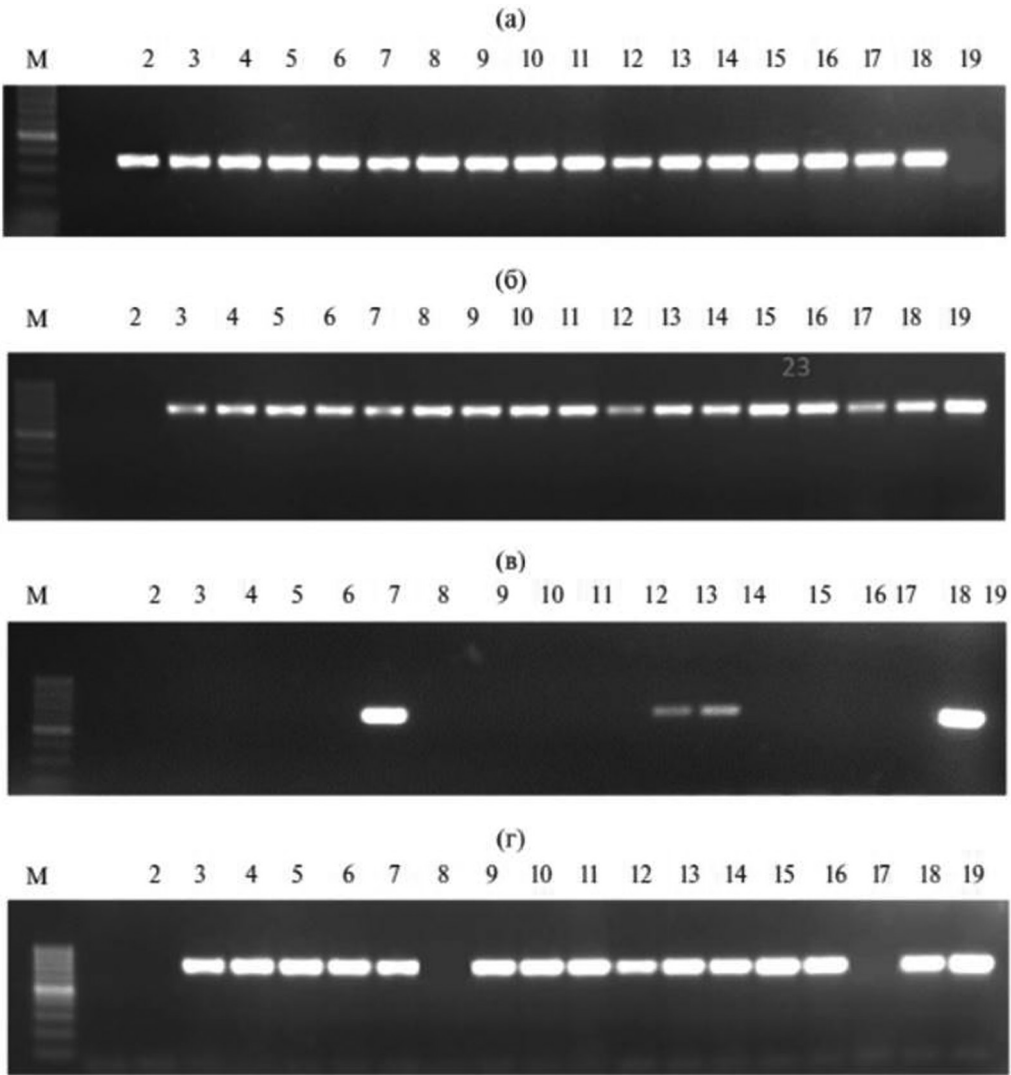


Рис. 2. ПЦР-амплификация генов Tom52 (а), nptII (б), VirB (в) и desC (г) на образцах геномной ДНК предполагаемых трансформантов и нетрансгенных растений томата. М – маркер молекулярной массы (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, “Fermentas”, Литва); 2 – отрицательный контроль (линия ЯЛФ); 3–18 – независимые трансформированные линии томатов; 19 – положительный контроль (плазмида pVIG-DesC).

выявлен сильно изогнутый гипокотиль с утолщением в нижней части (рис. 3).

В результате проведенного отбора для дальнейших исследований были выбраны 4 линии с ЭПР-локализацией, 5 линий с цитоплазматической локализацией и 1 линия с локализацией гетерологичного белка в хлоропластах. Использование для дальнейшей работы только одной линии растений с хлоропластной локализацией гетерологичной десатуразы обусловлено проблемами получения поколения T1 для данного типа трансформантов. А именно, отмечено, что большинство первичных трансформантов этой линии не образуют жизнеспособную пыльцу. Следует подчеркнуть, что сходные наблюдения были отмечены ранее в другом исследовании, в котором использование сигнальной последовательности RuBisCO для локализации белка холинэстеразы в хлоропластах также приводило к образованию стерильных растений. Это позволяет предположить, что локализация гетерологичных белков в хлоропластах может негативно сказываться на процессе формирования жизнеспособной пыльцы.

Результаты ПЦР-РВ

Для сравнительного анализа уровня транскрипции целевого гена *desC* в отобранных линиях использовали ПЦР-РВ метод. Было показано, что во всех линиях первичных трансформантов растений происходит транскрипция целевого гена, однако уровень транскрипции различается в широких пределах. Результаты представлены на рисунке 4. Было показано, что линии 25Cyt, 54ER, 8ER, характеризуются 3-, 4.5- и 5.5-кратным увеличением уровня мРНК целевого гена относительно линии сравнения, тогда как для линий 50ER, 10ER, 3Cyt, 12Cyt, 15Cyt, 50Chl этот показатель не превышает значения 2.17. В целом, различия в уровнях транскрипции *desC* могут быть обусловлены различием мест интеграции целевой последовательности в геном растения, поскольку при использовании метода агробактериальной трансформации интеграция Т-ДНК происходит случайным образом. Кроме того, различия в уровне транскрипции целевого гена можно также объяснить его различающейся дозой, поскольку анализ был проведен на T1-трансгенных растениях, содержащих как гомозиготные, так и гемизиготные формы.

Сравнительный анализ состава ЖК у контрольных и трансгенных растений

Для оценки функциональности гетерологичного фермента проведен сравнительный анализ содержания ЖК в листьях трансгенных растений. Данный подход ранее показал свою

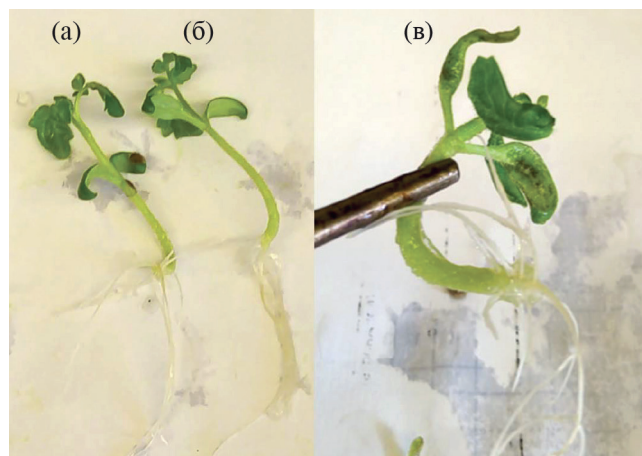


Рис. 3. Фенотип контрольных растений и первичных трансформантов растений. (а) — контрольное растение ЯЛФ (агаризованная МС-среда), (б) — трансгенное растение (линия 94Cyt) (агаризованная МС-среда + канамицин), (в) — трансгенное растение (линия 8ER) “необычного” фенотипа (агаризованная МС-среда + канамицин).

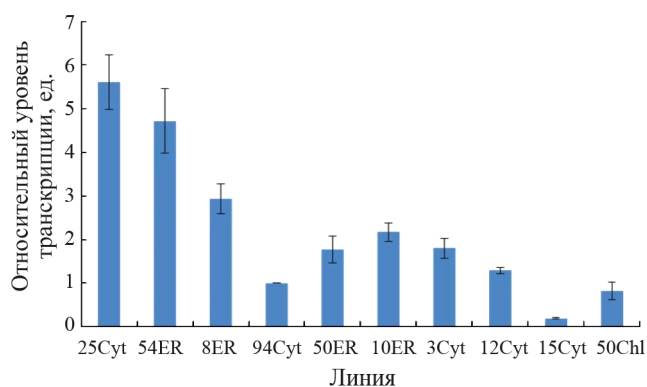


Рис. 4. Относительная представленность транскриптов гена *desC* в разных линиях трансформированных томатов. За единицу принята экспрессия линии 94Cyt.

состоятельность в ряде работ по изучению экспрессии гетерологичных десатураз в растениях. Так, Reza с соавт. использовали количественный показатель содержания линолевой и линоленовой кислот в качестве оценки функциональности дельта-12 десатуразы *desA* цианобактерии в листьях трансгенных растений картофеля [19]. Результаты данного исследования показали, что трансгенные растения характеризуются увеличенным содержанием ненасыщенных ЖК по сравнению с контрольными растениями. Важно, что для того, чтобы иметь возможность оценить уровень накопления гетерологичного фермента и отличить его активность от аналогичных активностей собственных десатураз картофеля, авторами было использовано слияние

Таблица 6. Содержание С16 ЖК (мг на г сухого веса) в листьях трансформированных растений томата

Линия	Тип ЖК		
	16:0	16:1	16:2
10ER	15.0 $\pm$ 5.16	0.3 $\pm$ 0.0598	0.1 $\pm$ 0.0354
50ER	14.2 $\pm$ 1.37	0.4 $\pm$ 0.117	0.05 $\pm$ 0.0480
54ER	13.5 $\pm$ 3.68	2.0 $\pm$ 0.625	0.4 $\pm$ 0.128
8ER	15.7 $\pm$ 1.53	1.2 $\pm$ 0.0197	0.3 $\pm$ 0.0797
50Chl	19.00 $\pm$ 1.60	0.2 $\pm$ 0.0966	0.04 $\pm$ 0.0412
3Cyt	29.7 $\pm$ 3.14	0.6 $\pm$ 0.123	0.1 $\pm$ 0.0271
94Cyt	16.3 $\pm$ 6.11	0.3 $\pm$ 0.0772	0.04 $\pm$ 0.0103
12Cyt	16.6 $\pm$ 1.36	0.4 $\pm$ 0.0208	0.04 $\pm$ 0.0407
15Cyt	18.8 $\pm$ 2.42	0.4 $\pm$ 0.0391	0.05 $\pm$ 0.00422
25Cyt	12.4 $\pm$ 1.82	2.4 $\pm$ 0.238	0.5 $\pm$ 0.136
Контроль	17.3 $\pm$ 2.73	0.3 $\pm$ 0.0237	0.04 $\pm$ 0.0407

Примечание: жирным шрифтом отмечены показатели, достоверно отличающиеся от контрольных ($P < 0.05$).

целевого белка с репортером — термостабильной лихеназой *C. thermocellum*. Таким образом, в этой работе параллельно с измерениями липидного состава, проводили анализ содержания целевого фермента посредством лихеназного метода, что позволяет с еще большей уверенностью говорить о достоверности связи между изменениями ЖК-состава и экспрессией бактериальной десатуразы в растениях.

Результаты ГХ-МС анализа содержания ЖК в листьях контрольных и трансгенных растений томатов представлены в таблицах 6 и 7.

По результатам ЖК-анализа, убедительно продемонстрировано достоверное увеличение пальмитоолеиновой кислоты (16:1) для трех линий, две из которых имеют ЭПР-локализацию фермента (54ER, 8ER), и одна — цитоплазма-

тическую локализацию (25Cyt). Для этих же линий показано достоверное увеличение 16:2 ($\Delta 9,12$) ЖК. Таким образом, для линий 25Cyt, 8ER, 54ER работа гетерологичного фермента desC в растениях томатов приводит к образованию 16:1 ЖК, которая является субстратом для $\Delta 12$ -десатуразы. Увеличение содержания субстрата (С16:1 ЖК) может приводить к накоплению продукта его десатурации под действием эндогенной $\Delta 12$ -десатуразы — С16:2 ($\Delta 9, 12$) ЖК. Схожие результаты получены в экспериментах, проведенных Verestovoy с соавт., где продемонстрированы сходные закономерности при транзгентной экспрессии desC гена в растениях табака. Следует отметить, что нами не выявлено изменение в уровне С18 ЖК, несмотря на то, что субстратом desC фермента преимущественно являются именно С18:0 ЖК. Помимо этого, показано, что индекс двойных связей у всех линий трансгенных растений, в том числе и у тех, которые демонстрировали изменения в ЖК-составе, остается неизменным относительно такового для контрольных растений.

В разных источниках сообщается о важной роли локализации десатураз в клетке. Так Dominguez с соавт. сообщают о доминантном вкладе хлоропласт-локализованной десатуразы в способность растений противостоять переохлаждению [13]. В работе Герасименко с соавт. была продемонстрирована активность гетерологичной desC десатуразы в растениях табака при локализации фермента в пластидах [20]. При этом экспрессия этого же гена, без направляющей в хлоропласт последовательности не приводила к изменению ЖК-состава. В нашей работе мы использовали три типа векторов для локализации белкового продукта в трех разных компартментах — хлоропластах, ЭПР и цитоплазме. Следует еще раз отметить, что первичные трансформанты растений, которые получали

Таблица 7. Содержание С18 ЖК (мг на г сухого веса) в листьях трансформированных растений томата

Линия	Тип ЖК			
	18:0	18:1	18:2	18:3
10ER	3.1 $\pm$ 1.30	0.2 $\pm$ 0.0561	7.3 $\pm$ 2.08	28.9 $\pm$ 10.3
50ER	2.4 $\pm$ 0.0919	0.2 $\pm$ 0.0707	8.3 $\pm$ 0.818	30.0 $\pm$ 2.71
54ER	2.7 $\pm$ 1.11	0.2 $\pm$ 0.0205	7.3 $\pm$ 1.06	29.2 $\pm$ 9.38
8ER	2.9 $\pm$ 0.494	0.4 $\pm$ 0.0256	8.8 $\pm$ 1.21	35.5 $\pm$ 6.32
50Chl	2.1 $\pm$ 0.626	0.2 $\pm$ 0.0254	5.6 $\pm$ 1.15	13.6 $\pm$ 2.47
3Cyt	5.3 $\pm$ 0.914	0.4 $\pm$ 0.0786	19.3 $\pm$ 4.04	57.7 $\pm$ 11.5
94Cyt	3.9 $\pm$ 1.23	0.1 $\pm$ 0.0973	9.3 $\pm$ 2.71	28.6 $\pm$ 7.87
12Cyt	2.3 $\pm$ 0.468	0.6 $\pm$ 0.133	11.5 $\pm$ 0.437	40.1 $\pm$ 5.22
15Cyt	3.5 $\pm$ 0.835	0.5 $\pm$ 0.0176	10.6 $\pm$ 1.06	40.5 $\pm$ 6.82
25Cyt	2.5 $\pm$ 0.674	0.3 $\pm$ 0.0581	7.6 $\pm$ 0.758	21.3 $\pm$ 3.62
Контроль	2.9 $\pm$ 0.727	0.4 $\pm$ 0.125	12.4 $\pm$ 2.09	31.8 $\pm$ 4.05

с использованием конструкции для хлоропластной локализации целевого белка, оказались не способны к образованию пыльцы и поколению T1 за исключением одной линии, которая и была проанализирована, однако изменений в ЖК-составе у этой линии не выявлено. Среди линий трансгенных растений с цитоплазматической и ЭПР-локализацией гетерологичной десатуразы обнаружены линии с измененным содержанием ненасыщенных ЖК. Эти результаты могут свидетельствовать о наличии субстратов для дельта-9-десатуразы как в составе цитоплазматической, так и ЭПР-мембран. Важно отметить, что наблюдаемые различия касаются C16:2 и C16:3 ЖК, тогда как содержание C18 ЖК во всех линиях трансгенных растений оставалось неизменным. Следует отметить, что об увеличении доли C16-ненасыщенных ЖК при экспрессии *desC* в растениях табака уже сообщалось ранее в работе Verestovoy с соавт. [14].

В нашем исследовании мы сопоставили данные ЖК-анализа листьев с данными, количественной оценки уровня мРНК целевого гена, для того, чтобы оценить взаимосвязь между уровнем представленности целевого транскрипта *desC* и содержанием ненасыщенных ЖК, как косвенным показателем активности белкового продукта *desC* [16]. Было показано, что линии трансгенных растений, которые характеризуются более высоким уровнем транскрипции гена *desC*, демонстрируют и увеличение содержания соответствующих ненасыщенных ЖК. Это линии – 25Cyt, 54ER, 8ER, у которых выявлен более высокий уровень относительного содержания транскрипта гена десатуразы по сравнению с линиями с неизменным ЖК-составом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе методом агробактериальной трансформации семядольных эксплантов с последующей регенерацией побегов путем непрямого органогенеза были получены независимые трансгенные растения томата линии ЯЛФ, экспрессирующие ген *desC*, с различной локализацией продукта экспрессии. Проведенный ГХ-МС анализ ЖК-состава позволил обнаружить линии (25Cyt, 8ER, 54ER), характеризующиеся увеличенным содержанием 16:1 и 16:2 ЖК в листьях. По данным ПЦР-РВ эти линии демонстрировали и увеличенный уровень транскрипции *desC* по сравнению с трансгенными линиями, ЖК-состав которых не отличался от контрольного значения. Таким образом, в данном исследовании нами сконструированы три линии трансгенных растений томатов с измененным ЖК-составом. Повышение содержания C16:1 ЖК, которая является субстратом для эндогенных дельта-12-десатураз, может при-

водить к увеличению экспрессии собственных ферментов растений с подобной активностью. Вероятно, именно изменение содержания C16:1 приводит к наблюдаемому увеличению количества C16:2 ЖК в полученных трансгенных линиях, в результате чего они могут являться хорошей моделью для изучения работы и регуляции эндогенных десатураз растений томата.

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда (проект № 21-74-30003) и в рамках государственных заданий Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 122042700043-9, тема № 122032300112-7).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лось Д.А. Структура, регуляция экспрессии и функционирование десатураз жирных кислот // Успехи биологической химии. 2001. Т. 41. С. 163.
2. He M., Qin C.-X., Wang X., Ding N.-Z. Plant unsaturated fatty acids: biosynthesis and regulation. // Front. Plant Sci. 2020. V. 11. P. 390. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00390>
3. Li N., Xu C., Li-Beisson Y., Philippar K. Fatty acid and lipid transport in plant cells // Trends Plant Sci. 2016. V. 21. P. 145. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.10.011>
4. Murata N., Wada H. Acyl-lipid desaturases and their importance in the tolerance and acclimatization to cold of cyanobacteria // J. Biochem. 1995. V. 308 P. 1. <https://doi.org/10.1042/bj3080001>
5. Kachroo P., Shanklin J., Shah J., Whittle E., Klessig D. A fatty acid desaturase modulates the activation of defense signaling pathways in plants // Proc. Natl. Acad. Sci. 2001. V. 98. P. 9448. <https://doi.org/10.1073/pnas.151258398>
6. Song N., Hu Z., Li Y. Overexpression of a wheat stearyl-ACP desaturase (SACPD) gene TaSSI2 in *Arabidopsis* ssi2 mutant compromise its resistance to powdery mildew // Gene. 2013. V. 524. P. 222. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.04.019>
7. Tsyurskaya E., Nikolaeva T., Lapshin P., Nechaeva T., Yuorieva N., Baranova E., Derevyagina M., Nazarenko L., Goldenkova-Pavlova I., Zagorskina N. Response of transgenic potato plants expressing heterologous genes of Δ9- or Δ12-Acyl-lipid desaturases to *Phytophthora infestans* infection // Plants. 2022. V. 11. P. 288. <https://doi.org/10.3390/plants11030288>
8. Ishizaki-Nishizawa O., Fujii T., Azuma M. Low-temperature resistance of higher plants is significantly en-

- hanced by a nonspecific cyanobacterial desaturase // Nat. Biotech. 1996. V. 14. P. 1003.
https://doi.org/10.1038/nbt0896-1003
9. Yu C., Wang H., Yang S., Tang X., Duan M., Meng Q. Overexpression of endoplasmic reticulum omega-3 fatty acid desaturase gene improves chilling tolerance in tomato // Plant Physiol. Biochem. 2009. V. 47. P. 1102. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.07.008
 10. Zhou Z., Wang M., Hu J. Improve freezing tolerance in transgenic poplar by overexpressing a ω -3 fatty acid desaturase gene // Mol. Breeding. 2010. V. 25. P. 571. https://doi.org/10.1007/s11032-009-9352-1
 11. Peng D., Zhou B., Jiang Y. Enhancing freezing tolerance of *Brassica napus* L. by overexpression of a stearyl-acyl carrier protein desaturase gene (SAD) from *Sapium sebiferum* (L.) Roxb // Plant Sci. 2018. V. 272. P. 32. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.03.028
 12. Liu X., Teng Y., Li B. Enhancement of low-temperature tolerance in transgenic tomato plants overexpressing Lefad7 through regulation of trienoic fatty acids // Photosynth. 2013. V. 51. P. 238. https://doi.org/10.1007/s11099-013-0014-5
 13. Dominguez T., Hernandez L., Pennycooke J., Jimenez P., Martinez-Rivas J., Sanz C., Stockinger E., Sanchez-Serrano J., Sanmartin M. Increasing ν -3 desaturase expression in tomato results in altered aroma profile and enhanced resistance to cold stress // Plant Physiol. 2010. V. 153. P. 655. https://doi.org/10.1104/pp.110.154815
 14. Berestovoy M., Pavlenko O., Tyurin A., Gorshkova E., Goldenkova-Pavlova I. Altered fatty acid composition of *Nicotiana benthamiana* and *Nicotiana excelsior* leaves under transient overexpression of the cyanobacterial desC gene // Biol. Plant. 2020. V. 64. P. 167. https://doi.org/10.32615/bp.2019.144
 15. Kiseleva L., Serebriiskaya T., Horváth I., Vigh L., Lyukevich A., Los D. Expression of the gene for the delta9 acyl-lipid desaturase in the thermophilic cyanobacterium. // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2000. V. 2. P. 331.
 16. Orlova I., Serebriiskaya T., Popov V., Merkulova N., Nosov A., Trunova T., Tsydendambaev V., Los D. Transformation of tobacco with a gene for the thermophilic acyl-lipid desaturase enhances the chilling tolerance of plants // Plant Cell Physiol. 2003. V. 44. P. 447. https://doi.org/10.1093/pcp/pcg047
 17. Vyacheslavova A., Berdichevets I., Tyurin A., Shishilashvili K., Mustafaev O., Goldenkova-Pavlova I. Expression of heterologous genes in plant systems: new possibilities // Russ. J. Gen. 2012. V. 48. P. 1067. https://doi.org/10.1134/S1022795412110130
 18. Höfgen R., Willmitzer L. Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation // Nucleic Acids Res. 1988. V. 16. P. 9877. https://doi.org/10.1093/nar/16.20.9877
 19. Reza M., Goldenkova-Pavlova I., Pchelkin V., Tsydendambaev V., Los D., Nosov A. Acyl-lipid $\Delta 12$ -desaturase of the cyanobacterium increases the unsaturation degree in transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) // Biologia. 2007. V. 53. P. 4.
 20. Герасименко И., Сахно Л., Кирпа Т., Остапчук А., Хаджиев Т. В., Голденкова-Павлова И. В., Шелудько Ю. Характеристика растений *Nicotiana tabacum*, экспрессирующих гибридные гены $\Delta 9$ - или $\Delta 12$ -ацил-липидных десатураз цианобактерий и термостабильной лихеназы // Физиология растений. 2015. Т. 62. С. 307.

УДК 581.1.575.113.1

ЭФФЕКТ НЕПОЛНОГО НОКАУТИРОВАНИЯ ГЕНА ПЛАСТИДНОЙ КРАХМАЛФОСФОРИЛАЗЫ *NtPHO1-L1* НА МЕТАБОЛИЗМ УГЛЕВОДОВ И КАРОТИНОИДОВ В ЛИСТЬЯХ *Nicotiana tabacum* L.¹

© 2024 г. А. В. Нежданова^a, А. В. Кулакова^{a,*}, М. А. Слугина^a, А. М. Камионская^a,
Е. З. Кочиева^a, А. В. Щенникова^a

^aИнститут биоинженерии им. К.Г. Скрябина Федерального исследовательского центра
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, Россия
*e-mail: kulakova_97@mail.ru

Поступила в редакцию 16.02.2024 г.

После доработки 12.03.2024 г.

Принята к публикации 03.04.2024 г.

Метаболизм крахмала регулируется сложной каталитической сетью, одним из ключевых ферментов которой является пластидная крахмалфосфорилаза PHO1. В нашем исследовании с использованием системы CRISPR-Cas9 были получены растения табака (*Nicotiana tabacum* L.) с неполным нокаутом гена *NtPHO1-L1* за счет делеционных вариантов каталитического домена белка *NtPHO1-L1*, приводящих к формированию нефункциональных форм фермента. Редактированные линии отличались от растений дикого типа повышенным накоплением крахмала и пониженным содержанием сахаров, хлорофиллов и каротиноидов в ткани листа. Показано, что в сравнении с контролем редактированные растения характеризовались дифференциальной экспрессией генов метаболизма крахмала (*NtPHO1-L1*, *NtGWD*, *NtBAM1*, *NtBAM9*, *NtAI*) и каротиноидов (*NtPSY2*, *NtPDS*, *NtZDS*, *NtCRTISO*, *NtVDE*), а также генов, кодирующих MADS-доменные транскрипционные факторы (*NtFUL1*, *NtSEP1*, *NtSEP2*, *NtSEP3*), которые предположительно участвуют в регуляции транскрипции исследуемых генов метаболизма. Предположено, что неполный нокаут *NtPHO1-L1* приводит к изменению функциональной активности крахмалфосфорилазы табака. Это, в свою очередь, может влиять на скоординированную работу ферментов катаболизма крахмала, а также синтеза хлорофиллов и каротиноидов, возможно, за счет дифференциальной экспрессии MADS-box генов. Наши результаты подчеркивают критическую регуляторную роль пластидной крахмалфосфорилазы в метаболизме транзитного крахмала, а также в стимулирующем влиянии на фотосинтез растения.

Ключевые слова: *Nicotiana tabacum*, CRISPR-Cas9, крахмалфосфорилаза, метаболизм крахмала, экспрессия генов

DOI: 10.31857/S0015330324050091, EDN: MMAQSH

ВВЕДЕНИЕ

Крахмал представляет собой смесь полисахаридов — линейной амилозы и разветвленного амилопектина, состоящих из мономеров α-глюкозы, связанных α-1,4-глюкозидными связями [1]. В процессе фотосинтеза растения накапливают данный α-1,4-полиглюкан в хлоропластах и затем используют его в ночное время в качестве источника энергии (транзитный крахмал)

или хранят в гетеротрофных органах (запасаемый крахмал) [1]. От особенностей регуляции метаболизма крахмала зависит развитие, стрессоустойчивость и урожайность культурных растений, а также питательность клубней, плодов или зерен [2, 3].

Известны ферменты, участвующие в синтезе и деградации крахмала, а также молекулярно-генетические механизмы регуляции данных путей [1, 2, 4]. Синтез крахмала начинается с катализа АДФ-глюкозопирофосфорилазой (AGP) образования АДФ глюкозы, который утилизируется синтазами крахмала (SS) с образованием линейных цепей α-1,4-глюкана. Один изофермент

¹ Дополнительные материалы размещены в электронном виде по DOI статьи: 10.31857/S0015330324050091

Сокращения: ТФ — транскрипционные факторы.

синтазы крахмала отвечает за синтез амилозы, тогда как другие участвуют в инициации формирования гранул крахмала и синтезе амилопектина. Точки ветвления внутри амилопектина вводятся изоферментами разветвления крахмала (SBE), и лишние α -1,6-звенья удаляются изоамилазами [2].

