

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ
ІНЖЕНЕРІЇ**

**СІНДАРОВСЬКА
Яна Рудольфівна**

УДК 57.084.1 + 582.926.2 + 577.21

***AGROBACTERIUM*-ОПОСЕРЕДКОВАНА ТРАНЗІЄНТНА
ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ РЕКОМБІНАНТНИХ БІЛКІВ (GFP, β -
ГЛЮКУРОНІДАЗИ ТА ІНТЕРФЕРОНУ АЛЬФА 2b) В РОСЛИНАХ
РОДУ *NICOTIANA* L.**

03.00.20 – біотехнологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2009 Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі генетичної інженерії Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, м. Київ

Науковий керівник: член-кор. НАН України, доктор біологічних наук, професор
Кучук Микола Вікторович
Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,
в/о директора Інституту

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук
Галкін Анатолій Павлович
Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії
НАН України, завідувач
відділу біоінженерії

доктор біологічних наук
Дубровна Оксана Василівна
Інститут фізіології рослин та генетики
НАН України,
старший науковий співробітник відділу
генетичних основ гетерозису

Захист дисертації відбудеться “29” жовтня 2009 р. об 11 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д.26.202.01 при Інституті клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адресою: 03680, м. Київ, вул. Заболотного 148.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адресою: 03680, м. Київ, вул. Заболотного 148.

Автореферат розісланий “29” вересня 2009 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук

Кравець О.А.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Рослинні системи мають великий потенціал для продукції рекомбінантних білків. Культивування або вирощування багатьох видів рослин не вимагає значних витрат, рослини вільні від бактеріальних ендотоксинів, тваринних вірусів, онкогенних послідовностей та пріонів, в рослинах відбуваються посттрансляційні модифікації білків [Gomord and Faye, 2004], отже, такі системи експресії генів можуть скласти альтернативу бактеріальним системам та культурі клітин ссавців. Отримання рекомбінантних білків в рослинах можливе шляхом створення трансформантів зі стабільною продукцією чужорідних білків або шляхом тимчасового накопичення цільових білків, яке відбувається без вбудовування трансгену в геном рослини (“транзйєтна експресія”).

Трансгенні рослини здатні накопичувати цільові білки у різних органах: листках, коренях, плодах та насінні. Основним недоліком трансгенозу є довгий час (місяці, роки) отримання трансформантів та відбір найкращих ліній продуцентів. Також в ряді країн світу вирощування трансгенних рослин має певні упередження.

Більш швидкий метод отримання рекомбінантного білка - транзйєтна експресія. Метод дозволяє отримати цільовий білок протягом 2-21 днів після введення трансгену. Такий спосіб не призводить до створення трансгенних рослин, і, таким чином, трансген не може потрапити в навколишнє середовище через перехресне запилення між близькими видами; також робота з нетрансгенними організмами не матиме проблем із сертифікацією рослин.

Більш того, метод транзйєнтної експресії має потенціал для масштабної продукції рекомбінантних білків, разом з тим попередні дослідження показали, що у багатьох випадках початковий вміст деяких цільових білків, отриманих шляхом транзйєнтної експресії трансгенів, був низьким для накопичення їх у препаративних кількостях [наприклад, Kumagai et al., 2003, Varsani et al., 2006]. Тому актуальним завданням залишається пошук факторів, які могли б підвищити вміст рекомбінантних білків при транзйєнтній експресії.

Створення високоефективних генетичних конструкцій є необхідною, проте недостатньою умовою для отримання максимальної кількості цільового білка.

Можливість впливу біологічних, фізичних та хімічних факторів на ефективність транзійтної експресії обговорювалась у наукових публікаціях [наприклад, Dillen et al., 1997, Wroblewski et al., 2005], але на даний момент бракує прикладів системного дослідження впливу різних факторів на продукцію рекомбінантних білків. Існують також фактори, вплив яких на транзійтну експресію припускається, але не підтверджений експериментально.

Ефект впливу може залежати також від характеристик цільового гена/ білка або виду рослини-продуцента: зважаючи на те, що створені людиною генетичні конструкції працюють не в штучному середовищі, а в живих гетерогенних організмах (рослинах), які наділені своїми власними особливостями, мають свої системи захисту проти трансгенів та вірусів, більш або менш стійкі до впливу факторів зовнішнього середовища, навряд варто сподіватися, що одна і та сама генетична конструкція буде високоефективною в будь-якому випадку. І навіть удосконалена генетична конструкція може не в повній мірі розкривати свій потенціал, якщо умови будуть не оптимальними для експресії цільового гена. Так, наприклад, більшість фармацевтично-цінних білків людини отримують в рослинах *Nicotiana tabacum* та *N. benthamiana*, нехтуючи при цьому багатьма іншими видами рослин, навіть цього ж роду, які можуть виявитися більш зручною системою для отримання рекомбінантних білків.

Отже, визначення чинників, які впливають на *Agrobacterium*-опосередковану транзійтну експресію та накопичення рекомбінантних білків дозволить підвищити вміст цільового продукту, завдяки максимальній реалізації потенціалу використаної експресійної системи.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалась в рамках бюджетних науково-дослідних робіт відділу генетичної інженерії Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України: “Створення нових генетичних конструкцій та отримання на їх основі трансгенних рослин методами пластомної та генетичної інженерії за допомогою високоефективних методів трансформації” (№ державної реєстрації 0102U006018), “Одержання препаративних кількостей фармакологічно-цінних білків людини

шляхом їх транз'єнтної експресії в рослинних системах” (№ державної реєстрації 0104U007551), “Підсилення транз'єнтної експресії фармацевтично-цїнних бїлків людини в рослинах за допомогою фїтогормонів та супресорів жасмонат-опосередкованої стресової реакції” (№ державної реєстрації 0105U005311), “Отримання бїлків тваринного та мїкробного походження шляхом транз'єнтної експресії *in planta*” (№ державної реєстрації 0107U004771), “Вивчення поведїнки перенесених генетичних маркерів у трансгенних рослин з цїнними агрономїчними та фармацевтичними властивостями” (№ державної реєстрації 0107U002734).

Мета і задачі дослідження. Метою роботи було розробити та оптимїзувати умови для отримання рекомбїнантних бїлків у рослинах методом *Agrobacterium*-опосередкованої транз'єнтної експресії.

Для досягнення мети необхідно було вирїшити наступні завдання:

1. Визначити та вїдїбрати новї види-продуценти з високими рївнями транз'єнтної експресії та накопичення репортерного бїлка GFP серед представникїв роду *Nicotiana*.
2. Отримати культуру “hairy roots” *N. benthamiana*, провести регенерацію з культури “hairy roots” трансгенних рослин зї змїненим гормональним балансом та оцїнити можливість використання таких рослин для отримання рекомбїнантних бїлків шляхом транз'єнтної експресії.
3. Визначити стадїю розвитку рослини та вїк листкїв рослини, найкращї для накопичення рекомбїнантних бїлків, на прикладї бїлка GFP.
4. Визначити вплив екзогенних речовин (фїтогормонів, метилжасмонату та їнгїбїторїв його бїосинтезу) і вїрусного супресора сайленсїнгу генїв на накопичення репортерного бїлка GFP.
5. Розробити умови очищення GFP їз сумарного бїлкового екстракту рослинної тканини.
6. В оптимальних умовах отримати в рослинах рекомбїнантні бїлки β -глюкуронїдазу та їнтерферон альфа 2b, довести наявнїсть даних бїлків в рослинних екстрактах та визначити їхню активнїсть.

Об'єкт дослідження – *Agrobacterium*-опосередкована транзйентна експресія в рослинах.

Предмет дослідження – фактори, які підвищують вміст рекомбінантного білка при транзйентній експресії чужорідних генів в рослинах.

