

© Н. В. Савельева¹,
М. С. Бурлаковский²,
В. В. Емельянов², Л. А. Лутова²

¹INRA, Франция

²Санкт-Петербургский государственный университет, Россия

Использование растительных систем в качестве биореакторов приобретает все большее значение в современной биотехнологии. С помощью трансгенных растений получают множество веществ, в том числе используемых в фармацевтике. Преимуществом растений являются безопасность продукта и меньшие затраты на его производство по сравнению с традиционными биопродуцентами — микроорганизмами и клеточными культурами. Одним из перспективных направлений в получении растений-продуцентов является создание «съедобных вакцин и адъювантов» на основе рекомбинантных антигенов и иммунорегуляторных цитокинов, которые планируется использовать в качестве биологических добавок в животноводстве. В лаборатории генной и клеточной инженерии растений СПбГУ проводятся исследования по получению растений-продуцентов, синтезирующих γ-интерфероны млекопитающих и птиц, обладающих антивирусной, антимикробной, противоопухолевой и иммуномодулирующей активностью. В статье рассмотрены основные этапы создания стабильной генетической линии, как продуцента фармакологического белка.

✿ **Ключевые слова:** экспрессия гетерологичных генов; растения-продуценты; *Nicotiana tabacum*, иммуномодуляторы; методы генетической трансформации; пищевые и кормовые добавки.

ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ-ПРОДУЦЕНТЫ ВЕЩЕСТВ МЕДИЦИНСКОГО И ВЕТЕРИНАРНОГО НАЗНАЧЕНИЯ

ВВЕДЕНИЕ

Биотехнология является одним из наиболее быстро развивающихся направлений современной биологии. Она позволяет конструировать организмы с заданными свойствами и использовать их в качестве биореакторов для производства гетерологичных белков. Наиболее перспективным направлением современной биотехнологии является получение организмов-продуцентов разнообразных белков человека и животных, имеющих медицинское и ветеринарное назначение. Создание лекарственных препаратов на основе этих белков открывает новые возможности в диагностике, профилактике и лечении различных заболеваний. Организация масштабного производства биологически активных соединений требует создания высокоэффективных организмов-продуцентов. В настоящее время для синтеза белков используются различные системы экспрессии на основе бактерий, дрожжей (Падкина с соавт., 2010), культур клеток насекомых и млекопитающих (Assenberg et al., 2013, Lambertz et al., 2014). Развиваются и такие направления, как наработка гетерологичного белка в молоке трансгенных животных и в бесклеточных системах (Bosze et al., 2008).

Применение растительных систем в качестве продуцентов разнообразных веществ в фармацевтической промышленности является одним из актуальных направлений метаболической инженерии, направленной на реализацию трансгенной клеткой новых биохимических реакций (Дейнеко, 2012; Sharma, Sharma, 2009). Обладая богатым природным биохимическим потенциалом, растения могут быть великолепными источниками разнообразных веществ: сахаров, фенольных соединений, жирных кислот, стероидов, алкалоидов и других биологически активных веществ, многие из которых сами по себе представляют большую ценность для фармакологии и медицины (Рукавцова с соавт., 2006; Дейнеко, 2012). В настоящее время активно проводятся исследования по модулированию вторичного обмена растений, в т. ч. методами генной инженерии, что позволяет управлять биосинтезом ценных биологически активных веществ лекарственных растений, создавать «дизайнерские» препараты и значительно изменять вторичный метаболизм, привнося в растения способность синтезировать новые вещества, или, наоборот, понижать их ядовитость, выключая метаболические пути биосинтеза терпеноидов, алкалоидов и фенольных соединений (Oksman-Caldentey, Inze, 2004; Staniek et al., 2013).

ПРЕИМУЩЕСТВА РАСТИТЕЛЬНЫХ СИСТЕМ

Растения как продуценты являются одним из наиболее привлекательных объектов в биотехнологии. Важнейшим преимуществом растений является их автотрофный способ питания. Основная масса систем гетерологичной экспрессии на основе бактерий, дрожжей и культур клеток животных требует дорогостоящих культиваторов и сред для выращивания. Применение трансгенных растений в качестве биореакторов позволяет получать большую биомассу на относительно небольших площадях при сравнительно небольших трудозатратах и капиталовложениях, что является важным преимуществом для агропромышленного производства. Себестоимость рекомбинантных белков,

Поступила в редакцию 19.05.2015
Принята к публикации 28.05.2015

произведенных в растениях, даже с учётом 50 % потерь при выделении и очистке составляет 2–10 % от стоимости продукции гетерологичных белков в микроогранизамах и в 1000 раз дешевле, чем в животных (Sharma, Sharma, 2009). Целые растения можно выращивать в теплицах или климатических камерах, в почвенной культуре, гидропонике или на стерильных твердых средах. Более того, растительные продуценты гетерологичных белков могут культивироваться и в условиях *in vitro*, в виде каллусов, «бородатых корней» или суспензионных клеточных культур (Stiles, Liu, 2013). Последние способы позволяют выращивать растения-продуценты в контролируемых условиях, что важно в связи с неоднозначным отношением общественности и законодательными ограничениями по отношению к генетически-модифицированным организмам. Возможность нарабатывать большие растительные массы в биореакторах, стала значимым этапом развития биотехнологии растений, так как часто продуцентами важных лекарственных веществ являются редкие, занесенные в «Красную книгу» тропические и эндемические растения, которые недоступны для агротехнического производства в умеренных климатических зонах большинства развитых стран мира (Рукавцова с соавт., 2006).

Важным аспектом растительной биотехнологии является относительная биобезопасность использования целевых соединений человеком, получаемых с помощью трансгенных растений. В отличие от культур клеток бактерий, дрожжей, насекомых и млекопитающих, синтез гетерологичных веществ в растениях исключает риск поражения вирусными патогенами, прионами и эндотоксинами, опасными для млекопитающих (Hellwig et al., 2004). С другой стороны, определенные проблемы могут возникнуть в связи с загрязнением целевого белка протеинами и токсичными вторичными метаболитами непосредственно самого растения. Эта проблема может быть решена путем очистки или модуляции вторичного обмена у растений-продуцентов (Staniek et al., 2013).

Универсальность аппарата транскрипции и трансляции растений как эукариотов позволяет использовать их не только для накопления гомологичных соединений, синтезируемых данным видом растения, но и для синтеза гетерологичных соединений различного происхождения (Глеба, 1998). Это особенно актуально при создании продуцентов белков животного происхождения, для которых необходимы процессы созревания и правильной укладки. Уже в 1982 году более 95 используемых в медицине белков были разрешены к производству с использованием клеточных культур бактерий, дрожжей, насекомых и млекопитающих (Thomas et al., 2002). Однако подобные системы имеют ряд недостатков. Например, в клетках прокариот не происходит посттрансляционная модификация и правильная укладка полипептидных цепей многих эукариотических белков. Напротив, растения-продуценты, подобно животным клеткам спо-

собны вырабатывать активные формы сложных белков с соответствующей посттрансляционной модификацией, например, гликозилированием, и обеспечить укладку белков, сходную с таковой в клетках млекопитающих (Thomas et al., 2002).

Еще одним преимуществом при создании растений-биореакторов является наличие разнообразных относительно простых и отработанных методов генетической трансформации (Лутова, 2010). Гетерологичный ген может либо интегрироваться в геном растения-хозяина, либо находиться в составе вектора для временной (транзиторной) экспрессии (Obembe et al., 2011). Использование тканеспецифичных или индуцибельных промоторов позволяет аккумулировать целевой белок в определенных органах растения (семенах, плодах, клубнях, корнеплодах, листьях) и/или под действием индукторов, что облегчает сбор растительного материала. Присоединение к целевому белку сигналов внутриклеточной локализации обеспечивает требуемую компартментализацию и позволяет длительное время хранить и транспортировать продукт без выделения, консервации или заморозки.

Наконец, для многих белков медицинского и ветеринарного назначения, способных оказывать эффект при пероральном введении, предложен вариант применения, при котором не требуются процедуры выделения и очистки. Для этого предполагается использовать съедобные растения-продуценты в пищу человека и/или животных в качестве пробиотических добавок. Подобные растения, синтезирующие гетерологичные белки-антигены или наиболее важные иммуногенные фрагменты антигенов возбудителей значимых заболеваний, называются «съедобными вакцинами» или «растениями-вакцинами». Аналогично можно создать «растения-адъюванты» и «растения-имуномодуляторы», вырабатывающие цитокины и другие иммуностимулирующие белки, «растения-гормоны» и т.п. (Desai et al., 2010; Obembe et al., 2011). Эти меры позволяют резко снизить стоимость наработанного в растениях рекомбинантного белка и упростить практику его применения.

РАСТЕНИЯ-ПРОДУЦЕНТЫ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ

С момента публикации в 1983 г. первых работ, посвященных получению трансгенных растений табака (Barton et al., 1983; Herrera-Estrella et al., 1983), генная инженерия растений прошла стремительный путь развития и в настоящее время трансгенные растения широко используются в фармацевтической промышленности. Попытки синтезировать животные белки в растительных системах увенчались успехом в 1986 г. Первым фармацевтически значимым белком, вырабатываемым растениями табака и подсолнечника, стал человеческий гормон роста (Barta et al., 1986). В растениях

синтезируются более стафармакологических соединений, а число генетически-модифицированных видов растений перевалило за 150, и с каждым годом этот список только увеличивается (Рукавцова с соавт., 2006; Дейнеко, 2012). Чаше всего, в качестве растений, на базе которых создаются продуценты фармакологически значимых белков, используют табак, тоmat, картофель, резуховидку, морковь, горох, сою, люцерну, клевер, салат, банан, кукурузу, пшеницу и рис (Рукавцова с соавт., 2006; Sharma, Sharma, 2009). В последнее время активно используют ряску (*Lemna*, *Spirodela*), мох *Physcomitrella patens* и одноклеточные водоросли (*Chlamydomonas*, *Chorella*, *Odontella*, *Phaeodactylum* и *Tetraselmis*) (Дейнеко, 2012; Sharma, Sharma, 2009). Из водорослей проще получать очищенные препараты рекомбинантных белков. Кроме того, гаплоидный набор хромосом *Physcomitrella* и водорослей позволяет относительно легко манипулировать геномом этих растений, нокаутируя гены, отвечающие за протеолиз и гликозилирование белков, или внедряя чужеродные гены, отвечающие за эти процессы. Так, наибольшие успехи в создании растений с гуманизированной системой гликозилирования достигнуты именно на *Physcomitrella patens* (Koprivova et al., 2004). С другой стороны, сельскохозяйственные растения активно применяются для создания съедобных растений-вакцин. Выбор растения для создания продуцента чрезвычайно важен. Это растение должно относительно легко трансформироваться, вводиться в культуру *in vitro* и регенерировать в целые растения. Желательно, чтобы на его основе можно было бы легко получать культуру клеток. Растение должно обладать высокой скоростью роста, достаточно большой биомассой, быть самоопыляемым (для семенных растений) и интенсивно размножаться вегетативным способом. Кроме того, желательно, чтобы оно было съедобным и имело относительно короткий (одно-двулетний) жизненный цикл. Важным критерием при выборе растения-кандидата служит наличие полностью секвенированного и аннотированного генома. Именно по этой причине такие растения как резуховидка, рис, *Physcomitrella*, *Chlamydomonas* и др. активно используются в качестве биореакторов. К сожалению, выполнение всех перечисленных условий не всегда возможно, а иногда и не целесообразно. Например, при создании съедобных продуцентов может возникнуть необходимость в трансформации конкретных видов растений, являющихся пищей для целевой группы животных или человека.

ТРАНСФОРМАЦИЯ РАСТЕНИЙ

Основную массу цветковых растений-продуцентов в настоящее время получают с помощью агробактериальной трансформации (Глеба, 1998; Лутова, 2010). Для этих целей используют *Agrobacterium tumefaciens*, *A. rhizogenes* и родственные им формы,

обладающие естественным механизмом трансформации. Этот метод применяется для стабильной трансформации ядерного генома большинства двудольных и ряда однодольных растений и обеспечивает, как правило, монокопийную интеграцию гетерологичного гена (Gao, Nielsen, 2013). Другой способ стабильной трансформации — биобаллистика, которая заключается в обстреле клеток микроскопическими частицами золота или вольфрама с нанесенной на них векторной ДНК. Это универсальный метод генной инженерии, который можно применять для генетической трансформации любого живого существа. Биобаллистический метод не зависит от видовой принадлежности растения, позволяет трансформировать как ядерный геном, так и геном органелл (хлоропластов и митохондрий). К недостаткам этого метода относится низкая частота трансформации и множественность вставки (Gao, Nielsen, 2013).

Важным преимуществом стабильной трансформации ядерного генома является наследование трансгенной вставки в ряду поколений, что позволяет получать чистые линии и гибриды для массового использования. К основным недостаткам ядерной трансформации относится низкий уровень экспрессии трансгена, в результате чего содержание рекомбинантного белка часто не превышает 1 % от общего содержания белка клетки, и может уменьшаться при активации процесса сайленсинга (Савельева с соавт., 2009; Дейнеко, 2012). Более того, возможность свободной гибридизации трансгенного растения с культурными и дикорастущими родственниками несет опасность неконтролируемого распространения трансгена в природе.

Альтернативой ядерной трансформации является внедрение трансгена в геном хлоропластов. Каждая клетка растений содержит около 100 пластид, в свою очередь, каждая пластида содержит до 100 копий пластидной ДНК. Поэтому транспластомные растения отличаются высоким уровнем экспрессии гетерологичной вставки и содержанием рекомбинантного белка, которое может достигать 70 % от общего белка клетки, они не подвержены эффекту сайленсинга (Дейнеко, 2012). Хлоропласты у высших растений передаются потомству только по материнской линии, поэтому выращивание транспластомных растений устраняет угрозу неконтролируемого распространения трансгена в полевых условиях. Синтез гетерологичного белка в пластидах может понижать его токсическое воздействие на клетку хозяина. Однако существенным недостатком данной системы экспрессии является невозможность направления рекомбинантного белка в секреторную систему клетки и, соответственно, проведения ряда посттрансляционных модификаций (Desai et al., 2010). Получение транспластомных растений представляет собой более сложную процедуру, нежели агробактериальная трансформация, и хорошо разработано пока только для табака (Дейнеко,

2012), хотя и сообщается об успешной трансформации пластома у томата, баклажана, хлопчатника, сои и салата (Obembe et al., 2011).

Перспективной является технология транзientной экспрессии, не предусматривающей встраивание гетерологичного гена в геном хозяйской клетки и обеспечивающей временную наработку рекомбинантного белка. Транзientная экспрессия осуществляется путем агроинфильтрации, вирусной трансформации и магнификации (Merle et al., 2002; Obembe et al., 2011). Метод агроинфильтрации заключается в обработке тканей растений агробактериями в присутствии повреждающих клетки агентов, или в вакууме, что вызывает массовое заражение клеток, появление в них множества копий Т-ДНК и наработку большого количества рекомбинантного белка. Трансформация с помощью модифицированных вирусов растений приводит к их массированному размножению, появлению множества копий гетерологичного гена и интенсивной наработке белка в растительной клетке. Метод магнификации представляет собой гибридную технологию, когда вирусный вектор лишается белков, отвечающих за заражение хозяйской клетки, и вводится туда, находясь внутри агробактерий, что позволяет значительно увеличить выход целевого белка (Gleba et al., 2014). Векторы транзientной экспрессии не наследуются при половом размножении растений, что устраняет угрозу неконтрольного распространения трансгена. Транзientная экспрессия требует выращивания растений в контролируемых условиях, для соблюдения режима стерильности. Недостатком этого метода является незначительное количество рекомбинантного белка, полученного в результате одного акта трансформации, и необходимость постоянной наработки векторной системы для следующих трансформаций. Транзientная экспрессия, не требующая регенерации целого растения, может применяться для быстрого получения рекомбинантных белков, в первую очередь вакцин, в условиях ограниченного времени (Obembe et al., 2011; Gleba et al., 2014).