Деградацию крахмала запускают α -глюкан водная дикиназа (GWD) и фосфоглюкан-водная дикиназа (PWD), которые нарушают поверхностную структуру гранулы крахмала, делая цепи доступными для α -, β - и изоамилаз [2, 5]. Образующиеся молекулы мальтозы и мальтотриозы расщепляются с высвобождением глюкозы с помощью диспропорционирующих ферментов DPE1 и DPE2, соответственно [5].

Помимо ферментов синтеза или распада крахмала существуют α -глюканфосфорилазы (крахмалфосфорилазы, КФ 2.4.1.1), которые могут участвовать в обоих процессах [6–8]. В зависимости от внутриклеточной локализации и сродства к молекуле крахмала выделяют цитозольные (Н-тип, PNO2, высокое сродство к линейным и разветвленным гликанам) и эволюционно более молодые пластидные (L-тип, PNO1, низкое сродство к разветвленным гликанам и гетерогликанам) изоферменты [6, 9]. Крахмалфосфорилаза PNO1 отличается от PNO2 наличием N-концевого транзитного пептида и характерной вставки L78 [10]. Обе формы способствуют распаду (фосфоролизу) амилопектина, амилозы и мальтодекстрина [11]. Изофермент PNO2 участвует в сложном метаболизме растворимых гетерогликанов в цитозоле, куда они экспортируются во время деградации крахмала [12, 13].

Изофермент PNO1 считается основной формой фосфорилазы в растении [4, 14], поскольку функционирует в пластидах, осуществляя 96% общей фосфорилазной активности у риса (*Oryza sativa*) [15] и являясь вторым по распространенности белком в строме амилопластов кукурузы *Zea mays* [16]. Между уровнем экспрессии гена *PNO1-L1* и содержанием крахмала в плодах тыквы (*Cucurbita* sp.) присутствует прямая взаимосвязь [17]. Показано участие PNO1 в инициации синтеза запасаемого крахмала в эндосперме ячменного (*Hordeum vulgare*) и рисового зерна [7, 15, 18], а также в клубнях картофеля (*Solanum tuberosum*) [8, 19, 20].

Изменения метаболизма крахмала являются одной из первых биохимических реакций растений на сигналы окружающей среды. Фермент PNO1 может выступать как переключатель между синтезом и деградацией крахмала, необходимый для корректировки роста и развития растения в ответ на воздействие стрессовых факторов. К примеру, отсутствие экспрессии *PNO1 (PHS1)* делает растения *Arabidopsis thaliana* значительно более чувствительными к засухе [14]. Катали-

тическая активность и сродство изофермента PNO1 к разветвленным α -глюканам и глюкозо-1-фосфату зависят от температуры [15]. Если в нормальных условиях снижение экспрессии *PNO1* не меняет морфологию ячменного зерна [21] и клубней картофеля [9], то при низкой температуре это приводит к уменьшению размера рисового зерна и содержания крахмала в нем [15]. Рост экспрессии *PNO1* при низких температурах стимулирует синтез коротких цепей декстринов (основа молекул амилозы) [20] и сопровождается накоплением редуцирующих сахаров в клубнях картофеля [22].

У видов семейства Пасленовых (картофель и томат) описаны два изофермента пластидной крахмалфосфорилазы – PNO1a (L-1) и PNO1b (L-2) [9, 23–26]. Белки гомологичны (идентичность 81–84%) с наибольшей вариабельностью в области N-концевого транзитного пептида и домена L78 [23]. *PNO1a* транскрибируется как в листьях, так и в клубнях, тогда как *PNO1b* – в основном, в листьях; в клубнях белок PNO1a образует гомодимер, а в листьях – как гомодимер, так и гетеродимер с PNO1b [23]. Таким образом, из двух пластидных изоферментов роль PNO1a может быть более важна и функционально широка, чем PNO1b. В пользу этого свидетельствует прямая взаимосвязь между уровнем экспрессии гена *PNO1a* и содержанием крахмала в плодах томата (*Solanum lycopersicum*) [24] и в листьях растений картофеля при воздействии холода [25]. Также продемонстрирована необходимость *PNO1a* для нормального формирования гранул крахмала в клубнях картофеля, подстрахованная наличием в геноме дублированной копии гена [27]. Нокаут *PNO1a* вызывает снижение содержания крахмала в клубнях в основном за счет уменьшения количества амилозы, при этом не отменяет, но усиливает эффект холодового осахаривания [27]. Миссенс-мутация G261V в функциональном домене PNO1a приводит к изменениям морфологии корней и надземной части растения картофеля, а также содержания крахмала и экспрессии генов метаболизма крахмала в корнях и листьях, в том числе в ответ на воздействие холодового стресса [26].

В данном исследовании мы использовали систему CRISPR-Cas9 для редактирования гена *PNO1-L1* (гомолога *PNO1a* картофеля) в геноме *Nicotiana tabacum* в рамках расширения данных о роли пластидной крахмалфосфорилазы в развитии растения. Нами были получены независимые трансгенные линии, химерные по нокауту *PNO1-L1* за счет нескольких одновременных делеций с последующим сдвигом рамки считывания. Неполный нокаут гена вызвал изменения в содержании углеводов (крахмал, сахароза, глюкоза, фруктоза), хлорофиллов и каротиноидов в листовой ткани проростков. Кроме того, об-

наружены сдвиги в уровне экспрессии *PHO1-L1*, других генов метаболизма крахмала (*NtBAM1*, *NtBAM9*, *NtGWD*, *NtAI*) и каротиноидов (*NtPSY2*, *NtPDS*, *NtZDS*, *NtCRTISO*, *NtVDE*), а также генов MADS-доменных транскрипционных факторов (ТФ) (*NtSEP1*, *NtSEP2*, *NtSEP3*, *NtANR1*, *NtFUL1*). Наши результаты говорят о значимости изофермента *PHO1-L1* в метаболизме крахмала и развитии растения, включая фотосинтез и стрессовый ответ, а также допускают возможность непрямого участия *PHO1a* в регуляции стресс-чувствительных MADS-box генов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. В исследовании использована культура *in vitro* табака — растения *Nicotiana tabacum* L. (сорт Samsun) на стадии 5–7 листьев, выращенные на МС-среде (Sigma-Aldrich, США), содержащей 0.7% агара и 1.0% сахарозы, в климатической камере (16-часовой фотопериод; 21°C).

Геномное редактирование табака с помощью системы CRISPR-Cas9. Для геномного редактирования табака использовали бинарный вектор p201N-*PHO1a*-gRNA, полученный и успешно примененный ранее для редактирования гена *PHO1a* в геноме *S. tuberosum* [26].

Предварительно была проведена оценка соответствия последовательности гидовой РНК (gRNA) *PHO1a* картофеля соответствующему участку гена *NtPHO1-L1* табака (NCBI Gene ID 107814807). Конструкция собрана на основе бинарного вектора p201N_Cas9 (AddGene, Warrington, MA, США; кат. № 59175; <https://www.addgene.org/>), Т-область которого включает гены *Cas9* (под контролем двойного промотора CaMV35S) и *NPTII* (устойчивость к канамицину (Km)), а также кассету экспрессии gRNA (промотор *U6.6 Medicago truncatula*) [28].

Конструкцией с gRNA, а также пустым вектором p201N, трансформировали штамм *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. Суспензию агробактерии p201N-*NtPHO1-L1*-gRNA (опыт) и p201N (контроль), полученную из 5 мл ночной культуры, использовали для трансформации табака, как это описано ранее [29]. Вкратце: листовые экспланты табака, инфицированные соответствующим агробактериальным штаммом, культивировали на питательной среде А3 (минеральный состав и витамины как в МС-среде, 2% глюкоза, 0.7% Plant-агар, 0.1 мг/мл НУК, 1 мг/мл БАП, pH 5.5) для калусо- и побегообразования [29], одновременно содержащей 500 мг/мл карбенициллина (подавление роста агробактерии) и 100 мг/мл канамицина (селективный антибиотик). Образующиеся на каллусе зеленые побеги срезали и укореняли на свежей среде А3, не содержащей фито-

гормонов. Регенеранты, устойчивые к канамицину, то есть укоренившиеся и давшие первые листья зеленой окраски, адаптировали к условиям теплицы (16-часовой фотопериод; 21°C) и выращивали до созревания семян. Из листовой ткани регенерантов выделяли геномную ДНК и с помощью ПЦР с праймерами, специфичными к последовательности генов *NPTII* (канамицин-резистентность растения) и *virB* (ген агробактерии, участвующий в переносе Т-ДНК), подтверждали присутствие трансгена в геноме растения и отсутствие остаточного заражения агробактерией. Всего было получено 17 независимых регенерантов с конструкцией p201N-*NtPHO1-L1*-gRNA (опыт; Nt1–Nt17) и 13 — p201N (контроль), 12 и 8 из которых, соответственно, оказались трансгенными. У данных растений анализировали редактируемую область гена *NtPHO1-L1* (см. следующий пункт), на основе чего выбирали трансгенные линии, в геноме которых произошло событие редактирования *NtPHO1-L1*. Из 12 независимых трансгенных линий только растение Nt1 показало данный эффект. Семена данного растения проращивали на среде А3 с 100 мг/мл канамицина, и устойчивые проростки поколения T₁ в количестве 20 шт. адаптировали к теплице и анализировали в сравнении с контролем (сроки инициации цветения, морфологические характеристики; последовательность целевого сайта редактирования; уровень экспрессии генов). При анализе морфологических параметров использовали: среднее значение по 20 растениям контроля vs. средние значения по всем 20 растениям T₁; среднее значение по 20 растениям контроля vs. значение параметра для каждой отдельной отобранной линии T₁.

Анализ редактируемой области гена *NtPHO1-L1*. Геномную ДНК выделяли из листовой ткани трансгенного побега (первично полученные регенеранты поколения T₀) с помощью стандартного СТАВ-метода. С использованием соответствующих праймеров (табл. 1, Дополнительные материалы) амплифицировали участок гена *NtPHO1-L1*, содержащий сайт редактирования (последовательность гидовой РНК): программа ПЦР — 5 мин, 95°C; 35 циклов (30 с, 95°C; 30 с, 59°C; 1 мин, 72°C); 10 мин, 72°C. Продукты ПЦР ожидаемого размера (641 пн) очищали выделением из агарозного геля (QIAEX® II Gel Extraction Kit, QIAGEN, Германия), клонировали в вектор pGEM®-T Easy (pGEM®-T Easy Vector System I, Promega, США) и секвенировали по 10 плазмидных клонов (ABI PRISM 3730 DNA Analyzer, ЦКП “Биоинженерия”, ФИЦ Биотехнологии РАН).

Анализ экспрессии генов. Верхушечные листья проростка (в фазе развития 5–7 листа) растирали в жидком азоте и из 0.2–0.5 г

выделяли суммарную РНК (RNeasy Plant Mini Kit и RNase-free DNase set, QIAGEN, Германия) с последующим синтезом кДНК (GoScript Reverse Transcription System, Promega, США). Полученный препарат кДНК в количестве 3 нг использовали для проведения количественной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) на приборе CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, США). Последовательности ген-специфичных праймеров для ПЦР-РВ приведены в таблице 1 Дополнительных материалов [29]. Для реакции применены: стандартная программа (5 мин, 95°C, 40 циклов (15 с, 95°C; 40 с, 60°C)); “Набор реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя SYBR Green I” (кат. № R-402, Синтол, Россия); референсный ген *Actin-7* (LOC107831145) *N. tabacum* [29].

Анализ содержания каротиноидов, хлорофиллов и углеводов. Количество (мкг/г сырого веса) хлорофиллов (*a* и *b*) и каротиноидов определяли в ткани верхушечных листьев проростка (фаза развития 5–7 листа; те же тканевые пробы, что и для анализа экспрессии генов), согласно [29], с регистрацией спектров поглощения с помощью Eppendorf BioSpectrometer® basic (Eppendorf, Германия).

В той же ткани определяли содержание крахмала и сахаров (мг/г сырого веса). В случае крахмала — ~0.5 г ткани растирали, суспендировали в 4.5 мл 33% (об./об.) ДМСО, содержащего 0.44 М соляной кислоты, инкубировали 30 мин при 60°C на водяной бане, охлаждали до 25°C и разводили водой в соотношении 1:5. Далее доводили pH до 4.5 с помощью 5 М NaOH и фильтровали суспензию через Miracloth (Merck, США). Содержание крахмала (мг/г сырого веса) измеряли в 100 мкл фильтрата с использованием набора Starch (BoehringerMannheim/R-Biopharm, Швейцария). Содержание сахаров (сахароза, глюкоза, фруктоза) определяли с помощью тестов Enzytec™ Liquid Sucrose/D-Glucose и Enzytec™ Liquid D-Glucose/D-Fructose (R-Biopharm AG, Германия).

Структурный анализ и статистическая обработка данных. Сравнительный анализ последовательностей ДНК и белков проводили с помощью NCBI-BLAST, NCBI-CDD (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) и MEGA 7.0 (<https://www.megasoftware.net/>). Для анализа влияния замещений аминокислотных остатков (ао) на структуру и функцию редактированных белков использовали PROVEAN (<http://provean.jcvi.org/index.php>; “deleterious variant if score < -2.5”) и Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>; анализ 3D структуры белка). Поиск сайтов связывания с MADS-доменными ТФ в промоторе гена осуществляли с помощью программы PLACE (<https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/?action=newplace>).

Данные биохимического и экспрессионного анализа статистически обрабатывали с помощью Graph Pad Prism v. 8 (<https://www.graphpad.com>, США), применяя для оценки значимости различий One-way ANOVA (“multiple comparisons, corrected with Bonferroni test”). Результаты выражали как среднее значение ± стандартное отклонение (SD) на основе двух биологических и трех технических повторов (различие достоверно при значении $P < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Трансгенные линии табака *N. tabacum* с редактированным геном *NtPHO1-L1*. Поиск в геноме *N. tabacum* обнаружил два паралогичных гена пластидной формы крахмалфосфоорилазы *NtPHO1-L1*, гомологичной *PHO1a* картофеля: LOC107814807 (два варианта мРНК — X1 (XM_016640265.1) и X2 (XM_016640266.1)) и LOC107810306 (один вариант мРНК (XM_016635072.1)). Гены отличаются локализацией (разные скаффолды), количеством экзонов (16 и 15, соответственно) и размером (9533 и 9490 пн). В сравнении с изоферментом LOC107810306 (976 ао), изоформа X2 (977 ао, LOC107814807) характеризуется 13 замещениями ао и инсерцией E590. Обе последовательности отличаются от изоформы X1 (1011 ао, LOC107814807) размером (за счет делеции 34 ао E74–G107 в N-концевой области); остальная последовательность X2 идентична X1.

Сравнительный анализ всех трех возможных кодирующих последовательностей показал, что гидовая РНК (gRNA) 5'-gatcagatggaaagaggtattgg-3', которая была использована ранее для редактирования гена *PHO1a* картофеля [26], подходит и для редактирования обеих версий гена *NtPHO1-L1* табака. Данный участок локализован в положении 1109–1131 н (мРНК XM_016635072.1 гена LOC107810306; экзон XI) и 1141–1163/1039–1061 н (мРНК изоформ X1 (XM_016640265.1)/X2 (XM_016640266.1) гена LOC107814807; в экзонах VI и V, соответственно). В целевой последовательности мРНК гена LOC107810306 присутствовала замена (1124g→а положение в мРНК; или 16g→а — в gRNA).

Выбранная нами последовательность gRNA не совпадала по локализации с gRNA, использованной в недавнем исследовании нокаута *PHO1a* в геноме картофеля [27]. Участок gRNA (5'-gctgttgcaagaatgcctt-3') из этой работы локализуется в мРНК *NtPHO1-L1* табака в положениях 631–650 н (LOC107810306) и 663–682/561–580 н (изоформы X1/X2, LOC107814807). Поэтому в результате нокаута *NtPHO1-L1* растения табака должны формировать белковые молекулы в 2 раза длиннее, чем в работе [27].

Также было определено, что выбранная нами последовательность gRNA не гомологична кДНК гена *NtPHO1-L2* (XM_016590767.1, LOC107771409), кодирующего изофермент L-2 α -1,4-глюканфосфорилазы.

В результате агробактериальной трансформации табака векторной конструкцией, содержащей выбранную gRNA, было получено 12 независимых, устойчивых к антибиотику канамицину регенерантов T_0 и с помощью ПЦР на геномной ДНК подтверждено присутствие в геноме переносимой кассеты для редактирования. Внешне растения T_0 не отличались по морфологическим признакам ни от нетрансгенных линий, ни от трансгенных линий, трансформированных пустым вектором p201N.

На геномной ДНК линий был амплифицирован фрагмент, содержащий целевой сайт редактирования. Клонирование и секвенирование фрагмента выявило несколько событий редактирования в геноме растения *Nt1*. Пять из 10 секвенированных вариантов целевого сайта соответствовали дикому типу (LOC107810306 и LOC107814807). Остальные содержали пять вариантов делеций: (1) a13–g17→del(5nt)#; (2) a13–t18→del(6nt)#; (3) a11–g17→del(7nt)#; (4) a/g16–g17→del(2nt)#; (5) a11–t18→del(8nt)# (из-за разной длины трех вариантов транскриптов *NtPHO1-L1* локализация делеций указана по целевому участку 5'-gatcagatggaagaggtattgg-3') (рис. 1а).

Вариантов делеционных событий, указывающих на то, что использованная gRNA была действенна в отношении гена LOC107810306 с заменой 16g→a в целевом сайте, не наблюдалось.

Дальнейший анализ транслируемых последовательностей показал, что варианты 1, 3, 4 и 5 приводят к сдвигу рамки считывания и образованию преждевременных стоп-кодонов. В варианте 2 произошла делеция 6 нуклеотидов, которые не совпадали с кодирующими аминокислоты кодонами, вследствие чего в белке вместо делеции двух аминокислот три аа были замещены остатком аспарагина (N) (рис. 1б).

В случае гена LOC107810306 (один вариант мРНК XM_016635072.1), кодирующего белок размером 976 аа, вариант 2 составил 974 аа, а варианты 1, 3, 4 и 5 – 286, 280, 285 и 287 аа, соответственно. В случае гена LOC107814807 (изоформа мРНК X1, XM_016640265.1), кодирующего белок размером 1011 аа, вариант 2 составил 1009 аа, а варианты 1, 3, 4 и 5 – 320, 314, 321 и 319 аа, соответственно. В случае гена LOC107814807 (изоформа мРНК X2, XM_016640266.1), кодирующего белок размером 977 аа, вариант 2 составил 975 аа, а варианты 1, 3, 4 и 5 – 286, 280, 287 и 285 аа, соответственно.

Согласно NCBI-CDD, функциональный домен GT35_Glycogen_Phosphorylase (cd04300)

расположен на участке 91–970 (LOC107810306), 125–1005 (LOC107814807, X1) и 91–971 (LOC107814807, X2) аа. Данный домен состоит из N- и C-концевых доменов, разделенных участком L78 (в позиции 497–572, 531–607 и 497–572 аа, соответственно), который включает каталитический центр и обеспечивает высокую степень гибкости белка. То есть, варианты 1, 3, 4 и 5 содержат только начало N-концевого домена GT35 и не имеют каталитического центра. Вариант 2 содержит замещение в N-концевом домене GT35 (K274–Y276delinsN, K308–Y310delinsN и K274–Y276delinsN, соответственно) (рис. 1б).

Дальнейший анализ показал, что варианты замещения K–YdelinsN не приходятся на активные каталитические или белок-связывающие сайты (согласно NCBI-CDD), однако являются радикальными (по прогнозу PROVEAN) для всех трех исходных форм белков (score = –8.649/–8.181/–8.817). Поэтому три варианта с замещением KKY или KRY на N в последовательности N-концевой области GT35, предположительно, могут иметь функциональные нарушения. В норме, структура N- и C-концевых частей домена GT35 представляет собой укладку Россмана (Rossmann fold), которая, в числе прочего, характеризуется наличием параллельных β -листов (NCBI-CDD). Анализ пространственной структуры белков (Phyre2) показал, что замещения KKY или KRY на N могут привести к потере одного из β -листов (рис. 1в), что свидетельствует в пользу нарушения функции таких белков.

Таким образом, в растении *Nt1* могут синтезироваться три варианта белка дикого типа, а также нефункциональные три варианта с замещением K–YdelinsN и 12 значительно укороченных вариантов белка.

Далее были проанализировано поколение T_1 от линии *Nt1*, среди которых было отобрано три растения (*Nt1-11*, *Nt1-13*, *Nt1-15*), содержащие все пять вариантов обнаруженных ранее делеций (рис. 2а). Сравнительный морфологический анализ показал, что в среднем поколение T_1 (20 растений) не отличается от контроля по времени инициации цветения и весу семян с одной коробочки (рис. 2б). В то же время были отмечены статистически значимые изменения у выбранных трех отдельных растений: *Nt1-13* имело более короткий стебель; *Nt1-15* формировало больше листьев; все три растения *Nt1-11*, *Nt1-13* и *Nt1-15* образовывали меньше цветков (рис. 2б). Кроме того, визуально была заметна разница в яркости зеленой окраски листьев у *Nt1-13* и *Nt1-15* в сравнении с контролем (рис. 2а).

Содержание углеводов и пигментов в листьях. Присутствие нефункциональных вариантов крахмалфосфорилазы, вероятно может повлиять на содержание, в первую очередь, углеводов, и, как следствие, пигментов, связанных

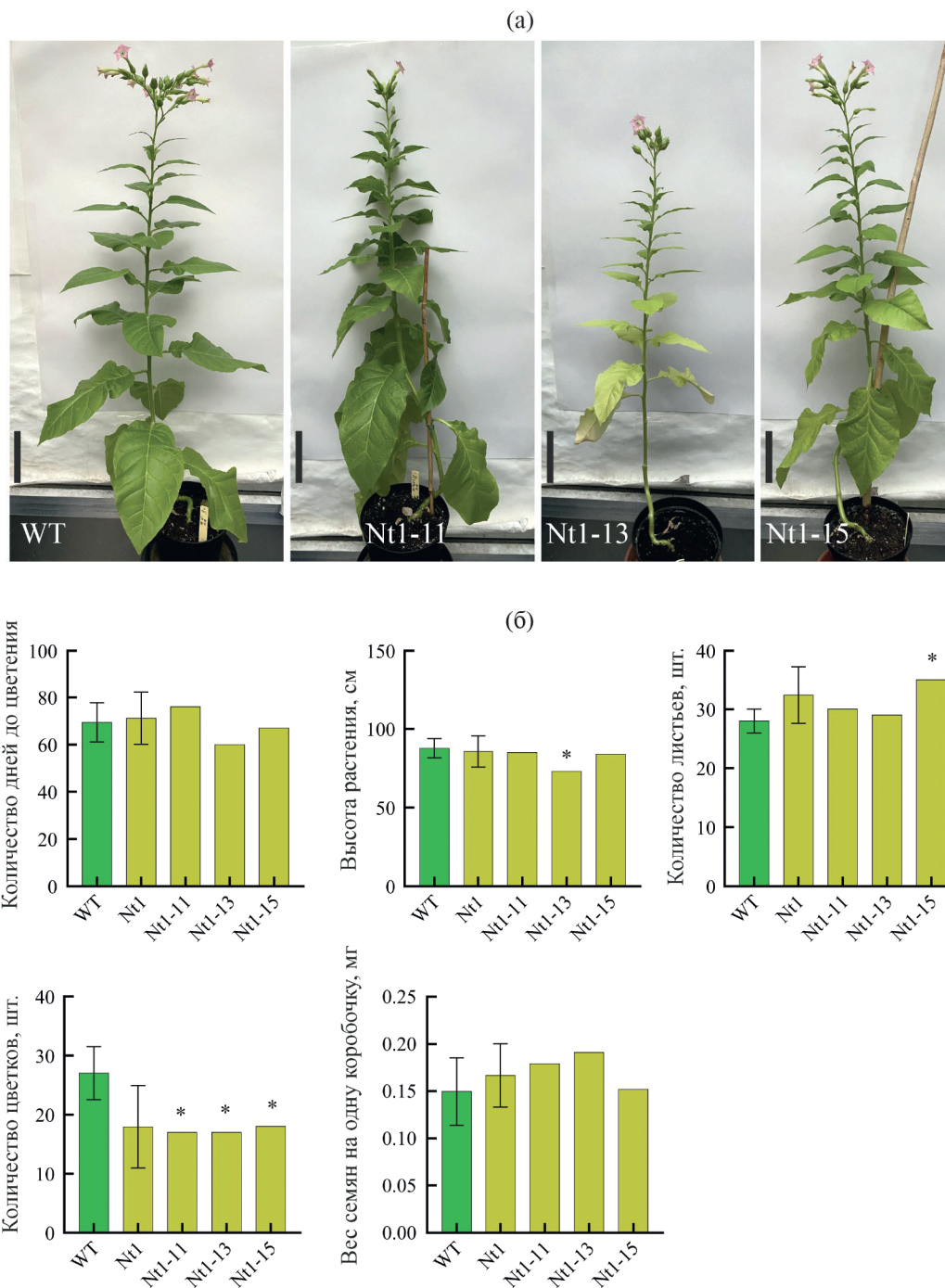


Рис. 2. Трансгенные линии *Nicotiana tabacum* (Nt1-11, Nt1-13 и Nt1-15) с мозаично нокаутированным геном пластидной крахмалфосфорилазы *NtPHO1-L1* в сравнении с нетрансгенным контролем (WT): (а) – фотографии растений WT, Nt1-11, Nt1-13 и Nt1-15 на стадии цветения (масштаб 10 см); (б) – сравнение основных характеристик контрольных (WT, среднее по 20 растений) и редактированных линий T1 от Nt1 (среднее по 20 растений Nt1-1–Nt1-20; далее по графику даны индивидуальные значения для каждого из анализируемых растений Nt1-11, Nt1-13 и Nt1-15). * $P < 0.05$ – статистически значимое различие T1 от Nt1 vs. WT.

с фотосинтезом, что косвенно подтверждается регистрируемыми нарушениями морфологических параметров и окраски листьев у линий Nt1-11, Nt1-13 и Nt1-15. Нами было определено содержание крахмала, сахарозы, фруктозы, глюкозы, а также суммы каротиноидов и хлорофил-

лов *a* и *b* в листьях трансгенных линий Nt1-11, Nt1-13 и Nt1-15 в сравнении с растениями дикого типа.