Методи дослідження. Інфільтрація рослин за допомогою суспензії *Agrobacterium tumefaciens* в умовах *in planta*. Визначення вмісту білка GFP в рослинних екстрактах спектрофлуориметричним методом та методом електрофоретичного розділення білків в ПААГ, вмісту сумарних розчинних білків - за методом Бредфорда, активності β -глюкуронідази – методом гістохімічного аналізу. Отримання трансгенних рослин *Nicotiana benthamiana* методом генетичної трансформації з використанням *A. rhizogenes*. Наявність трансгенів в геномі рослин підтверджували методом ПЛР. Очищення GFP проводили шляхом преципітації білків сульфатом амонію та іонообмінної хроматографії на колонках. Біологічну активність інтерферону визначали методом титрування.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше проведено відбір нових видів-продуцентів, серед представників роду *Nicotiana*, перспективних для отримання рекомбінантних білків методом *Agrobacterium*-опосередкованої транзйентної експресії з використанням різних типів векторних систем.

Вперше показано, що вид *N. excelsior* має кращі показники, ніж *N. benthamiana* та *N. tabacum* для накопичення репортерного білка GFP при транзйентній експресії з використанням різних експресійних векторних систем.

Вперше показано транзйентну експресію гена *GFP* під контролем 35S промотору вірусу мозаїки цвітної капусти у видах *N. cavicola* та *N. exigua* і встановлено, що рівень накопичення рекомбінантного білка в них можна зіставити з рівнями накопичення рекомбінантного білка у видах *N. benthamiana* та *N. tabacum*.

Вперше отримано культуру бородатих коренів *N. benthamiana* та розроблено систему регенерації рослин із трансгенних коренів *N. benthamiana*.

Вперше доведено вплив стадії розвитку рослини та віку листків рослини на накопичення білка GFP при транзйентній експресії відповідного гена.

Доведено вплив вірусного супресора сайленсингу p19 на накопичення репортерного білка GFP при транз'єнтній експресії відповідного гена у складі високоефективної модульної рекомбіназної векторної системи.

Вперше досліджено вплив фітогормонів групи ауксинів і цитокінінів, метилжасмонату та супресорів його біосинтезу на накопичення репортерного білка GFP при транз'єнтній експресії з використанням різних векторних систем.

Практичне значення одержаних результатів. Запропонований нами протокол підвищення вмісту рекомбінантних білків у рослинах шляхом підбору оптимальних умов для транз'єнтної експресії трансгенів є достатньо простим, широкодоступним та не вимагає значних витрат часу та коштів, а також має можливості для подальшого удосконалення.

Продемонстровано можливість отримання рекомбінантних білків у нових видах-продуцентах - *N. excelsior*, *N. cavicola* та *N. exigua*. Вміст репортерного білка в рослинах цих видів був не менший, або навіть вищий, ніж вміст репортерного білка, який спостерігали при транз'єнтній експресії відповідного гена в модельних видах *N. benthamiana* та *N. tabacum*. Оскільки саме *N. benthamiana* та *N. tabacum* часто використовуються для отримання фармацевтично-цінних білків методом транз'єнтної експресії, застосування нових видів-продуцентів може підвищити кінцевий вміст цільового білка при використанні тих самих генетичних конструкцій. Додатково підвищити кількість цільового білка дозволить вибір оптимальної для транз'єнтної експресії стадії розвитку рослини, а також інфільтрація листків, найбільш придатних для накопичення рекомбінантного білка.

Отримані нами дані про позитивний вплив супресора сайленсингу p19 на накопичення репортерного білка, ген якого знаходився у складі модульної рекомбіназної векторної системи, можуть бути використані для підвищення рівня накопичення інших білків, гени яких входять до цієї ж системи експресії.

Розроблений протокол очищення рекомбінантного GFP може бути використаний для отримання стандартного білка.

Нами показано, що в рослинах *N. excelsior* можна отримати людський лейкоцитарний інтерферон альфа 2b, який має біологічну активність. Таким чином,

даний спосіб може бути розглянутий як альтернатива “класичному” мікробіологічному способу отримання рекомбінантного інтерферону.

Особистий внесок здобувача. Особистий внесок здобувача полягає в розробці завдань досліджень, в плануванні та проведенні експериментів, обробці отриманих даних та їх інтерпретації, аналізі літературних джерел, написанні наукових статей та деклараційного патенту. Частка особистої участі дисертанта складає понад 80%.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень доповідалися на Установчому з'їзді Українського товариства клітинної біології (квітень 2004 р., м. Львів, Україна); XIV конгресі Європейського товариства рослинної біології (серпень 2004 р., м. Краків, Польща); 6-му Міжнародному симпозиумі “Сучасні досягнення у рослинній біотехнології: від лабораторії до бізнесу” (2005 р., м. Чеські Будейовіці, Чеська Республіка); XV конгресі Європейського товариства рослинної біології (липень 2006 р., м. Ліон, Франція); з'їзді членів Українського товариства генетиків та селекціонерів (2007 р., м. Алушта, Україна), а також на семінарах відділу генетичної інженерії Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України (м. Київ, Україна).

Структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 193 сторінках друкованого тексту, складається із вступу, трьох розділів (огляд літератури, матеріали та методи досліджень, результати досліджень та їх обговорення), узагальнень, висновків і списку використаних джерел, який налічує 272 найменування. Робота містить 54 ілюстрацій і 2 таблиці.

Публікації. За результатами дисертації опубліковано 10 наукових праць, з них 3 статті у фахових журналах та 1 деклараційний патент на корисну модель.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

В огляді літератури викладено узагальнену інформацію про накопичення рекомбінантних білків в гетерологічних системах, зокрема, в рослинах, про особливості транз'єнтної експресії трансгенів та способи введення чужорідної ДНК у рослинну клітину; способи підвищення вмісту рекомбінантних білків при транз'єнтній експресії; а також наводиться інформація про ряд фармацевтично-цінних білків, отриманих шляхом транз'єнтної експресії генів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Рекомбінантні білків в рослинах роду *Nicotiana* отримували шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої транз'єнтної експресії генів, використовуючи два типи векторних систем. Були обрані австралійські представники роду *Nicotiana*: *N.*

benthamiana, *N. cavicola*, *N. debneyi*, *N. excelsior*, *N. exigua*, *N. maritima*, *N. simulans*, а також тютюн *N. tabacum* cv. Wisconsin 38.

У роботі використовували бінарні векторні конструкції, що знаходились в *Agrobacterium tumefaciens* (для дослідження транз'єнної експресії) та *A. rhizogenes* (для стабільної трансформації експлантів рослин *N. benthamiana*). Для накопичення рекомбінантних білків шляхом транз'єнної експресії використовували дві системи. Перша, **35S- система**, містила цільовий ген під контролем 35S промотору вірусу мозаїки цвітної капусти. Друга, **модульна рекомбіназна система**, складалася із векторів (модулів) на основі вірусного геному. Експресія цільового гена відбувалась в результаті взаємодії трьох модулів, які опинялись в ядрі однієї клітини. Дія сайт-специфічної рекомбінази бактеріофагу Phi C31 викликала збирання 3' та 5' модулів, завдяки наявності у цих генетичних конструкціях відповідних сайтів рекомбінації. Після об'єднання 3' та 5' модулів утворювався повноцінний транскрипт. В якості цільових використали гени зеленого флуоресцентного білка медузи (GFP) (основна група експериментів), ген *uidA* (кодує фермент β -глюкуронідазу) та ген, який кодує інтерферон альфа 2b людини.

Стерилізоване та пророщене насіння дослідних рослин вирощували в тепличних умовах при 22-26 °C, 14-годинному освітленні (3000-4500 люкс).

Бактеріальну суспензію вирощували на рідкому середовищі LB pH 7,0 [Маниатис, 1984], з додаванням відповідних антибіотиків, при 26 °C в інкубаційному шейкері (180-200 об./хв.) протягом доби. Свіжонарощену культуру агробактерій осаджували та ресуспендували в ін'єкційному буфері [Liu and Lomonosoff, 2002] ($OD_{600}=2,0$ оптичні одиниці). Бактеріальні сублінії, що входили до складу модульної рекомбіназної системи, попередньо змішували у рівних співвідношеннях. До кожної системи, якщо не зазначене інше, додавали бактерії, що несли вектор з геном білка p19 (супресором сайленсингу генів) у рівній пропорції. У випадках, де це зазначається, до ін'єкційного буфера додавали екзогенні агенти (метилжасмонат, інгібітори синтезу жасмонатів, фітогормони) у відповідній концентрації. Інфільтрацію рослин проводили за методом [Schob et al., 1997] з модифікаціями [Sparkes et al., 2006]. Після проведення інфільтрації рослини повертали в теплицю.