РЕКОМБИНАНТНЫЕ БЕЛКИ, СИНТЕЗИРУЕМЫЕ РАСТЕНИЯМИ-ПРОДУЦЕНТАМИ

Как уже указывалось выше, первым белком, произведенным в растениях-продуцентах, был человеческий гормон роста (Barta et al., 1986). В 1990 г. в растениях табака и картофеля синтезировали человеческий сывороточный альбумин (Sijmons et al., 1990). В дальнейшем, множество ценных белков человека и животных было наработано в растениях. В целом, их можно подразделить на несколько групп: структурные и транспортные белки, ферменты, ингибиторы, гормоны, иммуномодуляторы (цитокины), антитела, антигены (вакцины), а также ряд других белков (Рукавцова с соавт., 2006; Дейнеко, 2012; Sharma, Sharma, 2009; Obembe et al., 2011).

Структурные и транспортные белки

Помимо сывороточных альбуминов в растениях синтезировали ряд других структурных белков. Так, в 1997 году была получена трансгенная кукуруза, в семенах которой накапливался рекомбинантный авидин — биотин-связывающий гликопротеин из яичного белка земноводных, пресмыкающихся и птиц (Hood et al., 1997). Авидин используется в качестве коммерческого препарата в диагностических наборах для определения биотинилирования белков. В растениях табака были синтезированы коллаген (Ruggiero et al., 2000; Merle et al., 2002) и эластин (Scheller et al., 2004). Из пищевых белков в растениях вырабатывают белки молока, казеин (Chong et al., 1997) и лактальбумин (Terashima et al., 1999; Yu et al., 2001), а из транспортных — гемоглобин (Dieryck et al., 1997), аполипопротеин (Obembe et al., 2011) и лактоферрин (Daniel et al., 2000; Rance et al., 2002).

Ферменты и ингибиторы

Значительные успехи достигнуты в создании растений-продуцентов рекомбинантных ферментов. В растениях риса синтезируют лизоцим (Yang et al., 2003), кукурузы — трипсин (Woodard et al., 2003), а резуховидки — человеческий внутренний фактор (фактор Касла), активирующий витамин В₁₂ (Keyet al., 2008). В ряде растений вырабатывают α -галактозидазу (Obembe et al., 2011), β -глюкуронидазу, пероксидазу, лакказу, целлюлазу, ксиланазу и другие ферменты, лизирующие клеточные стенки растений (Basaran, Rodrigues-Cerezo, 2008). Эти ферменты предполагают использовать для разрушения целлюлозы при производстве био-этанола (Obembe et al., 2011). β -глюкуронидаза широко применяется в диагностических целях. Отдельно следует остановиться на глюкоцереброзидазе (талиглуцеразе α , Cramer et al., 1996; Shaaltiel et al., 2007). Дефект в кодировании этого фермента у человека приводит к развитию тяжелого наследственного заболевания — глюкозилцерамидного липидоза (болезнь Гоше 1 типа). С использованием суспензионной культуры трансгенной моркови биотехнологическая компания Protalix Biotherapeutics (Израиль) производит препарат ELELYSO®. Он не только прошел все доклинические и клинические испытания, но уже одобрен Всемирной организацией здравоохранения и доступен на фармацевтическом рынке. Большинство других препаратов ещё проходят клинические испытания и только лишь приближаются к коммерческому использованию. Некоторые из них, такие как TrypZean™, Lacgromin™ (человеческий трипсин и лактоферрин из кукурузы соответственно, производство Prodigene, США) и Lysobac™ (лизоцим из риса, производство Ventria Bioscience, США) пока доступны в качестве химических препаратов, не предназначенных для употребления внутрь. В трансгенных растениях экспрессируют также гетерологичные гены, кодирующие ингибиторы трип-

сина ($\alpha 1$ -антитрипсин и апротинин; Zhong et al., 1999; Terashima et al., 1999; Trexler et al., 2002) и тромбина (гирудин; Parmenter et al., 1995).

Регуляторные белки

Из регуляторных белков, помимо уже упомянутого соматотропина, в растениях табака синтезировали энкефалины (Vandekerckhove et al., 1989), эпидермальный фактор роста (Higo et al., 1993), кальмодулин (Desai et al., 2002) и инсулиноподобный фактор роста (Daniell et al., 2009), причём последний — в транспластомных растениях. Получены трансгенные растения резуховидки, в семенах которой накапливается человеческий рекомбинантный инсулин (Nykiforuk et al., 2006). Отдельную группу регуляторных белков составляют цитокины — группа белковых медиаторов, участвующих в регуляции пролиферации, дифференцировки и клеточной подвижности. Цитокины являются важными компонентами иммунной системы, они также задействованы в эмбриогенезе, влияют на нервную систему и органы кроветворения. Эритропоэтин — сильно гликозилированный цитокин был одним из первых рекомбинантных цитокинов, полученных в клетках растений табака. Ген эритропоэтина экспрессировался под контролем промотора 35S вируса мозаики цветной капусты (CaMV) и кодировал секреторный сигнальный пептид на N-конце белка. Рекомбинантный эритропоэтин был гликозилирован, однако состав и длина полисахаридных цепочек отличались от таковых у млекопитающих, в результате чего белок не имел биологической активности *in vivo* (Matsumoto et al., 1995). Высокий уровень транзientной экспрессии гена *EPO* был достигнут в протопластах мха *Physcomitrella patens* дикого типа и мутантных линий Δ -*fuc*-*T* Δ -*xyl*-*T* с измененной системой гликозилирования (Weise et al., 2007). Получены также целые растения-продуценты эритропоэтина на базе табака и резуховидки (Sirko et al., 2011; DaCunha et al., 2014). Кроме эритропоэтина на базе растений табака, томата, картофеля, резуховидки, салата, риса, сахарного тростника, ряски, *Aloe vera* и *P. patens* созданы биопродуценты, вырабатывающие разнообразные цитокины человека и животных: колониестимулирующие факторы, факторы некроза опухолей, фактор роста фибробластов, интерфероны (см. ниже) и интерлейкины (Рукавцова с соавт., 2006; Дейнеко, 2012; Sharma, Sharma, 2009; Sirko et al., 2011; DaCunha et al., 2014). Препараты рекомбинантных цитокинов различного происхождения активно применяются для профилактики и терапии иммунодефицитов, малокровия, острых и хронических вирусных и бактериальных инфекций, онкологических заболеваний (Рукавцова с соавт., 2006; Sirko et al., 2011; DaCunha et al., 2014). Перспективным является использование цитокинов в качестве адъювантов для усиления иммунного ответа при вакцинации. В случае с выработкой рекомбинантных ферментов и структурных белков, их всегда

необходимо выделять из растений и очищать для дальнейшего использования. Растения, синтезирующие гетерологичные регуляторные белки (гормоны и цитокины), можно также подвергать переработке или непосредственно использовать в пищу человека или на корм животных, также как и растения-вакцины.

Антитела (иммуноглобулины)

Следующим направлением фитотерапевтики является создание растений-продуцентов антител. Антитела играют главную роль в гуморальном иммунитете. Типичные иммуноглобулины представляют собой тетрамеры из двух идентичных тяжелых и двух легких цепей. Кроме того, существуют и более сложные формы, например, секреторные антитела, представляющие собой димеры обычных антител и включающие две дополнительные полипептидные цепи. Все антитела гликозилированы. Впервые гетерологичная экспрессия антител была проведена в растениях табака (Hiatt et al., 1989). Данная работа стала доказательством того, что растения могут синтезировать не только простые гетерологичные пептиды, но и собирать сложные функциональные гликопротеины, состоящие из нескольких субъединиц. Были созданы линии трансгенных растений, синтезирующих отдельные тяжелые или легкие γ - и κ -цепи иммуноглобулинов. Скрещивание между этими трансформантами дало потомство, способное к сборке антител в одной клетке. Такие антитела обладали иммуногенностью и накапливались в клетках в количестве до 1,3 % от суммарного растворимого белка (Рукавцова с соавт., 2006; Hiatt et al., 1989). Более того, моноклональные антитела человека, синтезированные растениями ряски, проявляли большую активность, чем их гомологи, синтезированные в клетках СНО-линии яичников китайских хомячков (Дейнеко, 2012). В качестве платформы для синтеза антител используются табак (*Nicotiana tabacum* и *N. benthamiana*), резуховидка, горох, соя, люцерна, ряска, рис и пшеница (Рукавцова с соавт., 2006; Sharma, Sharma, 2009; Obembe et al., 2011). Кроме полноразмерных иммуноглобулинов в растениях были успешно синтезированы их производные: антиген-связывающие Fab-фрагменты (fragment antigen binding), одноцепочечные переменные фрагменты (single-chain variable fragment, scFv), биспецифичные переменные фрагменты, переменные фрагменты тяжелых цепей, секреторные антитела, химерные антитела, в которых легкая и тяжелая цепь слиты в единый полипептид, или сшиты с другими животными или растительными белками (McCormick et al., 1999; Ma et al., 2003). Полноразмерные антитела достаточно нестабильны в цитоплазме клеток растений-продуцентов, поэтому их принято направлять в секреторный путь или во внутриклеточные компартменты (Sharma, Sharma, 2009). Синтезированные растениями рекомбинантные антитела получили название «plantibodies» (De Jaeger et

al., 2000). После выделения и очистки из растительных тканей подобные антитела могут использоваться в качестве лекарственных препаратов или диагностических средств. В самих растениях «растительные антитела» могут применяться для аутоиммунизации против патогенов и ряда токсинов, включая гербициды (De Jaeger et al., 2000). Одним из первых продуктов на основе трансгенных растений табака, принятым в Европейском Союзе в качестве фармацевтического препарата, является CaroRx (Planet Biotechnology, США), представляющий собой секреторные антитела IgA против *Streptococcus mutans* — основного возбудителя кариеса (Sharma, Sharma, 2009). Эти антитела при нанесении их на зубы добровольцев оказались очень эффективными и предотвращали повторное заражение *S. mutans* на период до двух лет (Larrick et al., 2001). Еще один пример антител, прошедших фазу I клинических испытаний — scFv-антитела против неходжкинской лимфомы (McCormick et al., 1999). Другие моноклональные антитела, полученные из трансгенной сои — антитела против генитального герпеса, также могут быть внедрены в производство (Zeitlin et al., 1998). Эти антитела, несмотря на различие в гликозилировании, защищали мышей от вируса герпеса типа 2 так же хорошо, как и антитела, синтезированные в культуре клеток человека.

Антигены (растения-вакцины)

В настоящее время интенсивно разрабатывается концепция биосинтеза в растениях рекомбинантных антигенов возбудителей различных болезней и создание на их основе «растений-вакцин», чьи плоды, семена, листья или корни можно использовать в пищу. Применение «съедобных вакцин» делает ненужной дорогостоящую процедуру выделения и очистки антигенов, которая необходима при создании вакцин для парентерального введения. Впервые структурная идентичность и иммуногенность антигена, синтезированного в растениях, была подтверждена в 1992 г., когда были получены трансгенные растения табака, экспрессирующие ген поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg; Mason et al., 1992). В дальнейшем были получены растения картофеля, суспензионные культуры табака и сои, где количество антигена достигало 1,7 мг/г сухого веса (Richter et al., 2000; Smith et al., 2002). Выделенный из листьев табака HBsAg запускал иммунный ответ у мышей (Thanavala et al., 1995). Кроме того, этот антиген, синтезируемый растениями картофеля, был более иммуногенным, чем продуцируемый дрожжами (Kong et al., 2001). Проведены испытания «съедобной вакцины» против вируса гепатита В на основе трансгенного картофеля на добровольцах и показана её иммуногенность при оральном введении (Thanavala et al., 2005). В настоящее время имеются публикации, в которых описаны трансгенные растения, синтезирующие более 50 различных антигенов патогенов человека и животных, в том числе бактериаль-

ной и вирусной диареи, сибирской язвы, ящура, бешенства, папилломы, лимфомы, ОРВИ, кори, ВИЧ, дифтерии, коклюша, столбняка, туберкулеза, болезни Альцгеймера, малярии, гастроэнтерита, геморрагических лихорадок, козьей чумы, вирусной чумы крупного рогатого скота, цитомегаловирусной инфекции, парвовирусной инфекции собак, птичьего гриппа, болезни Ньюкасла и других (Sharma, Sharma, 2009). Растения-вакцины получают на основе рапса, резуховидки и табаков (требуется очистка), картофеля, томата, физалиса, люцерны, люпина, моркови, салата, шпината, ряски, банана и кукурузы (Рывакцова с соавт., 2006; Kim, Yang, 2010; Obembe et al., 2011).

Различные субъединичные вакцины получены в трансгенных растениях и для многих из них показана иммуногенность при оральном введении людям и животным (Tacket et al., 1998; 2000; Kim, Yang, 2010; Obembe et al., 2011). Антигены, синтезирующиеся в растениях, защищены растительными клеточными стенками от протеолиза при прохождении пищеварительного тракта и могут быть легко доставлены к клеткам слизистой оболочки кишечника, где они стимулируют мукозную систему иммунитета, базирующуюся на антиген-представляющей способности макрофагов тонкого кишечника (Дейнеко, 2012). Две вакцины, синтезируемые в растениях картофеля, уже прошли стадию клинических испытаний — это субъединица В термолabile токсина (LTB) патогенного штамма *E. coli* (ETEC) и капсидный белок вируса Норфолк (NVCP) (Tacket et al., 1998; 2000). Гены, выделенные из двух кишечных паразитов, были использованы при создании идеальных съедобных вакцин, поскольку кодируют белки, для которых характерна мультимерная структура и которые являются устойчивыми к перевариванию в кишечнике человека. Каждый из этих белков накапливался в больших количествах в клубнях картофеля и правильно собирался в олигомеры. Клинические испытания рекомбинантной вакцины LTB показали, что поедание добровольцами сырых клубней картофеля, содержащих 0,3–10 мг LTB, приводило к образованию мукозных и системных антител с высокими титрами (Tacket et al., 1998). Иногда антигены сшивают с другими белками для облегчения детекции, например, с геном β -глюкуронидазы (GUS). По GUS-активности можно легко определить уровень экспрессии гена, контролирующего синтез антигенов в трансформантах. При этом белки сохраняли свою иммуногенность (Дейнеко, 2012). В настоящее время более десятка растительных вакцин находятся на стадии доклинических и клинических испытаний и скоро будут доступны на рынке фармацевтических препаратов (Kim, Yang, 2010; Obembe et al., 2011). Нарбатываемые в табаке вакцины против кариеса и болезни птиц, вызываемой вирусом Ньюкасла, уже сертифицированы в Евросоюзе и США соответственно (Kim, Yang, 2010).

СПОСОБЫ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ РАСТИТЕЛЬНЫХ СИСТЕМ ЭКСПРЕССИИ

Одной из основных проблем при получении растен- ний-продуцентов является довольно низкий уровень вырабатываемого рекомбинантного белка, который часто не превышает 1 % от растворимых белков клет- ки. Продукция гетерологичного белка зависит от эф- фективности транскрипции, трансляции, корректного процессинга и устойчивости синтезированного белка к протеолизу. Уровень экспрессии гетерологичного гена зависит от того, в какую область ядерного хроматина он встроен. Многочисленные работы по трансформации продемонстрировали, что частота встраивания трансгена в область эухроматина значительно выше по сравнению с частотой встраивания этого же трансгена в гетерох- роматиновый участок генома (Лутова, 2010). С другой стороны ещё одной проблемой является замолкание трансгена в результате явления сайленсинга, вероятность которого существенно возрастает при увеличении ко- личества встраиваемых копий (Катохин с соавт., 2006). Синтезируемый в большом количестве белок может проявлять токсичность в цитоплазме клетки продуцента или, наоборот, быстро расщепляться протеолитичес- кими ферментами. Некорректная сборка и характерная для растений система гликозилирования может приво- дить к низкой биологической активности гетерологичных белков и развитию аллергических реакций. Для решения перечисленных проблем разработан ряд подходов.