Было показано, что у всех трех линий Nt1-11, Nt1-13 и Nt1-15 значительно повысилось содержание крахмала (в ~10, 37 и 12 раз, соответственно)

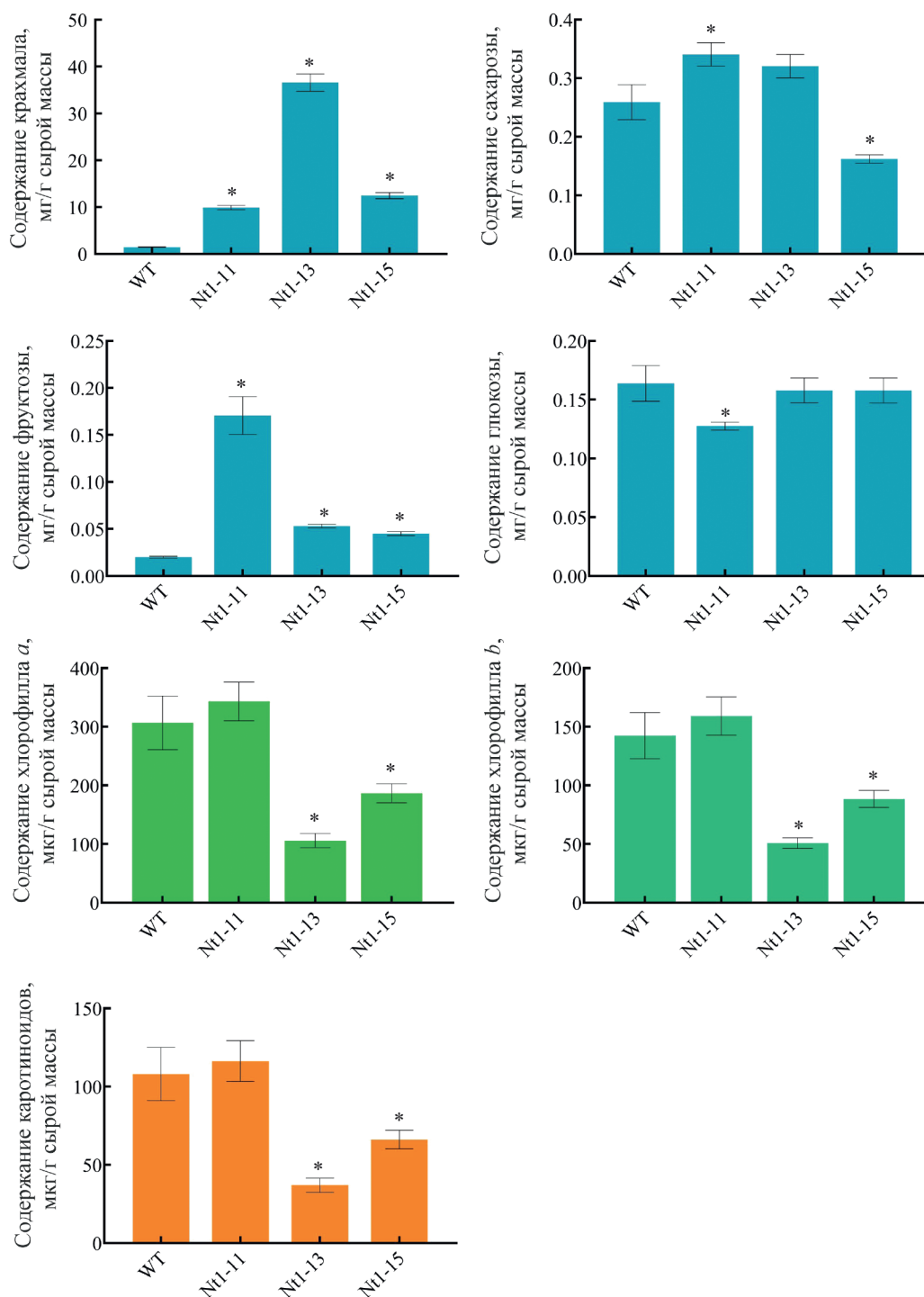


Рис. 3. Содержание крахмала, сахарозы, глюкозы, фруктозы (мг/г сырой массы), суммы каротиноидов и хлорофиллов а и b (мкг/г сырой массы) в листовой ткани растений Nt1-11, Nt1-13 и Nt1-15 в сравнении с нетрансгенным контролем WT. *P < 0.05 — статистически значимое различие T1 от Nt1 vs. WT.

и фруктозы (в ~8, 2 и 2 раза, соответственно). Количество сахарозы и глюкозы достоверно снизилось у растений Nt1-15 и Nt1-11, соответственно (рис. 3). В сравнении с контролем количество как каротиноидов, так и хлорофиллов в листьях линии Nt1-11 не изменилось, тогда как у редактированных линий Nt1-13 и Nt1-15 значительно

уменьшилось; при этом содержание каротиноидов прямо коррелировало с содержанием хлорофиллов (рис. 3). Наблюдаемые различия между редактированными линиями могут быть связаны с разной степенью полноты (как по числу клеток, так и по числу аллелей (4 с учетом двух генов)) произошедшего редактирования.

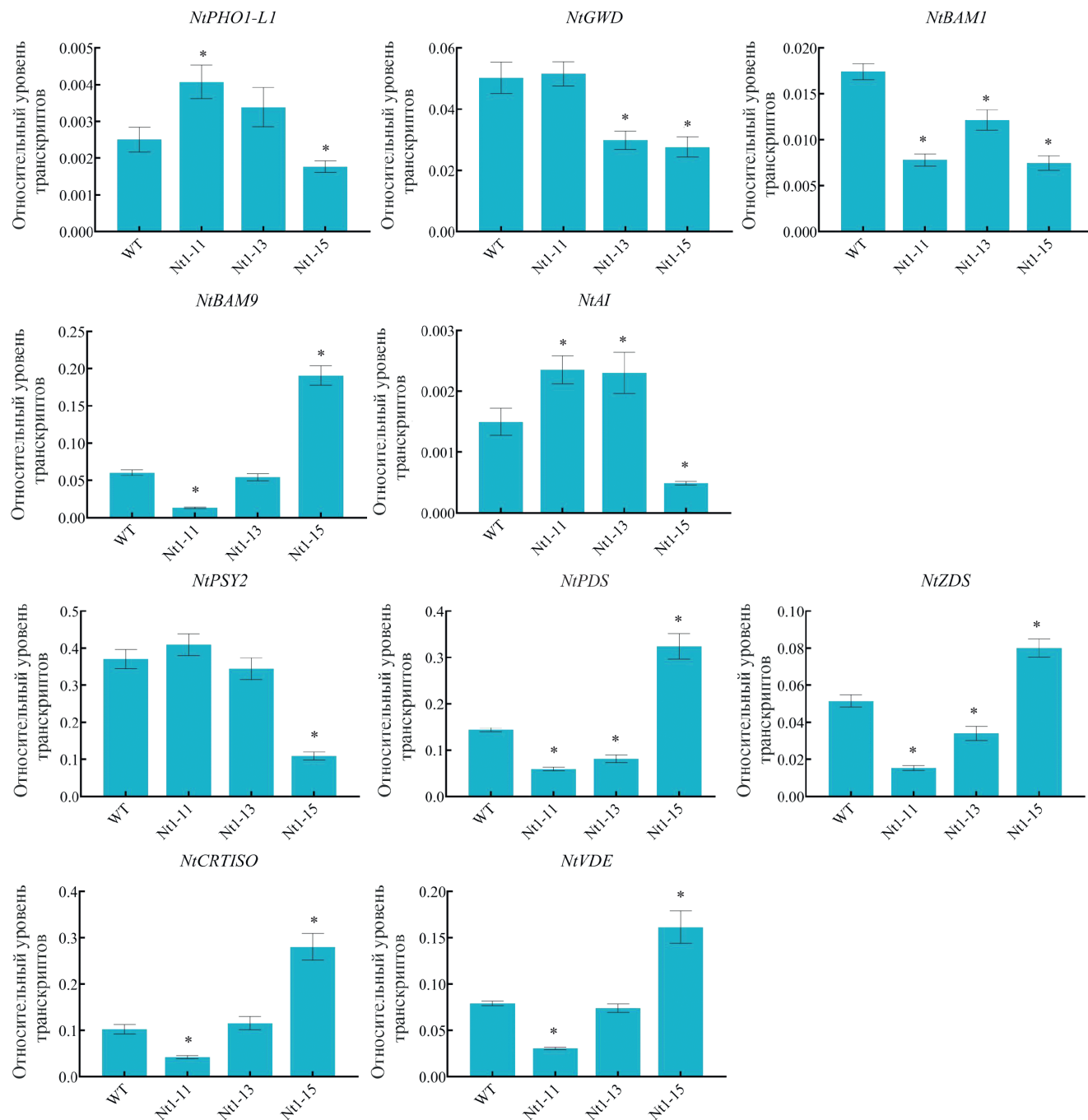


Рис. 4. Экспрессия генов метаболизма крахмала (*NtPHO1-L1*, *NtGWD*, *NtBAM1*, *NtBAM9*, *NtAI*) и биосинтеза каротиноидов (*NtPSY2*, *NtPDS*, *NtCRTISO*, *NtZDS*, *NtVDE*) в листовой ткани растений Nt1-11, Nt1-13 и Nt1-15 в сравнении с нетрансгенным контролем WT. *P < 0.05 – статистически значимое различие T1 от Nt1 vs. WT.

Профиль экспрессии генов метаболизма крахмала и каротиноидов в листьях. Принимая во внимание взаимосвязь и взаимное влияние количества метаболитов и экспрессии соответствующих генов, а также неполное редактирование гена *NtPHO1-L1* у линий Nt1-11, Nt1-13 и Nt1-15, мы проверили, в первую очередь, уровень транскриптов гена *NtPHO1-L1*. В сравнении с контролем количество мРНК гена увеличилось (Nt1-11), не изменилось (Nt1-13) или

уменьшилось (Nt1-15) (рис. 4). Далее была определена экспрессия отдельных генов метаболизма крахмала, кодирующих α -глюкан водную дикиназу (*NtGWD*), β -амилазы (*NtBAM1*, *NtBAM9*) и ингибитор амилаз (*NtAI*). Мы обнаружили, что уровень транскриптов *NtGWD* не изменился (Nt1-11) или снизился в ~2 раза (Nt1-13, Nt1-15); *NtBAM1* – снизился у всех трех линий в ~2 (Nt1-11, Nt1-15) и 1.5 (Nt1-13) раза; *NtBAM9* – уменьшился в ~5 раз (Nt1-11), не изменился

Таблица 1. Наличие CArG-box в последовательности промотора генов метаболизма углеводов и каротиноидов у *Nicotiana tabacum*

Ген	NCBI ID	Скаффолд (локализация гена)	Локализация промотора (1.5 кб)	Локализация CArG-box в промоторе (CARGCW8GAT)
<i>NtBAM1</i>	LOC107832261	NW_015787824.1 (26358..29662)	24858–26357	416, 1117
<i>NtBAM9</i>	LOC107827956	NW_015849100.1 (4074..7620, complement)	7621–9121	1368
<i>NtGWD</i>	LOC107780374	NW_015797716.1 (8065..13004)	7565–8064	1556, 1771
	LOC107832610	NW_015793074.1 (251..14125)	0–251*	—
	LOC107775774	NW_015901023.1 (87993..98472, complement)	86493–87992	878, 1218
<i>NtAI</i>	LOC107802234	NW_015802778.1 (26868..31183)	25368–26867	235, 383, 1710
<i>NtPHO1-L1</i>	LOC107810306	NW_015804840.1 (2762..12251, complement)	12252–13751	246
	LOC107814807	NW_015809487.1 (94062..103594)	92562–94061	232, 432
<i>NtPSY2</i>	LOC107772713	NW_015796120.1 (9958..12592)	8458–9957	—
	LOC107761716	NW_015874368.1 (9940..13765)	8440–9939	—
<i>NtZDS</i>	LOC107772271	NW_015892502.1 (11995..18341, complement)	18342–19842	964
<i>NtPDS</i>	LOC107816873	NW_015814914.1 (652..8553)	0–651*	270, 418
<i>NtCRTISO</i>	LOC107832559	NW_015864184.1 (1937..8985, complement)	8986–10485	—
	LOC107791326	NW_015919655.1 (47476..54454, complement)	54455–55954	462, 1675
<i>NtVDE</i>	LOC107780507	NW_015797768.1 (65794..70434)	64294–65793	1155, 1597
	LOC107763628	NW_015880850.1 (21643..26233)	20143–21642	1272, 1625

*Доступные в NCBI геномные последовательности не позволяют идентифицировать участки промотора размером 1.5 кб.

(Nt1-13) или вырос в ~4 раза (Nt1-15); *NtAI* – вырос в ~1.5 раза (Nt1-11, Nt1-13) или уменьшился в ~3 раза (Nt1-15) (рис. 4). Профиль экспрессии *NtPHO1-L1* и других тестируемых генов метаболизма крахмала (рис. 4) не коррелировал с содержанием крахмала или тестированных сахаров (рис. 3).

Последующий анализ экспрессии генов биосинтеза каротиноидов, кодирующих фитоинсинтазу (*NtPSY2*), фитоиндесатуразу (*NtPDS*), цис-транс-каротиноидизомеразу (*NtCRTISO*), 15-цис-ξ-каротинизомеразу (*NtZDS*) и виолак-сантиндеэпоксидазу (*NtVDE*), также обнаружил различия в сравнении с контролем. Было показано, что уровень транскриптов *NtPSY2* изменился только у Nt1-15 (снизился в ~3 раза); *NtPDS* – в ~2 раза снизился (Nt1-11, Nt1-13) или поднялся (Nt1-15); *NtCRTISO* – уменьшился в ~2 раза (Nt1-11), не изменился (Nt1-13) или возрос в ~2.5 раза (Nt1-15); *NtZDS* – снизился в ~3/1.5 раза (Nt1-11/Nt1-13) или увеличился в ~1.5–2 раза (Nt1-15); *NtVDE* – снизился

в ~3 раза (Nt1-11), не изменился (Nt1-13) или вырос в ~1.5–2 раза (Nt1-15) (рис. 4). Корреляций уровня экспрессии генов каротиногенеза с содержанием каротиноидов выявлено не было. Также не обнаружено взаимосвязи с содержанием крахмала/сахаров и с уровнем транскриптов генов метаболизма крахмала.

Профиль экспрессии MADS-box генов в листьях. Предполагая, что ТФ, гомологичные SEP и FUL, могут участвовать в регуляции транскрипции генов метаболизма крахмала и каротиноидов (согласно [30, 31]), мы проанализировали, во-первых, присутствие сайтов связывания CArG-box в промоторной области анализируемых генов, и, во-вторых, экспрессию MADS-box генов *NtSEP1*, *NtSEP2*, *NtSEP3* и *NtFUL1* в листьях редактированных растений.

В результате было показано, что промотор (1.5 кб) большинства анализируемых генов содержит по два CArG-box (табл. 1). Ни одного сайта не было найдено в промоторе гена *NtPSY2* (оба гомолога), а также в случае одной из двух

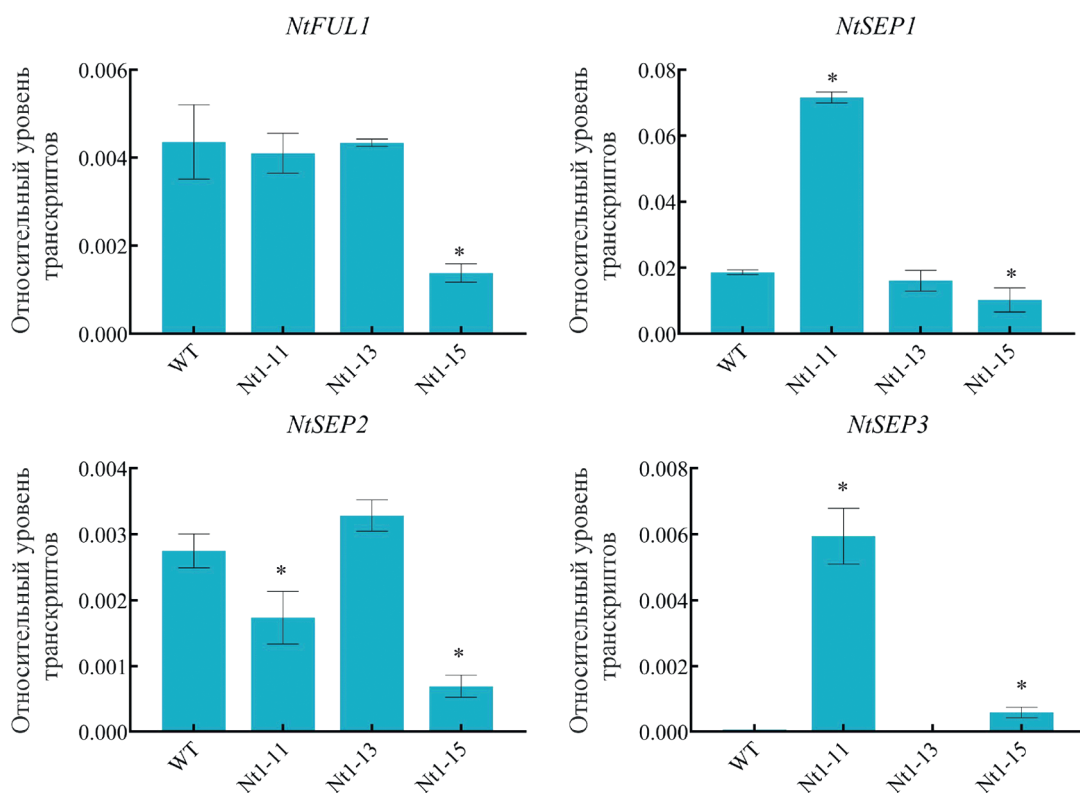


Рис. 5. Экспрессия генов MADS-доменных ТФ (*NtFUL1*, *NtSEP1*, *NtSEP2*, *NtSEP3*) в листовой ткани растений Nt1-11, Nt1-13 и Nt1-15 в сравнении с нетрансгенным контролем WT. *P < 0.05 – статистически значимое различие T1 от Nt1 vs. WT.

версий генов *NtCRTISO* и *NtGWD* (для *NtGWD* причина может быть в доступной слишком короткой последовательности промотора – 251 н). Промотор гена *NtZDS* и второй версии генов *NtBAM9* и *NtPHO1-L1* содержал только по одному CArG-box (табл. 1).

Проведенный далее анализ экспрессии MADS-box генов *NtSEP1*, *NtSEP2*, *NtSEP3* и *NtFUL1* показал наличие транскриптов *NtSEP1*, *NtSEP2* и *NtFUL1* в листьях контроля и всех трех редактированных линий, тогда как мРНК *NtSEP3* присутствовала только у Nt1-11 и, почти на порядок меньше, у Nt1-15 (рис. 5). В сравнении с контролем уровень транскриптов *NtFUL1* не изменился (Nt1-11, Nt1-13) или снизился в 2-3 раза (Nt1-15); *NtSEP1* – не отличался (Nt1-13), в ~3.5 раз вырос (Nt1-11) или в ~1.1 раз снизился (Nt1-15); *NtSEP2* – не менялся (Nt1-13) или был в ~1.2/5 раз ниже (Nt1-11/Nt1-15) (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ

Подобно другим метаболическим путям, протекающим в растении, регуляция пути метаболизма крахмала зависит от уровней содержания метаболитов, активности ферментов и экспрессии генов, кодирующих ферменты.

Помимо ферментов, катализирующих анаболизм или катаболизм α -1,4-полиглюкана, имеется пластидная крахмалфосфорилаза L-типа (PHO1), которая уникальна своим участием и в деградации, и в синтезе крахмала [27]. PHO1 катализирует фосфоролиз глюканов, расположенных на поверхности крахмальных гранул или образующихся в результате деградации крахмала. Происходит высвобождение молекул глюкозо-1-фосфата, который преобразуется в АДФ-глюкозу и далее в АТФ (источник энергии для всех биохимических процессов в растении). То, что глюкозо-1-фосфат дает больше АТФ, чем свободная глюкоза, образующаяся в процессе гидролиза, подчеркивает важность фосфоролиза и, следовательно, крахмалфосфорилаз [1, 2, 4, 27]. Роль PHO1 в синтезе крахмала заключается в образовании под ее действием в пластидах при деградации крахмала мальтоолигосахаридов, которые участвуют в создании праймирующих структур на начальных стадиях инициации крахмальных гранул [8]. Подтверждением данной роли PHO1 является положительная корреляция уровня экспрессии гена *PHO1* с содержанием α -1,4-полиглюкана в запасующих органах растения [7, 8, 15, 17–20]. Неясно, есть ли подобная зависимость для транзиторной формы крахмала,

поскольку показано, что эффект от выключения активности пластидной крахмалфосфорилазы различается для запасаемого и транзитного крахмала [27].

Данное исследование было сфокусировано на роли *PHO1a* в метаболизме транзитного крахмала, для чего было получено двенадцать независимых трансгенных линий *N. tabacum* с неполным нокаутом гена пластидной крахмалфосфорилазы *NtPHO1-L1* (LOC107814807 и, возможно, LOC107810306) (рис. 16, в). Растения поколения T_1 одной из линий (*Nt1*) внешне незначительно отличались от контроля, за исключением ослабления зеленой окраски листьев у отдельных образцов (*Nt1-13*, *Nt1-15*) при сохранении ярко-зеленой окраски другими образцами (например, *Nt1-11*, отобранный для дальнейшего анализа) (рис. 2а, б). Поскольку все три упомянутых растения характеризовались присутствием всех выявленных пяти вариантов делеций в геноме, сравнительный анализ их реакции на неполный нокаут *NtPHO1-L1* мог способствовать пониманию функции данного гена.

Поскольку нашей целью была связь пластидной крахмалфосфорилазы с транзитным крахмалом, дальнейший анализ проводился на листьях взрослых растений *Nt1-11*, *Nt1-13* и *Nt1-15*. Тестирование листовой ткани биохимическими методами показало, что даже частичное нокаутирование гена *NtPHO1-L1* способно привести к значительному повышению содержания крахмала (рис. 3). Предположительно, это происходит в результате сдвига метаболизма крахмала в сторону его синтеза и, следовательно, может означать, что в норме *NtPHO1-L1* оказывает значительное и предпочтительное влияние на деградацию транзитного крахмала. Полученные нами данные не согласуются с показанным другими исследователями сохранением количества крахмальных гранул в хлоропластах листьев картофеля при снижении уровня экспрессии гена *PHO1b* или нокауте гена *PHO1a* [27]. Также отличается показанный эффект от реакции запасаемого крахмала в клубнях картофеля, где нокаут *PHO1a* привел к снижению содержания крахмала, при этом повышение количества редуцирующих сахаров [27] сходится с нашими результатами только в отношении фруктозы (рис. 3). Это еще раз подтверждает, что *PHO1* может вести себя по-разному в отношении двух форм крахмала.

Известна положительная взаимосвязь между процессами биосинтеза крахмала и фотосинтезом [32]. Биохимическое тестирование растений *Nt1-11*, *Nt1-13* и *Nt1-15* показало отсутствие корреляции между количеством крахмала и накоплением хлорофиллов и каротиноидов как компонентов фотосинтетического аппарата (рис. 3).

Так, содержание крахмала было повышенным в листьях всех трех анализируемых линий, при этом только у двух линий произошли изменения в содержании хлорофиллов и каротиноидов в сторону существенного снижения (рис. 3), что отразилось на окраске листьев (рис. 2). Это предполагает существование не прямой, более сложной зависимости между содержанием крахмала и пигментов.

Наблюдаемые изменения содержания крахмала могут влиять на активность других ферментов, связанных с его метаболизмом, экспрессия которых может регулироваться крахмалом как субстратом или продуктом [27]. Для лучшего понимания происходящего мы провели анализ экспрессии основных (помимо крахмалфосфорилазы *PHO1*) генов деградации крахмала, кодирующих α -глюкан водную дикиназу *NtGWD*, β -амилазы *NtBAM1* и *NtBAM9*, а также ингибитор α - и β -амилаз *NtAI*. Гены амилаз были выбраны по гомологии генам β -амилаз картофеля *BAM1* и *BAM9*, о которых известно, что они участвуют в деградации крахмала, действуя в паре: не обладающий каталитической активностью *BAM9* связывается одновременно с поверхностью крахмальных гранул и с *BAM1*, привлекая ферментативно активный *BAM1* к областям деградации крахмала [33]. Ингибитор амилаз *AI* способен связываться с *BAM1* и *BAM9*, блокируя активный центр или изменяя конформацию молекул [34].

Наши данные показали, что гены *NtBAM1*, *NtBAM9* и *NtAI* под влиянием частичного нокаута *NtPHO1-L1* дифференциально экспрессировались в листьях изучаемых линий, но без какой-либо тенденции (рис. 4). Это может свидетельствовать о попытках редактированных растений приспособиться к частично отсутствующей активности крахмалфосфорилазы и адаптировать метаболизм крахмала с привлечением гидролитических ферментов. Отдельные гены меняли свою экспрессию сходным между редактированными растениями образом. Так, уровень мРНК гена каталитически активного *NtBAM1* снижался во всех трех линиях, и там же увеличивалось содержание крахмала (рис. 4). Однако, в целом, схема приспособления оказалась специфична для каждого конкретного растения, и регуловка, предположительно, могла осуществляться за счет комбинирования разных уровней экспрессии генов *NtGWD* (открытие доступа амилазам к грануле крахмала), *NtBAM9* (сродство к грануле крахмала и привлечение *NtBAM1*) и *NtAI* (ингибирование активности амилаз).

К примеру, у растения *Nt1-11* (vs. контроль) уровень транскриптов *NtGWD* сохранился, однако экспрессия *NtBAM1* и *NtBAM9* снизилась, а *NtAI* повысилась (рис. 4). То есть, деградация

крахмала может быть снижена за счет ослабления процесса привлечения активного NtBAM1 к грануле, уменьшения количества белка NtBAM1 и роста ингибиторной активности по отношению к амилазам.

У растения Nt1-13 (vs. контроль) уровень транскриптов *NtGWD* снизился, экспрессия *NtBAM9* не изменилась, *NtBAM1* снизилась, а *NtAI* повысилась (рис. 4). Деградация крахмала может быть снижена за счет снижения доступа амилаз к грануле, уменьшения количества активного фермента NtBAM1 и увеличения ингибиторной активности по отношению к амилазам (самое значительное среди образцов увеличение содержания крахмала) (рис. 3).

У растения Nt1-15 (vs. контроль) уровень транскриптов *NtGWD* снизился, экспрессия *NtBAM9* повысилась, а *NtBAM1* и *NtAI* снизилась (рис. 4). Деградация крахмала может быть снижена за счет снижения доступа амилаз к грануле и уменьшения количества активного фермента NtBAM1.

Таким образом, во всех трех случаях произошло замедление гидролиза крахмала и, как следствие, сдвиг метаболизма в сторону синтеза. Если сравнивать с контролем, то, исходя из содержания крахмала (рис. 3), растения Nt1-11 и Nt1-15 более успешно, чем Nt1-13 противостояли частичному нокауту *NtPHO1-L1*. Если исходить из окраски листьев и параметров растения, то адаптация образца Nt1-11 была более полной, чем Nt1-15. Растения не различались по высоте (рис. 2), листья Nt1-15 были светлее, чем листья Nt1-11 (но зеленее, чем листья Nt1-13), и содержали крахмала меньше, чем Nt1-15, что ближе к контрольному значению (рис. 3).

Успешность приспособления Nt1-11 к частичному нокауту *NtPHO1-L1* отразилась и в количестве хлорофиллов/каротиноидов в листовой ткани, которое не отличалось от контроля. Поэтому для большего понимания происходящего нами был проведен анализ экспрессии генов табака, кодирующих ферменты основных этапов биосинтеза каротиноидов — PSY2, PDS, ZDS, CRTISO и VDE. С работы фитинсинтазы PSY (в фотосинтезирующей ткани активен преимущественно светозависимый, хлоропласт-специфичный изофермент PSY2) начинается синтез каротиноидов. Далее, предшественник каротиноидов 15-*цис*-фитоин, преобразуется под действием фитоиндесатуразы PDS, ζ -каротиндесатуразы ZDS и *цис-транс*-каротиноидизомеразы CRTISO в *транс*-ликопин. Потом синтезируются ксантофиллы, в том числе виолаксантинового цикла, где виолаксантиндеэпоксидаза VDE играет важную роль в регуляции перераспределения энергии света между виолаксантином, зеаксантином (ксантофиллы) и хлорофиллом *a* [35].

В результате было показано, что образцы Nt1-11, Nt1-13 и Nt1-15 отличаются от контроля уровнем экспрессии большинства проанализированных генов, при этом профиль различий индивидуален для каждого из трех растений (рис. 4). Неполный нокаут *NtPHO1-L1* очевидно нарушил согласованную работу ферментов катаболизма крахмала и биосинтеза каротиноидов. При этом каких-либо корреляций с содержанием каротиноидов (рис. 3) выявлено не было.