Рослинний матеріал збирали на 4 (при використанні 35S- системи) або 18 (при використанні модульної рекомбіназної системи) добу після інфільтрації.

Накопичення GFP контролювали в умовах *in planta* за допомогою лампи з довгохвильовим УФ світлом (hand-held black ray lamp). Екстракцію сумарних розчинних білків проводили у фосфатному буфері або трисовому буфері.

Концентрацію сумарних розчинних білків в екстракті визначали за методом Бредфорда [Bradford, 1976], використовуючи БСА як стандарт.

Кількісний вміст білка GFP в пробах визначали, вимірюючи інтенсивність його флуоресценції при довжині хвилі збудження – 395 нм та випромінювання – 509 нм та порівнюючи ці значення зі стандартними розведеннями GFP.

Трансформацію рослин *N. benthamiana* проводили на агаризованому живильному середовищі. Листкові експланти кокультивали з *A. rhizogenes*, переносили на середовище MS [Murashige and Skoog, 1962] без антибіотиків та інкубували 24 години при 25 °C. Через добу експланти відмивали та переносили на

середовище MS без фітогормонів з антибіотиками. Після елімінації бактерії культура бородатих коренів росла на середовищі MS без фітогормонів з селективним антибіотиком. Регенерацію рослин проводили на середовищі MS з селективним антибіотиком та з додаванням певних комбінацій фітогормонів. Трансгенність культури коренів та регенерантів підтверджували ПЛР аналізом.

Електрофоретичне розділення білкових екстрактів проводили в 12% поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію [Sambrook et al., 1989].

Очищення GFP із сумарного білкового екстракту проводили шляхом преципітації білків сульфатом амонію та хроматографічним очищенням на аніонообмінній колонці з Q-сефарозою.

Для титрування інтерферону за основу використовували методику [Rubinstein et al., 1981] з незначними модифікаціями [Белоцкий, Спивак, 2006].

Активність ферменту β -глюкуронідази визначали гістохімічною реакцією.

Для статистичної обробки даних використовували середнє квадратичне відхилення та *t*-критерій Ст'юдента [Лакин, 1990].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вибір оптимального виду рослин для отримання рекомбінантних білків шляхом транз'єнтної експресії генів серед австралійських представників роду *Nicotiana*. Вміст рекомбінантного GFP у обраних представників роду *Nicotiana* порівнювали з вмістом GFP у видах *N. benthamiana* та *N. tabacum* cv. Wisconsin 38, які вважаються модельними об'єктами для проведення транз'єнтної експресії.

1. Накопичення GFP в рослинах роду *Nicotiana* при використанні 35S векторної системи експресії. GFP був помічений у всіх досліджених видах, проте, найбільший його вміст спостерігали у видах *N. cavicola*, *N. excelsior* та *N. exigua* ($6,0 \pm 1,5\%$; $3,7 \pm 1,7\%$; $3,1 \pm 1,2\%$ сумарних розчинних білків (СРБ), відповідно). В перерахунку на рослинну біомасу це складатиме: $0,44 \pm 0,14$; $0,24 \pm 0,11$; $0,11 \pm 0,05$ мг GFP/ г сирової ваги (СВ) листа, відповідно. Інші види накопичували репортерний білок у незначних кількостях. Відсотковий вміст GFP у видах *N. excelsior* та *N. exigua* можна зіставити з вмістом GFP у видах *N. benthamiana* ($3,8 \pm 1,3\%$) та *N. tabacum* ($2,6 \pm 1,2\%$), а для виду *N. cavicola* показано достовірне збільшення вмісту GFP в порівнянні з *N. benthamiana* ($P < 0,05$) та *N. tabacum* ($P < 0,001$).

Результати досліджень демонструють перспективність використання для накопичення рекомбінантних білків при транз'єнтній експресії не лише модельних видів, але й інших видів, а саме *N. cavicola*, *N. excelsior* та *N. exigua*.

2. Накопичення GFP в рослинах роду *Nicotiana* при використанні модульної рекомбіназної системи експресії. Ефективність транз'єнтної експресії при використанні модульної рекомбіназної системи варіювала в залежності від обраного виду. Для видів *N. excelsior* та *N. benthamiana* застосування модульної системи достовірно підвищило вміст GFP: $63,5 \pm 27,4\%$ та $16,2 \pm 5,7\%$ від СРБ, відповідно, у порівнянні з вмістом GFP, отриманим при використанні 35S- системи ($P < 0,001$). Для виду *N. cavicola* вміст репортерного білка становив $12,6 \pm 6,5\%$ СРБ, для виду *N. simulans* - $5 \pm 2,9\%$ СРБ, для виду *N. exigua* - $0,5 \pm 0,17\%$ СРБ, в інших видах

інтенсивність флуоресценції дослідної групи не перевищувала фонову флуоресценцію контролю.

Необхідно зазначити, що одним із наслідків використання модульної рекомбіназної системи, що характеризується більш пролонгованим часом накопичення GFP, є зниження загального рівня СРБ у клітині. Для всіх обраних видів показано, що вміст СРБ в екстрактах, отриманих через 4 дні після інфільтрації (35S- система експресії), був достовірно вищим ($P < 0,01$) ніж вміст СРБ в екстрактах, отриманих через 15-18 днів після інфільтрації (модульна рекомбіназна система). Можна припустити, що саме зниження СРБ, на фоні продовження накопичення репортерного білка, є основною причиною збільшення процентного вмісту GFP у видів *N. cavicola*, *N. simulans* та *N. benthamiana*, а також відіграє не останню роль в підвищенні відсотка GFP у виду *N. excelsior*.

Вміст GFP для видів *N. excelsior*, *N. cavicola* та *N. simulans* у перерахунку на одиницю ваги склав відповідно: $1,5 \pm 0,76$; $0,44 \pm 0,22$ та $0,11 \pm 0,05$ мг GFP/ г СВ листа, а для виду *N. benthamiana* цей показник становив $0,37 \pm 0,12$ мг GFP/ г СВ листа. Незважаючи на зменшення кількості СРБ, вміст GFP в перерахунку на СВ при використанні модульної рекомбіназної системи експресії зріс для видів *N. excelsior* ($P < 0,01$) та *N. simulans* ($P < 0,05$) у порівнянні з вмістом GFP, отриманим при використанні 35S- системи експресії.

Для біотехнологічного виробництва рекомбінантних білків характеристики самої рослини мають важливе значення. Відбір за ознакою листової біомаси рослин проводили серед видів які демонстрували високий вміст GFP при транзійтній експресії (табл. 1).

Таблиця 1.

Оцінка біотехнологічних характеристик видів з високим рівнем накопичення

GFP при транзійтній експресії (в умовах оранжереї).

Вид рослини	Середня вага листка, г	Кількість листків з рослини, придатних для експресії	Біомаса листків рослини, г
<i>N. excelsior</i>	3,66 ± 1,15	4	14,6 ± 4,6
<i>N. exigua</i>	1,06 ± 0,16	5	5,3 ± 0,8
<i>N. cavicola</i>	1,18 ± 0,36	3	3,5 ± 0,9
<i>N. benthamiana</i>	0,53 ± 0,14	5	2,7 ± 0,3

Співставлення даних таблиці з даними щодо кількості GFP на одиницю СВ (мг/г), дозволяє оцінити ефективність використання окремої рослини виду для отримання рекомбінантного білка шляхом транз'єнтної експресії.