Использование различных промоторов

При создании большинства трансгенных растений применяют конститутивные промоторы. Чаще всего ис- пользуются промотор 35S РНК вируса мозаики цветной капусты и промотор убиквитина кукурузы или других растений. Рукавцовой Е. Б. с соавторами (2006) были получены растения табака, экспрессирующие реком- бинантный ген поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) под контролем одинарного и двойного промо- торов 35S вируса мозаики цветной капусты. Использо- вание двойного промотора 35S было более эффективным и обеспечивало синтез антигена до 0,05 % от суммарного растворимого белка. Стогер со авторами (Stoger et al., 2000) получили растения риса, трансформированные ге- ном, кодирующим одноцепочечные вариabельные фраг- менты рекомбинантного химерного антитела человека и мыши (scFvT84.66), под контролем промотора уби- квитина кукурузы и усиленного р35SCaMV. В листьях уровень экспрессии трансгенов был одинаковым под контролем обоих промоторов, но целевой белок не на- коплялся в семенах при использовании 35S промо- тора. Значительно реже применяются другие консти- тивные промоторы, к числу которых можно отнести полиубиквитиновый промотор сои, агробактериальные промоторы маннопин- и нопалинсинтаз, Мас промотор,

который является гибридом маннопинсинтазного промо- тора и энхансера р35S, промотор актина из банана и др. (Sharma, Sharma, 2009). Основным преимуществом этих промоторов является конститутивная экспрессия це- левого гена во всех органах растения. Однако зачастую конститутивные промоторы отличаются низким уровнем экспрессии и подвергаются сайленсингу.

Один из способов увеличения уровня экспрессии трансгена заключается в применении тканеспецифич- ных промоторов. Эти промоторы обеспечивают накоп- ление рекомбинантного продукта в определённых тканях и на определённых стадиях онтогенеза. Они позволяют синтезировать трансгенные продукты в таких органах растений, как семена, плоды, листья, запасающие органы (корнеплоды, корне- и стеблеклубни, корневища, клуб- нелуковицы или луковицы). Направленный синтез бел- ка в определенных органах снижает его потенциальный негативный эффект в других тканях, а также уменьшает его влияние на рост и продуктивность растений. Про- мотор пататина из клубней картофеля был использован для направленного клубне-специфичного синтеза таких антигенов как СТВ (холерный токсин В), LTB, HBsAg и др. (Richter et al., 2000; Sharma, Sharma, 2009). Транс- генные растения картофеля, экспрессирующие ген анти- гена HBsAg под контролем двойного 35S и пататинового промоторов, аккумулировали до 1 мкг целевого антигена на 1 г массы клубня картофеля именно при использова- нии 35S-промотора (Шульга с соавт., 2004). Возможна орган-специфичная экспрессия гетерологичных генов и в корнеплодах растений. Так, в последнее время появил- ся ряд сообщений об успешном применении корне-специ- фичных промоторов из корнеклубневых крахмалоносных культур (батат, маниок, ямс) для экспрессии генов в кор- неплодах моркови (Arango et al., 2010; Noh et al., 2012). Плоды и семена часто применяются для накопления рас- тительных вакцин и антител, требующих минимальной очистки для последующего применения. Это достигается с помощью плодоспецифичного промотора томатов Е8. Из различных растений клонированы промоторы, позво- ляющие синтезировать чужеродные биоактивные моле- кулы исключительно в семенах. К их числу можно отнести промоторы глобулина-1, глобулина 7S и зеина из куку- рузы, глютелина риса, Р-конглицинина сои и арцелина фасоли (Sharma, Sharma, 2009). Экспрессия целевых генов в запасной ткани семян, где уровень биodeградации ниже, чем в обводнённых тканях (листья, плоды), спо- собствует повышению продуктивности на 2–3 порядка. Кроме того, необходимо отметить, что семена могут быть отличным резервуаром для хранения белка. Известно, что в семенах гороха гетерологичные белки могут сохра- няться до 6 месяцев (Дейнеко, 2012). Значительный про- гресс достигнут в создании съедобных вакцин на основе семян кукурузы (Chikwamba et al., 2002). Субъединица LTB накапливалась в семенах на уровне до 0,1 % от сы- рого веса и обладала иммуногенными свойствами при по-

едании мышами. Ассоциация с крахмалом обеспечивает термостабильность антигена и его устойчивость к протеолитической деградации при попадании в желудочно-кишечный тракт. На основе семян кукурузы также создана вакцина, защищающая свиней от вирусного гастроэнтерита (Lamphear et al., 2004). Показано, что арцелиновый промотор позволяет экспрессировать гетерологичные гены с высокой эффективностью. Трансгенные растения фасоли аккумулировали одноцепочечные вариабельные фрагменты мышиных иммуноглобулинов (ScFv) до 36 % от растворимого белка под контролем *arg5-1* промотора (DeJaeger et al., 2000).

Применение индуцибельных промоторов позволяет аккумулировать рекомбинантный белок под контролем индуцирующих веществ или воздействий. Эти промоторы пока недостаточно охарактеризованы, однако их несомненным преимуществом является отсутствие сайленсинга. Кроме того, индуцибельная аккумуляция целевого продукта требует от растения-производителя меньше энергзатрат и менее токсична, чем конститутивная. Индуцибельные промоторы часто применяются в суспензионной культуре клеток. Транскрипционная активность химически-регулируемых, промоторов модулируется этанолом, тетрациклином, стероидами (эстрадиолом, экдизоном и глюкокортикоидами) и дефицитом сахаров, тогда как промоторы, регулируемые физическими факторами, чувствительны к температуре, свету и т.п. Самый распространённый в биотехнологии растений индуцибельный промотор α -амилазы *α Amu3* активируется в отсутствие сахарозы. С его помощью получены растения-производители ряда белков человека: γ -интерферона, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора и α 1-антитрипсина (Terashima et al., 1999; Chen et al., 2004; Sharma, Sharma, 2009). Выход целевого белка в индуцибельных системах значительно выше, чем в конститутивных.

Отдельно следует вспомнить упомянутые ранее механизмы транзientной экспрессии и создания транспластомных растений, которые способствуют повышению выхода целевого рекомбинантного белка. Для трансформации генома пластид чаще всего используют промоторы хлоропласт-специфичных генов, кодирующих 16S рибосомную РНК (*Prrn*) и D1 белок фотосистемы II (*psbA*). С помощью этих промоторов в транспластомных растениях табака получены несколько биомолекул: холерная вакцина (СТВ), интерфероны и инсулин человека (Sharma, Sharma, 2009).

Компарментализация рекомбинантных белков

Большинство белков синтезируется в цитоплазме, некоторые — в пластидах и митохондриях. Аккумулируясь в цитоплазме клеток, целевой белок может нарушать обмен веществ или подвергаться быстрой деградации. Секреторные белки имеют N-концевой сигнальный пептид и/или трансмембранные домены, они доставляются

в ЭПС, аппарат Гольджи, вакуоли или секретируются из клетки. Применение специфических сигнальных пептидов позволяет направлять синтезируемый рекомбинантный белок в различные клеточные компартменты, что может приводить к увеличению его выхода. В системе везикулярного транспорта белки созревают, подвергаются гликозилированию и ограниченному протеолизу. Чаще всего целевые белки направляют в ЭПС, запасаящие белковые вакуоли, олеосомы или на секрецию. Возможно использование сигнальных пептидов в пластидах и митохондриях. В ЭПС может накапливаться достаточно много белка без возникновения существенных проблем для метаболизма, роста и развития растений. Эта особенность часто используется при создании систем для гетерологичной экспрессии. К С-концу рекомбинантного белка присоединяют сигнальный тетрапептид, KDEL (Лиз-Асп-Глу-Лей) или HDEL (Гис-Асп-Глу-Лей), что обеспечивает его сортировку в ЭПС. Этот компартмент отличается низкой гидролитической активностью и довольно эластичен, что позволяет накапливать белки в значительных количествах. Ещё более эффективно в ЭПС и белковых телах (запасных вакуолях, производных ЭПС) аккумулируются запасные белки семян — проламины. Так, слитые с γ -зеином, проламином кукурузы, антигены ВИЧ и вируса бронхита птиц аккумулируются в белковых телах клеток табака до уровня 1 % общего белка, тогда как введение KDEL-последовательности обеспечивает уровень 0,5 % (Sharma, Sharma, 2009).

Олеосомы, или липидные капли, также представляют интерес для аккумуляции рекомбинантных белков, особенно в семенах. При этом запасной белок семян масличных культур олеозин используется в качестве носителя для рекомбинантных белков. Целевой белок сшивают с олеозином таким образом, чтобы на границе между ними был сайт специфичного протеолиза, что облегчает последующую очистку. Синтезированный в трансгенных растениях химерный белок выделяют, обрабатывают специфической протеазой и центрифугируют. Олеозиновая часть остается в составе олеосом, а целевой белок переходит в водную фазу. Этот способ был использован для получения гирудина, инсулина, аполипопротеина AI и растительных вакцин (Parmenter et al., 1995).

Как уже неоднократно было отмечено, целевые белки часто локализуют в пластидах, но достигается это обычно не добавлением сигнальных последовательностей, а непосредственной трансформацией пластома. Пластидная локализация накладывает целый ряд ограничений на сборку мультисубъединичных комплексов и гликозилирование целевого белка. Наоборот, направление белка в секреторную систему, запускает гликозилирование по растительному типу, что может существенным образом влиять на биологическую активность целевого белка в животных организмах.

Гликозилирование рекомбинантных белков

Присоединение углеводов к полипептидной цепи происходит в ЭПС и аппарате Гольджи. Первые этапы N-гликозилирования являются общими для всех эукариот, однако окончательная структура сложных N-гликанов у грибов, растений и млекопитающих может сильно отличаться (Potula et al., 2008). У растений гликопротеины имеют ряд углеводных остатков, не встречающихся у млекопитающих — ксилозу, рамнозу, арабинозу и α (1,3)-фукозу, которые могут быть аллергенами для человека. В растениях отсутствуют механизмы сиаилирования и O-гликозилирования муцинового типа, характерные для секретируемых гликопротеинов млекопитающих. Отличие профиля гликозилирования рекомбинантных белков от нативного человеческого или животного стандарта может приводить к утрате их биологической активности и быстрой деградации. Одним из подходов для ограничения гликозилирования является удержание целевого белка в ЭПС, где происходят только его первичные этапы, а фукозил- и ксилозилтрансферазы функционируют уже в аппарате Гольджи. Для синтеза в растениях сложных гликопротеинов человека и животных требуется «гуманизация» растительной системы гликозилирования. Для этой цели получают нокаутные мутанты растений-продуцентов по генам, кодирующим α -1,3-фукозилтрансферазы и β -1,2-ксилозилтрансферазы, а затем их трансформируют генами гликозилтрансфераз человека, которые переносят в углеводную часть гликопротеинов остатки маннозы, галактозы, N-ацетилглюкозамина и сиаловой кислоты. Подобным образом были полностью или частично «гуманизированы» растения табака, резуховидки, риса, яски и *P. patens*. С их помощью были синтезированы антитела и цитокины: эритропоэтин, интерлейкин-10 и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (Sharma, Sharma, 2009; Sirko et al., 2011; DaCunha et al., 2014).

Для увеличения выхода рекомбинантного белка из трансгенных растений-продуцентов используются и другие подходы: стратегия оптимизации кодонов в гетерологичном гене, удаление из кодирующей части рекомбинантного белка сайтов гликозилирования или протеолиза, слияние с другими белками и т. п. По аналогии с нокаутированием гликозилтрансфераз, пытаются модулировать активность протеолитических ферментов; предпринимают попытки ослабить механизмы замолкания трансгенов, заражая растения-продуценты модифицированными вирусами, которые «отвлекают на себя» систему сайленсинга (Sharma, Sharma, 2009; Obembe et al., 2011). Все эти методические разработки позволяют создавать эффективные растения-продуценты разнообразных белков, на основе которых получают фармацевтические препараты преимущественно медицинского назначения, тогда как лекарства для ветеринарии встречаются в биотехнологии растений значительно реже.

ПРИМЕНЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ γ -ИНТЕРФЕРОНА В МЕДИЦИНЕ И ВЕТЕРИНАРИИ

В современном промышленном животноводстве осуществляется комплекс санитарно-ветеринарных мероприятий, направленных на сохранение здоровья и продуктивности животных. Поиски путей снижения заболеваемости, повышения продуктивности сельскохозяйственных животных и качества получаемой от них продукции ученые связывают с решением проблемы иммунодефицитов у животных при промышленной технологии выращивания (Придыбайло, 1991; Бояринцев, 2003). Иммунодефициты — одна из главных проблем современной клинической иммунологии. Последние годы характеризуются накоплением новых данных об отдельных клинических формах первичных и вторичных иммунодефицитов, о возможных патогенетических механизмах их развития, о подходах к их диагностике и лечению (Федоров с соавт., 1996). В связи с этим все больше внимания уделяется поиску и совершенствованию средств, направленных на повышение защитных сил организма, включая препараты различного происхождения в качестве стимуляторов или модуляторов специфического и неспецифического иммунитета (Бояринцев, 2003). Особое значение для иммунной системы имеет синтез макрофагами интерлейкина-1 и дополнительных растворимых факторов, которые могут подключать и активировать другие клетки, в частности, покоящиеся Т-клетки. Наиболее интересными из известных подобных факторов являются интерфероны (Кетлинский с соавт., 1992). Интерфероны (ИФН) относятся к цитокинам II класса, представлены гликопротеидами различной молекулярной массы и являются мощными стимуляторами иммунной системы против патогенов и опухолей различной природы (Симбирцев, 2013). Рекомбинантные интерфероны бактериального происхождения обычно используются для лечения саркомы Капоши, миеломной лейкемии, злокачественной меланомы (Pestka et al., 1987) и гепатитов А и С (Миошиников с соавт., 2003; Schroder et al., 2004). Показано, что ИФН- γ играет важную роль в иммунном ответе на *Mycobacteriatuberculosis bovis* (Flynn et al., 1993; Vesosky et al., 2006). Применение препаратов цитокинов в животноводстве, интерферонов в частности, имеет существенные преимущества по сравнению с традиционными антибиотиками и химиотерапевтическими препаратами. ИФН оказался в числе первых полноценных клеточных белков, синтезированных вне организма с помощью генно-инженерных манипуляций (Ершов, 1996). В лаборатории биохимической генетики СПбГУ созданы штаммы дрожжей *Pichia pastoris*, синтезирующие внутриклеточные и секреторные цитокины: ИФН- γ быка и курицы (Градобоева, Падкина, 2008; Цыганков с соавт., 2014). Первые сообщения о получении интерферона человека в растениях относятся к началу 90-х годов (Edelbaum et al., 1992), в том числе с использованием

транспластомных растений, что определило значительный уровень синтеза в 20 % от общего растворимого белка табака (Arlen et al., 2007). В настоящее время с помощью биотехнологии создан ряд запатентованных биопрепаратов для повышения неспецифического иммунитета животных, содержащих видоспецифичный интерферон. В частности это препарат для профилактики вирусных болезней свиней содержащий свиной лейкоцитарный ИФН- α и препарат для профилактики вирусных респираторных заболеваний крупного рогатого скота, содержащий бычий ИФН- α . Наиболее перспективным представляется создание трансгенных продуцентов ИФН, которые возможно добавлять непосредственно в корм животным, минуя дорогостоящую очистку (Tacket et al., 1998). Стоит отметить, что в растениях-продуцентах были успешно получены интерфероны птиц (Luchakivskaya et al., 2011) и костных рыб (Fukuzawa et al., 2010). Человеческий ИФН- γ был синтезирован в суспензионной культуре клеток риса под контролем конститутивного промотора убиквитина кукурузы и индуцируемого промотора α -амилазы риса α Amy3/Ram3D. Для обеспечения секреции рекомбинантный ИФН- γ был сшит с сигнальным пептидом альфа-амилазы. Наибольший выход под контролем убиквитинового промотора составил 12 нг/мл культуральной среды и 17,4 нг/мл — в случае индуцибельного промотора α Amy3/Ram3D. (Chen et al., 2004).