С регуляцией биосинтеза каротиноидов и углеводов в растениях связывают важнейшие регуляторы развития растений — MADS-доменные ТФ, сайты связывания (консенсус $CC(A/T)_6GG$, или CArG-box) с которыми обнаружены в регуляторной области почти всех генов каротиногенеза, а также некоторых генов углеводного метаболизма (например, инвертаз, гидролизующих сахарозу) [30]. Взаимодействие подтверждено опытным путем на примере томата при поиске генов-мишеней ТФ RIPENING INHIBITOR (MADS-RIN, подсемейство SEP). ТФ MADS-RIN в комплексе с другими MADS-доменными ТФ — гомологами FRUITFULL (FUL) и AGAMOUS (AG), определяет созревание плода томата; связывание тетрамерных MADS-комплексов с промоторами генов-мишеней задействует два CArG-box мотива [30]. На примере плода банана показано участие MADS-box генов, гомологичных *RIN*, в регуляции метаболизма крахмала [36].

Проведенный анализ промоторов изучаемых генов деградации крахмала и биосинтеза каротиноидов подтвердил присутствие у большинства генов по два консенсуса CArG-box, необходимых для связывания с комплексом MADS-доменных ТФ (табл. 1). Следовательно, транскрипция генов метаболизма крахмала, как и генов каротиногенеза, может находиться под контролем MADS-доменных ТФ. Таким образом, дифференциальная экспрессия MADS-box генов в ответ на изменение содержания углеводов и каротиноидов, также возможна.

В нашей работе анализируется ткань листа, поэтому мы выбрали для анализа гены *NtFUL1*, *NtSEP1*, *NtSEP2* и *NtSEP3*, так как в вегетативной ткани могут экспрессироваться гены подсемейств *SEP* и *FUL* [31].

В результате было показано, что у образца Nt1-13, в листе которого наиболее существенно снизилось количество хлорофиллов/каротиноидов и поднялось содержание крахмала, уровень транскриптов всех проанализированных MADS-box генов не отличался от контроля (рис. 5). В то же время у двух других образцов — Nt1-11 и Nt1-15, где количество крахмала выросло, но меньше, чем у Nt1-13, а количество пигментов не изменилось (Nt1-11) или упало (Nt1-15), профиль экспрессии MADS-box генов

изменился зависимым от образца образом (рис. 5). Каких-либо корреляций с экспрессией генов деградации крахмала или биосинтеза каротиноидов, а также с содержанием метаболитов в листе выявлено не было. Тем не менее, обнаруженная дифференциальная экспрессия MADS-box генов предполагает их возможное участие в регуляции углеводного метаболизма и биосинтеза каротиноидов в листьях табака.

Таким образом, в данном исследовании мы получили неполный нокаут гена пластидной крахмалфосфорилазы *NtPHO1-L1* в геноме *N. tabacum* с использованием системы CRISPR-Cas9 и проанализировали полученные трансгенные линии на предмет содержания крахмала, сахаров, каротиноидов и хлорофиллов, а также экспрессии генов путей метаболизма крахмала и каротиноидов и регуляторных MADS-box генов. Полученные результаты позволяют предположить, что частичный нокаут гена *NtPHO1-L1* может изменять метаболизм транзитного крахмала в листьях, смещая его в сторону синтеза. Эффект от нокаута распространяется на содержание сахаров, каротиноидов и хлорофиллов, а также профиль экспрессии соответствующих генов. Одним из основных последствий является снижение количества цветков в соцветии, то есть снижение репродукции растения, независимо от того, в какой степени растение смогло нормализовать углеводный обмен. Дифференциальная экспрессия MADS-box генов подсемейств *SEP* и *FUL*, а также наличие консенсусов связывания CArG-box в промоторах генов деградации крахмала и синтеза каротиноидов, предполагает участие MADS-доменных ТФ в регуляции метаболизма крахмала и каротиноидов, а также в ответе этих генов на изменение содержания данных метаболитов.

В целом, полученные данные не могут служить основанием для однозначных выводов о роли PHO1 в метаболизме транзитного крахмала, в том числе из-за неполного нокаутирования гена у редактированных линий. Учитывая участие PHO1 в двух противоположных процессах (синтезе и деградации крахмала), можно предположить, что PHO1 сохраняет свою двойственную роль у мутантных растений, скорее всего, выполняя ее за счет аллелей, не подвергшихся редактированию. В то же время нарушение, вносимое редактированием в функцию PHO1, вызывает изменение содержания крахмала. Это может быть результатом как нарушения уровня активности *NtPHO1-L1*, так и изменения регуляции других генов метаболизма крахмала в ответ на изменение содержания крахмала. Учитывая разницу в степени изменения содержания крахмала в листьях, можно предположить, что, во-первых, анализируемые растения имеют разный процент нокаутированных по гену клеток. Во-вторых, ка-

ждое растение может индивидуальным образом решать проблему, используя значительный генный/ферментный аппарат для восстановления баланса синтеза и деградации крахмала, направленное на выживание и нормализацию поддержания жизненно важных биохимических процессов. Мы полагаем, что наши данные могут быть использованы в дальнейших исследованиях роли пластидной крахмалфосфорилазы PHO1.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ. В работе использована экспериментальная установка искусственного климата (Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zeeman S.C., Smith S.M., Smith A.M. The diurnal metabolism of leaf starch // *Biochem. J.* 2007. V. 401. P. 13. <https://doi.org/10.1042/BJ20061393>
2. Lloyd J.R., Kossmann J. Starch trek: the search for yield // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 9: 1930. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01930>
3. Thalmann M., Santelia D. Starch as a determinant of plant fitness under abiotic stress // *New Phytol.* 2017. V. 214. P. 943. <https://doi.org/10.1111/nph.14491>
4. Shoaib N., Liu L., Ali A., Mughal N., Yu G., Huang Y. Molecular functions and pathways of plastidial starch phosphorylase (PHO1) in starch metabolism: current and future perspectives // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22: 10450. <https://doi.org/10.3390/ijms221910450>
5. Lütken H., Lloyd J.R., Glaring M.A., Baunsgaard L., Laursen K.H., Haldrup A., Kossmann J., Blennow A. Repression of both isoforms of disproportionating enzyme leads to higher malto-oligosaccharide content and reduced growth in potato // *Planta.* 2010. V. 232. P. 1127. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1245-3>
6. Rathore R.S., Garg N., Garg S., Kumar A. Starch phosphorylase: role in starch metabolism and biotechnological applications // *Crit. Rev. Biotechnol.* 2009. V. 29. P. 214. <https://doi.org/10.1080/07388550902926063>
7. Cuesta-Seijo J.A., Ruzanski C., Kruciewicz K., Meier S., Häggglund P., Svensson B., Palcic M.M. Functional and structural characterization of plastidic starch phosphorylase during barley endosperm development // *PLoS One.* 2017. V. 12: e0175488. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175488>
8. Flores-Castellanos J., Fettke J. The plastidial glucan phosphorylase affects the maltooligosaccharide metabolism in parenchyma cells of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber discs // *Plant Cell Physiol.* 2023. V. 64. P. 422. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcac174>

9. Sonnewald U., Basner A., Greve B., Steup M. A second L-type isozyme of potato glucan phosphorylase: cloning, antisense inhibition and expression analysis // Plant Mol. Biol. 1995. V. 27. P. 567.
<https://doi.org/10.1007/BF00019322>
10. Chen H.M., Chang S.C., Wu C.C., Cuo T.S., Wu J.S., Juang R.H. Regulation of the catalytic behaviour of L-form starch phosphorylase from sweet potato roots by proteolysis // Physiol. Plant. 2002. V. 114. P. 506.
<https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1140402.x>
11. Camirand A., St-Pierre B., Marineau C., Brisson N. Occurrence of a copia-like transposable element in one of the introns of the potato starch phosphorylase gene // Mol. Gen. Genet. 1990. V. 224. P. 33.
<https://doi.org/10.1007/BF00259448>
12. Fettke J., Poeste S., Eckermann N., Tiessen A., Pauly M., Geigenberger P., Steup M. Analysis of cytosolic heteroglycans from leaves of transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) plants that under- or overexpress the Pho 2 phosphorylase isozyme // Plant Cell Physiol. 2005. V. 46. P. 1987.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pci214>
13. Schopper S., Mühlenbock P., Sörensson C., Hellborg L., Lenman M., Widell S., Fettke J., Andreasson E. Arabidopsis cytosolic alpha-glycan phosphorylase, PHS2, is important during carbohydrate imbalanced conditions // Plant Biol. 2015. V. 17. P. 74.
<https://doi.org/10.1111/plb.12190>
14. Zeeman S.C., Thorneycroft D., Schupp N., Chapple A., Weck M., Dunstan H., Haldimann P., Bechtold N., Smith A.M., Smith S.M. The role of plastidial α -glucan phosphorylase in starch degradation and tolerance of abiotic stress in *Arabidopsis* leaves // Plant Physiol. 2004. V. 135. P. 849.
<https://doi.org/10.1104/pp.103.032631>
15. Satoh H., Shibahara K., Tokunaga T., Nishi A., Tadaki M., Hwang S.-K., Okita T., Kaneko N., Fujita N., Yoshida M., Hosaka Y., Sato A., Utsumi Y., Ohdan T., Nakamura Y. Mutation of the plastidial α -glucan phosphorylase gene in rice affects the synthesis and structure of starch in the endosperm // Plant Cell. 2008. V. 20. P. 1833.
<https://doi.org/10.1105/tpc.107.054007>
16. Yu Y., Mu H.H., Wasserman B.P., Carman G.M. Identification of the maize amyloplast stromal 112-kD protein as a plastidic starch phosphorylase // Plant Physiol. 2001. V. 125. P. 351.
<https://doi.org/10.1104/pp.125.1.351>
17. Mizuno S., Kamiyoshihara Y., Shiba H., Shinmachi F., Watanabe K., Tateishi A. Plastidial starch phosphorylase is highly associated with starch accumulation process in developing squash (*Cucurbita* sp.) fruit // Physiol. Plant. 2019. V. 167. P. 264.
<https://doi.org/10.1111/ppl.12886>
18. Hwang S.K., Singh S., Cakir B., Satoh H., Okita T.W. The plastidial starch phosphorylase from rice endosperm: catalytic properties at low temperature // Planta. 2016. V. 243. P. 999.
<https://doi.org/10.1007/s00425-015-2461-7>
19. Fettke J., Leifels L., Brust H., Herbst K., Steup M. Two carbon fluxes to reserve starch in potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber cells are closely interconnected but differently modulated by temperature // J. Exp. Bot. 2012. V. 63. P. 3011.
<https://doi.org/10.1093/jxb/ers014>
20. Orawetz T., Malinova I., Orzechowski S., Fettke J. Reduction of the plastidial phosphorylase in potato (*Solanum tuberosum* L.) reveals impact on storage starch structure during growth at low temperature // Plant Physiol. Biochem. 2016. V. 100. P. 141.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.01.013>
21. Higgins J.E., Kosar-Hashemi B., Li Z., Howitt C.A., Larroque O., Flanagan B., Morell M.K., Rahman S. Characterization of starch phosphorylases in barley grains // J. Sci. Food Agric. 2013. V. 93. P. 2137.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.6019>
22. Schreiber L., Nader-Nieto A.C., Schönhals E.M., Walkemeier B., Gebhardt C. SNPs in genes functional in starch-sugar interconversion associate with natural variation of tuber starch and sugar content of potato (*Solanum tuberosum* L.) // G3: Genes, Genomes, Genetics. 2014. V. 4. P. 1797.
<https://doi.org/10.1534/g3.114.012377>
23. Albrecht T., Koch A., Lode A., Greve B., Schneider-Mergener J., Steup M. Plastidic (Pho1-type) phosphorylase isoforms in potato (*Solanum tuberosum* L.) plants: expression analysis and immunochemical characterization // Planta. 2001. V. 213. P. 602.
<https://doi.org/10.1007/s004250100525>
24. Slugina M.A., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. The expression pattern of the Pho1a genes encoding plastidic starch phosphorylase correlates with the degradation of starch during fruit ripening in green-fruited and red-fruited tomato species // Funct. Plant Biol. 2019. V. 46. P. 1146.
<https://doi.org/10.1071/FP18317>
25. Slugina M.A., Meleshin A.A., Kochieva E.Z., Shchennikova A.V. The opposite effect of low temperature on the Pho1a starch phosphorylase gene expression in *Solanum tuberosum* L. tubers and Petota species leaves // Am. J. Potato Res. 2020. V. 97. P. 78.
<https://doi.org/10.1007/s12230-019-09758-z>
26. Nezhdanova A.V., Efremov G.I., Slugina M.A., Kamionskaya A.M., Kochieva E.Z., Shchennikova A.V. Effect of a radical mutation in plastidic starch phosphorylase PHO1a on potato growth and cold stress response // Horticulturae. 2022. V. 8: 730.
<https://doi.org/10.3390/horticulturae8080730>
27. Sharma S., Friberg M., Vogel P., Turesson H., Olsson N., Andersson M., Hofvander P. Pho1a (plastid starch phosphorylase) is duplicated and essential for normal starch granule phenotype in tubers of *Solanum tuberosum* L. // Front. Plant Sci. 2023. V. 14: 1220973.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1220973>
28. Jacobs T.B., LaFayette P.R., Schmitz R.J., Parrott W.A. Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9 // BMC Biotechnol. 2015. V. 15: 16.
<https://doi.org/10.1186/s12896-015-0131-2>

29. *Nezhdanova A.V., Slugina M.A., Kulakova A.V., Kamionskaya A.M., Kochieva E.Z., Shchennikova A.V.* Effect of mosaic knockout of phytoene desaturase gene *NtPDS* on biosynthesis of carotenoids in *Nicotiana tabacum* L. // Russ. J. Plant Physiol. 2023. V. 70: 116. <https://doi.org/10.1134/S1021443723601271>
30. *Slugina M.A.* Transcription factor RIPENING INHIBITOR and its homologs in regulation of fleshy fruit ripening of various plant species // Russ. J. Plant Physiol. 2021. V. 68: 783. <https://doi.org/10.1134/S1021443721050186>
31. *Parenicová L., de Folter S., Kieffer M., Horner D.S., Favalli C., Busscher J., Cook H.E., Ingram R.M., Kater M.M., Davies B., Angenent G.C., Colombo L.* Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in *Arabidopsis*: new openings to the MADS world // Plant Cell. 2003. V. 15. P. 1538. <https://doi.org/10.1105/tpc.011544>
32. *AbdElgawad H., Avramova V., Baggerman G., Van Raemdonck G., Valkenborg D., Van Ostade X., Guisez Y., Prinsen E., Asard H., Van den Ende W., Beemster G.T.S.* Starch biosynthesis contributes to the maintenance of photosynthesis and leaf growth under drought stress in maize // Plant Cell Environ. 2020. V. 43. P. 2254. <https://doi.org/10.1111/pce.13813>
33. *Hou J., Zhang H., Liu J., Reid S., Liu T., Xu S., Tian Z., Sonnewald U., Song B., Xie C.* Amylases StAmy23, StBAM1 and StBAM9 regulate cold-induced sweetening of potato tubers in distinct ways // J. Exp. Bot. 2017. V. 68. P. 2317. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx076>
34. *Zhang H., Liu J., Hou J., Yao Y., Lin Y., Ou Y., Song B., Xie C.* The potato amylase inhibitor gene *SbAI* regulates cold-induced sweetening in potato tubers by modulating amylase activity // Plant Biotech. J. 2014. V. 12. P. 984. <https://doi.org/10.1111/pbi.12221>
35. *Rosas-Saavedra C., Stange C.* Biosynthesis of carotenoids in plants: enzymes and color // Subcell. Biochem. 2016. V. 79. P. 35. https://doi.org/10.1007/978-3-319-39126-7_2
36. *Cordenunsi-Lysenko B.R., Nascimento J.R.O., Castro-Alves V.C., Purgatto E., Fabi J.P., Peroni-Okyta F.H.G.* The starch is (not) just another brick in the wall: the primary metabolism of sugars during banana ripening // Front. Plant Sci. 2019. V. 10: 391. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00391>

УДК 581.1

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ eGFP ГЕНА У ТРАНСПЛАСТОМНЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА *NICOTIANA TABACUM* L. CV. PETIT HAVANA¹

© 2024 г. Ю. В. Сидорчук^{a, *}, П. А. Белавин^a, А. А. Загорская^a, Т. В. Маренкова^a,
В. В. Кузнецов^a, Е. С. Хайрулина^a, Е. В. Дейнеко^a

^aФедеральное государственное бюджетное научное учреждение Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

*e-mail: sidorch@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 28.03.2024 г.

После доработки 18.05.2024 г.

Принята к публикации 27.05.2024 г.

Методом биобаллистики получены транспластомные растения табака, экспрессирующие репортерный ген *egfp* и ген селективного маркера *aadA* в составе бицистронного оперона. Исследованы особенности экспрессии гена *egfp* в двух группах транспластомных растений: семенного потомства, полученного от самоопыления, и растений, полученных в результате двух последовательных циклов регенерации из листьев исходных трансформантов. Проведен сравнительный флуориметрический анализ накопления рекомбинантного белка в группах транспластомных растений и ядерных трансформантов. Установлено, что количество рекомбинантного белка eGFP, накапливаемого в листьях транспластомных растений, оказалось неожиданно низким и не превышало уровня установленного для ядерных трансформантов. Результаты ПЦР в реальном времени показали, что низкий уровень накопления рекомбинантного eGFP не связан с низким уровнем экспрессии трансгена или с присутствием в хлоропластах нетрансгенных копий пластидного генома. Вероятнее всего, это связано с ограничениями, налагаемыми на уровне трансляции рекомбинантных белков в хлоропластах.

Ключевые слова: гомоплазмия, пластиды, рекомбинантные белки, транспластомные растения, трансформация, транзистентная экспрессия, хлоропласты

DOI: 10.31857/S0015330324050105, EDN: MMAIBU

ВВЕДЕНИЕ

Трансформация пластидного генома имеет ряд преимуществ по сравнению с ядерной. Прежде всего это связано с возможностью направленной интеграции трансгенов в пластидный геном по принципу гомологичной рекомбинации, что позволяет избежать эффекта положения, генного сайленсинга и перекрывания с собственными генами пластома [1, 2]. Кроме того, такой подход является более безопасным с точки зрения переноса трансгенов в окружающую среду за счет материнского типа наследования пластид [1].

С точки зрения биотехнологического приложения наиболее привлекательной является способность транспластомных растений достигать высокого выхода рекомбинантных белков

по сравнению с ядерной трансформацией, что обеспечивается высокой копийностью пластома в клетках. Например, показана возможность наработки фагового лизина PlyGBS в хлоропластах табака на уровне более 70% от общего растворимого белка (ОРБ) [3]. Однако такие количества чужеродных рекомбинантных белков могут негативно влиять на биосинтетическую активность хлоропластов, мешая фотосинтезу и приводя к различным плеiotропным эффектам, самым очевидным из которых является хлороз [3, 4].

Прокариотический тип экспрессии позволяет интегрировать в пластом искусственные опероны, что в свою очередь дает возможность переносить в растительные клетки новые метаболические пути и развивать метаболическую инженерию [5–7]. В целом спектр применения хлоропластной инженерии очень широк и направлен на создание стрессоустойчивых форм растений, синтез ферментов и материалов, биофортификацию

¹ Дополнительные материалы размещены в электронном виде по DOI статьи: 10.31857/S0015330324050105

и биофармацевтику [8, 9]. Таким образом, создание высокопродуктивной системы экспрессии на основе модификации пластидных геномов растений представляется весьма перспективной задачей современной биотехнологии.

Несмотря на всю привлекательность, технология модификации пластидного генома растений до сих пор не стала рутинной процедурой. На пути ее создания существует ряд трудностей, основными из которых являются крайне низкая эффективность трансформации и отбора высокопродуктивных гомопластидных трансформантов [2]. Благодаря пополнению списка секвенированных пластидных геномов увеличивается и список видов растений, у которых проведена трансформация пластома [8–10]. Однако воспроизводимые результаты получены с использованием узкого круга модельных видов растений, а выход целевых рекомбинантных белков сильно варьирует и часто не превышает уровня, который наблюдается у ядерных трансформантов [9].

В лаборатории биоинженерии растений ИЦиГ СО РАН были получены транспластомные растения табака, экспрессирующие репортерный ген *egfp* и селективный маркер *aadA* в составе бицистронного оперона. Целью данной работы было оценить уровень экспрессии репортерного *egfp*-гена по накоплению мРНК и его белкового продукта в листьях транспластомных растений. Проведено сравнение накопления рекомбинантного eGFP-белка в транспластомных и ядерных трансформантах, а также в растениях-регенерантах, полученных в результате двух циклов регенерации из эксплантов исходных транспластомных растений. Определен уровень гомоплазмии. В статье обсуждаются вопросы неожиданно низкого уровня накопления целевого белка в тканях транспластомных растений и возможности решения этой проблемы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал

В качестве исходного материала для биобаллистической трансформации генома пластид и агробактериальной трансформации ядерного генома использовали листья, полученные от стерильных растений табака *Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana, выращенных в асептических условиях *in vitro* на МС-среде [11]. Исходные стерильные растения, а также листовые экспланты, растения-регенеранты и проростки культивировали в условиях факторостатной комнаты при температуре 24°C и фотопериоде 16/8 ч (день/ночь). Растения выращивали в условиях гидропонной теплицы с использованием раствора Кнопа при световом режиме 16/8 ч (день/ночь), температуре 21°–24°C.

Создание экспрессионного вектора pPlastEx-GFP для трансформации пластидного генома табака

Общая схема конструирования экспрессионного вектора представлена на рис. 1 (Дополнительные материалы, рис. 1). В качестве места инсерции в пластидный геном был выбран район между генами, кодирующими тРНК изолейцина – *tRNA-Ile* и аланина – *tRNA-Ala*, располагающийся в инвертированном повторе. Поскольку встройка кассеты экспрессии в пластидный геном происходит по принципу гомологичной рекомбинации, были подобраны соответствующие фланкирующие последовательности, гомологичные сайту встраивания. Левую и правую фланкирующие последовательности длиной 1260 и 884 п.н., соответственно, получали при помощи ПЦР с матрицы пластидной ДНК табака, используя праймеры, представленные в табл. 1 (Дополнительные материалы, табл. 1). Полученные фрагменты ДНК клонировали в составе плазмиды pUC19 в два этапа (Дополнительные материалы, рис. 1а). По сайтам *EcoRI/Acc65I* клонировали левый фланк длиной 1260 п.н. с последующим делетированием сайта *EcoRI*. Затем по сайтам *HindIII/SalI* клонировали правый фланк длиной 884 п.н. На данном этапе получали промежуточную плазмиду pUC19_left_right-(deltaRI-НIII) (Дополнительные материалы, рис. 1б).

Ранее нами была получена генетическая конструкция, в которой репортерный ген *egfp* (фенотипический маркер) и селективный маркер *aadA* были поставлены под управление конститутивного пластидного промотора оперона рРНК (*Prrn*), слитого с лидерной последовательностью гена 10 фага Т7 (*G10L*) и терминатора *TpsbA* гена *psbA*, кодирующего белок D1 фотосистемы II (Дополнительные материалы, рис. 1в). Эта конструкция была клонирована в составе отдельной плазмиды pUC19, из которой кассету экспрессии получали в виде ПЦР-фрагмента с использованием праймеров, представленных в табл. 2 (Дополнительные материалы, табл. 2). Полученный фрагмент ДНК клонировали в составе плазмиды pUC_left_right_(delts_RI-НIII) по сайтам *Acc65I/SalI* с образованием конечной плазмиды pPlastEx-GFP, используемой для трансформации пластидного генома (Дополнительные материалы, рис. 1г).

Оценка экспрессионной активности генетической конструкции в прокариотической системе экспрессии

Полученную плазмиду pPlastEx-GFP клонировали в клетках *E. coli* штамма DH10B и выращивали на стандартной среде LB с добавлением антибиотика спектиномицина в концентрациях

от 50 до 400 мг/л. Флуоресценцию eGFP в колониях *E. coli* детектировали с помощью освещения чашек Петри лампой темно-синего света (HL34T, “Clare Chemical Research”, США) при длине волны $\text{ex/em} = 488/507$ нм.

Трансформация и отбор транспластомных растений табака

Трансформацию листовых эксплантов табака *N. tabacum* проводили с помощью биобаллистики по стандартной методике. Стерильные листья помещали на чашки Петри с базовой МС-средой [11] абаксиальной стороной вверх и дважды обстреливали золотыми частицами при давлении разрыва мембраны 1100 psi, расстоянии до экспланта 6 см и вакууме в камере 25 мм.рт.ст. Иммобилизацию плазмидной ДНК на золотые частицы размером 0.6 мкм проводили с помощью CaCl_2 и спермидина согласно инструкции производителя “генной пушки” PDS-1000/He (“Bio-Rad”, США). После биобаллистики листья культивировали на той же среде в темноте в течение 48 ч при 24°C. Затем листья разрезали на части размером примерно 1 см², экспланты раскладывали на поверхности среды для регенерации (МС-среда с добавлением 1 мг/л N6-бензиладенина, 0.1 мг/л 1-нафтилуксусной кислоты и 300 мг/л спектиномицина) по площади всей чашки Петри. Каждые 4 нед. экспланты пассировали на свежую среду того же состава до появления зеленых каллусов через 4–6 нед. Появившиеся и подрощенные зеленые каллусы пересаживали на свежую среду для индукции побегообразования (МС-среда с добавлением 0.1 мг/л N6-бензиладенина, 300 мг/л антибиотика спектиномицина и 300 мг/л антибиотика стрептомицина). Сформировавшиеся регенеранты отделяли и укореняли на безгормональной МС-среде.

Исходные транспластомные растения T₀ адаптировали к условиям гидропонной теплицы, выращивали и получали семена от самоопыления. Полученные семена извлекали из коробочек и стерилизовали спиртом 96% в течение 90 с. Семена дважды промывали стерильной водой, подсушивали на фильтровальной бумаге и высевали на МС-среду с добавлением двух селективных агентов (спектиномицина и стрептомицина) в максимальной концентрации 500 мг/л для устранения гетеропластидности. Зеленые T₁ проростки, устойчивые к антибиотикам, подращивали в стерильных условиях, а затем адаптировали к условиям гидропонной теплицы и выращивали для дальнейшего анализа.

Для устранения химерности и гетеропластидности у 4 исходных T₀ транспластомных растений стерильно отбирали листья и в условиях селективного отбора (спектиномицин в концентрации 500 мг/л) регенерировали новые побеги,

цикл повторяли дважды. Полученные молодые регенеранты подращивали на МС-среде с добавлением спектиномицина и стрептомицина в максимальной концентрации 500 мг/л. Хорошо укоренившиеся регенеранты R₂ адаптировали к условиям гидропонной теплицы и выращивали зрелые растения для дальнейшего анализа.

Получение ядерных трансформантов

Агробактериальную трансформацию листовых эксплантов табака и получение растений-трансформантов проводили по общепринятому протоколу [12] с использованием штамма *A. tumefaciens* C58C1Rif^R, несущей плазмиду pCAMBIA 1300 GFP, экспрессирующую репортерный ген *egfp* и ген доминантного селективного маркера *hptII* (Дополнительные материалы, рис. 2). В качестве селективного агента использовали антибиотик гигромицин В в концентрации 20 мг/л. Трансформанты T₀, устойчивые к гигромицину В, адаптировали к условиям гидропонной теплицы и выращивали зрелые растения для дальнейшего анализа.

Молекулярный анализ трансформантов

Наличие перенесенных генов в геноме трансформантов оценивали с помощью стандартной ПЦР. Тотальную ДНК растений выделяли в соответствии с методикой, опубликованной ранее [13]. Структура праймеров приведена в табл. 3 (Дополнительные материалы, табл. 3). Программа амплификации: 95°C — 1 мин.; далее 29 циклов: 95°C — 20 с, 52°C — 20 с, 72°C — 30 с, и затем 72°C — 2 мин. Уровень экспрессии перенесенных генов *egfp* и *aadA* в транспластомных растениях оценивали при помощи ПЦР в реальном времени против контрольной экспрессии собственного пластидного референсного гена табака *ycf2* [14].