Отже, при використанні 35S- векторної системи, в середньому з однієї рослини *N. excelsior* можна отримати 2,77 мг GFP, з рослини *N. cavicola* – 1,54 мг, *N. exigua* – 0,69 мг та *N. benthamiana* – 0,51 мг. При використанні модульної рекомбіназної системи з однієї рослини *N. excelsior* можна отримати набагато більше рекомбінантного білка – в середньому 21,75 мг. Для рослин видів *N. benthamiana* та *N. cavicola* середня кількість GFP у перерахунку на рослину залишається практично незмінною (0,99 мг та 1,69 мг, відповідно), проте його відносна кількість збільшується, що важливо для подальшого очищення.

Наведені дані свідчать про те, що серед досліджених представників роду *Nicotiana* найбільш оптимальними рослинами-продуцентами рекомбінантного білка GFP, отриманого шляхом транз'єнтної експресії, виявились види *N. excelsior* та *N. benthamiana*. Вид *N. exigua* може бути альтернативним продуцентом у випадку використання 35S- векторних систем. В якості альтернативного продуцента рекомбінантних білків при транз'єнтній експресії трансгену також може бути використаний вид *N. cavicola*, особливо при використанні 35S- векторних систем. Показано, що вид *N. tabacum* cv. Wisconsin 38 виявився неприйнятним для накопичення репортерного білка, ген якого входив до складу модульної рекомбіназної системи експресії.

Отримання рослин *Nicotiana benthamiana* шляхом регенерації з трансгенних коренів “hairy roots”. Вид *N. benthamiana* демонструє високі рівні накопичення рекомбінантного білка при транз'єнтній експресії (до 5 мг GFP/ г СВ [Marillonnet et al., 2004]), проте має невелику біомасу листків.

З метою покращення біотехнологічних характеристик даного виду, таких як маса рослини та рівень цільових білків при транз'єнтній експресії, ми провели трансформацію експлантів *N. benthamiana* агробактерією *A. rhizogenes*, отримали культуру бородатих коренів “hairy roots” та регенерували з неї трансгенні рослини (TR0).

Корінці з'явилися на 10-12 добу після проведення кокультивації експлантів з *A. rhizogenes* штам А4. Після елімінації бактерії корені відокремили від експлантів та перенесли на безгормональне середовище MS з додаванням селективного агенту канаміцину. Були відібрані лінії, які інтенсивно росли та виявляли фенотипові

ознаки культури бородатих коренів. ПЛР аналіз підтвердив наявність *rolB* (відіграє важливу роль у становленні фенотипу бородатих коренів) та *nptII* (селективний маркер) трансгенів.

З метою регенерації рослин трансформовані корені культивувались при освітленні на середовищі MS без фітогормонів або з додаванням певних комбінацій фітогормонів. Найкращі результати досягнуті на середовищі MS з додаванням бензиламінопурина (1 мг/л) та індолілоцтової кислоти (0,1 мг/л). Появу регенерантів на згаданому середовищі спостерігали через 40-45 днів.

Молоді регенеранти відокремлювали та переносили на середовище MS з канаміцином без фітогормонів. Трансформовані рослини (TR0) відрізнялись від рослин дикого типу вкороченими міжвузлями, потовщеним стеблом, товстими та скрученими листками та добре розвиненою кореневою системою.

Деякі рослини (TR0) *in vitro* утворили квітки, самозапилились та зав'язали насіння. З метою порівняння загальної біомаси рослин, насіння трансгенних рослин та насіння контрольних рослин *N. benthamiana* було одночасно пророщене в умовах *in vitro*.

Через два місяці була перевірена наявність гена *rolB* у першому поколінні (TR1) трансгенних рослин та порівняна біомаса дорослих дослідних (TR1) та контрольних рослин. Як показав ПЛР аналіз, при самозапиленні TR0 рослин утворилось гетерогенне насіння.

Порівняння маси рослин трьох категорій (контрольні рослини, TR1 нащадки регенерантів, які несли трансген, та TR1 нащадки без трансгену) довело, що рослини, які несли ген *rolB*, мали майже вдвічі більшу біомасу в умовах *in vitro*, ніж контрольні рослини або TR1 рослини без трансгену ($P < 0,05$): $2,6 \pm 1,9$ г, $1,2 \pm 0,8$ г, і $1,0 \pm 0,8$ г, відповідно.

Частина насіння трансгенних рослин (TR0) була пророщена та висаджена в ґрунт. Через 2 місяці рослини використали для отримання репортерного білка шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої транз'єнтної експресії з використанням 35S-експресійної системи. Показано, що відсотковий вміст GFP у трансгенних рослин склав $3,2 \pm 1,3\%$ СРБ, а у контрольних рослин – $3,8 \pm 1,3\%$ СРБ.

Описаний підхід дозволив отримати трансгенні рослини *N. benthamiana* з біомасою, що перевищує таку у рослин дикого типу в умовах *in vitro*, при цьому вміст рекомбінантного білка при транз'єнтній експресії залишився незмінним.

Визначення оптимальної стадії розвитку рослини для накопичення рекомбінантних білків шляхом транз'єнтної експресії. Для дослідження впливу стадії розвитку рослини на експресію гена *GFP* у складі різних експресійних систем та визначення стадії, оптимальної для накопичення рекомбінантних білків, ми використовували вид *N. benthamiana*. Були обрані рослини, які знаходились на трьох різних стадіях розвитку: молоді рослини з 6-8 листками, дорослі рослини перед цвітінням (10 листків) та рослини, які інтенсивно цвітуть (12-14 листків).

При використанні 35S- системи накопичення репортерного білка спостерігали на всіх трьох стадіях розвитку рослин: $1,9 \pm 0,05\%$ СРБ – у молодих рослин; $3,8 \pm 1,3\%$ СРБ – у дорослих рослин перед цвітінням; та $0,5 \pm 0,3\%$ СРБ – у рослин, які мали розкриті квітки. Дорослі рослини перед цвітінням демонстрували достовірно вищий

вміст цільового білка, ніж молоді рослини або рослини, що мали розкриті квітки ($P < 0,05$ та $P < 0,01$, відповідно).

При використанні модульної рекомбіназної системи максимальний рівень накопичення GFP ($16,2 \pm 5,7\%$ СРБ) також спостерігали в рослинах перед цвітінням. Інфільтровані ділянки листків молодих рослин на момент збирання матеріалу повністю некротизували, тому флуоресценція дослідних зразків не перевищувала фонову флуоресценцію контролів. Вміст репортерного білка в рослинах з розкритими квітками, склав $2,3 \pm 0,8\%$ СРБ. Відсотковий вміст GFP у рослинах перед цвітінням достовірно вищий ($P < 0,05$), ніж вміст GFP у рослинах з розкритими квітками. Схожі результати показані і для виду *N. excelsior*: відсотковий вміст GFP у рослинах перед цвітінням ($34,1 \pm 18,5\%$ СРБ) був достовірно вищим ($P < 0,01$), ніж вміст GFP у рослинах, які мали розкриті квітки ($1,4 \pm 1\%$ СРБ).

Наведені дані доводять, що вибір оптимальної стадії розвитку рослини для продукції рекомбінантних білків є одним із важливих факторів, який може підвищити вміст цільових білків.

Визначення віку листків рослини, оптимального для проведення транз'єнтної експресії гена. Для порівняння вмісту репортерного білка при транз'єнтній експресії гена у листках різного віку був обраний модельний об'єкт *N. benthamiana* на стадії дорослих рослин до цвітіння. В досліді тестували листки різного віку – 1^й-8^й листки від апікальної точки (найближчий до апікальної меристеми не повністю розкритий листок позначали першим).

Показано, що при використанні 35S- експресійної системи високий вміст GFP у перерахунку до СРБ, а саме від 2 до 4,5%, спостерігали у 2^{му}-6^{му} листках від апексу: $2,5 \pm 0,6\%$ – у 2-му листі, $3,5 \pm 1,1\%$ – у 3-му листі, $3,4 \pm 1,2\%$ – у 4-му листі, $3,0 \pm 0,9\%$ – у 5-му листі та $3,2 \pm 1\%$ – у 6-му листі. Листки, що розташовані нижче (7^й та 8^й), зменшували вміст GFP у перерахунку до СРБ: $1,4 \pm 0,5\%$ та $1,2 \pm 0,6\%$, відповідно. Відносно невисокий рівень репортерного білка $1,7 \pm 0,3\%$ отримали також у першому листку, причиною такого факту могло бути нерівномірне потрапляння агробактеріальної суспензії в листову пластинку з недостатньо розвиненими міжклітинниками. Відсоток GFP був достовірно вищим ($P < 0,05$) у пробах, отриманих з 2^{го} по 6^й лист, ніж у пробах, отриманих у 7^{му} та 8^{му} листках від апексу.