Препаратов бычьего ИФН- γ на основе растений в других лабораториях пока не производили, поэтому необходимость подобных лекарственных средств для ветеринарии с целью профилактики и лечения заболеваний крупного рогатого скота не вызывает сомнения.

ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ-ПРОДУЦЕНТОВ БЫЧЬЕГО γ -ИНТЕРФЕРОНА

В лаборатории генной и клеточной инженерии растений СПбГУ в сотрудничестве с лабораторией биохимической генетики методом агробактериальной трансформации с помощью штамма *Agrobacterium tumefaciens* EHA105, содержащего бинарный вектор, состоящий из хелперной и векторной (pART27INT6) плазмид, были созданы растения табака (*Nicotiana tabacum*) сорта Трапезунд, синтезирующие бычий ИФН- γ (Савельева с соавт., 2009; Савельева, Лутова, 2010). Ген *sIFNG*, кодирующий бычий ИФН- γ , находится под контролем промотора гена 35S РНК вируса мозаики цветной капусты. В результате эксперимента на среде, содержащей селективный агент — канамицин (100 мг/л), были получены 6 независимых трансформантов: InterA, InterB, Inter311, Inter335, Inter605, Inter623 (T_0). Для данных растений методом ПЦР-анализа с праймерами к гену *sIFNG* (Савельева, Лутова, 2010) было показано наличие целевой вставки. Все растения имели нормальный фенотип, внедрение гетерологичного гена γ -интерферона в рас-

тительный геном не оказывало негативного влияния на трансгенные растения. От этих растений путем самоопыления было получено потомство, которое было подвергнуто отбору на предмет наличия и активности вставки гена *sIFNG*.

Проявление чужеродных генов у трансгенных растений с точки зрения классической генетики принято рассматривать как доминантный признак (Horsh et al., 1984; Delores, Gardner, 1988). Поэтому генотип исходного растения, в геном которого произошло встраивание одной Т-ДНК инсерции, может быть определен как гемизигота. Таким образом, генотип исходного трансформанта, содержащего ген бычьего γ -интерферона можно записать как *sIFNG*⁺/*sIFNG*⁻. При самоопылении такого трансформанта перенесенный ген *sIFNG* будет комбинировать в составе гамет и среди потомков будут выявляться три генотипических класса в соотношении 1 *sIFNG*⁺/*sIFNG*⁺: 2 *sIFNG*⁺/*sIFNG*⁻: 1 *sIFNG*⁻/*sIFNG*⁻, соответствующие двум фенотипическим классам 3 *sIFNG*⁺/⁻: 1 *sIFNG*⁻/*sIFNG*⁻. Это также справедливо для некоторых полиплоидных видов растений, например, для табака (*Nicotiana tabacum*), который является автополиплоидом и содержит тетраплоидный набор хромосом (Clausen, 1941; Грант, 1989).

В ядерный геном растительных клеток могут встраиваться от одной до нескольких копий Т-ДНК. На основании результатов анализа популяций исходных трансгенных растений установлено, что примерно в 40–60 % выявляются растения с одной вставкой трансгена, в остальных случаях — с множественными Т-ДНК инсерциями (Delores, Gardner, 1988; Sallaud et al., 2003). Используя критерий χ^2 , мы проверили возможные гипотезы $H_0: H_0 - 3:1$ в случае встраивания одной копии Т-ДНК, $H_0 - 15:1$ в случае встраивания двух копий Т-ДНК, $H_0 - 63:1$ — при трех копиях Т-ДНК в растительном геноме. Результаты, представленные в таблице 1, свидетельствуют, что расщепление, полученное в 5 семьях (InterA, InterB, Inter311, Inter605 и Inter 623) не противоречит нулевой гипотезе о наличии одной копии Т-ДНК в геноме исходных трансформантов (T_0). Нулевые гипотезы о встраивании двух и более копий в геном трансформантов (T_0) подтверждены не были. Среди независимых трансформантов выявлено растение Inter335 (T_0), у потомков (T_1) которого в 92 % случаев произошла потеря гетерологичного гена бычьего γ -интерферона (табл. 1).

Анализ наследования гетерологичного гена *sIFNG* в следующих поколениях T_2 и T_3 , был проведен у двух растений (T_0): InterB и Inter311. Для анализа поколения T_2 в каждой семье (T_1) были выбраны три растения, от которых путем самоопыления были получены семена T_2 : в семье InterB — растения InterB.5, InterB.6 и InterB.13; в семье Inter311 — растения Inter311.1, Inter311.2 и Inter311.15. Для анализа поколения T_3 от растений InterB.6 (T_2), InterB.13 (T_2) и Inter311.2 (T_2) также путем самоопыления были по-

Таблица 1

Расщепление среди растений T_1 при самоопылении по наличию вставки гена *sIFNG*

Семья (T_1)	Расщепление среди растений T_1 при самоопылении		Факт. (H_0 : 3:1, теор. ожид.: 18,75:6,25)	χ^2 H_0 : 3:1	Факт. (H_0 : 15:1, теор. ожид.: 23,44:1,56)	χ^2 H_0 : 15:1	Факт. (H_0 : 63:1, теор. ожид.: 24,61:0,39)	χ^2 H_0 : 63:1
	<i>sIFNG</i> ⁺	<i>sIFNG</i> ⁻						
InterA	17	8	2,72:1	0,65*	10,90:1	6,91	43,59:1	15,59
InterB	21	4	3,36:1	1,08*	13,46:1	4,45	53,85:1	35,69
Inter311	17	8	2,72:1	0,65*	10,90:1	6,91	43,59:1	15,59
Inter335	2	23	0,32:1	59,85	1,28:1	21,15	5,13:1	21,72
Inter605	20	5	3,20:1	0,33*	12,82:1	5,01	51,28:1	29,85
Inter623	21	4	3,36:1	1,08*	13,46:1	4,45	53,85:1	35,69

* — фактическое расщепление достоверно соответствует теоретическому при $\chi^2 = 3,841$ (d.f. = 1)

лучены семена. Соотношения *sIFNG*⁺ и *sIFNG*⁻ растений в семьях InterB и Inter311 в поколениях T_2 и T_3 представлены в таблице 2. В результате ПЦП-анализа, проведенного для семей InterB (T_1 - T_3) с праймерами к гену *sIFNG*, мы выявили расщепление 3:1, что подтверждает гипотезу о содержании одной копии Т-ДНК в геноме исходного трансформанта InterB (T_0). Таким образом, растения InterB.5 (T_1), InterB.6 (T_1) и InterB.13 (T_1), являются гетерозиготами по гену *sIFNG*. Для анализа следующего поколения T_3 использовали растения, также гетерозиготные по исследуемому гену. Расщепление во всех семьях T_3 соответствовало расщеплению гетерозиготных по гену *sIFNG* растений. Таким образом, среди семей, родоначальником которых было трансгенное растение InterB (T_0), не выявлено семьи с отсутствием расщепления по гену *sIFNG*.

Для потомков растения Inter311 (T_0) был также проведен анализ семей до поколения T_3 . Так, в результате анализа трех семей Inter311 поколения T_2 мы выявили две семьи Inter311.1 и Inter311.15, в которых расщепление,

не противоречило теоретически ожидаемому расщеплению 3:1. В третьей семье Inter311.2 расщепление отсутствовало. Таким образом, в геноме исходного трансформанта Inter311 также присутствует одна копия Т-ДНК. Родители растений семей Inter311.1 и Inter311.15 являлись гетерозиготами по гену *sIFNG*, в то время как растение Inter311.2 являлось гомозиготой по целевому гену. Для подтверждения гомозиготности этих растений по гену *sIFNG* проведен ПЦП-анализ семей потомков Inter311.2.6, Inter311.2.7 и Inter311.2.12. Расщепление во всех трех семьях (T_3) отсутствовало. Эти данные подтверждают, что растение Inter311.2 являлось гомозиготным по гену *sIFNG*. Таким образом, растение Inter311.2 стало родоначальником линии трансгенных растений табака, стабильно наследующих гетерологичный ген бычьего γ -интерферона.

Полученные результаты указывают на важность тщательного анализа трансформантов в нескольких поколениях, что позволяет выявить родоначальников линий — продуцентов интерферона.

Таблица 2

Соотношение *sIFNG*⁺ - и *sIFNG*⁻ -потомков трансгенных растений табака в семьях InterB и Inter311 (T_2 - T_3)

Поколение T_1			Поколение T_2			Поколение T_3		
Семья	Соотн. <i>sIFNG</i> ⁺ : <i>sIFNG</i> ⁻	χ^2 H_0 : 3:1	Семья	Соотн. <i>sIFNG</i> ⁺ : <i>sIFNG</i> ⁻	χ^2 H_0 : 3:1	Семья	Соотн. <i>sIFNG</i> ⁺ : <i>sIFNG</i> ⁻	χ^2 H_0 : 3:1
InterB	21:4	1,08*	InterB.5	20:5	0,33*	Анализ не проводился		
			InterB.6	19:6	0,01*	InterB.6.2	22:3	2,25*
						InterB.6.13	21:4	1,08*
						InterB.6.20	21:4	1,08*
Inter311	17:8	0,65*	InterB.13	21:4	1,08*	InterB.13.6	22:3	2,25*
			Inter311.2	25:0	8,33	Анализ не проводился		
						Inter311.2.6	25:0	8,33
						Inter311.2.7	25:0	8,33
			Inter311.15	21:4	1,08*	Inter311.2.12	25:0	8,33
						Анализ не проводился		

* — фактическое расщепление достоверно соответствует теоретическому при $\chi^2_{\text{ст},0,05} = 3,841$ (d.f. = 1)

АНАЛИЗ СТАБИЛЬНОСТИ ЭКСПРЕССИИ
ГЕНА γ -ИНТЕРФЕРОНА У ТРАНСГЕННЫХ
РАСТЕНИЙ ТАБАКА

Ранее было показано, что уровень экспрессии гетерологичных генов зависит от многих факторов и, в значительной степени, от того в какую область ядерного хроматина попал введенный ген (Дейнеко, 2012). Экспрессия трансгена, как правило, высока при его попадании в область активного хроматина. Встраивание в транскрипционно неактивные, гиперметилированные участки генома, наоборот, приводит к инактивации трансгена (Linn et al., 1990). Отсутствие экспрессии трансгена может быть обусловлено нарушениями целостности перенесенных генов в результате образования перестроек внутри генетической конструкции (Meyer et al., 1992; Morino et al., 1999; Forsbach et al., 2003) а также встраиванием трансгена вблизи генов, участвующих в регуляции развития растений (Bucherna et al., 2004). Кроме того, были выявлены случаи делетирования трансгенов у потомков в результате самоопыления исходных трансформантов (Morino et al., 1999; Forsbach et al., 2003).

Следует принять во внимание и возможность потери во времени активности интродуцированного гена при его сохранении в геноме. Данный феномен определяется явлением сайленсинга, которое широко распространено в растительном мире и подтверждается наличием множественных вставок чужеродных фрагментов ДНК (Morino et al., 1999; Sallaud et al., 2003). Предполагают, что данный механизм может служить одним из механизмов защиты от чужеродной ДНК и от РНК-содержащих вирусов (Лутова, 2010).

Стабильность экспрессии перенесенных генов зависит и от влияния факторов внешней среды. Например, выращивание трансформантов (полученных в стерильных условиях *in vitro*) и их потомков в полевых условиях может провоцировать значительные изменения в экспрессии рекомбинантных генов (Meyer et al., 1992).

Таким образом, существуют различные причины, ведущие к вариабельности экспрессии рекомбинантных генов в трансгенных растениях и к отклонениям от менде-

Таблица 3
Анализ экспрессии гена *sIFNG* у растений поколения T_1

Семья	Колич. проанализ. раст. T_1	Колич. растений, содержащих ген <i>sIFNG</i>	Колич. растений, экспрессиру. ген <i>sIFNG</i>
InterB	25	21	11
Inter311	25	17	16
Inter605	25	20	9
Inter623	25	21	7
InterA	25	17	—

левского наследования, которые необходимо учитывать при создании растительных продуцентов.

Для выявления и изучения стабильности экспрессии гетерологичного гена γ -интерферона проводили ОТ-ПЦР-анализ трансгенных растений (T_1 - T_3), которые являлись потомками пяти исходных трансформантов: InterA, InterB, Inter311, Inter605 и Inter623 (табл. 3). В каждой из пяти проанализированных семей T_1 были выявлены растения, для которых показано наличие экспрессии гетерологичного гена *sIFNG*. Среди растений внутри каждой семьи была выявлена вариабельность по экспрессии гена *sIFNG*. Так, например, в семье InterB (T_1) девять растений из восемнадцати характеризовались отсутствием экспрессии (рис. 1). Остальные девять растений характеризовались различной интенсивностью свечения продуктов ПЦР-реакции, проведенной с пробами кДНК и праймерами к гену *sIFNG*. В семьях InterB, Inter605 и Inter623 показано отсутствие экспрессии гена *sIFNG* более, чем для половины растений, а семья InterA, характеризовалась отсутствием экспрессии гетерологичного гена (табл. 3).