Для проведения анализа экспрессии генов для каждого образца была выделена тотальная РНК при помощи реагента ExtractRNA (“Евроген”, Россия), РНК обрабатывали DNase I (“Qiagen”, Германия). Затем с помощью набора реактивов (“Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit”, США) получали раствор кДНК из 4 мкг суммарной РНК в 20 мкл реакционной смеси.

В реакцию мультиплексной ПЦР в реальном времени брали 1 мкл раствора ДНК или кДНК и амплифицировали в 20 мкл реакционной смеси следующего состава: 50 mM Tris-SO₄, pH 9.0, 30 mM KCl, 10 mM сульфата аммония, 0.01% Tween-20, 3 mM MgCl₂, 0.2 mM смеси дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, смесь праймеров и зонда по 0.4 мкМ каждого и 0.1 е.а./мкл Hot Start ДНК-полимеразы (“СибЭнзим”, Россия). Структура праймеров и зондов приведены

в табл. 4 (Дополнительные материалы, табл. 4). Программа амплификации: 95°C — 3 мин., далее 40 циклов с детекцией на стадии отжига (каналы FAM, HEX, ROX): 95°C — 10 с, 60°C — 20 с. Каждый образец амплифицировали в трех повторах. Уровень экспрессии оценивали при помощи ПО “Bio-Rad CFX Manager 3.1”.

Для определения и контроля гомоплазмии использовали ПЦР в реальном времени [15]. Степень гомоплазмии оценивали в препаратах тотальной ДНК растений, выделенной в соответствии с методикой, опубликованной ранее [13]. Структура праймеров и зондов приведены в табл. 4 (Дополнительные материалы, табл. 4). Каждый образец амплифицировали в трех повторах. Уровень экспрессии оценивали при помощи ПО “Bio-Rad CFX Manager 3.1”.

Микроскопия

Детекцию автофлуоресценции хлоропластов и флуоресценцию рекомбинантного белка eGFP в хлоропластах клеток листовой паренхимы, замыкающих клеток устьиц транспластомных растений проводили на конфокальном микроскопе NLO 780 (“Zeiss”, Германия) при использовании лазеров с длиной волны 488 нм, 633 нм и комплектами фильтров Ch1: 493–598 нм, Ch2: 647–721 нм. Изображения обрабатывали с использованием программного обеспечения ZEN (“Zeiss”, Германия).

Определение eGFP флуориметрическим методом

Определение количества рекомбинантного eGFP (% от ОРБ) в листьях транспластомных растений проводили флуориметрическим методом в 3–5 повторностях. На каждом этапе получения транспластомных растений проводили контроль eGFP-флуоресценции хлоропластов с использованием конфокальной микроскопии.

Для определения количества рекомбинантного белка eGFP в транспластомных растениях табака и ядерных трансформантах с каждого анализируемого растения брали среднюю пробу из трех листьев разного возраста. Примерно 250 мг ткани растирали в жидком азоте, порошок

переносили в 1.5 мл пробирки с 500 мкл буфера PBS (phosphate buffered saline) pH 7.4 с добавлением ингибитора протеаз (Pierce Protease Inhibitor Tablets, “Thermo Scientific”, США) и тщательно встряхивали. Пробирки держали на льду. Дебрис осаждали центрифугированием при 4°C в течение 10 мин. при 13000 об/мин. Супернатант отбирали, стараясь не захватить осадок, и переносили в новые пробирки на лед. Экстракт разводили буфером PBS в 10 раз и определяли флуоресценцию eGFP в 200 мкл раствора флуориметрическим способом на приборе Clariostar Plus (“BMG Labtech”, Германия) при длине волны 485 нм.

Определение общего растворимого белка

ОРБ выделяли из листьев зрелых растений (см. выше). Определение ОРБ проводили с использованием реактива Бредфорд на приборе Clariostar Plus (“BMG Labtech”, Германия) при длине волны 595 нм. Калибровку строили по БСА в рабочей концентрации 1 мг/мл.

Статистическая обработка полученных данных

Для сравнения групп применяли непараметрический критерий Краскела–Уоллиса. Критическое значение уровня значимости принималось равным 5%, P – достигнутый уровень значимости. Для множественного сравнения выборок разного объема использовали критерий Данна ($Q_{кр} = 2.394$; $k = 3$; $\alpha = 0.05$), где $Q_{кр}$ – критическое значение, k – число сравниваемых групп, α – уровень значимости. Статистическую обработку проводили с использованием программного пакета Statistica 5.5.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Генетическая конструкция

Для оценки уровня экспрессии и накопления рекомбинантного белка в модельных транспластомных растениях табака была создана генетическая конструкция pPlastEx-GFP, схема которой представлена на рис. 1. В состав конструкции входили репортерный ген *egfp* в каче-

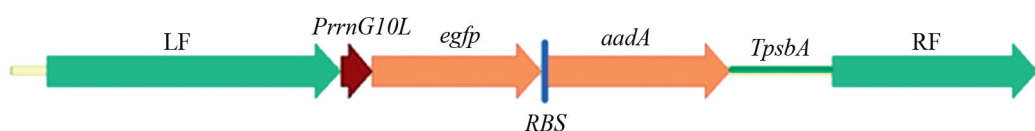


Рис. 1. Схема генетической конструкции pPlastEx-GFP для экспрессии генов *egfp* и *aadA* в пластидах (хлоропластах) табака. *PrnG10L* – промотор оперона рННК (*Prn*), слитый с лидерной последовательностью гена 10 фага T7 (*G10L*), *egfp* – кодирующая последовательность гена зеленого флуоресцирующего белка, RBS – сайт связывания рибосом, *aadA* – кодирующая последовательность гена устойчивости к спектиномицину, *TpsbA* – терминатор гена *psbA*, кодирующего белок D1 фотосистемы II, LF и RF – левая и правая фланкирующие последовательности.

стве фенотипического маркера и целевого гена, а также селективный маркер *aadA*, обеспечивающий устойчивость к антибиотикам спектиномицину и стрептомицину, разделенные сайтом связывания рибосом.

Конструкция организована в виде бицистронного оперона [16, 17], в котором оба гена поставлены под управление конститутивного пластидного промотора оперона *pRNK* (*Prrn*), слитого с лидерной последовательностью гена 10 фага T7 (*G10L*) и терминатора *TpsbA* гена *psbA*, кодирующего белок D1 фотосистемы II. Кодирующая часть конструкции фланкирована последовательностями, обеспечивающими ее инсерцию в район между генами *tRNK* изолейцина и аланина, которые располагаются в инвертированном повторе пластидного генома табака.

Оценка эффективности генетических конструкций для трансформации пластидного генома в прокариотической системе экспрессии

Функциональную активность создаваемых генетических конструкций для ядерной трансформации возможно предварительно оценивать в эукариотических клетках в режиме транзientной экспрессии. Особенности дизайна генетических конструкций для пластидной экспрессии делают предварительную проверку их функциональности (экспрессионной активности) проблематичной. Это связано с использованием в их составе регуляторных элементов прокариотического типа, которые делают трансген функционально активным только при встройке в геном пластид, но не в ядро. Для решения этой проблемы мы предлагаем проводить оценку экспрессионной активности новых конструкций в прокариотической системе экспрессии *E. coli*.

Данный подход позволяет оценить экспрессионную активность созданной нами генетической конструкции сразу по двум генам. Из представленных на рис. 2 данных видно, что экспрессия

в *E. coli* генетической конструкции *pPlastEx_GFP* обеспечивает устойчивость клеток к антибиотикам спектиномицину в том диапазоне концентраций, который используется для отбора транспластомных растений (рис. 2а–г). В тоже время флуоресценция *eGFP* свидетельствует о наработке репортерного/целевого белка и, соответственно, о функциональности кассеты экспрессии.

Отбор и анализ транспластомных растений

Из числа первичных трансформантов были отобраны растения, которые послужили основой для создания 19 независимых линий T_1 поколения, а также 8 линий растений-регенерантов R_2 . Наличие встройки генов доминантного селективного маркера *aadA* и флуоресцентного репортера *egfp* в пластомах полученных растений доказывали с помощью ПЦР.

Все анализируемые транспластомные растения показали наличие в пластидном геноме перенесенных генов (рис. 3).

Кроме того полученные транспластомные растения тестировали с помощью конфокальной микроскопии на наличие флуоресценции рекомбинантного *eGFP* в хлоропластах на всех этапах проводимого исследования. Из-за сильного наложения сигналов *eGFP* в клетках мезофилла листа наиболее удобными для анализа оказались замыкающие клетки устьиц. Флуоресценция *eGFP* наблюдалась в хлоропластах всех исследованных растений поколения T_1 и R_2 , устойчивых к используемым селективным агентам (рис. 4 а–г).

Сравнительный анализ накопления рекомбинантного *eGFP* в исследуемых группах растений

Согласно полученным данным количество рекомбинантного *eGFP* в группе транспластомных растений поколения T_1 , полученных от самоопыления исходных независимых трансформантов,

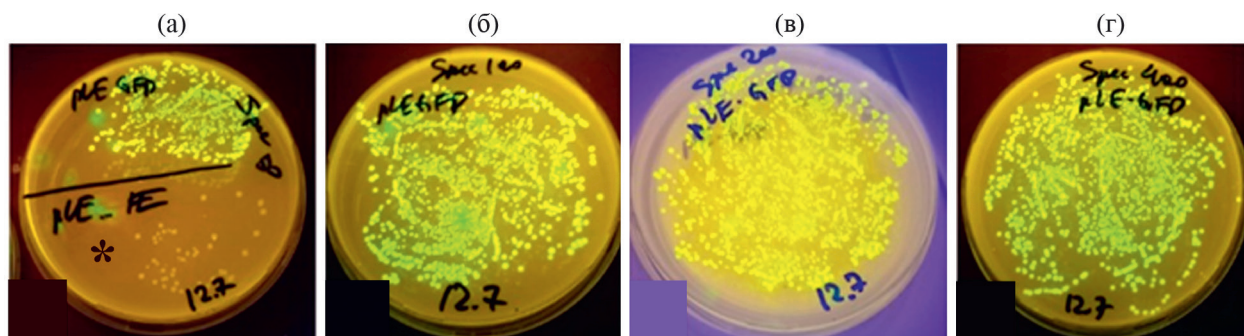


Рис. 2. Оценка экспрессионной активности генетической конструкции *pPlastEx_GFP* в клетках *E. coli*. а–г — клетки *E. coli*, трансформированные экспрессионным вектором, на питательной среде с различным содержанием спектиномицина. (а) — 50 мг/л; (б) — 100 мг/л; (в) — 200 мг/л; (г) — 400 мг/л. Зеленый цвет — флуоресценция *eGFP*. * — колонии не экспрессирующие *egfp*.

в среднем составило $0.37 \pm 0.02\%$. Разброс изменчивости в этой группе растений был незначительным и составил от минимального значения равного $0.22 \pm 0.04\%$ у линии С9 до максимального значения равного $0.65 \pm 0.07\%$ от ОРБ у линии С18 (рис. 5а). Это соответствует примерно трехкратному превышению максимальных значений по накоплению eGFP над минимальными.

На рисунке 5б представлены результаты по накоплению eGFP в группе транспластомных растений-регенерантов поколения R_2 , полученных из листьев исходных трансформантов T_0 после двух циклов регенерации в условиях селективного отбора. Как видно из представленных данных, максимальное значение признака равное $0.59 \pm 0.05\%$ от ОРБ у линий R3.2 и R4.2 превышало минимальное значение равное $0.35 \pm 0.04\%$ у линии R4.1 примерно в 1.7 раза (рис. 5б), соответственно, размах изменчивости в данной группе был минимальным. В среднем рекомбинатный eGFP накапливался в листьях этой группы растений на уровне $0.48 \pm 0.05\%$ от ОРБ.

В качестве контрольной группы для проведения сравнительного анализа нами также были по-

лучены ядерные трансформанты T_0 (21 растение), продуцирующие eGFP. Структура генетической конструкции, использованной для векторного переноса, и результаты ПЦР анализа на наличие встройки гена *egfp* в ядерный геном трансформантов представлены на рис. 3 (Дополнительные материалы, рис. 3). Согласно данным флуориметрического определения в листьях растений данной группы количество рекомбинатного eGFP в среднем составило $0.50 \pm 0.05\%$, а минимальное и максимальное значения определялись на уровне $0.07 \pm 0.02\%$ и $1.01 \pm 0.04\%$ от ОРБ у растений N4 и N11, соответственно, показывая разницу между этими значениями в 14 раз (рис. 5в).

Сравнительный анализ полученных данных с помощью непараметрического критерия Краскала-Уоллиса подтвердил наличие достоверных различий между исследуемыми (T_1 , R_2 , T_0) группами растений ($H_{(2N=48)} = 10.082$, $P = 0.0065$). Попарное сравнение групп анализируемых растений с использованием критерия Данна позволяют утверждать, что в среднем ядерные трансформанты T_0 накапливали в листьях достоверно больше eGFP, чем транспластомные растения T_1 поколения ($Q_{T_0,T_1} = 2.808$, $K = 3$, $\alpha = 0.05$). Однако, по этому параметру они достоверно не отличались от транспластомных растений-регенерантов поколения R_2 ($Q_{T_0,R_2} = 0.364$, $K = 3$, $\alpha = 0.05$). В целом можно отметить тенденцию к статистически значимому увеличению (примерно на 30%) количества рекомбинатного eGFP у растений-регенерантов R_2 , по сравнению с транспластомными растениями T_1 поколения, полученных от самоопыления ($Q_{T_1,R_2} = 2.468$, $K = 3$, $\alpha = 0.05$).

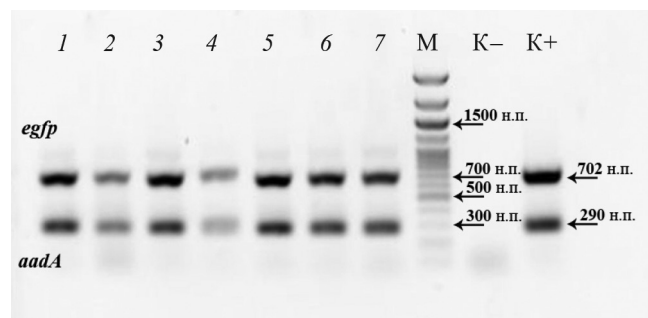


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов амплификации в 1% агарозном геле (на примере 7 образцов), подтверждающая наличие генов *aadA* и *egfp* в геноме транспластомных растений. М — маркер молекулярных весов Step100 Long.

Уровень экспрессии по накоплению мРНК генов *aadA* и *egfp*

Одним из важных факторов, определяющих накопление рекомбинатного продукта в тканях трансгенных растений, является уровень

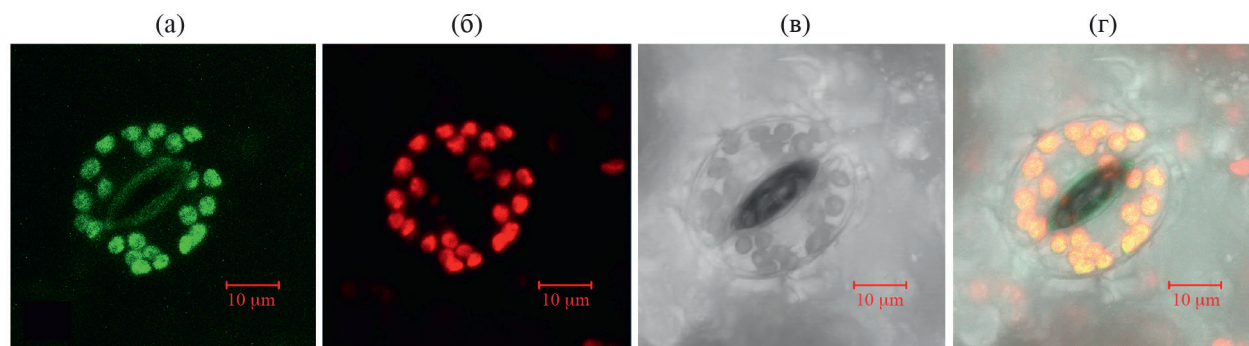


Рис. 4. Детекция рекомбинатного eGFP с помощью конфокальной микроскопии на примере замыкающих клеток устьиц в листьях табака. а — флуоресценция eGFP в хлоропластах; б — автофлуоресценция хлоропластов; в — фазовый контраст; г — совмещение. Масштабная линейка: 10 мкм.

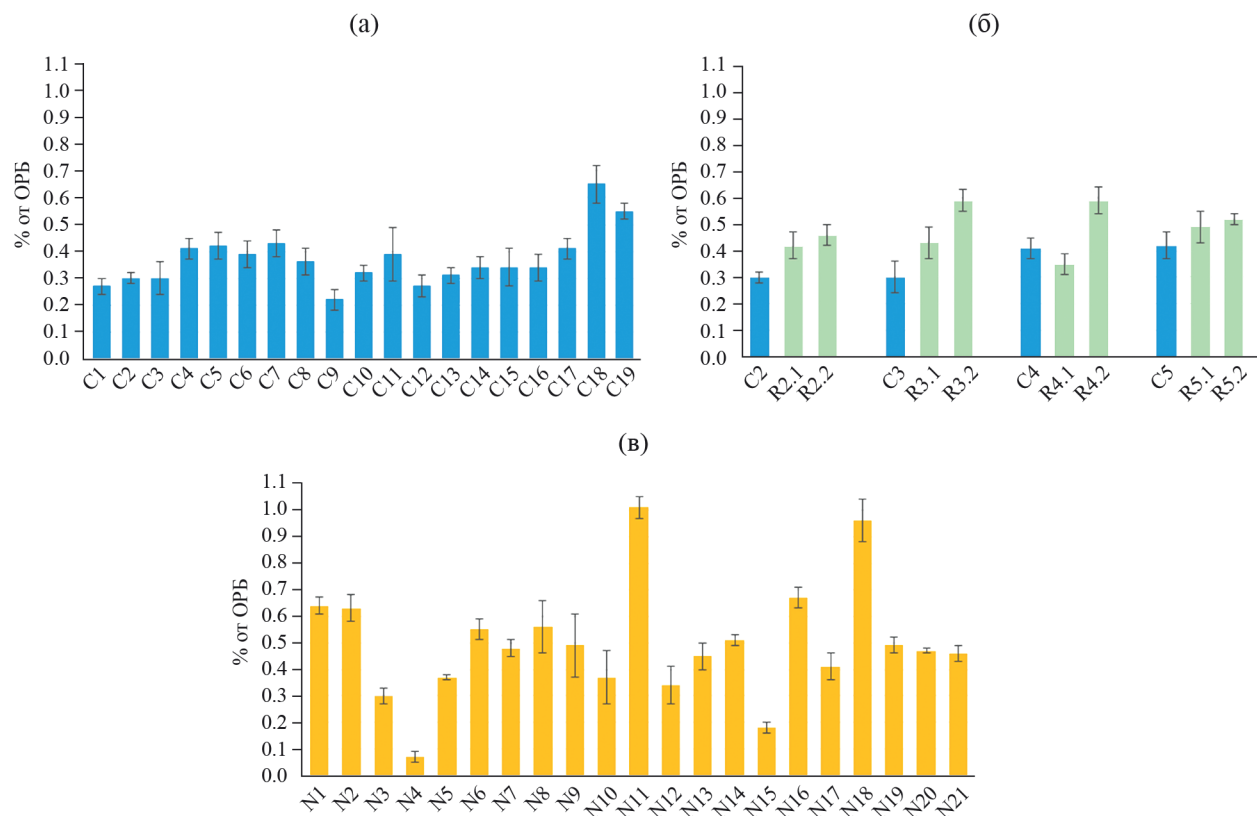


Рис. 5. Накопление рекомбинантного eGFP-белка в линиях транспластных растений и ядерных трансформантов. а — транспластные растения табака поколения T₁, полученные от самоопыления исходных T₀ трансформантов; б — транспластные растения-регенеранты табака R₂, полученные в результате двух раундов регенерации из листовых эксплантов исходных транспластных трансформантов T₀ (синие столбики — транспластные растения T₁ поколения, для сравнения, полученные от тех же самых исходных T₀); в — ядерные трансформанты поколения T₀.

экспрессии перенесенных генов, оцениваемый по количеству их мРНК. На рис. 6 представлены данные по определению уровня экспрессии генов *aadA* и *egfp* в листьях транспластных растений поколения T₁, а также растений-регенерантов поколения R₂. Результаты, представленные на рисунке, нормированы по уровню экспрессии референсного гена *ycf2*, представленного в пластидном геноме табака одной копией.

Во всех исследованных транспластных растениях табака поколения T₁, полученного от самоопыления исходных трансформантов, обнаруживалась экспрессия генов *aadA* и *egfp* с незначительной степенью вариабельности между растениями (рис. 6а). Так, минимальное значение по количеству мРНК, транскрибируемой с гена *aadA*, составило от 0.70 ± 0.09 , а максимальное — 1.39 ± 0.19 относительных единиц у линий C4 и C16, соответственно, а гена *egfp* — от 0.59 ± 0.07 до 1.37 ± 0.14 у тех же самых линий. В среднем же уровень экспрессии по анализируемым генам в данной группе относительно экспрессии референсного гена *ycf2* оказал-

ся одинаковым и составил 1.02 ± 0.05 для *aadA* и 1.02 ± 0.06 для *egfp*.

Транспластные растения-регенеранты R₂ были получены для устранения химерности и достижения гомоплазии. У растений данной группы уровень экспрессии гена *aadA* варьировал от 0.49 ± 0.02 до 0.94 ± 0.10 относительных единиц у линий R4.1 и R3.1, а уровень экспрессии гена *egfp* — от 0.59 ± 0.05 до 1.24 ± 0.14 у линий R2.2 и R3.1, соответственно (рис. 6б). В целом можно отметить тенденцию к некоторому незначительному снижению значений уровня экспрессии у растений этой группы, которые составили в среднем 0.73 ± 0.06 относительных единиц для гена *aadA* и 0.85 ± 0.09 для гена *egfp*.

Интересно отметить, что сравнительный анализ полученных данных с помощью непараметрического критерия Краскела-Уоллиса не выявил достоверных различий между исследуемыми группами растений по уровню экспрессии репортерного/целевого гена *egfp* ($H_{(1, N=20)} = 0.982$, $P = 0.3216$), но показал достоверные отличия по уровню экспрессии гена *aadA* ($H_{(1, N=20)} = 8.603$, $P = 0.0034$).

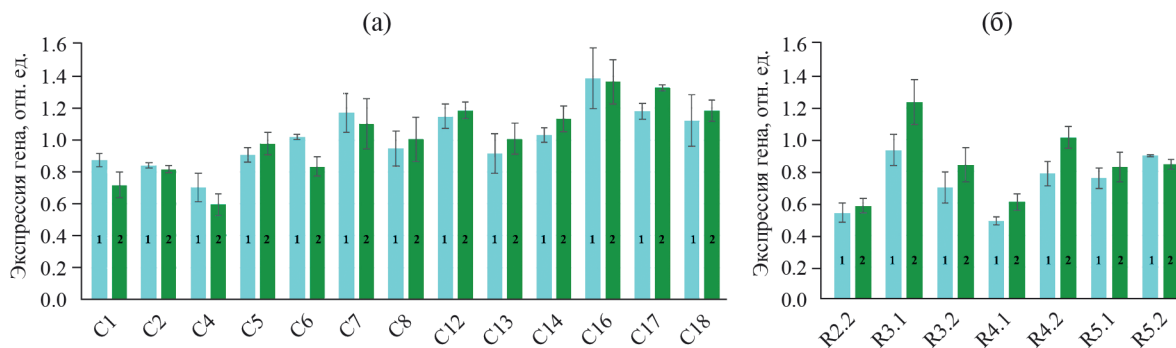


Рис. 6. Уровень экспрессии генов *aadA* и *egfp* в составе генетической конструкции pPlastEx_GFP в пластидах транспластомных растений по накоплению матричной РНК. а — растения поколения T_1 ; б — растения регенеранты поколения R_2 ; синий цвет (1) — *aadA*; зеленый цвет (2) — *egfp*; отн. ед. — относительные единицы.

Определение гомоплазмии в транспластомных растениях

Согласно условиям, разработанной нами ПЦР в реальном времени, статус гомоплазмии подтверждается, если количество продукта, нормированного на контрольный ген *ycf2*, присутствующий в пластидном геноме табака в одной копии, варьирует в границах от 0.8 до 1.2 относительных единиц. Как видно из представленных данных при оценке степени гомоплазмии по гену доминантного селективного маркера *aadA* все исследованные транспластомные растения как поколения T_1 (рис. 7а), так и растения-регенеранты R_2 (рис. 7б), являются гомоплазматическими, то есть все копии пластидного генома у них трансгенные.

Интересно отметить, что при оценке степени гомоплазмии по гену *egfp* большая часть растений T_1 показала результат, превысивший верхнюю границу, определенную для гомоплазматических растений, несмотря на то, что оба гена находятся в одной cassette экспрессии, представляющей собой бицистронный оперон (рис. 7а). Однако у транспластомных растений R_2 табака подобного явления не наблюдалось (рис. 7б).

ОБСУЖДЕНИЕ

Для повышения частоты интеграции и уровня экспрессии трансгена в пластидном геноме важное значение имеют выбор места встраивания и правильный подбор элементов экспрессионной cassette: промотора, 5'- и 3'-UTRs. Наиболее сильный промотор в пластидах высших растений, *prn*, управляет опероном рРНК, и он использовался при создании многих наиболее интенсивно экспрессирующихся cassette [8, 9]. Так как рРНК не транслируется, для высокой экспрессии трансгена *prn*-промотор должен быть дополнен соответствующим сигналом о начале трансляции [10]. По уровню экспрессии репортерных генов были протестированы не только пластидные, но и некоторые экзогенные 5'-UTRs [18]. Одним из таких сильнейших факторов, инициирующих трансляцию, оказался 5'-UTR гена 10 бактериофага Т7, который в сочетании с пластидным промотором *prn* обеспечивает очень высокие уровни аккумуляции чужеродных белков [3]. Исследования роли пластидных 3'-UTRs говорят о том, что, хотя они и влияют на уровень аккумуляции мРНК, стабилизируя транскрипты, их вклад в экспрессию трансгена

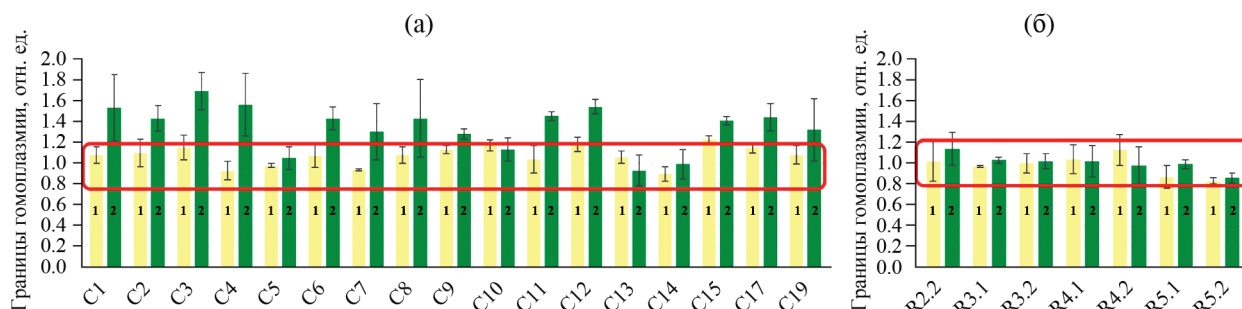


Рис. 7. Определение гомоплазмии транспластомных растений. а — в транспластомных растениях T_1 поколения; б — в транспластомных растениях-регенерантах R_2 ; желтый цвет (1) — ген *aadA*; зеленый цвет (2) — ген *egfp*; красная рамка — границы гомоплазмии; отн. ед. — относительные единицы.