Оцінка вмісту рекомбінантного білка в перерахунку на сиру вагу листа та співставлення з даними про масу окремого листка, дає змогу казати, що оптимальними для накопичення цільових білків шляхом транз'єнтної експресії з використанням 35S- експресійної системи є 2^й-6^й листок від апексу.

Для порівняння вмісту репортерного білка в листках різного віку при використанні модульної рекомбіназної системи експресії обрали вид *N. excelsior*. Перевіряли вміст GFP у 1^{му}-6^{му} (на момент інфільтрації) листках від апексу.

Показано, що відносна кількість GFP у листках різного віку склала: $9,7 \pm 6,0\%$; $20,4 \pm 16,7\%$; $26,0 \pm 6,6\%$ та $30,0 \pm 11,5\%$ СРБ для листків з 1-го по 4-й, відповідно, на момент проведення інфільтрації. Вміст GFP у 3^{му}-4^{му} листі перевищував вміст GFP у 1-му листі ($P < 0,05$). У 5^{му}-6^{му} листках до кінця періоду накопичення спостерігались значні некрози, тому детекція вмісту GFP в них не проводилась.

Отже, при використанні рекомбіназної системи експресії оптимальними для накопичення цільового білка є 2-4 листок від апексу.

Дані вказують, що вік листка впливає на вміст рекомбінантного GFP при *Agrobacterium*-опосередкованій транзійтній експресії.

Вплив супресора посттранскрипційного сайленсингу генів p19 на накопичення репортерного білка при транзійтній експресії гена. Одним з найбільш ефективних супресорів посттранскрипційного сайленсингу генів в рослинах вважається білок p19 вірусу кущистої карликовості томату. Ефективність дії цього супресора показана для трансгенів, що знаходились під контролем 35S промотору вірусу мозаїки цвітної капусти [Voinnet et al., 2003, Lindbo, 2007]. Ми перевіряли вплив даного супресора сайленсингу генів на рівень накопичення GFP при використанні модульної рекомбіназної системи експресії. Дослідження проводили на об'єкті *N. excelsior*.

Показано, що вміст репортерного білка в присутності супресора сайленсингу генів p19 склав $53,9 \pm 26,3\%$ СРБ, на противагу $13,6 \pm 9,7\%$ СРБ, отриманих у контрольній групі (без супресора p19). Різниця є достовірною ($P < 0,001$).

Базуючись на отриманих даних можна стверджувати, що білок p19 позитивно впливає також на експресію генів у складі модульної рекомбіназної системи.

Вплив вторинних посередників стресового сигналу (жасмонатів) та інгібіторів їхнього біосинтезу на накопичення репортерного білка при транзійтній експресії гена. Для дослідження впливу екзогенного метилжасмонату на накопичення рекомбінантних білків до ін'єкційного буферу додавали 10 та 100 мкМ метилжасмонату (дослідні групи рослин). У контрольній групі до буферу додавали відповідну кількість розчинника.

В результаті експерименту не було знайдено відмінності між рівнями накопичення репортерного білка у дослідних та контрольних варіантах. Відсоток GFP при використанні 35S- векторної системи склав: $3,8 \pm 0,6\%$ СРБ (контрольна група), $3,9 \pm 1,5\%$ СРБ (з додаванням 10 мкМ метилжасмонату) та $4,2 \pm 0,4\%$ СРБ (з додаванням 100 мкМ метилжасмонату) для рослин виду *N. benthamiana*. Аналогічні результати показані для видів *N. cavicola* та *N. excelsior*.

Відсоток GFP при використанні модульної рекомбіназної системи в рослинах виду *N. excelsior* склав: $32,1 \pm 14,2\%$ СРБ (контрольна група) і $26,2 \pm 8,9\%$ СРБ (з додаванням 100 мкМ метилжасмонату).

Інгібітори біосинтезу жасмонатів – фенідон (в концентраціях 0,1 та 0,5 мМ) та диетилдитіокарбамат (в концентрації 1 мМ) також не вплинули на накопичення GFP у рослинах виду *N. excelsior* при використанні 35S- векторної системи. Вміст репортерного білка склав $4,5 \pm 3,0\%$ СРБ у контрольних зразках; $4,0 \pm 1,3\%$ СРБ (при додаванні 0,1 мМ фенідону) та $5,4 \pm 1,6\%$ СРБ (при додаванні 0,5 мМ фенідону). При використанні диетилдитіокарбамату вміст GFP склав $3,4 \pm 1,7\%$ СРБ (дослідна група) та $2,5 \pm 1,9\%$ СРБ (контрольна).

Оскільки, ані метилжасмонат, ані інгібітори його біосинтезу не вплинули на вміст GFP, ми припускаємо, що дані фактори не відіграють вирішальної ролі у накопиченні рекомбінантних білків при транзійтній експресії.

Вплив різних концентрацій фітогормонів на накопичення репортерного білка при транзйентній експресії. Для дослідження впливу різних концентрацій фітогормонів/ регуляторів росту на накопичення репортерного білка при транзйентній експресії були обрані наступні ауксини та цитокініни: індоліл-3-оцтова кислота (ІОК) (в концентраціях 0,5; 1, 5, 10 та 50 мг/л), 2,4-дихлорфеноксіоцтова кислота (2,4-Д) (в концентраціях 0,1; 0,2, 1 та 2 мг/л) та кінетин (в концентраціях 1 та 2 мг/л). Відповідні концентрації фітогормонів додавали до ін'єкційного буферу. Дослідження проводили на об'єкті *N. excelsior*, використовуючи 35S- векторну систему.

При використанні ІОК відсоток GFP від сумарних розчинних білків склав: $5,4 \pm 1,4\%$ у контролі, $4,0 \pm 0,7\%$ (концентрація ІОК 0,5 мг/л), $4,9 \pm 1,7\%$ (ІОК 1 мг/л), $4,7 \pm 3,4\%$ (ІОК 5 мг/л), $5,7 \pm 2,9\%$ (ІОК 10 мг/л) та $4,2 \pm 1,1\%$ (ІОК 50 мг/л). Схожі результати спостерігали при використанні іншого ауксина – 2,4-Д.

При використанні кінетину відсоток GFP від СРБ склав: $4,3 \pm 1,8\%$ (контрольні рослини) $5,1 \pm 3,3\%$ (концентрація кінетину 1 мг/л), $5,2 \pm 1,8\%$ (кінетин 2 мг/л).

Отримані нами результати вказують на те, що додавання екзогенних ІОК, 2,4-Д та кінетину до буферного розчину не вплинуло на накопичення GFP при транзйентній експресії відповідного гена у складі 35S векторної системи.

Розробка протоколу очищення білка GFP із неочищеного рослинного екстракту. З метою правильної кількісної оцінки вмісту рекомбінантного GFP необхідно використовувати стандартний очищений білок відомої концентрації. В роботі використали двофазову схему очищення GFP із рослинного екстракту.

Фракціонування білків шляхом преципітації сульфатом амонію. Сульфат амонію осаджує клітинний дебрис, рибосоми та мембранні фрагменти та стабілізує у розчині більшість білків. Ми проводили ступінчасту преципітацію білків із неочищеного екстракту в діапазоні від 20% (~0,81 М) до 100% (~5,36 М) насичення сульфатом амонію з кроком 10%, з метою визначення концентрації солі, при якій осаджується максимальна кількість GFP. Було показано, що максимальна кількість репортерного білка містилась у фракціях, що преципітували при 60% (~2,77 М) та 70% (~3,35 М) насичення.