Как правило, инактивация трансгена характерна для растений с множественными инсерциями Т-ДНК. Так, явление инактивации экспрессии тесно сцепленных копий трансгенов было впервые описано в 1991 году (Mittelsten et al., 1991). Авторы продемонстрировали корреляцию потери устойчивости к антибиотику гигромицину со встраиванием множественных копий транс-

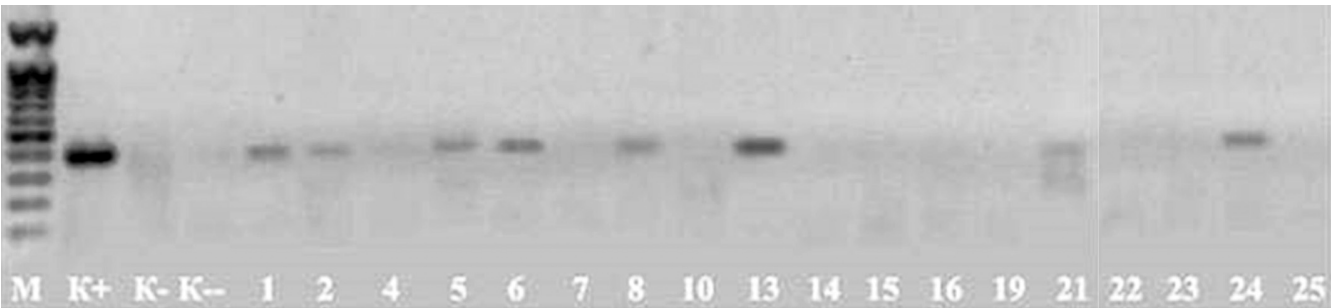


Рис. 1. Подтверждение экспрессии гена *sIFNG* в трансформированных растениях семьи InterB (T_1). Электрофорез продуктов ОТ-ПЦР кДНК растений семьи InterB с праймерами к гену *sIFNG*. М — маркер молекулярного веса (100 — 1000 н.п.); К— — ПЦР-реакция, проведенная с водой; К- — кДНК нетрансгенного растения; К+ — ПЦР-реакция, проведенная с ДНК *Agrobacterium tumefaciens*; 1-25 — кДНК анализируемых растений

Таблица 4

Анализ экспрессии гена *sIFNG* у растений семей InterB и Inter311 (T_2)

Родительское растение (T_0)	Семья (T_2)	Колич. проанализ. раст. T_2	Колич. растений, содерж. ген <i>sIFNG</i>	Колич. растений, экспрессир. ген <i>sIFNG</i>
InterB	InterB.5	25	20	20
	InterB.6	25	19	19
	InterB.13	25	21	21
Inter311	Inter311.1	25	21	21
	Inter311.2	25	25	25
	Inter311.15	25	21	21

гена в один локус растительного генома у трансгенных растений. В другой работе целенаправленно была получена серия аллелей с различным числом копий гена устойчивости к антибиотику. У растений с дупликациями перенесенных генов наблюдали их инактивирование. Это явление получило специальное название: RIGS (*repeat-induced gene silencing*) — замолкание гена, индуцируемое наличием tandemно повторенных фрагментов ДНК в районе расположения анализируемого гена. Данное явление было обнаружено у петунии, у которой были продемонстрированы инвертированные повторы Т-ДНК, содержащей ген халконсинтетазы, что приводило к пост-транскрипционной инактивации гомологичного гена петунии (Stam et al., 1998). К настоящему времени известно большое количество работ, в которых проводили исследования влияния различных дублицированных Т-ДНК фрагментов на проявление и стабильность экспрессии перенесенных генов. Однако анализ наследования гена *sIFNG* в семье InterA показал наличие одной копии трансгена в геноме исходного трансформанта (табл. 1). Так, феноменологические случаи «замолкания» чужеродных генов среди потомков первого поколения трансгенных растений, описаны для разных видов растений: табака, петунии, резуховидки и др. (Mittelsten et al., 1991; Meyer et al., 1992). Подобные результаты могут быть объяснены химерностью растительных тканей у исходных трансформантов, возникновением микроделений и мутаций по районам Т-ДНК, встраиванием инсерций в гиперметилированные участки генома и др. Так, у растений табака возможно образование химер — растений с двумя типами клеток: с интеграцией трансгена в ядерную ДНК и без неё (Schmulling, Shell, 1993). С другой стороны, известно, что встраивание чужеродных генов в слабо или сильно метилированные районы также приводит к инактивированию трансгенов (Furner et al., 1998). Подобное объяснение возможно и в нашем случае: либо инсерция Т-ДНК в исходном трансформанте InterA (T_0) произошла в гиперметилированный участок растительного генома, либо растение InterA (T_0) являлось химерным. Оба возможных события могли привести к полной инактивации гена *sIFNG* у растений поколения T_1 , которое мы и наблюдали при анализе его экспрессии в семье InterA.

Проанализировав пять семей трансгенных растений поколения T_1 , мы показали наличие экспрессии гетерологичного гена *sIFNG* у половины растений в семьях InterB, Inter311, Inter605 и Inter623. Кроме того, среди растений была выявлена изменчивость уровня экспрессии гетерологичного гена. Дальнейшая работа по анализу экспрессии гена *sIFNG* была проведена для потомков двух трансгенных растений InterB и Inter311 (T_2 - T_3) с целью создания линий трансгенных растений-продуцентов γ -интерферона со стабильным наследованием и экспрессией гена *sIFNG*. По мнению ряда исследователей, однокопийные трансформанты предпочтительны с точки зрения поддержания стабильной экспрессии перенесенных генов у потомков в течение многих поколений. По результатам анализа растения InterB и Inter311 (T_1) характеризовались наличием одной копии Т-ДНК. Таким образом, основываясь на выше изложенном, мы ожидали выявить стабильное наследование экспрессии у потомков растений InterB и Inter311 (T_0) в поколениях T_2 и T_3 .

Методом ОТ-ПЦР-анализа мы проанализировали растения поколения T_2 , полученные в результате самоопыления растений InterB.5, InterB.6, InterB.13, Inter311.1, Inter311.2 и Inter311.15 (T_1), для которых ранее был показан высокий уровень экспрессии гена *sIFNG*. У всех растений поколения T_2 была выявлена его экспрессия (табл. 4). Более того, у растений внутри семьи уровень экспрессии гетерологичного гена был примерно на одном и том же уровне. Аналогичные результаты были получены и для других пяти семей. Эти результаты согласуются с литературными данными, описанными в работах по изучению экспрессии трансгенов. Например, было показано, что трансгены, встроившиеся в районы, богатые АТ-парами нуклеотидов, стабильно экспрессируются в ряду поколений (Furner et al., 1998). Продemonстрирована зависимость стабильности экспрессии трансгенов от генотипов родителей (Iglesias et al., 1997). Авторы наблюдали стабильный уровень экспрессии гена *nptII* у потомков поколения T_2 , полученных при скрещивании трансгенных растений табака Н9 и Н83. В то же время, у гибридов (T_2), полученных в результате скрещивания трансгенных растений табака Н59 и Н11, были выявлены отклонения от ожидаемых

менделевских соотношений. Исследования растений методом гибридизации *in situ* продемонстрировали, что стабильность экспрессии маркерного гена *nptII* у анализируемых растений табака коррелирует с местоположением вставок на хромосомах. Так, у растений Н9 и Н83 инсерции Т-ДНК были локализованы в теломерных районах, а у растений Н59 и Н11 — в интеркалярном и парацентрическом районах хромосом. Эти данные указывали, что стабильность экспрессии перенесенных генов у трансгенных растений определялась местом встраивания инсерции Т-ДНК в растительный геном.

Таким образом, сохранение экспрессии гетерологичного гена *sIFNG* у растений поколения T_2 , полученных в результате последовательных самоопылений растений T_0 и растений T_1 , позволило предположить, что у исходных трансгенных растений InterB и Inter311 (T_0) интеграция Т-ДНК произошла в транскрипционно активные участки растительного генома. Анализ экспрессии гетерологичного гена *sIFNG* у этих растений также показал отсутствие вариабельности уровня экспрессии внутри проанализированных семей.

Для подтверждения наследования экспрессии гена *sIFNG* мы также осуществили аналогичный ОТ-ПЦР-анализ для растений поколения T_3 . Результаты показали, что растения поколения T_3 сохраняли экспрессию гена *sIFNG* (данные не приводятся). Изменчивость уровня экспрессии гена *sIFNG* среди растений (T_3) в пределах одной семьи не обнаружена. Аналогичные данные были получены и для остальных проанализированных семей.

АНАЛИЗ БЕЛКОВЫХ ПРОБ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА

Для доказательства присутствия синтезируемого бычьего γ -интерферона в трансгенных растениях табака была проведена Вестерн-блот гибридизация с пробами белка, полученными из трансгенных растений InterA.5 и Inter311.2 (T_1) (рис. 2). В результате эксперимента выявлено наличие белка массой 15 kDa, соответствующему бычьему γ -интерферону, в растении Inter311.2 и его отсутствие в растении InterA.5 (Савельева, Лутова, 2010). Эти данные совпадают с ранее полученными данными об экспрессии гена *sIFNG* в растениях семей Inter311 и InterA (T_1). Вестерн-гибридизация белковых проб, выделенных из растений семей Inter311.2 и InterB.6 поколения T_2 выявила наличие белка ИФН- γ у всех проанализированных растений (Савельева, Лутова, 2010). Для массового скрининга растений поколения T_3 мы провели дот-блот гибридизацию. Пробы белка были получены из 21 растения семьи InterB.6.13 и из 25 растений семьи Inter311.2.7, для которых ранее было показано наличие экспрессии гена *sIFNG*. В результате дот-блот гибридизации было продемонстрировано присутствие гетерологичного белка γ -интерферона во всех трансгенных растениях семей InterB.6.13 и Inter311.2.7 поколения T_3 (Савельева,

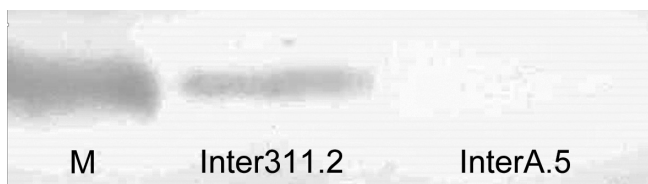


Рис. 2. Вестерн-блот гибридизация проб белка, полученных из листьев трансгенных растений Inter311.2 и InterA.5 (T_1) с диагностическими антителами против бычьего ИФН- γ . М — маркер молекулярного веса, 15 кДа

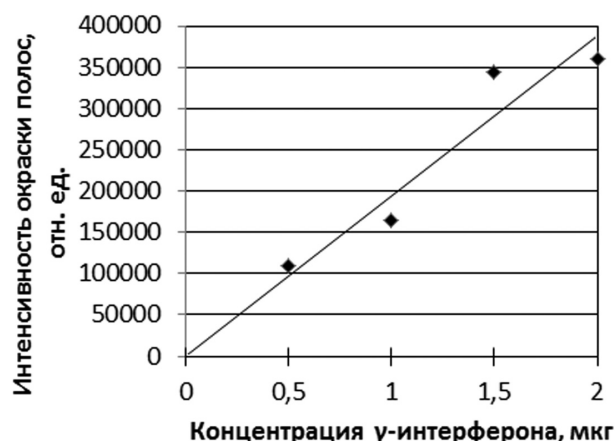


Рис. 3. Зависимость интенсивности окраски полос γ -интерферона от его концентрации на нитроцеллюлозной мембране после окрашивания диаминобензидином

Лутова, 2010). Таким образом, трансгенные растения, принадлежащие к семьям Inter311.2 и InterB.6 и экспрессирующие ген *sIFNG*, синтезируют бычий ИФН- γ . Причём в семье Inter311.2 уже в T_2 поколении произошла гомозиготизация трансгена *sIFNG*, на основе этой семьи мы получили инбредную линию растений-продуцентов бычьего ИФН- γ .

Для полуколичественной оценки концентрации бычьего γ -интерферона синтезируемого в трансгенных растениях табака, с использованием методов денатурирующего ПААГ-электрофореза и Вестерн-блот гибридизации построена калибровочная кривая со следующими концентрациями коммерческого препарата бычьего γ -интерферона: 0,5 мг, 1 мг, 1,5 мг и 2 мг. Интенсивность окраски полос, полученных в результате этого эксперимента, оценивали с помощью программы ImageJ 1.41. На рисунке 3 приведен график зависимости интенсивности окраски полос от концентрации. Полуколичественная оценка показала, что в одном 1 грамме листьев трансгенных растений табака семьи Inter311.2 (сырой вес) содержалось в среднем от 1 до 1,5 мкг γ -интерферона.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Работы по биотехнологии и генной инженерии начались около 30 лет тому назад. Этому предшествовала огромная исследовательская работа, в результате которой

были отработаны методы культивирования клеток, тканей и органов, созданы новые генетические конструкции, методы их переноса в геном и т.д.

Получение и многопрофильное использование трансгенных растений стало важным в современной биотехнологии. К настоящему времени в геном растения можно встраивать гены из различных гетерологичных систем для синтеза необходимых соединений. Перспективными направлениями стали работы по созданию трансгенных растений-продуцентов фармакологически значимых соединений: белков, антител, вакцин и других уникальных компонентов животного происхождения. Использование растений в качестве «фабрик» по производству подобных веществ имеет ряд несомненных преимуществ перед использованием культур микроорганизмов и животных клеток. Например, для растений характерна правильная укладка и созревание гетерологичных белков, обеспечивающих их функциональную активность и, в дальнейшем, экономическую выгоду, т.к. культивирование растений не требует дорогостоящего оборудования и реактивов, биологическую безопасность, т.к. данный способ синтеза гетерологичных белков исключает возможность контаминации микробными антигенами и токсинами, и, наконец, возможности создания растительных вакцин, которые можно будет употреблять как пищевые добавки, не прибегая к трудоемкой и дорогостоящей стадии очистки целевого продукта.

В настоящее время исследователь обладает широким спектром современных методов трансформации для получения трансгенных растений. Однако для создания определенного растения-продуцента необходимо учитывать большое количество факторов, определяющих успех работы. Так, важнейшими из них являются генотип растения, от которого зависит использование того или иного метода трансформации, структура вектора, содержащая целевой ген, степень токсичности гетерологичного белка для растения и т.д. Таким образом, создание первичного трансгенного растения (T_0) является необходимым и трудоемким процессом, требующим кропотливой работы. Однако получение первичных трансгенных растений, содержащих целевой ген, это только первый этап в создании растений — продуцентов фармакологических соединений. Важной составляющей таких экспериментов является отбор и последующий анализ T_1 , T_2 , T_3 и т.д. растений со встроенным целевым геном в геномную ДНК растения, на стабильность наследования и экспрессии целевого гена. Важным этапом эксперимента является создание стабильной генетической линии, как продуцента фармакологического белка, обладающего биологической активностью. Последний раздел статьи посвящен экспериментам авторов по созданию трансгенных растений, синтезирующих гамма-интерферона быка. В результате агробактериальной трансформации и последующей селекции была получена линия растений-продуцентов гамма-интерферона быка, стабильно наследующая и экспрессирующая ген *sIFNG*.

Исследования выполнены при финансовой поддержке программы развития Санкт-Петербургского государственного университета (проект 1.38.229.2014).

ЛИТЕРАТУРА

1. Бояринцев Л.Е. (2003) Разработка и применение препаратов интерферона и биологически активных добавок в ветеринарии. Дисс. на соиск. уч. ст. докт. ветер. наук. Воронеж.
2. Глеба Ю.Ю. (1998) Биотехнология растений. Соровский образовательный журнал. № 6: С. 3–8.
3. Градобоева А.Е., Падкина М.В. (2008) Изучение влияния продукции гетерологичного белка на физиологическое состояние дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*. Вестник СПбГУ. Сер. 3. № 2: С. 56–61.
4. Грант В. (1989) Эволюционный процесс. Москва: Мир.
5. Дейнеко Е.В. (2012) Генетически модифицированные растения — продуценты белков медицинского назначения. Вестник Томского государственного университета. Биология. № 2. (18): С. 41–51.
6. Ершов В.И. (2008) Наглядная гематология./Ред. Ершов В.И.//Москва: ГЭОТАР-Меди.
7. Катохин А.В., Кузнецова Т.Н., Омелянчук Н.А. (2006) миРНК — новые регуляторы активности генов у эукариот. Вестник ВОГиС. Т. 10: С. 241–272.
8. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., Воробьев А.А. (1992) Эндогенные иммуномодуляторы СПб.: Гиппократ.
9. Лутова Л.А. (2010) Биотехнология высших растений. 2-е изд. СПб.: Изд-во Санкт-Петербургского государственного университета.
10. Мирошников П.Н., Лебедев Л.Р., Терещенко Т.А. с соавт. (2003) Разработка способов получения интерферона-гамма и его мутантного аналога дельта-ферона. Биотехнология: состояние и перспективы развития. Т. 152: С. 78–82.
11. Падкина М.В., Парфёнова Л.В., Градобоева А.Е., Самбук Е.В. (2010) Синтез гетерологичных интерферонов в клетках дрожжей *Pichia pastoris*. Прикл. Биохим. Микробиол. Т. 46: С. 448–455.
12. Придыбайло Н.Д. (1991) Иммунодефициты у сельскохозяйственных животных и птиц. Профилактика и лечение их иммуностимуляторами. Москва: ВАСХНИЛ.
13. Рукавцова Е.Б., Бурьянов Я.И., Шульга Н.Я., Быков В.А. (2006) Трансгенные растения для фармакологии. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. № 2: С. 3–12.
14. Савельева Н.В., Курдюков И.Д., Дудник Е.Э. с соавт. (2009) Растения-продуценты бычьего гамма-интерферона для профилактики туберкулеза и лейкемии крупного рогатого скота. Вестник С.-Петербургского ун-та. Сер. 3. №. 4: С. 65–80.