сильно ограничен [19]. Это согласуется с тем, что регуляция генной экспрессии в пластидах происходит преимущественно на трансляционном уровне. В созданном нами экспрессионном векторе pPlastEx_GFP гены доминантного селективного маркера *aadA* и репортера *egfp* поставлены под управление регуляторных элементов, которые согласно данным литературы способны обеспечивать высокий выход рекомбинантных белков в тканях транспластомных растений [8, 9]. Подобранные фланкирующие последовательности обеспечивают интеграцию кассеты экспрессии в пластидный геном между генами, кодирующими тРНК изолейцина и аланина, локализованные в инвертированном повторе пластидного генома. Это не только повышает частоту трансформации, но также способствует экспрессии трансгена и более высокому накоплению целевого продукта [8, 9]. Интеграция трансгенной кассеты в одну копию инвертированного повтора облегчает интеграцию в другую посредством механизма коррекции копий, который является характерной особенностью реорганизации генома хлоропластов, усиливая тем самым эффективность отбора и достижение гомоплазии [20].

Как фланкирующие последовательности, так и регуляторные элементы должны быть получены из пластидного генома того вида, который трансформируется. Это связано с тем, что замена последовательностей одного вида на последовательности другого вида может приводить к значительному снижению не только уровня экспрессии перенесенных генов в пластидах, но и частоты интеграции трансгена в пластом [21]. Это еще раз доказывает, что для получения высоких уровней экспрессии трансгена в пластидах необходимо конструировать видоспецифичные векторы.

Процедура получения и отбора транспластомных растений все еще сложна и требует большого количества времени, поэтому весьма желательна предварительная оценка работоспособности векторов, создаваемых для трансформации пластома. Одним из возможных вариантов предварительной оценки вновь создаваемых генетических конструкций является их проверка в режиме транзientной экспрессии [22]. Это особенно удобно при наличии в конструкции слитых с целевыми генами флуоресцентных репортеров, детекция которых достаточно проста. Однако такой подход возможен при работе с генетическими конструкциями, рассчитанными на ядерную экспрессию эукариотического типа. В случае пластидной трансформации для экспрессии как репортерных, целевых генов, так и генов доминантных селективных маркеров используют регуляторные элементы, промоторы, рассчитанные на прокариотический тип

экспрессии, характерный для пластид. Такие генетические конструкции при ядерной инсерции не будут экспрессироваться. Оценка же их экспрессионной активности при доставке непосредственно в пластиды требует длительного отбора и не укладывается во временные рамки транзientной экспрессии. Существует примеры оценки транзientной (полученной в течение 2–4 сут.) экспрессии eGFP в различных типах пластид табака и *A. thaliana* при доставке генетических конструкций с помощью биобаллистики [23]. Однако такой подход имеет серьезные ограничения: очень низкое число пластид в клетке, экспрессирующих eGFP после доставки (в 80% случаев в клетке обнаруживался только один хлоропласт), и необходимость использования конфокальной микроскопии [23]. Все это усложняет процедуру оценки особенно при низком уровне экспрессии флуоресцентного репортера.

На сегодняшний день в научной литературе представлен еще один подход, позволяющий достичь транзientной экспрессии флуоресцентных репортеров в пластидах разных видов растений. Он основан на доставке экспрессионных векторов в хлоропласты с помощью наночастиц, связанных с полимером, например, однослойных углеродных нанотрубок, покрытых положительно заряженным хитозаном (CS-SWNT) [24]. Такой способ доставки более эффективен, чем биобаллистика, поскольку до 88% хлоропластов могут содержать SWNT [24]. Однако подходы, связанные с использованием наночастиц, в данный момент находятся на стадии разработки и не применимы для решения рутинных задач. Таким образом, оценка функциональности новых генетических конструкций, создаваемых для транспластомной трансформации, в экспрессионной системе *E. coli* является наиболее удобным подходом для решения подобных задач. Она проста и не ограничена использованием флуоресцентных репортеров, поскольку показана возможность трансляции в клетках *E. coli*, например, инсулиноподобного фактора роста 1 человека при использовании хлоропластного экспрессионного вектора [25].

Одним из главных преимуществ транспластомных растений по сравнению с ядерными трансформантами является их способность накапливать значительные количества рекомбинантных белков [9]. Полученные нами транспластомные растения табака с экспрессионным вектором pPlastEx_GFP поколения T₁ продуцировали рекомбинантный eGFP-белок на уровне достоверно меньшем, чем контрольные ядерные трансформанты. Интересно отметить, что транспластомные растения-регенеранты R₂, прошедшие два раунда регенерации под давлением отбора на двух антибиотиках, продуцировали eGFP на уровне ядерных трансформантов,

что примерно на 30% больше, чем у потомков T₁ полученных от самоопыления исходных трансформантов.

Таким образом, уровень накопления рекомбинантного белка eGFP и разброс изменчивости по этому признаку, выявленные в листьях ядерных трансформантов табака, являются нормой, отражающей особенности случайной интеграции трансгена в ядерный геном. Однако уровень накопления рекомбинантного белка eGFP в листьях транспластомных растений оказался неожиданно низким вне зависимости от выбранного уровня селективного давления при отборе и расхимеривании. Это может быть связано либо с недостаточным уровнем экспрессии трансгена, либо с тем, что при использованных методах отбора не был достигнут уровень полной гомоплазии хлоропластов.

Количественный анализ мРНК, транскрибируемой с pPlastEx_GFP экспрессионного вектора, не показал очевидной прямой взаимосвязи между накоплением рекомбинантного eGFP у отдельных образцов с наблюдаемыми флуктуациями по экспрессии соответствующих транскриптов. Результаты показывают отсутствие значимых отличий по уровню экспрессии целевого *egfp* между исследуемыми группами, несмотря на то, что количество нарабатываемого белкового продукта в них достоверно отличается. В целом полученные данные не позволяют связать низкий уровень накопления рекомбинантного eGFP с низким уровнем его экспрессии. Вероятнее всего, это связано с ограничениями, налагаемыми на уровне трансляции рекомбинантных белков.

Характерной особенностью пластидного генома является его огромная копияность. С одной стороны, это позволяет нарабатывать высокие уровни рекомбинантных белков в клетках транспластомных растений, но с другой стороны, создает серьезные трудности при их отборе и преодолении химеризма. Достижение гомоплазии, то есть такого состояния пластидного генома, при котором все его копии содержат трансген, обусловлено еще и необходимостью предотвращения генной конверсии, рекомбинационного механизма, в результате которого может произойти потеря трансгена и реверсия к дикому типу [10, 26]. Кроме того, предполагается, что при гетероплазии наличие нетрансгенных копий пластома может снижать выход рекомбинантных белков [2]. Учитывая неожиданно низкий уровень накопления рекомбинантного eGFP в полученных нами транспластомных растениях табака, мы предположили, что это может быть обусловлено гетероплазмией.

Переход на уровень гомоплазии у транспластомных растений достигается с помощью разных подходов, например, отбором на двух антибиотиках и дополнительными раундами реге-

нерации под давлением отбора [10, 27–29]. В нашей работе мы использовали оба этих подхода для получения исследуемых групп транспластомных растений. Представленные данные свидетельствуют о том, что низкий уровень накопления рекомбинантного eGFP в изученных группах транспластомных растений с кассетой экспрессии pPlastEx_GFP не связан с присутствием нетрансгенных копий пластидного генома.

Одним из подходов, который, как предполагается, влияет на итоговое накопление рекомбинантных белков в пластидах растений, является оптимизация кодонного состава генетических конструкций. Действительно, в некоторых случаях высокие уровни экспрессии (от 12 до 70% рекомбинантных белков от ОРБ) были получены именно с трансгенами, оптимизированными по кодонному составу [3, 29–31]. Однако в этих случаях использовались только синтетические, то есть оптимизированные по кодонному составу кодирующие области и не проводилось сравнения с нативными кодирующими областями. Кроме того, данный подход не всегда приводит к усилению экспрессии и разница в накоплении белка в хлоропластах при использовании трансгенов с синтетическими кодирующими районами и нативными может быть незначительной. Так, показано, что транспластомные растения табака, экспрессирующие оптимизированную генетическую конструкцию, накапливали 11.3% инсулиноподобного фактора роста 1 человека в листьях, а не оптимизированную – 9.5% от ОРБ [25]. Следовательно, реальный вклад оптимизации кодонного состава в достижение высоких уровней экспрессии и накопления рекомбинантных белков не вполне очевиден.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Трансформация пластидного генома растений является весьма привлекательной альтернативой ядерной трансформации и активно разрабатывается уже не один десяток лет. Достаточно хорошо изучены молекулярно-генетические механизмы этого процесса, и отработаны технологические варианты доставки трансгенов в пластиды по крайней мере для модельных видов растений. Однако до сих пор ожидаемые результаты этого подхода в каждом конкретном случае плохо прогнозируются на всех этапах его реализации, начиная с создания экспрессионного вектора. Даже использование оптимизированных по характеристикам регуляторных элементов и нацеливание генетической конструкции в наиболее эффективные для экспрессии сайты пластидного генома не гарантирует высоких уровней выхода продукта. Широкая вариабельность уровня накопления рекомбинантных белков (от 0.85% до 45.0% от общего растворимого

белка) отмечалась даже для случаев оптимального сочетания регуляторных элементов и сайта интеграции [2]. На самом деле этот разброс может быть еще больше. Отобранные нами транспластомные растения табака показали накопление рекомбинантного eGFP на неожиданно низком уровне, соответствующем экспрессии ядерных трансформантов. Кроме того, полученные транспластомные растения табака показали незначительную степень изменчивости как по уровню экспрессии, так и по уровню накопления рекомбинантного eGFP, что, очевидно, обусловлено молекулярно-генетическими особенностями самого процесса трансформации пластидного генома. Соответственно, даже увеличение выборки исходных трансформантов не гарантирует того, то что будут выделены высокопродуктивные формы. Полученные нами данные не позволяют связать низкий уровень накопления рекомбинантного eGFP с низким уровнем экспрессии трангена или с присутствием в хлоропластах нетрансгенных копий пластидного генома. Вероятнее всего, это связано с ограничениями, налагаемыми на уровне трансляции рекомбинантных белков в хлоропластах, что требует дальнейшего исследования.

Авторы благодарны Центру коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН за предоставленное оборудование.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского Научного Фонда (№ 23-24-00545). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая работа не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Meyers B., Zaltsman A., Lacroix B., Kozlovsky S.V., Krichevsky A. Nuclear and plastid genetic engineering of plants: comparison of opportunities and challenges // *Biotechnol. Adv.* 2010. V. 28. P. 28747. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.05.022>
2. Rozov S.M., Sidorchuk Yu.V., Deineko E.V. Transplastomic plants: problems of production and their solution. // *Russ. J. Plant Physiol.* 2022. V. 69. P. 132. <https://doi.org/10.1134/S1021443722020157>
3. Oey M., Lohse M., Kreikemeyer B., Bock R. Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic // *Plant J.* 2009. V. 57. P. 436. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03702.x>
4. Scotti N., Cardi T. Transgene-induced pleiotropic effects in transplastomic plants // *Biotechnol Lett.* 2014. V. 36. P. 229. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1356-6>
5. Fuentes P., Armarego-Marriott T., Bock R. Plastid transformation and its application in metabolic engineering // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2018. V. 49. P. 10. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.07.004>
6. Jensen P.E., Scharff L.B. Engineering of plastids to optimize the production of high-value metabolites and proteins // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2019. V. 59. P. 8. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.01.009>
7. Bock R. Transplastomic approaches for metabolic engineering // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2022. V. 66. P. 102185. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2022.102185>
8. Daniell H., Lin Ch.-S., Yu M., Chang W.-J. Chloroplast genomes: diversity, evolution, and applications in genetic engineering // *Genome Biol.* 2016. V. 17. P. 134. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1004-2>
9. Yu Y., Yu P.-C., Chang W.-J., Yu K., Lin C.-S. Plastid transformation: how does it work? Can it be applied to crops? What can it offer? // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. P. 4854. <https://doi.org/10.3390/ijms21144854>
10. Bock R. Engineering plastid genomes: methods, tools, and applications in basic research and biotechnology // *Ann. Rev. Plant Biol.* 2015. V. 66. P. 211. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-040212>
11. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.* 1962. V. 15. P. 473. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
12. Horsch R.B., Fraley R.T., Rogers S.G., Sanders P.R., Lloyd A., Hoffmann N. Inheritance of functional foreign genes in plants // *Sci.* 1984. V. 223. P. 496. <https://doi.org/10.1126/science.223.4635.496>
13. Allen G., Flores-Vergara M., Krasynanski S., Kumar S., Thompson W.F. A modified protocol for rapid DNA isolation from plant tissues using cetyltrimethylammonium bromide // *Nat. Protoc.* 2006. V. 1. P. 2320. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.384>
14. Drescher A., Ruf S., Calsa T.Jr., Carrer H., Bock R. The two largest chloroplast genome-encoded open reading frames of higher plants are essential genes. // *Plant J.* 2000. V. 22. P. 97. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00722.x>
15. Shen H., Qian B., L Yang., Liang W., Chen W., Liu Z., Zhang D. Estimation of the homoplasmy degree for transplastomic tobacco using quantitative real-time PCR // *Eur. Food Res. Technol.* 2010. V. 231. P. 143. <https://doi.org/10.1007/s00217-010-1265-z>
16. Yu Q., LaManna L.M., Kelly M.E., Lutz K.A., Maliga P. New tools for engineering the arabidopsis plastid genome // *Plant Physiol.* 2019. V. 181. P. 394. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00761>
17. Yu Q., Tungsuchat-Huang T., Verma K., Radler M.R., Maliga P. Independent translation of ORFs in dicistronic operons, synthetic building blocks for polycistronic chloroplast gene expression // *Plant J.* 2020. V. 103. P. 2318. <https://doi.org/10.1111/tpj.14864>

18. Herz S., Füßl M., Steiger S. Koop H.-U. Development of novel types of plastid transformation vectors and evaluation of factors controlling expression // *Transgenic Res.* 2005. V. 14. P. 969. <https://doi.org/10.1007/s11248-005-2542-7>
19. Tangphatsornruang S., Birch-Machin I., Newell C.A., Gray J.C. The effect of different 3' untranslated regions on the accumulation and stability of transcripts of a *gfp* transgene in chloroplasts of transplastomic tobacco // *Plant Mol. Biol.* 2011. V. 76. P. 385. <https://doi.org/10.1007/s11103-010-9689-1>
20. Dhingra A., Daniell H. Chloroplast genetic engineering via organogenesis or somatic embryogenesis // *Meth. Mol. Biol.* 2006. V. 323. P. 245. <https://doi.org/10.1385/1-59745-003-0:245>.
21. Ruhlman T., Verma D., Samson N., Daniell H. The role of heterologous chloroplast sequence elements in transgene integration and expression // *Plant Physiol.* 2010. V. 152. P. 2088. <https://doi.org/10.1104/pp.109.152017>
22. Lacroix B., Citovsky V. Biolistic approach for transient gene expression studies in plants // *Meth. Mol. Biol.* 2020. V. 2124. P. 125. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0356-7_6
23. Hibberd J.M., Linley Ph.J., Khan M.S., Gray J.C. Transient expression of green fluorescent protein in various plastid types following microprojectile bombardment // *Plant J.* 1998. V. 16. P. 627. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1998.00328.x>
24. Kwak S.Y., Lew T.T.S., Sweeney C.J., Koman V.B., Wong M.H., Bohmert-Tatarev K., Snell K.D., Seo J.S., Chua N.H., Strano M.S. Chloroplast-selective gene delivery and expression in planta using chitosan-complexed single-walled carbon nanotube carriers // *Nat. Nanotech.* 2019. V. 14. P. 447. <https://doi.org/10.1038/s41565-019-0375-4>
25. Daniell H., Ruiz G., Denes B., Sandberg L., Langridge W. Optimization of codon composition and regulatory elements for expression of human insulin like growth factor-1 in transgenic chloroplasts and evaluation of structural identity and function // *BMC Biotech.* 2009. V. 9. P. 33. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-9-33>
26. Khakhlova O., Bock R. Elimination of deleterious mutations in plastid genomes by gene conversion. // *Plant J.* 2006. V. 46. P. 85. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02673.x>
27. Gerasymenko I.M., Sheludko Y.V., Klebanovych A.A., Rudas V.A., Shakhovsky A.M., Klein T.M., Kuchuk N.V. Comparison of effectiveness of 5'-regulatory sequences in transplastomic tobacco chloroplasts // *Transgenic Res.* 2017. V. 26. P. 65. <https://doi.org/10.1007/s11248-016-9980-2>
28. Sheludko Y.V., Gerasymenko I.M., Herrmann F.J., Warzecha H. Evaluation of biotransformation capacity of transplastomic plants and hairy roots of *Nicotiana tabacum* expressing human cytochrome P450 2D6 // *Transgenic Res.* 2022. V. 31. P. 351. <https://doi.org/10.1007/s11248-022-00305-x>
29. Wang Y., Wei Zh., Fan J., Song X., Xing Sh. Hyper-expression of GFP-fused active hFGF21 in tobacco chloroplasts // *Protein Expr. Purif.* 2023. V. 208. P. 106271. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2023.106271>.
30. Zhou F., Badillo-Corona J.A., Karcher D., Gonzalez-Rabade N., Piepenburg K., Borchers A.-M.I., Maloney A.P., Kavanagh T.A., Gray J.C., Bock R. High-level expression of human immunodeficiency virus antigens from the tobacco and tomato plastid genomes // *Plant Biotech. J.* 2008. V. 6. P. 897. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2008.00356.x>
31. Kwon K.-C., Chan H.-T., Leon I.R., Williams-Carrier R., Barkan A., Daniell H. Codon optimization to enhance expression yields insights into chloroplast translation // *Plant Physiol.* 2016. V. 172. P. 62. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00981>

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ *rol*-ГЕНОВ *AGROBACTERIUM RHIZOGENES* ШТАММОВ А4, 15834 И К599 НА РОСТ КОРНЕЙ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА И СОСТОЯНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В УСЛОВИЯХ АБИОТИЧЕСКОГО СТРЕССА

© 2024 г. Д. Ю. Шве́ц ^{a, b, *}, З. А. Бережнева ^a, Х. Г. Мусин ^a, Б. Р. Кулуев ^{a, c}

^aИнститут биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение

Федерального государственного бюджетного научного учреждения

Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук, Уфа, Россия

^bБашкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия

^cУфимский университет науки и технологий, Уфа, Россия

*e-mail: shvetsdasha99@yandex.ru

Поступила в редакцию 24.01.2024 г.

После доработки 03.04.2024 г.

Принята к публикации 19.04.2024 г.

Генетическая трансформация *rol*-генами *Agrobacterium rhizogenes* приводит к многочисленным фенотипическим изменениям, в том числе к повышению стрессоустойчивости трансгенных растений. Механизмы стрессоустойчивости у растений, экспрессирующих *rol*-гены, остаются малоизученными, кроме того, фенотипические эффекты этих трансгенов зависят от того, из какого штамма агробактерий они происходят. Целью работы было создание трансгенных растений табака *Nicotiana tabacum* L., несущих *rol*-гены штаммов А4, 15834 и К599 *A. rhizogenes*, анализ их стрессоустойчивости и состояния антиоксидантной системы. Трансгенные растения с *rol*-генами штаммов А4 и 15834 характеризовались увеличением скорости роста корней, как при нормальных условиях, так и при воздействии повышенных концентраций хлорида натрия и ацетата кадмия по сравнению с диким типом. Экспрессия *rol*-генов штамма К599 оказывала негативное действие на рост корней трансгенных растений табака как в норме, так и в стрессовых условиях засоления, гипотермии и повышенных концентрациях ацетата кадмия. В корнях трансгенных растений табака в оптимальных условиях и при засолении экспрессия *rol*-генов штаммов А4 и 15834 способствовала повышению количества общего растворимого белка, пролина, общего пула глутатиона и активности супероксиддисмутазы. В корнях трансгенных растений с *rol*-генами штамма К599 в условиях засоления обнаруживалось повышение активности супероксиддисмутазы, гваяколпероксидазы и глутатион-S-трансферазы. Таким образом, показано, что положительный эффект экспрессии *rol*-генов на рост корней трансгенных растений может быть связан с влиянием на различные компоненты антиоксидантной системы. Полученные нами результаты говорят о перспективности использования *rol*-генов штаммов А4 и 15834 *A. rhizogenes* для создания новых сортов и линий растений с улучшенными параметрами роста корней и повышенной стрессоустойчивостью, тогда как *rol*-гены штамма К599 не подходят для таких целей.

Ключевые слова: *Agrobacterium rhizogenes*, *Nicotiana tabacum*, агробактериальная трансформация, антиоксидантная система, стрессоустойчивость, *rol*-гены

DOI: 10.31857/S0015330324050111, EDN: MLUDPV

ВВЕДЕНИЕ

Agrobacterium rhizogenes (*Rhizobium rhizogenes*) [1, 2] в процессе генетической трансформации переносит в составе Т-ДНК в геном растений

гены *rolA*, *rolB*, *rolC* и *rolD*, так называемые гены “корневого локуса” (англ. *root locus*), выполняющие разнообразные биологические функции, которые нарушают нормальное функционирование растений путем действия на гормональную

систему, что в итоге приводит к образованию волосовидных корней (англ. hairy roots) [3–5]. На сегодняшний день известно, что экспрессия всех *rol*-генов как вместе, так и по отдельности может оказывать различное влияние на морфогенез, антиоксидантную систему, стрессоустойчивость и вторичный метаболизм, что было подробно рассмотрено в нашем обзоре [6]. Накапливаются данные о позитивном влиянии отдельных *rol*-генов на стрессоустойчивость через воздействие на компоненты антиоксидантной системы и гормональный статус растений. К примеру, ген *rolB* способен активировать защитные системы растений в ответ на активные формы кислорода (АФК), предотвращая гибель некротических клеток, и уменьшать симптомы апоптоза [7]. Было показано, что растения *Rubia cordifolia* L., несущие ген *rolC* штамма A4 *A. rhizogenes*, лучше нейтрализуют действие АФК, чем дикий тип [8]. Дальнейшие исследования показали, что у *rolC*-трансформированных растений активируются *myb*-response elements и *C*-related elements, регулирующие синтез вторичных метаболитов, что проявляется снижением содержания АФК [3, 9]. Также есть данные о 2–3-кратном повышении устойчивости *rolC*-трансформантов к солевому стрессу, низким и высоким температурам [8]. Экспрессия каждого из *rol*-генов у растений *Centella asiatica* L., трансформированных штаммом A4 *A. rhizogenes*, способствовала увеличению содержания абсцизовой кислоты [10].

Несмотря на описанные результаты, остается менее изученным, как влияет на рост и стрессоустойчивость растений встраивание в геном всех *rol*-генов из различных штаммов агробактерий. Сравнительные исследования направленные на оценку стрессоустойчивости и состояния компонентов антиоксидантной системы трансгенных растений, полученных при встраивании всех *rol*-генов различных штаммов агробактерий, судя по всему, не проводились. Поэтому целью данного исследования явилось создание трех вариантов трансгенных растений табака, несущих *rol*-гены штаммов A4, 15834 и K599 *A. rhizogenes*, анализ их стрессоустойчивости и состояния антиоксидантной системы.

Штаммы *A. rhizogenes* классифицируют в соответствии с использованием ими основных опинонов для питания: агропина, маннопина, кукумопина и микимопина [11–13]. Наиболее известны штаммы *A. rhizogenes* агропинового типа – 15834, A4 и LBA9402, чаще всего используемые для генетической трансформации растений с целью получения волосовидных корней. К кукумопиновому типу относится менее изученный штамм K599 (NCPB2659), но успешно используемый для трансформации растений семейства *Fabaceae* [14, 15]. Предполагалось, что *rol*-гены агропиновых и кукумопиновых штаммов будут

оказывать разное влияние на рост, стрессоустойчивость и компоненты антиоксидантной системы в трансформированных растениях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Создание трансгенных растений табака с rol-генами штаммов A4, 15834 и K599 A. rhizogenes

В работе использовали кукумопиновый штамм *A. rhizogenes* K599 (NCPB2659) с плазмидой pRi2659, агропиновые штаммы A4 и 15834 с плазмидами pRi15834 и pRiA4, соответственно. Трансгенные растения табака *Nicotiana tabacum* L. сорта *Petit Havana* линии SR1 были получены методом агробактериальной трансформации листовых дисков с использованием соответствующих штаммов *A. rhizogenes*. Для проведения генетической трансформации штаммами K599, A4 и 15834 использовали двухмесячные растения табака, выращенные *ex vitro*. Агробактерии предварительно наращивали в жидкой среде LB (Lysogeny Broth) с добавлением рифампицина 100 мг/л (“Фармсинтез”, Россия), затем осаждали центрифугированием при 4000 об/мин в течение 5 мин, осадок растворяли в 5 мл среды minA (K_2HPO_4 –1.37%; KH_2PO_4 –0.45%; $(NH_4)_2SO_4$ –0.1%; цитрат натрия–0.05%; $MgSO_4 \times 7H_2O$ –0.025%; сахароза–0.2% г; pH 5.4) с добавлением 100 мкМ ацетосирингона (“Sigma”, США). Суспензию агробактерий наращивали на орбитальном шейкере (“Innova 40”, Германия) в течение двух часов при 25°C и 180 об/мин. Экспланты листьев табака стерилизовали с использованием 70% раствора этанола (~1 мин) и 2% раствора гипохлорита натрия (~10 мин), затем промывали 5 раз стерильной дистиллированной водой. Инокуляцию листовых эксплантов суспензией агробактерий проводили в течение 30 мин, после чего помещали их на твердую МС-среду, предварительно подсушивая на стерильной фильтровальной бумаге, на совместное культивирование в течение 2 суток при температуре 25 °C, затем листовые экспланты переносили на твердую МС-среду с цефотаксимом (100 мг/л) (“Биохимик”, Россия) для элиминации агробактерий.

Выросшие волосовидные корни длиной 1.5–2 см помещали в отдельные чашки Петри со МС-средой с добавлением цефотаксима (100 мг/л) и содержали при температуре $24^\circ \pm 1^\circ C$ в темноте. Для регенерации побегов из волосовидных корней перемещали их в камеру роста Binder с интенсивностью света 140 мкмоль/(м² с). Выращивали эти корни на МС-среде с pH 5.7–5.8 [16], дополненную 6-бензиламинопурином (БАП) (1 мг/л) и нафтилуксусной кислотой (НУК) (0.5 мг/л). Тотальную ДНК из побегов выделяли стандартным СТАВ-методом [17]. Трансгенность индуцированных

побегов проверяли методом ПЦР с праймерами RolAB1F 5'-AATTGCTACGAGGGGACGCTTTGT-3', RolAB1R 5'-ACGCTCCGCCGGTGGTCATACTTA-3', RolAB2F 5'-TCGGCGGGCTAAGGTCAAGAA-3', RolAB2R 5'-CTCGCGAGAAGATGCAGAAAGTA-3', подобранными нами ранее для одновременной детекции генов *rolA* и *rolB* различных штаммов *A. rhizogenes*. Для ПЦР-анализа на наличие гена *rolC* использовали праймеры rolC1F 5'-GGCGCACTCCTACCAACCTTC-3' и rolC1R 5'-CTCGCCATGCCTACCAACTCA-3', подобранные нами ранее к различным штаммам *A. rhizogenes* [18]. Необходимо отметить, что эти праймеры не дают специфичных ПЦР-продуктов на табаке дикого типа, хотя табак является природно-трансгенным растением, содержащим гомологи *rol*-генов [4]. Для акклиматизации регенерантов к почвенным условиям корни очищали от агара, после чего сажали на почвенный субстрат, покрывали пленкой для сохранения влажности и выращивали при температуре $26^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, при интенсивности света $35 \text{ мкмоль}/(\text{м}^2 \text{ с})$ и фотопериоде 16/8 ч (свет/темнота). Акклиматизация проходила в течение 1 недели, после чего пленку убрали и выращивали растения до стадии созревания семян. Случайным образом для дальнейшего размножения были отобраны ПЦР-положительные трансгенные растения табака A4 (16, 17, 19), 15834 (5, 7) и K599 (14, 24). Семена, полученные от этих 7 трансгенных растений, стали родоначальниками соответствующих линий и были использованы в дальнейшей работе. Отбор трансгенных форм табака в ряду поколений осуществляли также при помощи метода ПЦР на гены *rolA*, *B*, *C*.