Іонообмінна хроматографія. Наступним кроком очищення була аніонообмінна хроматографія. Діалізований білковий екстракт наносили на урівноважену хроматографічну колонку з Q-сефарозою. Після промивання колонки проводили елюцію білків лінійним градієнтом NaCl. Найвищу концентрацію GFP (визначали візуально за інтенсивністю флуоресценції) спостерігали у 35–55 мл після початку елюції, що відповідає приблизно 0,14 – 0,25 М хлориду натрію в буфері. Фракції з максимальним вмістом GFP використовували для аналізу чистоти, визначення кількості рекомбінантного білка та оцінки ефективності запропонованого протоколу очищення.

Розроблена схема збагачення дозволила збільшити вміст рекомбінантного GFP у відповідних фракціях у 26 разів у порівнянні з вихідним вмістом. В результаті запропонованого протоколу очищення кінцевий вихід рекомбінантного білка склав приблизно 77% від початкового вмісту з чистотою приблизно 85% (Табл. 2).

Таблиця 2.

Загальна схема очищення GFP із неочищеного рослинного екстракту

Стадія очистки	Вміст СРБ, мг	Вміст GFP, % СРБ	Кількість GFP, % від початкового вмісту
Неочищений екстракт	30,19	3,26	100
Осадження (NH ₄) ₂ SO ₄	5,40	16,38	89,94
Хроматографія	0,89	84,80	76,58

Рівень очищення GFP у фракціях було перевірено за допомогою електрофорезу білків в 12% поліакриламідному гелі (ПААГ) з додецилсульфатом натрію (ДСН). Вміст рекомбінантного білка у фракціях аналізували шляхом денситометричного аналізу, використовуючи алгоритм Gel Pro Analyzer software. Дана програма аналізує інтенсивність забарвлення смуги та її ширину по відношенню до всіх інших смуг доріжки. За даними денситометричного аналізу середня чистота білка у зібраних фракціях склала 85,1% СРБ (84,8% – за даними інтенсивності флуоресценції).

Даний протокол може бути взятий за основу при необхідності подальшого очищення рекомбінантного GFP або гібридних білків на основі GFP.

Транзйєтна експресія гена білка β -глюкуронідази в рослинах *Nicotiana benthamiana*, *N. cavicola* та *N. excelsior*. В нашій роботі репортерний білок β -глюкуронідаза був використаний як альтернатива репортерному білку GFP. Ген *uidA* (*GUS*) (без інтрона або з інтроном), що кодує білок β -глюкуронідазу, знаходився у складі 35S- векторної системи. Результати дослідження вказують на те, що транзйєтна експресія гена *uidA* в усіх обраних видах рослин проходила в обох випадках: коли ген не мав інтрона та коли переривався інтронною послідовністю. Отримані дані ще раз підтверджують, що види *N. benthamiana*, *N. cavicola* та *N. excelsior* є перспективними продуцентами для накопичення різних гетерологічних білків шляхом транзйєнтної експресії відповідних генів у складі 35S- векторної системи.

Продукція інтерферону альфа 2b людини у рослинах *Nicotiana excelsior* шляхом транзйєнтної експресії гена та перевірка його біологічної активності. Основним джерелом одержання рекомбінантного інтерферону на даний час є бактеріальні системи експресії генів [наприклад, Neves et al., 2004]. Альтернативним методом є продукція рекомбінантного інтерферону в рослинах.

Ген інтерферону альфа 2b людини (з нативним лідерним сигналом або калретикуліновим рослинним сигналом виведення білка в апопласт) входив до складу модульної рекомбіназної системи. Дана система є аналогом модульної рекомбіназної системи з геном *GFP*, тому в роботі як об'єкт для накопичення рекомбінантного інтерферону був використаний вид рослин *N. excelsior*, який демонстрував високі рівні накопичення GFP при використанні даної системи. Інфільтраційну процедуру проводили в оптимальних умовах: рослини на стадії перед цвітінням та використовували 2-4 лист від апексу.

Отримані нами дані свідчать про наявність біологічно-активного інтерферону альфа 2b людини в екстрактах рослин, інфільтрованих агробактерією, що несли вектор з відповідним геном.

Підтвердження присутності інтерферону в екстрактах проводили за допомогою ДСН електрофорезу білків в 12% ПААГ (детекція забарвленої смуги відповідної молекулярної маси – 19 кДа) та шляхом виявлення антивірусної активності в рослинному екстракті на культурі тваринних клітин, заражених вірусом везикулярного стоматиту. Кількість рекомбінантного інтерферону оцінювали, визначаючи титр його біологічної активності по відношенню до стандарту.

Середня активність інтерферону (ген мав нативний сигнал виведення білка в апопласт) у екстрактах рослин склала $1,3 \pm 0,59 \times 10^2$ Міжнародних одиниць (МО)/мл, (1,3-2 нг/г СВ листа). Максимальна активність у зразках – 8×10^2 МО/мл (8-10 нг інтерферону /г СВ листа).

Середня активність інтерферону (ген мав рослинний сигнал виведення білка в апопласт) в екстрактах складала $20,6 \pm 7,8 \times 10^2$ МО/мл, що приблизно дорівнює 20-30 нг/г СВ листа. Максимальна активність склала 32×10^2 МО/мл (30-50 нг/г СВ).

Такі результати свідчать про важливість створення удосконалених генетичних конструкцій для накопичення рекомбінантних білків в препаративних кількостях. А використання оптимальних умов дають змогу максимально реалізувати закладені генетичні можливості створених векторних конструкцій.

ВИСНОВКИ

1. В дисертаційній роботі розроблено оптимізований протокол для отримання рекомбінантних білків у рослинах методом *Agrobacterium*-опосередкованої транз'єнтної експресії з використанням двох типів векторних систем, що містили гени цільових білків.

2. Відібрано види рослин серед австралійських представників роду *Nicotiana*, в яких вміст репортерного білка GFP, отриманого в результаті транз'єнтної експресії трансгену, був найвищим при використанні 35S- векторної системи експресії (*N. cavicola*, *N. exigua* та *N. excelsior*) або модульної рекомбіназної системи експресії (*N. excelsior*).

3. Отримано трансгенну кореневу культуру “hairу roots” *N. benthamiana* та регенеровано з неї рослини. Показано, що біомаса трансгенних рослин в культурі *in vitro* перевищує біомасу нетрансгенних рослин, а вміст репортерного білка при транз'єнтній експресії трансгену не зменшується.

4. Доведено, що вміст репортерного білка при транз'єнтній експресії трансгену залежить від стадії розвитку рослини та віку листка, в якому накопичується чужорідний білок. Найбільший вміст GFP спостерігали у 2-6 (для 35S векторної системи експресії) або 2-4 (для модульної рекомбіназної векторної системи) листках від апексу у дорослих рослин перед цвітінням.

5. Доведено, що екзогенні фітогормони (індолілоцтова кислота, 2,4-дихлорфеноксіоцтова кислота (ауксини), кінетин (цитокінін)), а також метилжасмонат та інгібітори його біосинтезу (фенідон та диетилдитіокарбамат) не впливали на вміст репортерного білка при транзійтній експресії.

6. Доведено, що вміст білка GFP при транзійтній експресії гена *GFP* в складі модульної рекомбіназної векторної системи збільшувався при коекспресії гена білка p19 (вірусного супресора сайленсингу генів).

7. Розроблено методику двох-стадійного очищення GFP, отриманого при транзійтній експресії гена, із сумарного екстракту рослинних білків. Методика дозволяє отримати 77% від початкової кількості рекомбінантного білка з чистотою 85%.

8. Показано транзійтну експресію гена репортерного білка β -глюкуронідази в рослинах видів *N. cavicola* та *N. excelsior*.