15. Савельева Н.В., Лутова Л.А. (2010) Растения — продуценты рекомбинантных белков медицинского назначения. Продуценты γ -интерферона быка. Саарбрюкен: Изд-во LAPLAMBERT Academic Publishing.
16. Симбирцев А.С. (2013) Достижения и перспективы использования рекомбинантных цитокинов в клинической практике. Медицинский академический журнал. Т. 13: С. 7–22.
17. Федоров Ю.Н., Верховский О.А. (1996) Иммунодефициты домашних животных Москва: Москва.
18. Цыганков М.А., Зобнина А.Е., Падкина М.В. (2014) Синтез модифицированных, устойчивых к протеолитической деградации интерферонов-гамма в дрожжах *Pichia pastoris*. Прикл. Биохим. Микробиол. Т. 50: С. 429–436.
19. Шульга Н.Я., Рукавцова Е.Б., Крымский М.А. с соавт. (2004) Экспрессия поверхностного антигена вируса гепатита В в трансгенных растениях картофеля и его характеристика. Биохимия. Т. 69: С. 1422–1430.
20. Arango J., Salazar B., Welsch R. et al. (2010) Putative storage root specific promoters from cassava and yam: cloning and evaluation in transgenic carrots as a model system. Plant Cell Rep. V. 29: P. 651–659.
21. Arlen P.A., Falconer R., Cherukumilli S. et al. (2007) Field production and functional evaluation of chloroplast-derived interferon- α 2b. Plant Biotechnol. J. V. 5: P. 511–525.
22. Assenberg R., Wan P., Geisse S., Mayr L. (2013) Advances in recombinant protein expression for use in pharmaceutical research. Curr. Opin. Struct. Biol. V. 23: P. 393–402.
23. Barta A., Sommergruber K., Thompson D. et al. (1986) The expression of a nopal synthase human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. Plant Mol. Biol. V. 6: P. 347–357.
24. Barton K.A., Binns A.N., Matzke A.J., Chilton M.D. (1983) Regeneration of intact tobacco plants containing full length copies of genetically engineering T-DNA, and transmission of T-DNA to R1 progeny. Cell. V. 32: P. 1033–1043.
25. Basaran P., Rodriguez-Cerezo E. (2008) Plant molecular farming: opportunities and challenges. Crit. Rev. Biotechnol. V. 28: P. 153–172.
26. Bosze Z., Baranyi M., Whitelaw C. (2008) Producing recombinant human milk proteins in the milk of livestock species. Adv. Exp. Med. Biol. V. 606: P. 357–393.
27. Bucherna N., Okkels F.T., Palmgren C. (2004) Developmental timing of transgene expression in *Arabidopsis thaliana* using gene silencing mutants and matrix attachment regions. Plant J. V. 39: P. 440–449.
28. Chen T.L., Lin Y.L., Lee Y.L. et al. (2004) Expression of bioactive human interferon-gamma in transgenic rice cell suspension cultures. Transgenic Res. V. 13: P. 499–510.
29. Chikwamba R., Cunnick J., Hathaway D. et al. (2002) A functional antigen in a practical crop: LT-B producing maize protects mice against *Escherichia coli* heat labile enterotoxin (LT) and cholera toxin (CT). Transgenic Res. V. 11: P. 497–493.
30. Chong D.K.X., Roberts W., Arakawa T. et al. (1997) Expression of the human milk protein β -casein in transgenic potato plants. Transgenic Res. V. 6: P. 289–296.
31. Clausen R.E. (1941) Polyploidy in *Nicotiana*. Amer. Nat. J. N 75: P. 291–306.
32. Cramer C.L., Weissenborn D.L., Oishi K.K. et al. (1996) Bioproduction of human enzymes in transgenic tobacco. Ann. NY Acad. Sci. V. 792: P. 62–71.
33. Da Cunha N.B., Vianna G.R., Da Almeida L.T., Rech E. (2014) Molecular farming of human cytokines and blood products from plants: Challenges in biosynthesis and detection of plant-produced recombinant proteins. Biotechnol. J. V. 9: P. 39–50.
34. Daniel K., Chong X., Langridge W.H.R. et al. (2000) Expression of full-length bioactive antimicrobial human lactoferrin in potato plants. Transgenic Res. V. 9: P. 71–78.
35. Daniell H., Ruiz G., Denes B. et al. (2009) 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 Biotechnol. V. 9: Art. 33.
36. De Jaeger G., De Wilde C., Eeckhout D. et al. (2000) The plantibody approach: expression of antibody genes in plants to modulate plant metabolism or to obtain pathogen resistance. Plant Mol. Biol. V. 43: P. 419–428.
37. Delores S.C., Gardner R.C. (1988) Expression and inheritance of kanamycin resistance in number of transgenic petunias generated by *Agrobacterium*-mediated transformation. Plant Mol. Biol. V. 11: P. 355–364.
38. Desai P., Shrivastava N., Padh H. (2010) Production of heterologous proteins in plants: strategies for optimal expression. Biotechnol. Adv. V. 28: P. 427–435.
39. Desai U.A., Sur G., Daunert S. et al. (2002) Expression and affinity purification of recombinant proteins from plants. Protein Expr. Purif. V. 25: P. 195–202.
40. Dieryck W., Pagnier J., Poyart C. et al. (1997) Human haemoglobin from transgenic tobacco. Nature. V. 386: P. 29–30.
41. Edelbaum O., Stein D., Holland N. et al. (1992) Expression of active human interferon-beta in transgenic plants. J. Interferon Res. V. 12: P. 449–453.
42. Flynn J.L., Chan J., Triebold K.J. et al. (1993) An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. J. Exp. Med. V. 178: P. 2249–2253.

43. Forsbach A., Schubert D., Lechtenberg B. et al. (2003) Comprehensive characterization of single copy T-DNA insertions in the *Arabidopsis thaliana* genome. *Plant Mol. Biol.* V. 52: P. 161–176.
44. Fukuzawa N., Tabayashi N., Okinaka Y. et al. (2010) Production of biologically active Atlantic salmon interferon in transgenic potato and rice plants. *J. Biosci. Bioeng.* V. 110: P. 201–207.
45. Furner I.J., Sheikh M.A., Collett C.E. (1998) Gene silencing and homology-dependent gene silencing in *Arabidopsis*: genetic modifiers and DNA methylation. *Genet.* V. 149: P. 651–662.
46. Gao C., Nielsen K. (2013) Comparison between *Agrobacterium*-mediated and direct gene transfer using the gene gun. *Meth. Mol. Biol.* V. 940: P.3–16.
47. Gleba Y., Tuse D., Giritch A. (2014) Plant viral vectors for delivery by *Agrobacterium*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* V. 375: P. 155–192.
48. Hellwig S., Drossard J., Twyman R.M., Fischer R. (2004) Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nature Biotechnol.* V. 22: P. 1415–1422.
49. Herrera-Estrella L., Depicker A., van Montagu M., Schell J. (1983) Expression of chimeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature.* V. 303: P. 209–213.
50. Hiatt A., Cafferkey R., Bowdish K. (1989) Production of antibodies in transgenic plant. *Nature.* V. 342: P. 76–78.
51. Higo K., Saito Y., Higo H. (1993) Expression of a chemically synthesized gene for human epidermal growth factor under the control of cauliflower mosaic virus 35S promoter in transgenic tobacco. *Biosci. Biotech. Biochem.* V. 57: P. 1477–1481.
52. Hood E., Witcher D., Maddock S. et al. (1997) Commercial production of avidin from transgenic maize: characterization of transformant, production, processing, extraction and purification. *Mol. Breed.* V. 3: P. 291–306.
53. Horsh R.B., Fraley R.T., Rogers S.G. et al. (1984) Inheritance of functional foreign genes in plants. *Science.* V. 223: P. 496–498.
54. Iglesias V.A., Moscone E.A., Papp I. et al. (1997) Molecular and cytogenetic analysis of stably and unstably expressed transgene loci in tobacco. *Plant Cell.* V. 9: P. 1251–1264.
55. Key S., Ma J.K.C., Drake P.M.W. (2008) Genetically modified plants and human health. *J.R. Soc. Me.* V. 101: P. 290–298.
56. Kim T.-G., Yang M.-S. (2010) Current trends in edible vaccine development using transgenic plants. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* V. 15: P. 61–65.
57. Kong Q., Richter L., Yang Y.F. et al. (2001) Oral immunization with hepatitis B surface antigen expressed in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 98: P. 11 539–11 544.
58. Koprivova A., Stemmer C., Altmann F. et al. (2004) Targeted knockouts of *Physcomitrella* lacking plant-specific immunogenic N-glycans. *Plant Biotechnol. J.* V. 2: P. 517–523.
59. Lambertz C., Garvey M., Klinger J. et al. (2014) Challenges and advances in the heterologous expression of cellulytic enzymes: a review. *Biotechnol. Biofuels.* V. 7: Art. 135.
60. Lamphear B.J., Jilka J.M., Kesl L. et al. (2004) A corn-based delivery system for animal vaccines: an oral transmissible gastroenteritis virus vaccine boosts lactogenic immunity in swine. *Vaccine.* V. 22: P. 2420–2424.
61. Larrick J.W., Yu L., Naftzger C. et al. (2001) Production of secretory IgA antibodies in plants. *Biomol. Eng.* V. 18: P. 87–94.
62. Linn F., Heidmann I., Saedler H., Meyer P. (1990) Epigenetic changes in the expression of the maize *Al* gene in *Petunia hybrida*: role of numbers of integrated copies and state of methylation. *Mol. Gen. Genet.* V. 222: P. 329–336.
63. Luchakivskaya Yu., Kishchenko O., Gerasymenko I. et al. (2011) High-level expression of human interferon alpha-2b in transgenic carrot (*Daucus carota* L.) plants. *Plant Cell Rep.* V. 30: P. 407–415.
64. Ma J.K., Drake P.M., Christou P. (2003) The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat. Rev. Genet.* V. 4: P. 794–805.
65. Mason H.S., Lam D.M., Arntzen C.J. (1992) Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 89: P. 11 745–11 749.
66. Matsumoto S., Ikura K., Ueda M., Sasaki R. (1995) Characterization of a human glycoprotein (erythropoietin) produced in cultured tobacco cells. *Plant Mol. Biol.* V. 27: P. 1163–1172.
67. McCormick A.A., Kumagai M.H., Hanley K. et al. (1999) Rapid production of specific vaccines for lymphoma by expression of the tumor-derived single-chain Fv epitopes in tobacco plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 96: P. 703–708.
68. Merle C., Perret S., Lacour T. et al. (2002) Hydroxylated human homotrimeric collagen I in *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transient expression and in transgenic tobacco plant. *FEBS Lett.* V. 515: P. 114–118.
69. Meyer P., Linn F., Heidmann I. et al. (1992) Endogenous and environmental factors influence 35S promoter methylation of a maize *Al* gene construct in transgenic petunia and its colour phenotype. *Mol. Gen. Genet.* V. 231: P. 345–352.
70. Mittelsten S.O., Paszkowsky J., Potrykus I. (1991) Reverseble inactivation of a transgene in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* V. 228: P. 104–112.
71. Morino K., Olsen O.A., Shimamoto K. (1999) Silencing of an aleurone-specific gene in transgenic rice is caused by a rearranged transgene. *Plant J.* V. 17: P. 275–285.

72. Noh S. A., Lee H. S., Huh G. H. et al. (2012) A sweet-potato SRD1 promoter confers strong root-, taproot-, and tuber-specific expression in Arabidopsis, carrot, and potato. *Transgenic Res.* V. 21: P. 265–278.
73. Nykiforuk C. L., Boothe J. G., Murray E. W. et al. (2006) Transgenic expression and recovery of biologically active recombinant human insulin from Arabidopsis thaliana seeds. *Plant Biotechnol. J.* V. 4: P. 77–85.
74. Obembe O. O., Popoola J. O., Leelavathti S., Reddy S. V. (2011) Advances in plant molecular farming. *Biotechnol. Adv.* V. 29: P. 210–222.
75. Oksman-Caldentey K.-M., Inze D. (2004) Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends Plant Sci.* V. 9: P. 433–440.
76. Parmenter D. L., Boothe J. G., van Rooijen G. J. H. et al. (1995) Production of biologically active hirudin in plant seeds using oleosin partitioning. *Plant Mol. Biol.* V. 29: P. 1167–1180.
77. Pestka S., Langer J. A., Zoon K. C., Samuel C. E. (1987) Interferons and their actions. *Ann. Rev. Biochem.* V. 56: P. 727–777.
78. Potula H. H. S. K., Kathuria S. R., Ghosh A. K. et al. (2008) Transient expression, purification and characterization of bioactive human fibroblast growth factor 8b in tobacco plants. *Transgenic Res.* V. 17: P. 19–32.
79. Rance I., Norre F., Gruber V., Theisen M. (2002) Combination of viral promoter sequences to generate highly active promoters for heterologous therapeutic protein over-expression in plants. *Plant Sci.* V. 162: P. 833–842.
80. Richter L. J., Thanavala Y., Arntzen C. J., Mason H. S. (2000) Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. *Nat. Biotechnol.* V. 18: P. 1167–1171.
81. Ruggiero F., Exposito J. Y., Bournat P. et al. (2000) Triple helix assembly and processing of human collagen produced in transgenic tobacco plants. *FEBS Lett.* V. 469: P. 132–136.
82. Sallaud C., Meynard D., van Bortel J. et al. (2003) Highly efficient production and characterization of T-DNA plants for rice (*Oryza sativa* L.) functional genomics. *Theor. Appl. Genet.* V. 106: P. 1396–1408.
83. Scheller J., Henggeler D., Viviani A., Conrad U. (2004) Purification of spider silk-elastin from transgenic plants and application for human chondrocyte proliferation. *Transgenic Res.* V. 13: P. 51–57.
84. Schmulling T., Schell, J. (1993) Transgenic tobacco plants regenerated from leaf disks can be periclinal chimeras. *Plant Mol. Biol.* V. 21: P. 705–708.
85. Schroder K., Hertzog P. J., Ravasi T., Hume D. A. (2004) Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* V. 75: P. 163–189.
86. Shaaltiel Y., Bartfeld D., Hashmueli S. et al. (2007) Production of glucocerebrosidase with terminal mannose glycans for enzyme replacement therapy of Gaucher's disease using plant cell system. *Plant Biotechnol. J.* V. 5: P. 579–590.
87. Sharma A. K., Sharma M. K. (2009) Plants as bioreactors: Recent developments and emerging opportunities. *Biotechnology Advances.* V. 27: P. 811–832.
88. Sijmons P. C., Dekker B. M., Schrammeijer B. et al. (1990) Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. *Biotechnol. (NY).* V. 8: P. 217–221.
89. Sirko A., Vanek T., Gora-Sochacka A., Redkiewicz P. (2011) Recombinant cytokines from plants. *Int. J. Mol. Sci.* V. 12: P. 3536–3552.
90. Smith M. L., Mason H. S., Shuler M. L. (2002) Hepatitis B surface antigen (HBsAg) expression in plant cell culture: Kinetics of antigen accumulation in batch culture and its intracellular form. *Biotechnol. Bioeng.* V. 80: P. 812–822.
91. Stam M., Viterbo A., Mol J. N. M., Kooter J. M. (1998) Position-dependent methylation and transcriptional silencing of transgenes in inverted T-DNA repeats: implications for posttranscriptional silencing of homologous host genes in plant. *Mol. Cell. Biol.* V. 18: P. 6165–6177.
92. Staniek A., Bouwmeester H., Fraser P. D. et al. (2013) Natural products — modifying metabolite pathways in plants. *Biotechnol. J.* V. 8: P. 1159–1171.
93. Stiles A., Liu C. (2013) Hairy root culture: bioreactor design and process intensification. *Adv. Biochem. Engineer. Biotechnol.* V. 134: P. 91–114.
94. Stoger E., Vaquero C., Torres E. et al. (2000) Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies. *Plant Mol Biol.* V. 42: P. 583–590.
95. Tacket C. O., Mason H. S., Losonsky G. et al. (1998) Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato. *Nat. Med.* V. 4: P. 607–609.
96. Tacket C. O., Mason H. S., Losonsky G. et al. (2000) Human immune responses to a novel norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes. *J. Infect. Dis.* V. 182: P. 302–305.
97. Terashima M., Murai Y., Kawamura M. et al. (1999) Production of functional human α 1-antitrypsin by plant cell culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* V. 52: P. 516–523.
98. Thanavala Y., Mahoney M., Pal S. et al. (2005) Immunogenicity in humans of an edible vaccine for hepatitis B. *Ibid.* V. 102: P. 3378–3382.
99. Thanavala Y., Yang Y. F., Lyons P. et al. (1995) Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 92: P. 3358–3361.
100. Thomas B. R., Deynze A. V., Bradford K. J. (2002) Production of therapeutic proteins in plants. *Agricultural biotechnology in California series.* 342 p.