Морфометрический анализ корней трансгенных растений табака при действии засоления, гипотермии и ацетата кадмия

Семена трансгенных растений *N. tabacum* поколения T_2 линий A4 (16, 17, 19), 15834 (5, 7) и K599 (14, 24), высевали на твердую МС-среду и выращивали в камерах роста ("Binder", Германия) при температуре 25°C , освещенности около $140 \text{ мкмоль}/(\text{м}^2 \text{ с})$ и фотопериоде 16/8 ч (свет/темнота) (нормальные условия). 10-дневные проростки с одинаковыми размерами корней пересаживали на вертикально-ориентированные чашки Петри со МС-средой при нормальных условиях, действии засоления в концентрациях 50 и 100 мМ NaCl, ацетата кадмия в концентрациях 100 и 200 мкМ, гипотермии (12°C). Растворы NaCl и CdAc добавляли в среду перед автоклавированием. Для выявления оптимальных концентраций NaCl предварительно был проведен эксперимент с растениями табака дикого типа (ДТ) с использованием следующих концентраций этой соли: 25, 50, 100 и 200 мМ. Поскольку при концентрации

25 мМ наблюдалось незначительное изменение длины корней по сравнению с нормальными условиями, а при концентрации 200 мМ прирост не отличался от 100 мМ, то нами были выбраны две концентрации, при действии которых наблюдалось либо улучшение (50 мМ) либо замедление роста (100 мМ) корней. Для выявления концентрации CdAc также проводили эксперимент с растениями табака ДТ с использованием следующих концентраций: 50, 100, 200 и 400 мкМ. При концентрации 50 мкМ прирост корней табака не отличался от прироста в нормальных условиях, а при концентрации 200 и 400 мкМ прирост был примерно одинаковый, но меньший, чем при норме, поэтому нами были выбраны две минимальные концентрации (100 и 200 мкМ), при действии которых наблюдалось снижение роста корней. Затем через 10 дней определяли прирост корней (изменение длины). В качестве контроля были выбраны нетрансгенные растения табака сорта *Petit Havana* линии SR1 (дикий тип – ДТ). Выборка составила 60 растений для каждой линии ($n = 60$).

Анализ антиоксидантной системы и содержания общего растворимого белка трансгенных растений табака при действии засоления

10-дневные проростки растений *N. tabacum* поколения T_2 , выращенные в чашках Петри на твердой МС-среде линий A4 (16, 17, 19), 15834 (5, 7) и K599 (14, 24) с одинаковыми размерами корней пересаживали на вертикально-ориентированные чашки Петри со МС-средой с добавлением 50 мМ NaCl. Активность всех ферментативных систем в корнях была пересчитана на мг общего растворимого белка. Все биохимические исследования проводили в 10 повторностях ($n = 10$).

Для определения активности супероксиддисмутазы (СОД) в корнях применяли метод, основанный на способности СОД конкурировать с нитросиним тетразолием за супероксид-анионы [19]. Активность аскорбатпероксидазы (АПОК) определяли методом, основанным на определении скорости разложения перекиси водорода аскорбатпероксидазой с образованием воды и дегидроаскорбата [20]. Активность гваяколпероксидазы (ГПОК) определяли по способности полимеризации гваякола до тетрагваякола [21]. Активность каталазы (КАТ) проверяли по скорости деградации молекул перекиси водорода [22]. Количество малонового диальдегида (МДА) в навеске определяли с помощью тиобарбитуровой кислоты [23]. Метод определения пролина был основан на работе Khedr с соавт. [24]. Содержание водорастворимых сахаров определяли методом, описанным в работе Dubois с соавт. [25]. Общая антиоксидантная способность (ОАС) оценивалась на метанольных (80%) экстрактах

по восстановлению Mo (VI) до Mo (V) при кислом pH [26]. Активность глутатион-S-трансферазы (GST) определяли по скорости образования конъюгатов между восстановленным глутатионом и 1-хлор-2,4-динитробензолом [27]. Содержание окисленного и восстановленного глутатиона определяли методом Хиссина и Хильфа [28]. Содержание общего растворимого белка определяли по методу Бредфорд.

Результаты всех исследований представлены в виде гистограмм со средними значениями выборки. Барами обозначали стандартную ошибку среднего ($M \pm SEM$). Достоверность различий во всех экспериментах оценивали при помощи *U*-критерия Манна-Уитни ($P < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение трансгенных растений табака, несущих rol-гены штаммов A4, 15834 и K599

В результате агробактериальной трансформации табака штаммом K599 спустя 7 дней на листовых эксплантах начали появляться спонтанные точки регенерации (рис. 1а), из которых через 7 дней развивались не корни, а побеги (рис. 1б). Затем, побеги, изолированные от материнского экспланта, укореняли на МС-среде без добавления гормонов (рис. 1г, д). Стоит отметить, что через 25 дней после инокуляции агробактериями на поверхности эксплантов появля-



Рис. 1. Результаты трансформации листовых эксплантов табака *rol*-генами штамма K599 *A. rhizogenes*: (а) — образование на поверхности эксплантов точек регенерации на 7-й день после инокуляции, (б) — регенерация побегов на 14-й день после инокуляции, (в) — образование волосовидных корней на 25-й день после инокуляции (отмечено стрелкой), (г), (д) — регенерация корней из побегов на безгормональной среде, (е) — акклиматизация регенеранта к условиям почвы.

лись и типичные волосовидные корни (рис. 1в) длиной 1.5–2 см, которые переносили на свежую МС-среду с добавлением БАП (1 мг/л) и НУК (0.5 мг/л) для индукции геммогенеза. Из полученных побегов (8 – образовавшихся спонтанно, 10 – индуцированных из волосовидных корней на среде с гормонами) выделяли геномную ДНК и проводили ПЦР на наличие генов *rolA*, *B*, *C*. В итоге было отобрано 16 трансгенных растений, из которых 14 были успешно акклиматизированы к почвенным условиям (рис. 1е).

При использовании штаммов А4 и 15834 волосовидные корни на поверхности эксплантов индуцировались на безгормональной среде спустя 7–10 дней после проведения трансфор-

мации (рис. 2а), причем, в отличие от штамма К599, на безгормональных питательных средах образования побегов не происходило. При пересадке изолированных волосовидных корней на среду с добавлением БАП (1 мг/л) и НУК (0.5 мг/л) начинали появляться побеги (рис. 2б), которые затем каждые две недели переносили на свежую МС-среду такого же состава (рис. 2в, г). Трансгенность полученных регенерантов проверяли с помощью ПЦР на наличие генов *rolA*, *B*, *C*. ПЦР-анализ показал наличие *rol*-генов во всех анализируемых регенерантах. В результате было получено 15 трансгенных растений табака при помощи штамма А4 и 12 при помощи штамма 15834.

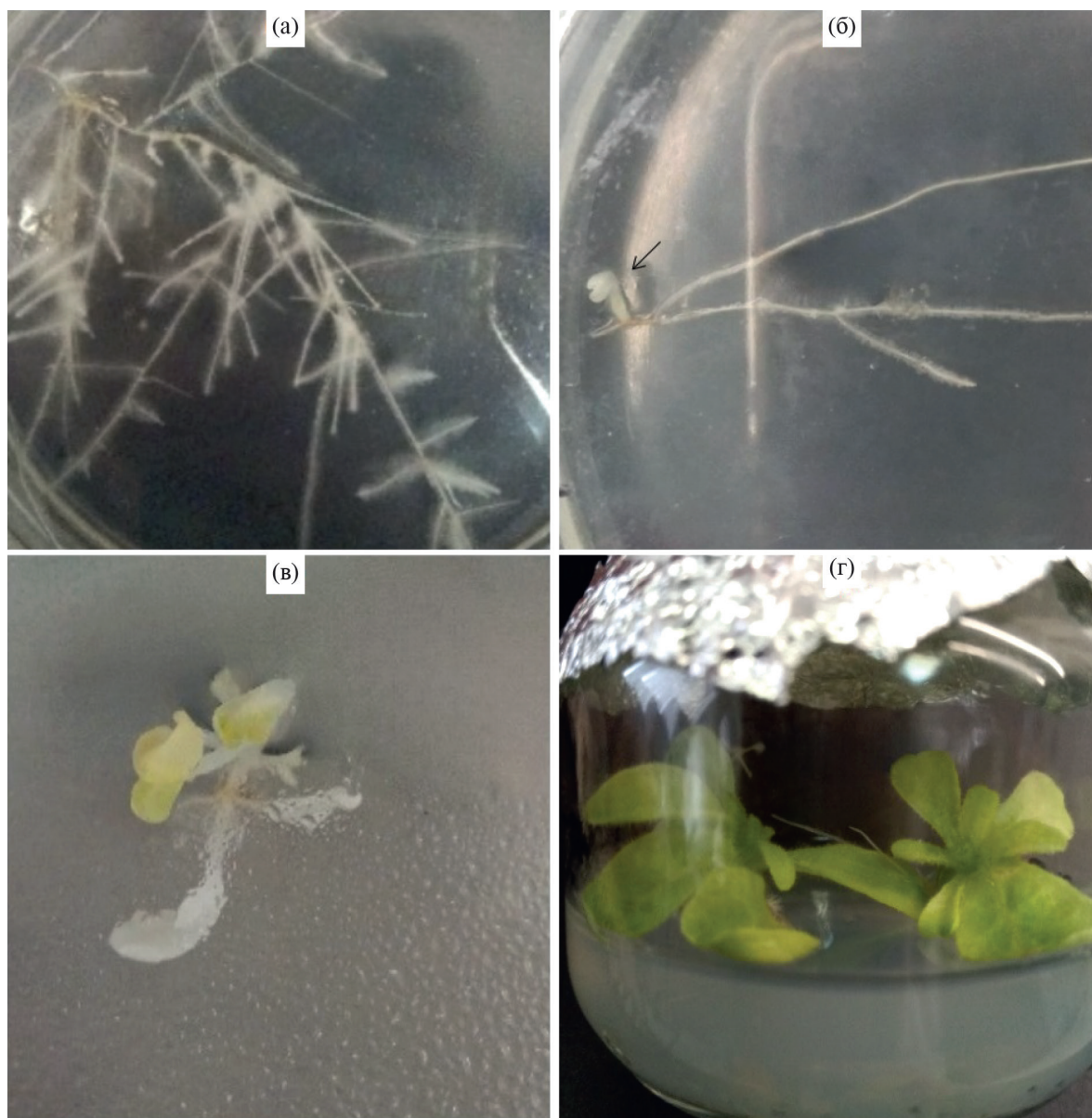


Рис. 2. Результаты трансформации листовых эксплантов табака *rol*-генами штамма А4 *A. rhizogenes*: (а) – внешний вид волосовидных корней на 14 день культивирования на среде без фитогормонов, (б), (в) – регенерация побега из волосовидного корня на среде с добавлением БАП и НУК, (г) – культивирование регенерантов на среде с добавлением БАП и НУК.

Для проведения анализа роста корней и активности компонентов антиоксидантной системы из *rol*-трансформантов (рис. 3а-г) случайным образом были выбраны следующие 7 растений: A4 (16, 17, 19), 15834 (5, 7) и K599 (14, 24). Далее получали трансгенные растения поколения T_1 , методом ПЦР-анализа оставляли лишь те, которые содержали агробактериальные *rol*-гены. Семена от этих растений использовали в дальнейшей работе (поколение T_2). Растения T_2 тоже проверяли на наличие *rol*-генов методом ПЦР-анализа.

Морфометрический анализ корней трансгенных растений табака при нормальных условиях и при действии стрессовых факторов

При нормальных условиях (25°C) у трансгенных растений табака, несущих *rol*-гены штаммов A4 и 15834, было выявлено достоверное увеличение длины корней, а у линий штамма K599 выявлено снижение темпов роста корней (рис. 4а), по сравнению с ДТ. Степень повышения роста при этом составила в среднем 35% и 57% для линий штаммов A4 и 15834 соответственно, а степень снижения роста корней у линий штамма K599 в среднем 86% по сравнению с ДТ. При действии NaCl в концентрации 50 мМ продемонстрировано достоверное увеличе-

ние длины корней у линий A4 (16, 19) и линии 15834 (5), в то время как, линии K599 (14, 24) характеризовались снижением роста корней по сравнению с ДТ (рис. 4б). Сходные результаты были получены при анализе роста корней при действии NaCl в концентрации 100 мМ — увеличение роста корней у линий A4 (19) и 15834 (5), а также снижение темпов роста у корней линий K599 (14, 24). Степень увеличения длины корней при засолении составила в среднем 52% и 38% для линий 19 и 5 соответственно, а степень уменьшения длины корней для линий 14 и 24 составила в среднем 88% (рис. 4в). При гипотермии у трансгенных растений обнаружено ухудшение параметров роста корней, чем у ДТ. Большее уменьшение длины корней по сравнению с ДТ было характерно для растений табака, трансформированных штаммом K599 и в среднем составило 86% по сравнению с ДТ. Для корней линий A4 и 15834 в условиях гипотермии уменьшение длины корней по сравнению с ДТ в среднем составило 23% и 26% соответственно (рис. 4г). В условиях кадмиевого стресса в концентрации CdAc 100 мкМ было выявлено увеличение длины корней у линий A4 (19), 15834 (5, 7), а также уменьшение длины корней у линии A4 (16) и у обеих анализируемых линий K599 по сравнению с ДТ (рис. 4д). При действии ацетата кадмия в концентрации 200 мкМ более

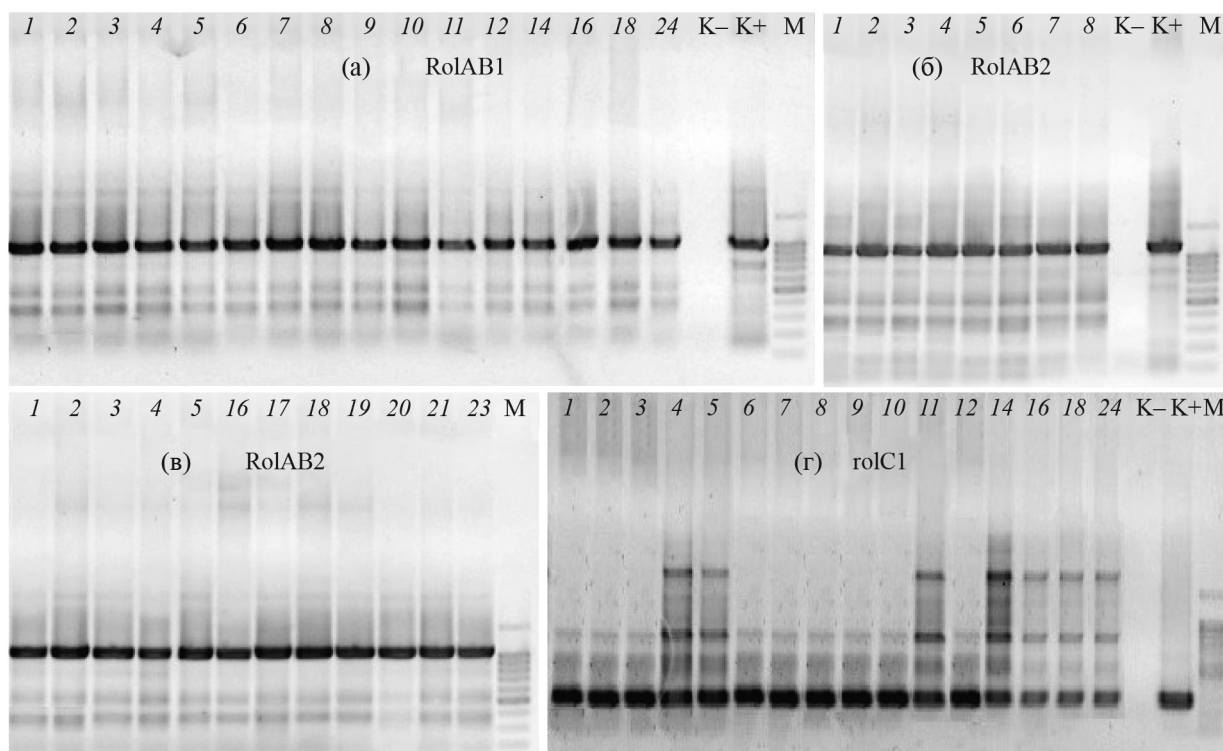


Рис. 3. Электрофореграмма результатов ПЦР-анализа побегов-регенерантов с праймерами RolAB1, RolAB2 и rolC1: (а), (г) — K599, (б) — 15834, (в) — A4. М — маркер длин ДНК 1kb DNA Ladder. К — отрицательный контроль ПЦР. К+ — положительный контроль ПЦР. Размеры ПЦР-продуктов: 1112 п.н. (RolAB1), 1127 п.н. (RolAB2), 267 п.н. (rolC1).

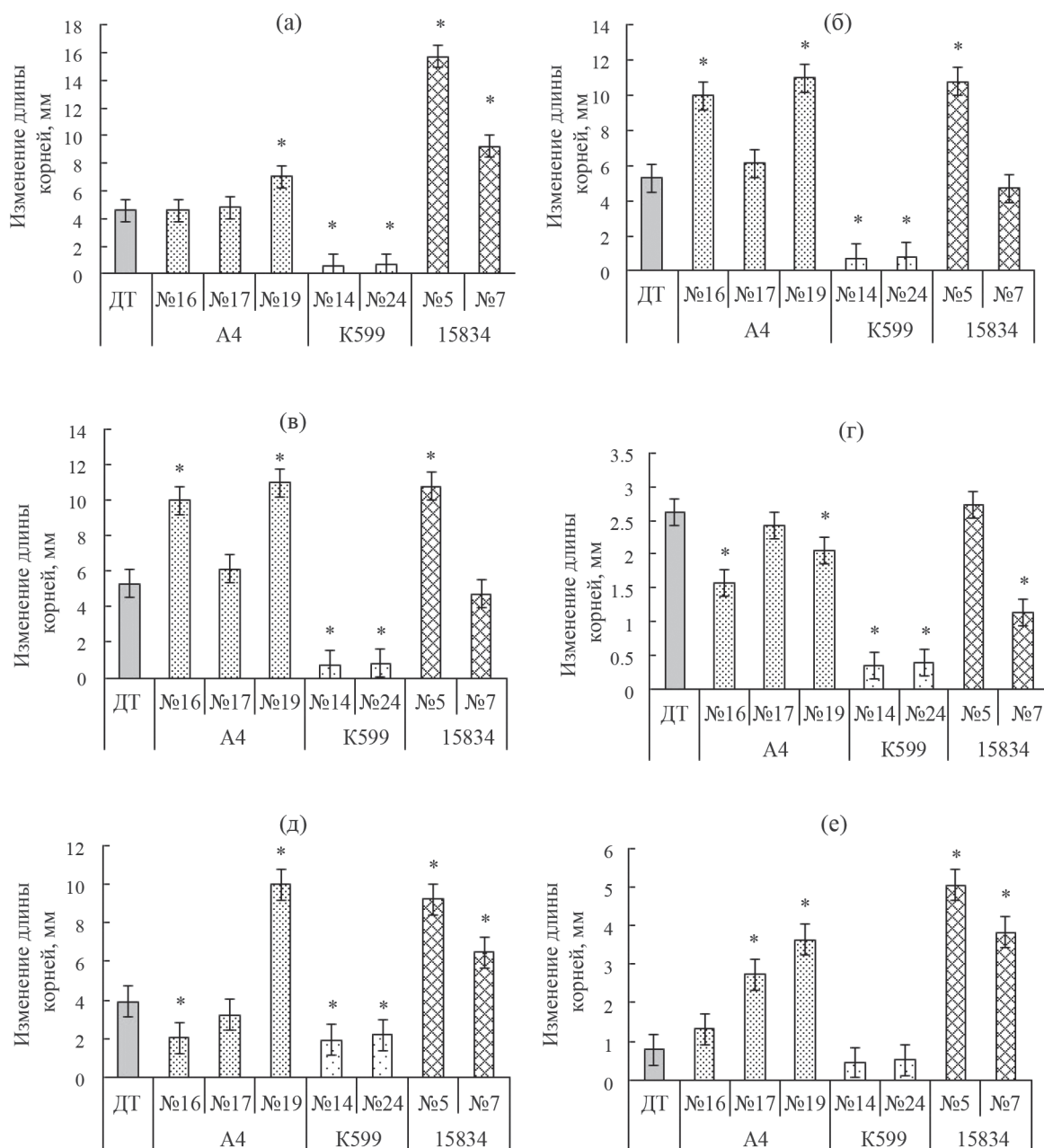


Рис. 4. Изменение длины корней трансгенных растений табака при выращивании на вертикально-ориентированных чашках Петри: (а) – нормальные условия, (б) – 50 mM NaCl, (в) – 100 mM NaCl, (г) – +12°C, (д) – 100 мкМ CdAc, (е) – 200 мкМ CdAc. Звездочками (*) обозначены достоверно различающиеся результаты изменения длины корней между ДТ и трансгенными растениями ($P \leq 0.05$).

быстрыми темпами роста корней характеризовались линии A4 (17, 19) и 15834 (5, 7) (рис. 4е). Степень повышения темпов роста корней при действии ацетата кадмия в концентрации 100 мкМ в среднем составила для линий A4–23% и 15834 – 50%, при концентрации 200 мкМ – 69% и 82% соответственно, по сравнению с ДТ. Степень снижения роста корней для линий, трансформированных штаммом K599, при действии ацетата кадмия в концентрации 100 мкМ составила в среднем 47% по сравнению с ДТ (рис. 4д).

Анализ антиоксидантной системы и содержания общего растворимого белка в трансгенных растениях табака при воздействии засоления

Засоление наряду с другими стрессовыми факторами оказывает негативное действие на растения за счет образования АФК и повышения уровня окислительного стресса. Поскольку NaCl содержится в почве, то этот стрессовый фактор оказывает свой отрицательный эффект, прежде всего, на рост корней [29], в которых, по данным литературы [6], экспрессируются *rol*-гены.

Кроме того, результаты морфометрического анализа корней при засолении в концентрации 50 мМ NaCl продемонстрировали достоверное изменение длины у всех трансгенных растений, поэтому нами было принято решение провести анализ антиоксидантной системы при засолении именно с данной концентрацией NaCl.

У трансгенных растений линий A4 и 15834 содержание водорастворимых сахаров в корнях (рис. 5а) при нормальных условиях было достоверно меньше по сравнению с ДТ. При воздействии засоления количество водорастворимых сахаров у ДТ достоверно снижалось, а у растений линий A4 и 15834 хотя и превысило ДТ, но не отличалось от значений, полученных в оптимальных условиях культивирования. Содержание водорастворимых сахаров в нормальных условиях в корнях линий K599 было достоверно ниже, чем в растениях ДТ, однако при засолении их количество увеличилось в 1.8 раз, превысив значение у ДТ.

Количество пролина (рис. 5б) в нормальных условиях в корнях трансгенных растений линий A4 и 15834 было выше в 4 и 4.5 раза соответственно, чем в растениях ДТ. В условиях засоления количество пролина возросло в среднем для линий A4 и 15834 — в 1.5 раза, K599 — в 3 раза, по сравнению с нормальными условиями, превысив значение ДТ в 3.5 и 3 раза соответственно. Таким образом, при нормальных условиях у растений K599 количество пролина было как у ДТ, а в условиях засоления превысило его показатель (рис. 5б).

В нормальных условиях содержание общего растворимого белка (рис. 5в) в корнях растений ДТ соответствовало значениям в корнях линий 15834 и было достоверно выше, чем в корнях трансгенных растений линий A4 и K599 в среднем на 30% и 51% соответственно. В условиях засоления в корнях линий K599 содержание растворимых белков снижалось, но достоверно не отличалось от ДТ, в то время как в корнях трансгенных растений линий A4 и 15834 содержание белков наоборот возрастало и превысило значения, полученные у растений ДТ на 51% и 60% соответственно.

Активность каталазы (рис. 5г) при нормальных условиях была выше по сравнению с ДТ у линий A4 — в 3.8 раза, 15834 — в 2.8 раза и K599 — в 5.5 раза. При добавлении 50 мМ NaCl активность каталазы в корнях растений ДТ повысилась в 4.8 раза. В условиях засоления активность каталазы в корнях линий K599 превышала значения, полученные в корнях ДТ в среднем в 1.4 раза, однако по сравнению с нормальными условиями было характерно незначительное повышение. При засолении активность каталазы в корнях линий A4 и 15834 оставалась на том же уровне и достоверно не отличалась от значений у ДТ.

Активность ГПОК (рис. 5д) в корнях всех трансгенных линий в нормальных условиях была выше, чем у растений ДТ в среднем в растениях A4 — в 2.9 раза, 15834 — в 2.5 раза и K599 — в 6.5 раза. При засолении активность ГПОК в корнях растений линий A4 и 15834 достоверно снижалась в среднем в 1.3 и 1.8 раза соответственно, и была ниже по сравнению с ДТ у линий A4 — в 1.7 раза и 15834 — в 2.8 раза, а в корнях растений линий K599 повысилась в среднем в 1.2 раза, превысив значение ДТ в среднем в 1.9 раза.

По активности АПОК в корнях (рис. 5е) при нормальных условиях растения ДТ и трансгенные линии не различались. В условиях засоления активность АПОК в корнях ДТ повышалась и была больше в среднем, чем в корнях линий A4 — в 14.4 раза, 15834 — в 7.3 раза и K599 — в 9.3 раза. То есть активность АПОК в трансгенных растениях при засолении оставалась на том же уровне.

В корнях трансгенных растений линий A4, 15834 и K599 содержание МДА в корнях (рис. 6а), как при нормальных условиях, так и при засолении было достоверно ниже по сравнению с ДТ. При этом разница в содержании МДА в условиях засоления была больше в корнях линий A4 и 15834 — в 1.4 раза, K599 — в 3.4 раза в среднем, по сравнению с ДТ.

Активность СОД (рис. 6б) в корнях всех анализируемых линий трансгенных растений в нормальных условиях была достоверно выше в среднем у линий A4 — в 2.8 раза, 15834 — в 2 раза и K599 — в 3.6 раза, по сравнению с ДТ. При действии NaCl, активность СОД повышалась в корнях линий K599 в 1.2 раза, по сравнению с нормальными условиями и превысила значение ДТ в 2 раза. В корнях линий A4 и 15834 в условиях засоления активность СОД оставалась на том же уровне, не превышая значения у ДТ.

В нормальных условиях ОАС в корнях (рис. 6в) трансгенных растений линий A4, 15834 и K599 была выше в среднем в 2.9, 1.8 и 2 раза соответственно, по сравнению с растениями ДТ. Однако при засолении в корнях трансгенных растений накапливалось меньшее количество эквивалентов аскорбиновой кислоты (в среднем в корнях A4 — на 21%, 15834 — на 35%, K599 — на 25% меньше, чем у ДТ).

Глутатион-S-трансферазная (GST) (рис. 6г) активность была выше, как при нормальных условиях, так и при действии засоления в корнях растений K599. Причем у этих растений активность GST при засолении в среднем была выше в 2.7 раза по сравнению с ДТ.