9. Показано можливість отримання фармацевтично-цінного білка людини (лейкоцитарного інтерферону альфа 2b) в рослинах *N. excelsior* шляхом транзійтної експресії трансгену. Доведено біологічну активність отриманого рекомбінантного інтерферону за здатністю пригнічувати розмноження вірусу везикулярного стоматиту в культурі клітин ссавців.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Transgenic plants regenerated from hairy roots of *Nicotiana benthamiana*: a promising host for transient expression of foreign proteins / **Y.R. Sindarovska**, Y.V. Sheludko, I.M. Gerasymenko [et al.] // Цитология и генетика. – 2005. – № 6. – С. 9. – 14. *Особистий внесок здобувача - отримано трансгенну культуру коренів "hairy roots" N. benthamiana, підібрано умови для регенерації з культури "hairy roots" трансгенних рослин, проведено порівняльний аналіз трансгенних та нетрансгенних рослин.*

2. Comparison of several *Nicotiana* species as host for high-scale *Agrobacterium*-mediated transient expression / Y.V. Sheludko, **Y.R. Sindarovska**, I.M. Gerasymenko [et al.] // Biotechnology and Bioengineering. – 2007. – V. 96. – No. 3. – P. 608 – 614. *Особистий внесок здобувача - проведено інфільтрацію рослин різних видів роду *Nicotiana* агробактеріальними клітинами, що несли різні типи генетичних конструкцій, а також інфільтрацію рослин *N. benthamiana*, які знаходились на різних стадіях розвитку, отримано рослинні екстракти, визначено вміст сумарних розчинних білків та репортерного білка, проведено аналіз результатів.*

3. Production of recombinant GFP by *Agrobacterium*-mediated transient expression in *Nicotiana excelsior* and its purification / **Y.R. Sindarovska**, Y.V. Sheludko, I.M. Gerasymenko [et al.] // Цитология и генетика. – 2008. – № 2. – С. 16 – 20. *Особистий внесок здобувача – проведено агроінфільтрацію рослин N. excelsior, отримано рослинний екстракт, проведено преципітацію білків сульфатом амонію з наступним діалізом, іонообмінну хроматографію, визначено вміст репортерного білка, перевірено чистоту білка електрофоретичним методом, частково проведено аналіз результатів.*

4. Пат. 31239 Україна, МПК А 01 Н 5/00, А 01 Н 5/12, С 07 К 14/00, С 12 N 15/63, С 12 N 15/84, С 12 Р 21/00. Спосіб одержання рекомбінантного білка шляхом транз'єнтної експресії трансгену в рослині виду *Nicotiana excelsior* / **Сіндаровська Я.Р.**, Шелудько Ю.В., Герасименко І.М., Кучук М.В.; заявник та патентовласник Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАНУ. – u 2007 14867; заявл. 27.12.07; опубл. 25.03.08, Бюл. № 6. *Особистий внесок здобувача – проведено агроінфільтрацію рослин N. excelsior на різних стадіях розвитку рослини та інфільтрацію листків різного віку, визначено вміст сумарних розчинних білків та репортерного білка, проведено аналіз результатів, підготовлено патент.*

5. *Agrobacterium*-опосередкована транз'єнтна експресія: перспективний підхід для масштабної продукції рекомбінантних білків у рослинах / Ю.В. Шелудько, **Я.Р. Сіндаровська**, І.М. Герасименко [та ін.] // Наука та інновації. – 2006. – № 6. – С. 65 – 76. *Особистий внесок здобувача – проведено інфільтрацію рослин Nicotiana агробактеріальними клітинами, що несли векторні конструкції з генами GFP, інтерферону альфа та соматотропіну, отримано та проаналізовано рослинні екстракти з репортерним білком, проведено електрофорез рослинних екстрактів з рекомбінантними білками.*

6. **Sindarovska Y.R.** Influence of phytohormones and suppressor of jasmonate-mediated stress reactions on transient expression in plants // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: збірник наукових праць / Y.R. Sindarovska, Y.V. Sheludko, M.A. Bannikova, N.V. Kuchuk. – К.: Логос, 2007. – С. 613 – 616. *Особистий внесок здобувача – проведено агроінфільтрацію рослин N. excelsior з додаванням*

різних концентрацій фітогормоїв/ регуляторів росту та метилжасмонату до інфільтраційного буферу, визначено вміст репортерного білка, в отриманих рослинних екстрактах, проведено аналіз результатів.

7. **Sindarovska Y.** Regenerated transgenic plants from hairy roots of *Nicotiana benthamiana*: a perspective tool for transient expression of foreign proteins / Y. Sindarovska, Y. Sheludko, I. Gerasymenko, M. Bannikova // Установчий з'їзд Українського товариства клітинної біології, 25 – 28 квітня 2004 р.: тези доповідей. – Львів, 2004. – С. 108. *Особистий внесок здобувача – проведено агробактеріальну трансформацію та отримано культуру коренів “hairy roots” N. benthamiana, підібрано умови для регенерації рослин з культури трансгенних коренів.*

8. **Sindarovska Y.R.** Optimization of *Agrobacterium*-mediated transient expression in *Nicotiana* species / Y.R. Sindarovska, Y.V. Sheludko, I.M. Gerasymenko, N.V. Kuchuk // Acta Physiologiae Plantarum. – 2004. – V. 26. – No. 3S. – P. 15, PC – 14. *Особистий внесок здобувача – проведено агроінфільтрацію рослин роду Nicotiana, отримано екстракти та визначено в них вміст сумарних розчинних білків та репортерного білка, проведено електрофоретичний аналіз рослинних екстрактів, проведено аналіз результатів.*

9. Comparison of wild-type and transgenic plants of *Nicotiana benthamiana* as hosts for transient expression / **Y.R. Sindarovska**, Y.V. Sheludko, I.M. Gerasymenko [et al.] // Recent advances in plant biotechnology: From laboratory to business: міжнар. симпозіум, 12 – 16 вересня 2005 р.: тези доповідей. – Чеські Будейовіці, 2005. – С. 61. *Особистий внесок здобувача – порівняно біомасу трансгенних та нетрансгенних рослин, отриманих після регенерації з культури коренів “hairy roots” N. benthamiana, проведено агроінфільтрацію трансгенних та нетрансгенних рослин, визначено вміст репортерного білка після транз'єнтної експресії.*

10. **Sindarovska Y.** Inhibitor of methyl jasmonate biosynthesis can enhance transient expression in *Nicotiana excelsior* / Y. Sindarovska, Y. Sheludko, I. Gerasymenko, N. Kuchuk // XV конгрес Європейського товариства рослинної біології, 17 – 21 липня 2006 р.: тези доповідей. – Ліон, 2006. – С. 201, TEC02-008. *Особистий внесок здобувача – проведено агроінфільтрацію рослин N. excelsior з додаванням до*

інфільтраційного буферу різних концентрацій метилжасмонату та інгібітору його біосинтезу, визначено вміст репортерного білка, проведено аналіз результатів.

АНОТАЦІЯ

Сіндаровська Я.Р. *Agrobacterium*-опосередкована транз'єнтна експресія генів рекомбінантних білків (GFP, β -глюкуронідази та інтерферону альфа 2b) в рослинах роду *Nicotiana* L. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ, 2009.

Дисертація присвячена розробці протоколу отримання рекомбінантних білків шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої транз'єнтної експресії відповідних трансгенів. Розроблено протокол для транз'єнтної експресії генів чужорідних білків, що знаходились в генетичних конструкціях різних типів, у рослинах роду *Nicotiana*, досліджено вплив ряду біологічних факторів на рівень накопичення рекомбінантних білків. Показано, що важливе значення для отримання цільових білків методом *Agrobacterium*-опосередкованої транз'єнтної експресії має вид рослини-продуцента. Серед австралійських представників роду *Nicotiana* нами були відібрані види рослин, які демонстрували високий вміст накопичення репортерного білка GFP при використанні векторних конструкцій різних типів. В результаті трансформації експлантів *N. benthamiana* бактерією *A. rhizogenes* було отримано трансгенну кореневу культуру "hairy roots", регеновано з неї рослини та проведено оцінку трансгенних рослин. Продемонстровано, що вміст репортерного білка залежить від стадії розвитку рослини та віку листків, в яких відбувається транз'єнтна експресія. Доведено, що супресор сайленсингу генів p19 збільшує вміст репортерного білка GFP, ген якого входить до складу модульної рекомбіназної векторної системи експресії. Показано, що фітогормони (ауксини, цитокінін) в різних концентраціях, метилжасмонат та інгібітори його біосинтезу не впливають на накопичення репортерного білка при транз'єнтній експресії. Було розроблено методику двох-стадійного очищення репортерного білка GFP з рослинного екстракту. Було показано транз'єнтну експресію гена *uidA* (кодує білок β -глюкуронідазу) в рослинах видів *N. excelsior* та *N. cavicola* і продемонстровано активність даного ферменту. Було отримано інтерферон альфа 2b людини в рослинах виду *N. excelsior* шляхом транз'єнтної експресії гена та доведено біологічну активність даного білка.