101. Trexler M. M., McDonald K. A., Jackman A. P. (2002) Bioreactor production of human I-antitrypsin using metabolically regulated plant cell cultures. *Biotechnol. Prog.* V. 18: P. 501–508.
102. Trimble R. B., Atkinson P. H., Tschopp R. R., Mailey F. (1991) Structure of oligosaccharides on *Saccharomyces* SUC2 invertase secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J. Biol. Chem.* V. 266: P. 22807–22817.
103. Vandekerckhove J., Van Damme J., Van Lijsebettens M. et al. (1989) Enkephalins produced in transgenic plants using modified 2S seed storage proteins. *BioTechnology*. V. 7: P. 929–932.
104. Veluthambi K., Jayaswal R. K., Gelvin S. B. (1987) Virulence genes *A*, *G*, and *D* mediate the double-stranded border cleavage of T-DNA from the *Agrobacterium* Ti plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 84: P. 1881–1885.
105. Vesosky B., Turner O. C., Turner J., Orme I. M. (2004) Gamma interferon production by bovine gamma delta T cells following stimulation with mycobacterial mycolylarabinogalactan peptidoglycan. *Infection and immunity*. V. 72: P. 4612–4618.
106. Weise A., Altmann F., Rodriguez-Franco M. et al. (2007) High-level expression of secreted complex glycosylated recombinant human erythropoietin in the *Physcomitrella* Δ -*fuc-t* Δ -*xyl-t* mutant. *Plant Biotechnol. J.* V. 5: P. 389–401.
107. Woodard S. L., Mayor J. M., Bailey M. R. et al. (2003) Maize (*Zea mays*)-derived bovine trypsin: characterization of the first large-scale, commercial protein product from transgenic plants. *Biotechnol. Appl. Biochem.* V. 38: P. 123–130.
108. Yang D. C., Guo F. L., Liu B. et al. (2003) Expression and localization of human lysozyme in the endosperm of transgenic rice. *Planta*. V. 216: P. 597–603.
109. Yu J., Langridge W. H. (2001) A plant-based multi-component vaccine protects mice from enteric diseases. *Nat. Biotechnol.* V. 19: P. 548–552.
110. Zeitlin L., Olmsted S. S., Moench T. R. et al. (1998) A humanized monoclonal antibody produced in transgenic plants for immunoprotection of the vagina against genital herpes. *Nat. Biotechnol.* V. 16: P. 1361–1364.
111. Zhong G.-Y., Peterson D., Delaney D. E. et al. (1999) Commercial production of aprotinin in transgenic maize seeds. *Mol. Breed.* V. 36: P. 345–356.

TRANSGENIC PLANTS AS BIOREACTORS FOR THE PRODUCTION OF SUBSTANCES OF MEDICINAL AND VETERINARY IMPORTANCE

Saveleva N. V., Burlakovskiy M. S., Yemelyanov V. V., Lutova L. A.

✿ **SUMMARY:** The use of plants as bioreactors has become of a great importance in the modern biotechnology. The transgenic plants are

capable of synthesizing of many substances, including valuable pharmaceuticals. Plants possess a number of advantages compared to conventional bioreactors — microorganisms and animal cell cultures. The product safety and lower production costs are among them. One of the promising directions in plant biotechnology is the creation of “edible vaccines, plantibodies and adjuvants” based on recombinant antigens, immunoglobulins and immunoregulatory cytokines. Edible bioreactor plants can be administered as food and feed additives in medicine and veterinary avoiding expensive purification procedures. Interferons have antiviral, antibacterial, antitumor and immunomodulatory activity, and are implicated in the prophylaxis and therapy of diseases of different etiologies. Investigations concerning with obtaining of bioreactor plants synthesizing γ -interferons of mammals and birds are carried out in the laboratory of genetic and cellular engineering of plants St. Petersburg State University. Our recent achievements in the creation of inbred tobacco line producing bovine γ -interferon are described.

✿ **KEY WORDS:** expression of heterologous genes; bioreactor plants; *Nicotiana tabacum*; immunomodulators; genetic transformation; food and feed additives.

✿ REFERENCES (TRANSLITERATED)

1. Arango J., Salazar B., Welsch R. et al. (2010) Putative storage root specific promoters from cassava and yam: cloning and evaluation in transgenic carrots as a model system. *Plant Cell Rep.* V. 29: P. 651–659.
2. Arlen P. A., Falconer R., Cherukumilli S. et al. (2007) Field production and functional evaluation of chloroplast-derived interferon- α 2b. *Plant Biotechnol. J.* V. 5: P. 511–525.
3. Assenberg R., Wan P., Geisse S., Mayr L. (2013) Advances in recombinant protein expression for use in pharmaceutical research. *Curr. Opin. Struct. Biol.* V. 23: P. 393–402.
4. Barta A., Sommergruber K., Thompson D. et al. (1986) The expression of a nopal synthase human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant Mol. Biol.* V. 6: P. 347–357.
5. Barton K. A., Binns A. N., Matzke A. J., Chilton M. D. (1983) Regeneration of intact tobacco plants containing full length copies of genetically engineering T-DNA, and transmission of T-DNA to R1 progeny. *Cell*. V. 32: P. 1033–1043.
6. Basaran P., Rodriguez-Cerezo E. (2008) Plant molecular farming: opportunities and challenges. *Crit. Rev. Biotechnol.* V. 28: P. 153–172.
7. Bosze Z., Baranyi M., Whitelaw C. (2008) Producing recombinant human milk proteins in the milk of livestock species. *Adv. Exp. Med. Biol.* V. 606: P. 357–393.
8. Boyarintsev L. E. (2003) Razrabotka i primeneniye preparatov interferona i biologicheskii aktivnykh dobavok v veterenarii. Diss. na soisk. uch. st. dokt. veter. nauk. [Development and application of interferon and dietary supplement in veterinary. Dr. Sci. Thesis]. Voronezh.
9. Bucherna N., Okkels F. T., Palmgren C. (2004) Developmental timing of transgene expression in *Arabidopsis*

- thaliana* using gene silencing mutants and matrix attachment regions. Plant J. V. 39: P. 440–449.
10. Chen T.L., Lin Y.L., Lee Y.L. et al. (2004) Expression of bioactive human interferon-gamma in transgenic rice cell suspension cultures. Transgenic Res. V. 13: P. 499–510.
 11. Chikwamba R., Cunnick J., Hathaway D. et al. (2002) A functional antigen in a practical crop: LT-B producing maize protects mice against *Escherichia coli* heat labile enterotoxin (LT) and cholera toxin (CT). Transgenic Res. V. 11: P. 497–493.
 12. Chong D.K.X., Roberts W., Arakawa T. et al. (1997) Expression of the human milk protein β -casein in transgenic potato plants. Transgenic Res. V. 6: P. 289–296.
 13. Clausen R.E. (1941) Polyploidy in *Nicotiana*. Amer. Nat. J. N 75: P. 291–306.
 14. Cramer C.L., Weissenborn D.L., Oishi K.K. et al. (1996) Bioproduction of human enzymes in transgenic tobacco. Ann. NY Acad. Sci. V. 792: P. 62–71.
 15. Da Cunha N.B., Vianna G.R., Da Almeida L.T., Rech E. (2014) Molecular farming of human cytokines and blood products from plants: Challenges in biosynthesis and detection of plant-produced recombinant proteins. Biotechnol. J. V. 9: P. 39–50.
 16. Daniel K., Chong X., Langridge W.H.R. et al. (2000) Expression of full-length bioactive antimicrobial human lactoferrin in potato plants. Transgenic Res. V. 9: P. 71–78.
 17. Daniell H., Ruiz G., Denes B. et al. (2009) 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 Biotechnol. V. 9: Art. 33.
 18. De Jaeger G., De Wilde C., Eeckhout D. et al. (2000) The plantibody approach: expression of antibody genes in plants to modulate plant metabolism or to obtain pathogen resistance. Plant Mol. Biol. V. 43: P. 419–428.
 19. Delores S.C., Gardner R.C. (1988) Expression and inheritance of kanamycin resistance in number of transgenic petunias generated by Agrobacterium-mediated transformation. Plant Mol. Biol. V. 11: P. 355–364.
 20. Desai P., Shrivastava N., Padh H. (2010) Production of heterologous proteins in plants: strategies for optimal expression. Biotechnol. Adv. V. 28: P. 427–435.
 21. Desai U.A., Sur G., Daunert S. et al. (2002) Expression and affinity purification of recombinant proteins from plants. Protein Expr. Purif. V. 25: P. 195–202.
 22. Deyneko E. V. (2012) Geneticheski modifitsirovannye rasteniya — produtsenty belkov meditsinskogo naznacheniya. [Genetically modified plants — bioreactors for synthesis of proteins for medical purposes]. Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya. N 2. (18): P. 41–51.
 23. Dieryck W., Pagnier J., Poyart C. et al. (1997) Human haemoglobin from transgenic tobacco. Nature. V. 386: P. 29–30.
 24. Edelbaum O., Stein D., Holland N. et al. (1992) Expression of active human interferon-beta in transgenic plants. J. Interferon Res. V. 12: P. 449–453.
 25. Ershov V.I. (2008) Naglyadnaya gematologiya. [Visual hematology]. / Red. Ershov V.I. // Moscow: GEOTAR-Medi.
 26. Fedorov Yu. N., Verkhovskiy O. A. (1996) Immunodefitsity domashnikh zhivotnykh. [Immunodeficiencies of pets]. Moscow: Moscow.
 27. Flynn J. L., Chan J., Triebold K. J. et al. (1993) An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. J. Exp. Med. V. 178: P. 2249–2253.
 28. Forsbach A., Schubert D., Lechtenberg B. et al. (2003) Comprehensive characterization of single copy T-DNA insertions in the *Arabidopsis thaliana* genome. Plant Mol. Biol. V. 52: P. 161–176.
 29. Fukuzawa N., Tabayashi N., Okinaka Y. et al. (2010) Production of biologically active Atlantic salmon interferon in transgenic potato and rice plants. J. Biosci. Bioeng. V. 110: P. 201–207.
 30. Furner I.J., Sheikh M.A., Collett C.E. (1998) Gene silencing and homology-dependent gene silencing in Arabidopsis: genetic modifiers and DNA methylation. Genet. V. 149: P. 651–662.
 31. Gao C., Nielsen K. (2013) Comparison between Agrobacterium-mediated and direct gene transfer using the gene gun. Meth. Mol. Biol. V. 940: P. 3–16.
 32. Gleba Y., Tuse D., Giritch A. (2014) Plant viral vectors for delivery by Agrobacterium. Curr. Top. Microbiol. Immunol. V. 375: P. 155–192.
 33. Gleba Yu. Yu. (1998) Biotekhnologiya rasteniy. [Plant biotechnology]. Soros Education. J. N 6: P. 3–8.
 34. Gradoboeva A.E., Padkina M. V. (2008) Izuchenie vliyaniya produktsii geterologichnogo belka na fiziologicheskoe sostoyanie drozhzhey *Saccharomyces cerevisiae* i *Pichia pastoris*. [Analysis of the influence of heterologous protein production on physiological state of yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*]. Vestnik SPbGU. ser. 3. N. 2: P. 56–61.
 35. Grant V. (1989) Evolyutsionnyy protsess. [The evolutionary process]. Moscow: Mir.
 36. Hellwig S., Drossard J., Twyman R.M., Fischer R. (2004) Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. Nature Biotechnol. V. 22: P. 1415–1422.
 37. Herrera-Estrella L., Depicker A., van Montagu M., Schell J. (1983) Expression of chimeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. Nature V. 303: P. 209–213.
 38. Hiatt A., Cafferkey R., Bowdish K. (1989) Production of antibodies in transgenic plant. Nature. V. 342: P. 76–78.
 39. Higo K., Saito Y., Higo H. (1993) Expression of a chemically synthesized gene for human epidermal growth factor under the control of cauliflower mosa-