Количество восстановленного глутатиона (GSH) (рис. 6д) при нормальных условиях было выше в среднем в 41 раз в корнях растений A4, в 26.8 раза — 15834, в 65.5 раза — K599 по срав-

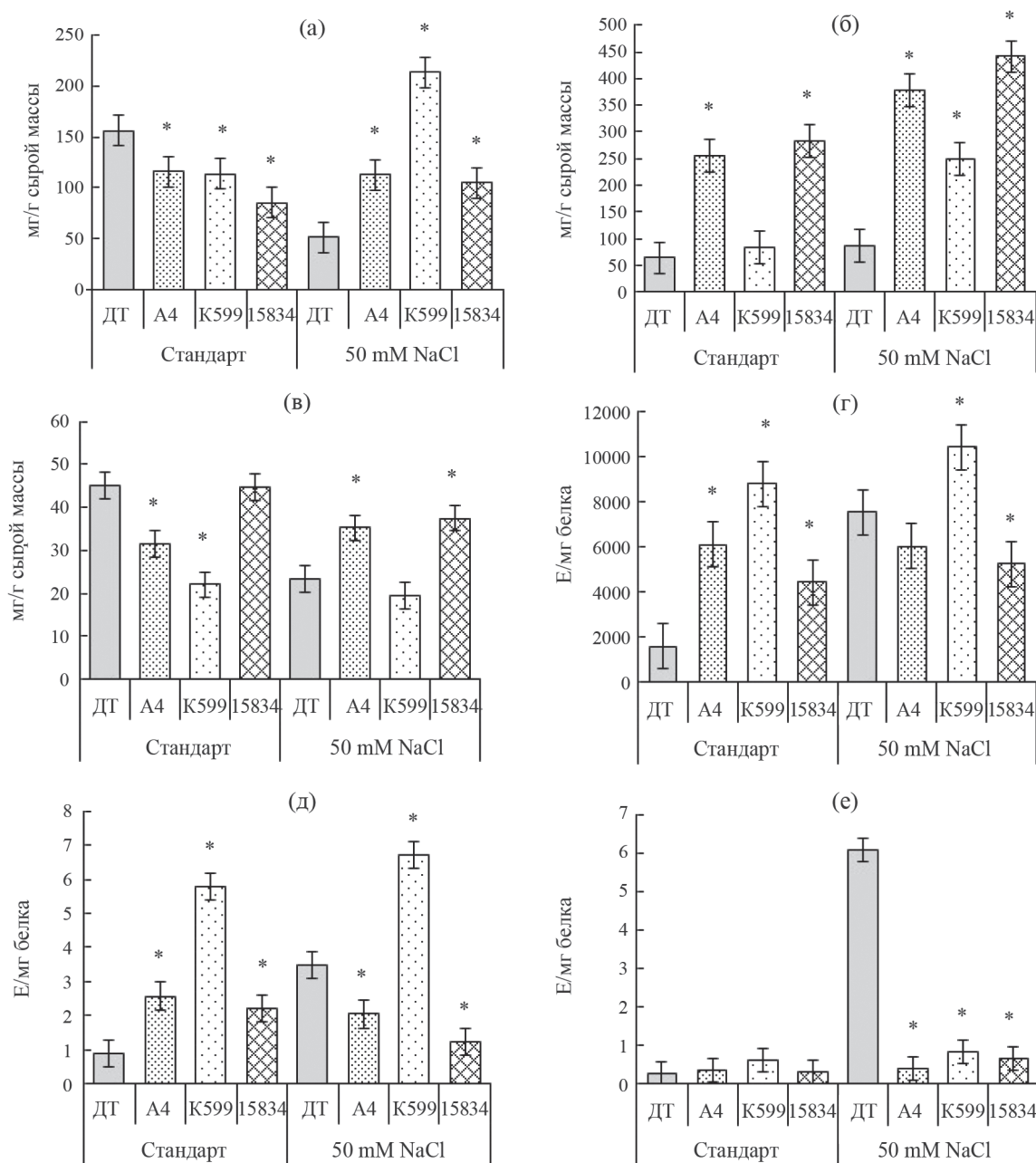


Рис. 5. Анализ антиоксидантной системы и определение общего растворимого белка табака ДТ и трансгенных растений в нормальных условиях и при засолении в концентрации 50 мМ NaCl: (а) – содержание водорастворимых сахаров, (б) – содержание пролина, (в) – содержание общего растворимого белка, (г) – активность каталазы, (д) – активность гваяколпероксидазы, (е) – активность аскорбатпероксидазы. Звездочками (*) обозначены достоверно различающиеся результаты между ДТ и трансгенными растениями ($P \leq 0.05$).

нению с ДТ. При засолении содержание GSH в корнях растений ДТ увеличилось в 43.6 раза, а в трансгенных растениях А4 в среднем в 1.7 раза, 15834 – в 2.8 раза, К599 – в 1.2 раза. Таким образом, в корнях всех трансгенных растений с *rol*-генами при засолении было больше GSH, чем у ДТ.

Содержание GSSG (рис. 6е) при нормальных условиях культивирования в корнях трансгенных растений было больше значений ДТ в линиях А4 – в 78.7 раза, 15834 – в 29.6 раза, К599 – в 40

раз в среднем. При действии NaCl содержание окисленного глутатиона в корнях ДТ повысилось в 30 раз, а в корнях трансгенных растений повышение относительно нормальных условий составило в среднем для растений К599 – в 1.4 раза, 15834 – в 2 раза. Стоит отметить, что содержание GSSG в корнях растений линии А4 наоборот снизилось на 11%. Однако в любом случае у всех трансгенных растений с *rol*-генами при засолении содержание GSSG было значительно выше, чем у ДТ.

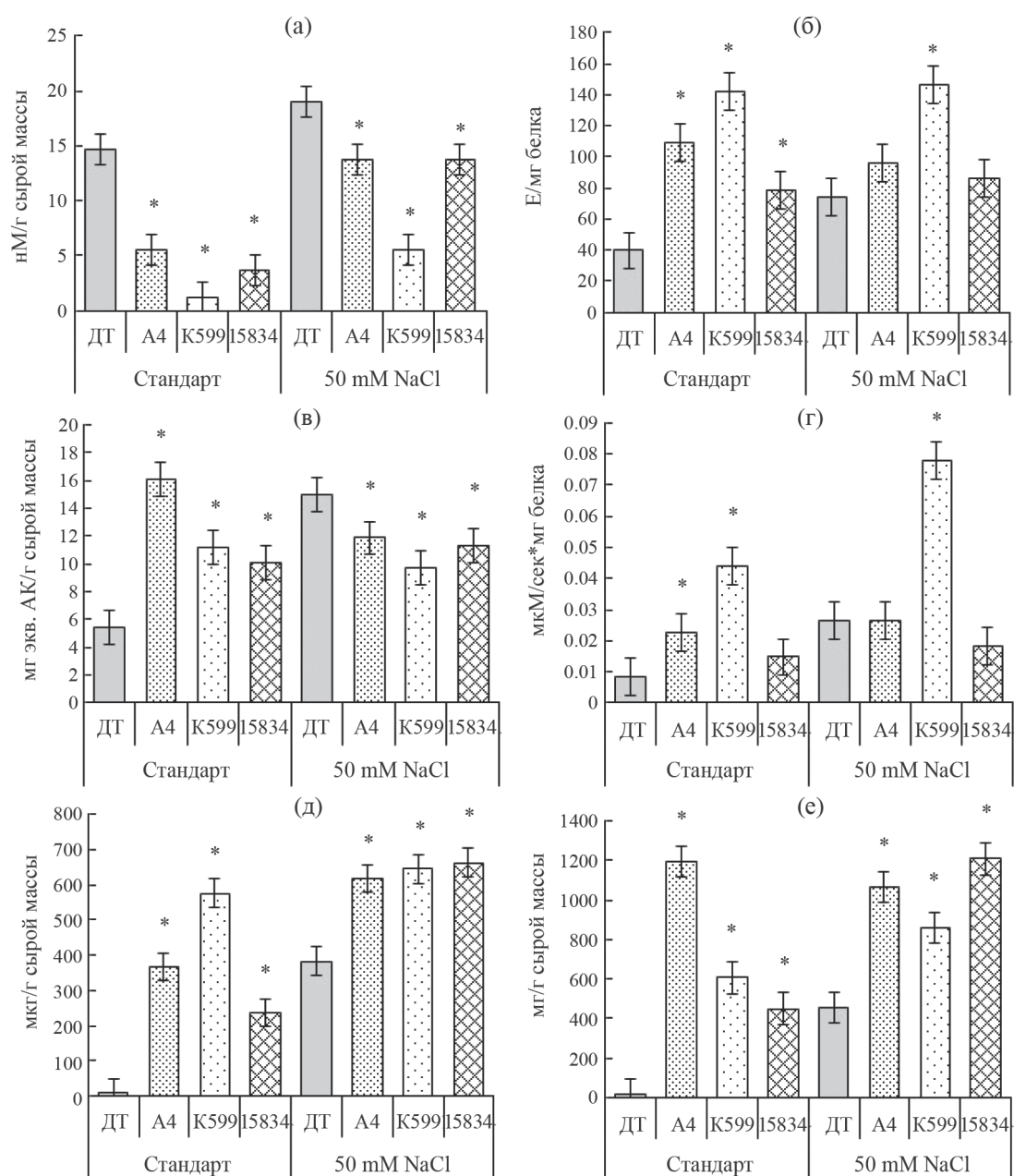


Рис. 6. Анализ антиоксидантной системы табака ДТ и трансгенных растений в нормальных условиях и при воздействии засоления в концентрации 50 mM NaCl: (а) — содержание малонового диальдегида, (б) — активность супероксиддисмутазы, (в) — общая антиоксидантная способность, (г) — активность глутатион-S-трансферазы, (д) — содержание восстановленного глутатиона, (е) — содержание окисленного глутатиона. Звездочками (*) обозначены достоверно различающиеся результаты между ДТ и трансгенными растениями ($P \leq 0.05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Метод трансформации растительных тканей различными штаммами *A. rhizogenes* для получения культур волосовидных корней, продуцирующих вторичные метаболиты нашел широкое применение в биотехнологии растений [13, 30]. Помимо этого, трансгены из Т-ДНК агробактерий способны оказывать влияние на рост и стрессоустойчивость трансформированных

растений, однако исследований в этой области проведено пока мало [10, 31, 32, 33, 36]. В нашей работе с помощью штаммов A4, 15834 и K599 *A. rhizogenes* были созданы трансгенные растения табака, несущие гены *rolA*, *B*, *C*, *D* со своими нативными промоторами в качестве модельных объектов для исследования роли этих генов в регуляции роста и стрессоустойчивости. Ранее нами были описаны результаты агробактериальной трансформации листовых экплантов

штамма K599, где кроме появления волосовидных корней была зафиксирована интенсивная прямая индукция побегов [18]. При использовании агропиновых штаммов для трансформации листовых эксплантов нами также были получены культуры волосовидных корней, которые визуально росли лучше, чем волосовидные корни, полученные с использованием штамма K599. Нужно отметить, что на поверхности эксплантов, трансформированных штаммами A4 и 15834, на безгормональных питательных средах не происходило спонтанного побегообразования, в отличие от штамма K599, а геммогенез из корней запускался только при добавлении в среду БАП (1 мг/л) и НУК (0.5 мг/л). Поскольку эти три штамма продемонстрировали неодинаковую способность активировать процессы побего- и корнеообразования, то предполагалось, что соответствующие трансгенные растения будут также отличаться по параметрам роста и стрессоустойчивости. Так как *rol*-гены преимущественно экспрессируются в корнях, была поставлена задача провести анализ роста корней трансгенных растений при нормальных и стрессовых условиях.

Полученные нами данные морфометрического анализа доказывают участие *rol*-генов штаммов A4 и 15834 в регуляции и обеспечении роста корней, как при нормальных условиях, так и при повышенных концентрациях хлорида натрия и ацетата кадмия. Для *rol*-генов с нативными промоторами штаммов A4 и 15834 таких результатов до наших исследований показано не было. Результаты, полученные на трансгенных растениях табака, трансформированных штаммом K599, доказывают, что экспрессия *rol*-генов этого штамма оказывает негативное влияние на рост корней табака, как при нормальных условиях, так и при действии стрессовых факторов.

На сегодняшний день ряд исследований подтверждают важность отдельных *rol*-генов в регуляции роста и стрессоустойчивости растений при воздействии засоления, засухи, гипотермии и высоких температур [10, 31]. Так обнаружено, что *rolC*-экспрессирующие каллусные культуры *R. cordifolia* и *Arabidopsis thaliana* L. более устойчивы к воздействию абиотических факторов по сравнению с контролем за счет способности *rolC* специфически регулировать экспрессию генов NADPH-оксидазы, каталазы, СОД и АПОК, тем самым подавляя образование АФК [31]. Трансформация *R. cordifolia* штаммом A4 *A. rhizogenes* приводила к снижению уровня АФК, что сопровождалось усилением экспрессии ряда генов, кодирующих ферменты, детоксицирующие АФК [32]. В *rolB*-трансформантах *R. cordifolia*, *A. thaliana* и *Panax ginseng* С. А. Мей. обнаружена повышенная экспрессия генов антиоксидантных ферментов, кодирующих цитозольную

аскорбатпероксидазу, каталазу и супероксиддисмутазу, которые в свою очередь ингибируют чрезмерное повышение АФК [33].

Полученные нами результаты анализа антиоксидантной системы при засолении показывают, что корни трансгенных растений табака, несущие *rol*-гены штаммов A4 и 15834, характеризуются повышенным содержанием водорастворимых сахаров, белка (рис. 5а, в) и снижением МДА (рис. 6а). Кроме того, у растений линий A4 и 15834 количество пролина (рис. 5б), восстановленного и окисленного глутатиона (рис. 6д, е), как при нормальных условиях, так и при действии засоления было больше по сравнению с ДТ. При действии стрессовых факторов растительные клетки накапливают различные осмо- и криопротекторы, в том числе пролин, а повышенное содержание пролина у *rolD*-трансформированных растений может играть адаптивную роль и, вероятно, связано с тем, что этот ген кодирует фермент орнитинциклодеаминазу [34], который превращает L-орнитин в L-пролин.

В нашем исследовании обнаружено достоверное увеличение общего пула глутатиона (GSH+GSSG) (рис. 6д, е) в корнях трансгенных растений A4 и 15834, как при нормальных условиях, так и при действии засоления. Bulgakov с соавт. [33] также обнаружили, что в *rolB*-трансформированных клетках *R. cordifolia* общий пул глутатиона и соотношение GSH/GSSG были достоверно выше, чем в нетрансформированных. Полученные результаты, могут быть обусловлены тем, что центральным звеном в поддержании окислительно-восстановительного баланса клеток является соотношение между GSH/GSSG, а повышенная концентрация восстановленного глутатиона коррелирует со способностью растений противостоять индуцированному окислительному стрессу.

В корнях трансгенных растений, трансформированных штаммом K599, было обнаружено более высокое содержание пролина, водорастворимых сахаров, общего пула глутатиона, а также достоверно большая активность ГПОК (рис. 5д), СОД и GST (рис. 6б, г), снижение МДА (рис. 6а) по сравнению с ДТ при солевом стрессе. Нужно отметить, что количество водорастворимых сахаров (рис. 5а) в корнях трансгенных растений табака линий K599 заметно превышало значения, полученные при использовании агропиновых штаммов в условиях засоления. Повышение количества водорастворимых сахаров в корнях является одним из эффективных механизмов стрессоустойчивости в ответ на избыток одновалентных ионов в вакуолях клеток при засолении [35]. Избыточная активность СОД, ГПОК и GST в корнях трансгенных растений табака линии K599,

вероятно, обусловлена способностью *rol*-генов активировать защитные системы растений в ответ на появление АФК. Bulgakov с соавт. [36] выявили способность *rolB*-трансформированных клеток *R. cordifolia* длительное время переносить сверхвысокие дозы АФК путем синтеза ферментов, обеспечивающих устойчивую антиоксидантную защиту растений от последующих стрессов. В целом, в корнях растений К599 обнаруживалось гораздо больше позитивных изменений в компонентах антиоксидантной системы по сравнению с ДТ, чем у растений А4 и 15834. Однако корни растений К599 росли медленнее как при норме, так и при засолении по сравнению с ДТ и растениями А4 и 15834. Все это говорит о том, что параметры роста, стрессоустойчивость и состояние компонентов антиоксидантной системы не всегда находятся в прямой зависимости. В случае с растениями К599 позитивные изменения в антиоксидантной системе корней проявлялись ухудшением роста и стрессоустойчивости. Данное предположение поддерживается исследованием Katsuhara с соавт. [37], которые доказали, что сверхэкспрессия GST не оказывала выраженного влияния на снижение роста корней у растений *A. thaliana* при действии засоления в концентрации 100 мМ NaCl, поскольку лишь обезвреживание АФК было недостаточным для восстановления осмотического дисбаланса, вызванного солевым стрессом. Более того, в исследовании Bernstein с соавт. [38] было обнаружено, что повышение активностей СОД и АПОК в растущих листьях может приводить к ингибированию роста клеток растений в условиях засоления за счет снижения АФК, так как последние тоже необходимы для нормального роста.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, *rol*-гены штаммов А4 и 15834 *A. rhizogenes* оказывают стимулирующее действие на рост корней табака, как при нормальных условиях, так и при повышенных концентрациях NaCl и ацетата кадмия. Экспрессия *rol*-генов штамма К599 оказывает негативное влияние на рост корней, как при норме, так и при действии стрессовых факторов. Показано, что в условиях засоления *rol*-гены агропиновых штаммов способствуют увеличению в клетках содержания пролина, окисленного и восстановленного глутатиона как при норме, так и при засолении. *rol*-гены штамма К599 способствуют повышению активности супероксиддисмутазы, гваяколпероксидазы и глутатион-S-трансферазы. Полученные нами результаты говорят о перспективности использования *rol*-генов штаммов А4 и 15834 *A. rhizogenes* для создания новых сортов и линий растений с улучшенными параметрами

роста корней и повышенной стрессоустойчивостью, тогда как *rol*-гены штамма К599 не подходят для таких целей.

Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием животных и людей в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Riker A.J., Banfield W.M., Wright W.H., Keitt G.W., Sagen H. E. Studies on infectious hairy root of nursery apple trees // J. Agr. Res. 1930. V. 41. P. 507.
2. Young J.M., Kuykendall L.D., Martínez-Romero E., Kerr A., Sawada H. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis* // Inter. J. System. Evolut. Microbiol. 2001. V. 51. P. 89. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-1-89>
3. Павлова О.А., Мамзеева Т.В., Лытова Л.А. *Rol*-гены *Agrobacterium rhizogenes* // Экологическая генетика. 2013. Т. 11. С. 59.
4. White F.F., Garfinkel D.J., Huffman G.A., Gordon M.P., Nester E.W. Sequences homologous to *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA in the genomes of uninfected plants // Nature. 1983. V. 301. P. 348. <https://doi.org/10.1038/301348a0>
5. Sarkar S., Ghosh I., Roychowdhury D., Jha S. The effects of *rol* genes of *Agrobacterium rhizogenes* on morphogenesis and secondary metabolite accumulation in medicinal plants // Biotechnological approaches for medicinal and aromatic plants. Chapter 2 / Ed. N. Kumar. Singapore: Springer Nature Singapore Pte Ltd. 2018. P. 27.
6. Швец Д.Ю., Бережнева З.А., Мусин Х.Г., Баймухаметова Э.А., Кулуев Б.Р. *rol*-гены агробактерий: возможные биологические функции // Успехи современной биологии. 2023. Т. 143. С. 487. <https://doi.org/10.31857/S004213242305006X>
7. Bulgakov V.P., Shkryl Y.N., Veremeichik G.N., Gorpichenko T.Y., Vereshchagina Y.V. Recent advances in the understanding of *Agrobacterium rhizogenes*-derived genes and their effects on stress resistance and plant metabolism // Adv. Biochem. Eng. Biotech. 2013. V. 134. P. 1. https://doi.org/10.1007/10_2013_179
8. Bulgakov V.P., Aminin D.L., Shkryl Y.N., Gorpichenko T.Y., Veremeichik G.N., Dmitrenok P.S., Zhuravlev Y.N. Suppression of reactive oxygen species and enhanced stress tolerance in *Rubia cordifolia* cells expressing the *rolC* oncogene // Molec. Plant Microbe Interact. 2008. V. 21. P. 1561. <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-12-1561>

9. Ganesan G., Sankararamasubramanian H. M., Harikrishnan M., Ganpudi A., Parida A. A MYB transcription factor from the grey mangrove is induced by stress and confers NaCl tolerance in tobacco // J. Exp. Bot. 2012. V. 63. P. 4549. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers135>
10. Alcalde M.A., Müller M., Munné-Bosch S., Landin M., Gallego P.P., Bonfill M., Palazon J., Hidalgo-Martinez D. Using machine learning to link the influence of transferred *Agrobacterium rhizogenes* genes to the hormone profile and morphological traits in *Centella asiatica* hairy roots // Front. Plant Sci. 2022. V. 13. P. 1. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1001023>
11. White F.F., Nester E. W. Relationship of plasmids responsible for hairy root and crown gall tumorigenicity // J. Bacteriol. 1980. V. 144. P. 710. <https://doi.org/10.1128/jb.144.2.710-720.1980>
12. Nemoto K., Hara M., Goto S., Kasai K., Seki H., Suzuki M., Oka A., Muranaka T., Mano Y. The *aux1* gene of the Ri plasmid is sufficient to confer auxin autotrophy in tobacco BY-2 cells // J. Plant Physiol. 2009. V. 166. P. 729. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2008.09.006>
13. Кулуев Б.Р., Вершинина З.Р., Князев А.В., Чемерис Д.А., Баймиев Ан.Х., Чумаков М.И., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. “Косматые” корни растений – важный инструментальный для исследователей и мощная фитохимбиофабрика для производственников // Биомика. 2015. Т. 7. С. 70.
14. Aggarwal P.R., Nag P., Choudhary P., Chakraborty N., Chakraborty S. Genotype-independent *Agrobacterium rhizogenes*-mediated root transformation of chickpea: A rapid and efficient method for reverse genetics studies // Plant Methods. 2018. V. 14. P. 1. <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0315-6>
15. Foti C., Pavli O. I. High-efficiency *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transgenic hairy root induction of *Lens culinaris* // Agronomy. 2020. V. 10. P. 1. <https://doi.org/10.3390/agronomy10081170>
16. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. V. 15. P. 473. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
17. Doyle J.J., Doyle J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // Phytochem. Bull. 1987. V. 19. P. 11.
18. Баймухаметова Э.А., Бережнева З.А., Мусин Х.Г., Швеиц Д.Ю., Князев А.В. Кулуев Б.Р. Индукция прямой регенерации побегов при генетической трансформации табака штаммом K599 *Agrobacterium rhizogenes* // Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки. 2022. Т. 164. С. 249. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2022.2.249-262>
19. Чевари С., Чаба И., Секей И. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах // Лабораторное дело. 1985. № 11. С. 578.
20. Verma S., Dubey R. S. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alert the activities of antioxidant enzymes in grooving rice plants // Plant Sci. 2003. V. 64. P. 645. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00022-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00022-0)
21. Ермаков А.И., Арисимович В.В., Ярош Н.П., Перуански Ю.В., Луковникова Г.А. Иконникова М.И. Методы биохимического исследования растений // Ленинград: Агропромиздат, 1987. 430 с.
22. Panchuck I. I. Volkov R. A., Schoff F. Heat stress and heat shock transcription factor-depend expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis* // Plant Physiol. 2002. V. 129. P. 838.
23. Taylor N.L., Millar A. H. Oxidative stress and plant mitochondria // Meth. Mol. Biol. 2007. V. 372. P. 389. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-365-3_28
24. Khedr A. H. A., Abbas M. A., Abdel W. A. A., Quick W. P., Abogadallah G. M. Proline induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancreaticum maritimum* L. to salt-stress // J. Exp. Bot. 2003. V. 54. P. 2553. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg277>
25. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J., Roberts P. A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // Anal. Chem. 1956. V. 28. P. 350. <http://dx.doi.org/10.1021/ac60111a017>
26. Boestfleisch C., Wagenseil N. B., Buhmann A. K., Seal C. E., Wade E. M., Muscolo A., Papenbrock J. Manipulating the antioxidant capacity of halophytes to increase their cultural and economic value through saline cultivation // AoB Plants. 2014. V. 13. P. 6. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plu046>
27. Habig W. H., Pabst M. S., Jakoby W. B. Glutathione-S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation // J. Biol. Chem. 1974. V. 246. P. 7130. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42083-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42083-8)
28. Hissin P. J., Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues // Anal. Biochem. 1976. V. 74. P. 214. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90326-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90326-2)
29. Бережнева З.А., Кашафутдинова А.Р., Кулуев Б.Р. Рост корней трансгенных растений *Nicotiana tabacum* L. с конститутивной экспрессией гена глутатионсинтетазы рапса BnGSH при действии стрессовых факторов // Вестник защиты растений. 2017. Т. 3. С. 55.
30. Кузовкина И.Н., Вдовитченко М. Ю. Генетически трансформированные корни как модель изучения физиологических и биохимических процессов корневой системы целого растения // Физиология растений. 2011. Т. 58. С. 787.
31. Shkryl Y., Veremeichik G., Avramenko T., Gorpenchenko T., Tchernoded G., Bulgakov V. Transcriptional regulation of enzymes involved in ROS metabolism and abiotic stress resistance in *rolC*-transformed cell cultures // Plant Growth Regul. 2022. V. 97. P. 485. <https://doi.org/10.1007/s10725-022-00812-1>
32. Shkryl Y. N., Veremeichik G. N., Bulgakov V. P., Gorpenchenko T. Y., Aminin D. L., Zhuravlev Y. N. Decreased ROS level and activation of anti-oxidant gene

- expression in *Agrobacterium rhizogenes* pRiA4-transformed calli of *Rubia cordifolia* // *Planta*. 2010. V. 232. P. 1023.
<https://doi.org/10.1007/s00425-010-1237-3>
33. Bulgakov V.P., Gorpenchenko T. Y., Veremeichik G. N., Shkryl Y. N., Tchernoded G. K., Bulgakov D. V., Aminin D. L., Zhuravlev Y. N. The *rolB* gene suppresses reactive oxygen species in transformed plant cells through the sustained activation of antioxidant defense // *Plant Physiol*. 2012. V. 158. P. 1371.
<https://doi.org/10.1104/pp.111.191494>
34. Trovato M., Maras B., Linhares F., Costantino P. The plant oncogene *rolD* encodes a functional ornithine cyclodeaminase // *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 2001. V. 98. P. 13449. <https://doi.org/10.1073/pnas.231320398>
35. Kafi M., Stewart W.S., Borland A. M. Carbohydrate and proline contents in leaves, roots, and apices of salt-tolerant and salt-sensitive wheat cultivars // *Russ. J. Plant Physiol*. 2003. V. 50. P. 155.
<https://doi.org/10.1023/A:1022956727141>
36. Bulgakov V.P., Shkryl Y. N., Veremeichik G. N., Gorpenchenko T. Y., Vereshchagina Y. V. Recent advances in the understanding of *Agrobacterium rhizogenes*-derived genes and their effects on stress resistance and plant metabolism // *Adv. Biochem. Eng. Biotech.* 2013. V. 34. P. 11. https://doi.org/10.1007/10_2013_179
37. Katsuhara M., Otsuka T., Ezaki B. Salt stress-induced lipid peroxidation is reduced by glutathione S-transferase, but this reduction of lipid peroxides is not enough for a recovery of root growth in *Arabidopsis* // *Plant Sci.* 2005. V. 169. P. 369.
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.03.030>
38. Bernstein N., Shores M., Xu Y., Huang B. Involvement of the plant antioxidative response in the differential growth sensitivity to salinity of leaves vs roots during cell development // *Free Radic. Biol. Med.* 2010. V. 49. P. 1161.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.06.032>