Ключові слова: *Agrobacterium*-опосередкована транз'єнтна експресія, рекомбінантні білки, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana excelsior*, GFP, інтерферон альфа 2b людини, *Agrobacterium rhizogenes*, генетична трансформація.

АННОТАЦИЯ

Синдаровская Я.Р. *Agrobacterium*-опосредованная транз'єнтная экспрессия генов рекомбинантных белков (GFP, β -глюкуронидазы и интерферона альфа 2b) в растениях рода *Nicotiana* L. - Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук за специальностью 03.00.20 – биотехнология. – Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев, 2009.

Диссертационная работа посвящена разработке протокола получения рекомбинантных белков методом *Agrobacterium*-опосредованной транзientной экспрессии соответствующих трансгенов. Разработан протокол для транзientной экспрессии генов чужеродных белков, которые находились в генетических конструкциях различных типов, в растениях рода *Nicotiana*; исследовано влияние ряда биологических факторов на уровень накопления рекомбинантных белков. Показано, что для получения целевых белков методом *Agrobacterium*-опосредованной транзientной экспрессии существенное значение имеет вид растения-продуцента. Среди австралийских представителей рода *Nicotiana* были отобраны виды растений, которые накапливали репортерный белок GFP в значительных количествах при использовании различных типов векторных систем. В результате трансформации эксплантов *N. benthamiana* с помощью *A. rhizogenes* была получена культура трансгенных корней “hairy roots”, из которой были регенерированы растения и проведена их оценка с биотехнологической точки зрения. Продемонстрировано, что содержание репортерного белка зависит от стадии развития растения и возраста листьев, в которых происходит транзientная экспрессия. Доказано, что вирусный супрессор сайленсинга генов p19 увеличивает содержание репортерного белка GFP, если соответствующий целевой ген находится в составе модульной рекомбиназной векторной системы. Показано, что фитогормоны (ауксины, цитокинин) в различных концентрациях, метилжасмонат и ингибиторы его биосинтеза не влияют на накопление репортерного белка при транзientной экспрессии. Разработана методика двухстадийной очистки репортерного белка GFP из растительного экстракта. Была показана транзientная экспрессия гена *uidA* (кодирует белок β -глюкуронидазу) в растениях видов *N. excelsior* и *N. cavicola* и продемонстрирована активность данного фермента. Был получен интерферон альфа 2b человека в растениях вида *N. excelsior* методом транзientной экспрессии гена и доказана биологическая активность данного белка.

Ключевые слова: *Agrobacterium*-опосредованная транзientная экспрессия, рекомбинантные белки, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana excelsior*, GFP, интерферон альфа 2b человека, *Agrobacterium rhizogenes*, генетическая трансформация.

ABSTRACT

Sindarovska Y.R. *Agrobacterium*-mediated transient expression of genes of recombinant proteins (GFP, β -glucuronidase and interferon alpha 2b) in plants of *Nicotiana* L. genus. – Manuscript.

Thesis for PhD degree in biology by specialty 03.00.20 – biotechnology. – Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2009.

The thesis focuses on protocol development for recombinant protein production in plants of *Nicotiana* L. genus by *Agrobacterium*-mediated transient expression using different types of expression cassettes. The first cassette contained gene of interest driven by 35S promoter of cauliflower mosaic virus (35S- system). The second one (module recombinase system) consisted of two vectors (modules) included virus genome elements. Their recombination inside of plant cell with site-specific recombinase (the third module) produced mature transcript.

It was tested the suitability of seven Australian species of *Nicotiana* L. genus and common American species of this genus (*N. tabacum* cv. Wisconsin 38) for *Agrobacterium*-mediated transient expression. It was demonstrated the importance of correct choice of plant species for production of recombinant proteins using *Agrobacterium*-mediated transient expression. It was selected plant species with high level of accumulation of reporter protein GFP (green fluorescent protein). The best results we observed for species *N. cavicola*, *N. excelsior* and *N. exigua* (6.0%, 3.7% and 3.1% of total soluble proteins (TSP), respectively) if 35S- vector system was used. Additionally *N. excelsior* and *N. cavicola* had shown the best results when module recombinase system was used (up to 60% TSP and 12% TSP, respectively). The level of reporter protein accumulation in *N. cavicola*, *N. excelsior* and *N. exigua* was comparable with that in model species commonly used for *Agrobacterium*-mediated transient expression: *N. benthamiana* (3.8% and 16% TSP for 35S- system and module recombinase system, respectively) and *N. tabacum* (2.6% TSP for 35S- system). The additional advantage of *N. excelsior* is high biomass yield: the raw weight of one *N. excelsior* leaf is approximate 3.6 g while the raw weight of one *N. benthamiana* leaf is only 0.5 g. This advantage allows of harvesting more recombinant protein from one experimental plant. Using 35S- vector system we demonstrated the transient expression of *uidA* (*GUS*) gene (coding for reporter protein β -glucuronidase) in *N. cavicola* and *N. excelsior*.

After transformation of *N. benthamiana* leaf explants with *A. rhizogenes* A4 we obtained transgenic root culture (“hairy roots”). Transgenic plants were regenerated from “hairy roots” using nutrient medium Murashige-Skoog supplemented with phytohormones – indolylacetic acid (IAA) (0.1 mg/l) and benzilaminopurine (1 mg/l). Biomass of transgenic plants surpassed twice the biomass of wild type *N. benthamiana* plants (*in vitro* conditions). The content of GFP after transient expression of gene was similar in transgenic and non-transgenic plants.

We demonstrated that the content of reporter protein after *Agrobacterium*-mediated transient expression depends on the plant development stage and leaf age. The best results for the both types of expression systems were shown for adult plants before flowering. GFP accumulation levels in *N. benthamiana* plants were 3.8% TSP and 16% TSP for 35S- system and module recombinase system, respectively. Flowering plants had statistically lower GFP content ($P < 0.05$): 0.5% TSP and 2.3% TSP for 35S- system and module recombinase system, respectively. The best level of reporter protein accumulation was observed in younger leaves. In *N. benthamiana* high level of reporter protein was found in the 2nd-6th leaves from the apical meristem if 35S- vector system was used. When module recombinase system was used (in *N. excelsior*) good GFP accumulation was observed in the 2nd-4th leaves from the apical meristem.

We demonstrated the importance of *p19* (gene coding for suppressor of PTGS) coexpression with module recombinase system. The level of reporter protein reached 50% TSP in the presence of p19 and was about 14% TSP without p19.

Plant hormones (auxins (IAA and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid) and cytokinin (kinetin)) as well as methyljasmonate or inhibitors of jasmonate biosynthesis (diethylthiocarbamic acid or phenidone) in the tested range of concentrations did not affect reporter protein accumulation if 35S- vector system was used.

In order to obtain preparative amounts of standard GFP we developed the scheme for its purification from crude protein extract. The scheme included of two steps: ammonium sulfate precipitation and anion-exchange chromatography. As a result we obtained recombinant reporter protein with 85% purity and 75% yield of initial GFP level.

Under the developed optimal conditions we carried out agroinfiltration in *N. excelsior* and demonstrated transient expression of human interferon alpha 2b gene (replacing GFP in the module recombinase system). It was resulted accumulation of biologically active recombinant interferon. The maximal activity of recombinant interferon reached 32×10^2 IU/ml, approximately 30-50 ng/g fresh weight.

Key words: *Agrobacterium*-mediated transient expression, recombinant proteins, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana excelsior*, GFP, human interferon alpha 2b, *Agrobacterium rhizogenes*, genetic transformation.