- ic virus 35S promoter in transgenic tobacco. Biosci. Biotech. Biochem. V. 57: P. 1477–1481.
40. Hood E., Witcher D., Maddock S. et al. (1997) Commercial production of avidin from transgenic maize: characterization of transformant, production, processing, extraction and purification. Mol. Breed. V. 3: P. 291–306.
 41. Horsh R. B., Fraley R. T., Rogers S. G. et al. (1984) Inheritance of functional foreign genes in plants. Science. V. 223: P. 496–498.
 42. Iglesias V. A., Moscone E. A., Papp I. et al. (1997) Molecular and cytogenetic analysis of stably and unstably expressed transgene loci in tobacco. Plant Cell. V. 9: P. 1251–1264.
 43. Katokhin A. V., Kuznetsova T. N., Omel'yanchuk N. A. (2006) miRNK — novye regulatory aktivnosti genov eukariot. [miRNAs novel regulator of gene activity in Eukaryotes]. Vestnik VOGiS. V. 10: P. 241–272.
 44. Ketlinskiy S. A., Simbirtsev A. S., Vorob'ev A. A. (1992) Endogennye immunomodulatory. [Endogenous immunomodulators]. SPb.: Hippocrates.
 45. Key S., Ma J. K. C., Drake P. M. W. (2008) Genetically modified plants and human health. J. R. Soc. Med. V. 101: P. 290–298.
 46. Kim T.-G., Yang M.-S. (2010) Current trends in edible vaccine development using transgenic plants. Biotechnol. Bioprocess Eng. V. 15: P. 61–65.
 47. Kong Q., Richter L., Yang Y. F. et al. (2001) Oral immunization with hepatitis B surface antigen expressed in transgenic plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 98: P. 11539–11544.
 48. Koprivova A., Stemmer C., Altmann F. et al. (2004) Targeted knockouts of Physcomitrella lacking plant-specific immunogenic N-glycans. Plant Biotechnol. J. V. 2: P. 517–523.
 49. Lambert C., Garvey M., Klinger J. et al. (2014) Challenges and advances in the heterologous expression of cellulolytic enzymes: a review. Biotechnol. Biofuels. V. 7: Art. 135.
 50. Lamphear B. J., Jilka J. M., Kest L. et al. (2004) A corn-based delivery system for animal vaccines: an oral transmissible gastroenteritis virus vaccine boosts lactogenic immunity in swine. Vaccine. V. 22: P. 2420–2424.
 51. Larrick J. W., Yu L., Naftzger C. et al. (2001) Production of secretory IgA antibodies in plants. Biomol. Eng. V. 18: P. 87–94.
 52. Linn F., Heidmann I., Saedler H., Meyer P. (1990) Epigenetic changes in the expression of the maize *Al* gene in *Petunia hybrida*: role of numbers of integrated copies and state of methylation. Mol. Gen. Genet. V. 222: P. 329–336.
 53. Luchakivskaya Yu., Kishchenko O., Gerasymenko I. et al. (2011) High-level expression of human interferon alpha-2b in transgenic carrot (*Daucus carota* L.) plants. Plant Cell Rep. V. 30: P. 407–415.
 54. Lutova L. A. (2010) Biotekhnologiya vysshikh rasteniy. [Higher plant biotechnology]. 2nd ed. St. Petersburg: SPSU publishing.
 55. Ma J. K., Drake P. M., Christou P. (2003) The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. Nat. Rev. Genet. V. 4: P. 794–805.
 56. Mason H. S., Lam D. M., Arntzen C. J. (1992) Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 89: P. 11745–11749.
 57. Matsumoto S., Ikura K., Ueda M., Sasaki R. (1995) Characterization of a human glycoprotein (erythropoietin) produced in cultured tobacco cells. Plant Mol. Biol. V. 27: P. 1163–1172.
 58. McCormick A. A., Kumagai M. H., Hanley K. et al. (1999) Rapid production of specific vaccines for lymphoma by expression of the tumor-derived single-chain Fv epitopes in tobacco plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 96: P. 703–708.
 59. Merle C., Perret S., Lacour T. et al. (2002) Hydroxylated human homotrimeric collagen I in *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transient expression and in transgenic tobacco plant. FEBS Lett. V. 515: P. 114–118.
 60. Meyer P., Linn F., Heidmann I. et al. (1992) Endogenous and environmental factors influence 35S promoter methylation of a maize *Al* gene construct in transgenic petunia and its colour phenotype. Mol. Gen. Genet. V. 231: P. 345–352.
 61. Miroshnikov P. N., Lebedev L. R., Tereshchenko T. A. et al. (2003) Razrabotka sposobov polucheniya interferona-gamma i ego mutantnogo analoga del'taferona. V [The elaboration of methods for the preparation of interferon-gamma and its mutant counterpart deltaferon]. Biotekhnologiya: sostoyanie i perspektivy razvitiya. V. 152: P. 78–82.
 62. Mittelsten S. O., Paszkowsky J., Potrykus I. (1991) Reverseable inactivation of a transgene in *Arabidopsis thaliana*. Mol. Gen. Genet. V. 228: P. 104–112.
 63. Morino K., Olsen O. A., Shimamoto K. (1999) Silencing of an aleurone-specific gene in transgenic rice is caused by a rearranged transgene. Plant J. V. 17: P. 275–285.
 64. Noh S. A., Lee H. S., Huh G. H. et al. (2012) A sweet potato SRD1 promoter confers strong root-, taproot-, and tuber-specific expression in Arabidopsis, carrot, and potato. Transgenic Res. V. 21: P. 265–278.
 65. Nykiforuk C. L., Boothe J. G., Murray E. W. et al. (2006) Transgenic expression and recovery of biologically active recombinant human insulin from Arabidopsis thaliana seeds. Plant Biotechnol. J. V. 4: P. 77–85.
 66. Obembe O. O., Popoola J. O., Leelavathi S., Reddy S. V. (2011) Advances in plant molecular farming. Biotechnol. Adv. V. 29: P. 210–222.
 67. Oksman-Caldentey K.-M., Inze D. (2004) Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce

- designer secondary metabolites. Trends Plant Sci. V. 9: P. 433–440.
68. Padkina M. V., Parfenova L. V., Gradoboeva A. E., Sambuk E. V. (2010) Heterologous interferons synthesis in yeast *Pichia pastoris*. Appl. Biochem. Microbiol. V. 46: P. 409–414.
 69. Parmenter D. L., Boothe J. G., van Rooijen G. J. H. et al. (1995) Production of biologically active hirudin in plant seeds using oleosin partitioning. Plant Mol. Biol. V. 29: P. 1167–1180.
 70. Pestka S., Langer J. A., Zoon K. C., Samuel C. E. (1987) Interferons and their actions. Ann. Rev. Biochem. V. 56: P. 727–777.
 71. Potula H. H. S. K., Kathuria S. R., Ghosh A. K. et al. (2008) Transient expression, purification and characterization of bioactive human fibroblast growth factor 8b in tobacco plants. Transgenic Res. V. 17: P. 19–32.
 72. Pridybaylo N. D. (1991) Immunodeficiency u sel'skokhozyaystvennykh zhivotnykh i ptits. Profilaktika i lechenie ikh immunostimulyatorami. [Immunodeficiencies in cattle and poultry. Prophylaxis and therapy by immunostimulators]. Moscow: VASKhNIL.
 73. Rance I., Norre F., Gruber V., Theisen M. (2002) Combination of viral promoter sequences to generate highly active promoters for heterologous therapeutic protein overexpression in plants. Plant Sci. V. 162: P. 833–842.
 74. Richter L. J., Thanavala Y., Arntzen C. J., Mason H. S. (2000) Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. Nat. Biotechnol. V. 18: P. 1167–1171.
 75. Ruggiero F., Exposito J. Y., Bournat P. et al. (2000) Triple helix assembly and processing of human collagen produced in transgenic tobacco plants. FEBS Lett. V. 469: P. 132–136.
 76. Rukavtsova E. B., Bur'yanov Ya. I., Shul'ga N. Ya., Bykov V. A. (2006) Transgennye rasteniya dlya farmakologii. [Transgenic plants for pharmacology]. Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii. N 2: P. 3–12.
 77. Sallaud C., Meynard D., van Boxtel J. et al. (2003) Highly efficient production and characterization of T-DNA plants for rice (*Oryza sativa* L.) functional genomics. Theor. Appl. Genet. V. 106: P. 1396–1408.
 78. Saveleva N. V., Kurdyukov I. D., Dudnik E. E. et al. (2009) Rasteniya-produksenty bych'ego gamma-interferona dlya profilaktiki tuberkuleza i leykemii krupnogo rogatogo skota. [Bioreactor plants for synthesis of bovine interferon-gamma for prophylaxis of cattle tuberculosis and leukemia]. Vestnik SPbGU. ser. 3. N. 4: P. 65–80.
 79. Saveleva N. V., Lutova L. A. (2010) Rasteniya — produksenty rekombinantnykh belkov meditsinskogo naznacheniya. Produksenty γ -interferona byka. [Bioreactor plants for synthesis of recombinant proteins of medicinal use. Production of bovine γ -interferon]. Saarbrücken: LAPLAMBERT Academic Publishing.
 80. Scheller J., Henggeler D., Viviani A., Conrad U. (2004) Purification of spider silk-elastin from transgenic plants and application for human chondrocyte proliferation. Transgenic Res. V. 13: P. 51–57.
 81. Schmulling T., Schell, J. (1993) Transgenic tobacco plants regenerated from leaf disks can be periclinal chimeras. Plant Mol. Biol. V. 21: P. 705–708.
 82. Schroder K., Hertzog P. J., Ravasi T., Hume D. A. (2004) Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. J. Leukoc. Biol. V. 75: P. 163–189.
 83. Shaaltiel Y., Bartfeld D., Hashmueli S. et al. (2007) Production of glucocerebrosidase with terminal mannose glycans for enzyme replacement therapy of Gaucher's disease using plant cell system. Plant Biotechnol. J. V. 5: P. 579–590.
 84. Sharma A. K., Sharma M. K. (2009) Plants as bioreactors: Recent developments and emerging opportunities. Biotechnology Advances. V. 27: P. 811–832.
 85. Shulga N. Ya., Rukavtsova E. B., Krymsky M. A. et al. (2004) Expression and characterization of Hepatitis B surface antigen in transgenic potato plants. Biochemistry (Moscow). V. 69: P. 1158–1164.
 86. Sijmons P. C., Dekker B. M., Schrammeijer B. et al. (1990) Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. Biotechnol. (NY). V. 8: P. 217–221.
 87. Simbirtsev A. S. (2013) Dostizheniya i perspektivy ispol'zovaniya rekombinantnykh tsitokinov v klinicheskoy praktike. [Achievements and prospects for the use of recombinant cytokines in clinical practice]. Meditsinskiy akademicheskij zhurnal. V. 13: P. 7–22.
 88. Sirko A., Vanek T., Gora-Sochacka A., Redkiewicz P. (2011) Recombinant cytokines from plants. Int. J. Mol. Sci. V. 12: P. 3536–3552.
 89. Smith M. L., Mason H. S., Shuler M. L. (2002) Hepatitis B surface antigen (HBsAg) expression in plant cell culture: Kinetics of antigen accumulation in batch culture and its intracellular form. Biotechnol. Bioeng. V. 80: P. 812–822.
 90. Stam M., Viterbo A., Mol J. N. M., Kooter J. M. (1998) Position-dependent methylation and transcriptional silencing of transgenes in inverted T-DNA repeats: implications for posttranscriptional silencing of homologous host genes in plant. Mol. Cell. Biol. V. 18: P. 6165–6177.
 91. Staniek A., Bouwmeester H., Fraser P. D. et al. (2013) Natural products — modifying metabolite pathways in plants. Biotechnol. J. V. 8: P. 1159–1171.
 92. Stiles A., Liu C. (2013) Hairy root culture: bioreactor design and process intensification. Adv. Biochem. Engineer. Biotechnol. V. 134: P. 91–114.

93. Stoger E., Vaquero C., Torres E. et al. (2000) Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies. *Plant Mol Biol.* V. 42: P. 583–590.
94. Tacket C. O., Mason H. S., Losonsky G. et al. (1998) Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato. *Nat. Med.* V. 4: P. 607–609.
95. Tacket C. O., Mason H. S., Losonsky G. et al. (2000) Human immune responses to a novel norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes. *J. Infect. Dis.* V. 182: P. 302–305.
96. Terashima M., Murai Y., Kawamura M. et al. (1999) Production of functional human α 1-antitrypsin by plant cell culture. *Appl. Microbiol. Biotech.* V. 52: P. 516–523.
97. Thanavala Y., Mahoney M., Pal S. et al. (2005) Immunogenicity in humans of an edible vaccine for hepatitis B. *Ibid.* V. 102: P. 3378–3382.
98. Thanavala Y., Yang Y.F., Lyons P. et al. (1995) Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 92: P. 3358–3361.
99. Thomas B. R., Deynze A. V., Bradford K. J. (2002) Production of therapeutic proteins in plants. *Agricultural biotechnology in California series.* 342 p.
100. Trexler M. M., McDonald K. A., Jackman A. P. (2002) Bioreactor production of human 1-antitrypsin using metabolically regulated plant cell cultures. *Biotechnol. Prog.* V. 18: P. 501–508.
101. Trimble R. B., Atkinson P. H., Tschopp R. R., Maley F. (1991) Structure of oligosaccharides on *Saccharomyces* SUC2 invertase secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J. Biol. Chem.* V. 266: P. 22807–22817.
102. Tsygankov M. A., Zobnina A. E., Padkina M. V. (2014) Synthesis of recombinant gamma interferons resistant to proteolysis in the yeast *Pichia pastoris*. *Appl. Biochem. Microbiol.* V. 50: P. 387–393.
103. Vandekerckhove J., Van Damme J., Van Lijsebettens M. et al. (1989) Enkephalins produced in transgenic plants using modified 2S seed storage proteins. *BioTechnology.* V. 7: P. 929–932.
104. Veluthambi K., Jayaswal R. K., Gelvin S. B. (1987) Virulence genes *A*, *G*, and *D* mediate the double-stranded border cleavage of T-DNA from the *Agrobacterium* Ti plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 84: P. 1881–1885.
105. Vesosky B., Turner O. C., Turner J., Orme I. M. (2004) Gamma interferon production by bovine gamma delta T cells following stimulation with mycobacterial mycolylarabino galactan peptidoglycan. *Infection and immunity.* V. 72: P. 4612–4618.
106. Weise A., Altmann F., Rodriguez-Franco M. et al. (2007) High-level expression of secreted complex glycosylated recombinant human erythropoietin in the *Physcomitrella* Δ -fuc-*t* Δ -xyl-*t* mutant. *Plant Biotechnol. J.* V. 5: P. 389–401.
107. Woodard S. L., Mayor J. M., Bailey M. R. et al. (2003) Maize (*Zea mays*)-derived bovine trypsin: characterization of the first large-scale, commercial protein product from transgenic plants. *Biotechnol. Appl. Biochem.* V. 38: P. 123–130.
108. Yang D. C., Guo F. L., Liu B. et al. (2003) Expression and localization of human lysozyme in the endosperm of transgenic rice. *Planta.* V. 216: P. 597–603.
109. Yu J., Langridge W. H. (2001) A plant-based multi-component vaccine protects mice from enteric diseases. *Nat. Biotechnol.* V. 19: P. 548–552.
110. Zeitlin L., Olmsted S. S., Moench T. R. et al. (1998) A humanized monoclonal antibody produced in transgenic plants for immunoprotection of the vagina against genital herpes. *Nat. Biotechnol.* V. 16: P. 1361–1364.
111. Zhong G.-Y., Peterson D., Delaney D. E. et al. (1999) Commercial production of aprotinin in transgenic maize seeds. *Mol. Breed.* V. 36: P. 345–356.

✳ Информация об авторах

Савельева Наталья Владимировна — к. б. н., доцент, Lab. UMR 1136 Interactions of Plant/Micro-organisms. INRA. 54280, Champenoux, route d'Amance, France. E-mail: nata.saveljeva@gmail.com.

Бурлаковский Михаил Сергеевич — аспирант, кафедра генетики и биотехнологии. СПбГУ. 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9. E-mail: burmish@yandex.ru.

Емельянов Владислав Владимирович — к. б. н., доцент, кафедра генетики и биотехнологии. СПбГУ. 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9. E-mail: bootika@mail.ru.

Лутова Людмила Алексеевна — д. б. н., профессор, кафедра генетики и биотехнологии. СПбГУ. 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9. E-mail: la.lutova@gmail.com.

Saveleva Natalia Vladimirovna — Lab. UMR 1136 Interactions of Plant/Micro-organisms. INRA. 54280, Champenoux, route d'Amance, France. E-mail: nata.saveljeva@gmail.com.

Burlakovskiy Mikhail Sergeevich — Dept. Of Genetics and Biotechnology. St. Petersburg State University. 199034, Saint Petersburg, Universitetskaya nab., 7/9, Russia. E-mail: burmish@yandex.ru.

Yemelyanov Vladislav Vladimirovich — Dept. Of Genetics and Biotechnology. St. Petersburg State University. 199034, Saint Petersburg, Universitetskaya nab., 7/9, Russia. E-mail: bootika@mail.ru.

Lutova Lyudmila Alekseevna — Dept. Of Genetics and Biotechnology. St. Petersburg State University. 199034, Saint Petersburg, Universitetskaya nab., 7/9, Russia. E-mail: la.lutova@gmail.com.