

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор ІКБГІ НАН України,
акад. НАН України



М.В.Кучук

27 липня 2021 р.

РОБОЧА ПРОГРАМА НАВЧАЛЬНОЇ ДИСЦИПЛІНИ

«Механізми регуляції експресії генів в еукаріотичних клітинах та їх застосування в сучасній біотехнології»

для здобувачів вищої освіти ступеня доктора філософії

галузь знань 09 «Біологія»

спеціальність 091 «Біологія»

профілі підготовки «Біотехнологія», «Цитологія, клітинна біологія, гістологія», «Радіобіологія»

КИЇВ – 2021

Робоча програма навчальної дисципліни «Механізми регуляції експресії генів в еукаріотичних клітинах та їх застосування в сучасній біотехнології» для здобувачів вищої освіти ступеня доктор філософії галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія» за профілями підготовки «Біотехнологія», «Цитологія, клітинна біологія, гістологія», «Радіобіологія».
27 липня 2021 року – 17 с.

Розробник:


Щербак Н.Л.,
н.с. відділу генетичної інженерії, к.б.н.



(підпис)

Робоча програма дисципліни «Механізми регуляції експресії генів в еукаріотичних клітинах та їх застосування в сучасній біотехнології» схвалена на засіданні вченої ради ІКБГІ НАН України (протокол № 7 від 27 липня 2021 року).

Робоча програма дисципліни «Механізми регуляції експресії генів в еукаріотичних клітинах та їх застосування в сучасній біотехнології» розглянута та схвалена на засіданні відділу генетичної інженерії ІКБГІ НАН України

Завідувач відділу чл.-кор. НАН України 
(підпис) М.В.Кучук

26 липня 2021 року

ВСТУП

Навчальна дисципліна «**Механізми регуляції експресії генів в еукаріотичних клітинах та їх застосування в сучасній біотехнології**» є складовою освітньо-наукової програми підготовки здобувачів вищої освіти ступеня доктор філософії галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія» за профілями підготовки «Біотехнологія», «Цитологія, клітинна біологія, гістологія» та «Радіобіологія».

Дана дисципліна є навчальною дисципліною за вибором аспірантів за спеціальністю 091 «Біологія».

Викладається на II курсі аспірантури **в обсязі – 40 годин (1,34 кредити ECTS)** зокрема: лекції – 30 годин, практичні роботи – 2 годин, семінари – 4 годин, самостійна робота – 4 годин. У курсі передбачено 2 змістовних модулі. Завершується дисципліна заліком.

Мета дисципліни – отримання знань щодо сучасних уявлень про регуляцію експресії генів та регуляторні послідовності, що використовуються у векторах для генетичної трансформації рослин.

Завдання:

1. систематизувати та узагальнити знання про регуляцію експресії генів в еукаріотичних клітинах, будову промотора РНК полімерази II та інші регуляторні послідовності;
2. сформувані цілісне уявлення про експресію генів в еукаріотичних клітинах;
3. познайомити з новими відкриттями молекулярної біології, що стосуються регуляції процесів ініціації транскрипції та трансляції, замовчування генів в трансгенних рослинах, РНК інтерференції та глобальної регуляції експресії генів;
4. сформувані основні принципи застосування відкриттів та досягнень сучасної молекулярної біології при вдосконаленні генетичних векторів для забезпечення бажаного рівня стабільної та керованої експресії перенесених генів в трансгенних рослинах.

В результаті вивчення навчальної дисципліни аспірант повинен

знати:

- основні поняття, визначення, термінологію молекулярної біології, що стосується регуляції експресії генів;
- модулі еукаріотичного промотору РНК полімерази II, основні підходи, які використовуються при створенні штучних промоторів, можливості їх використання для проведення фундаментальних досліджень та для досягнення оптимального практичного результату;

- основні типи регуляторних послідовностей та принципи їх використання у векторах для генетичної трансформації та транз'єнтно́ї експресії рекомбінантних білків у рослинах;
- особливості організації геному пластид та мітохондрій та особливості векторів, що використовуються для отримання транспластомних рослин;

вміти:

- проводити *in silico* аналіз послідовностей за допомогою програм Plant CARE та бази даних PLACE, Softberry, TSSPlant та ін.
- проводити інформаційний пошук та самостійно вивчати наукову літературу, що стосується регуляції експресії генів та біотехнології рослин, аналізувати та інтерпретувати опубліковані результати;
- вести наукові дискусії з питання сучасних напрямів біотехнології рослин, застосування рослин як біофабрик для синтезу рекомбінантних білків та використання векторів з різними системами експресії для отримання оптимального результату

володіти: навичками самостійної роботи з комп'ютерними програмами та базами даних регуляторних послідовностей.

Місце дисципліни (в структурно-логічній схемі підготовки фахівців відповідного напрямку підготовки).

Навчальна дисципліна «Механізми регуляції експресії генів в еукаріотичних клітинах та їх застосування в сучасній біотехнології» є навчальною дисципліною за вибором аспірантів програми підготовки здобувачів вищої освіти ступеня доктор філософії галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія» за профілями підготовки «Біотехнологія», «Цитологія, клітинна біологія, гістологія» та «Радіобіологія». Дисципліна висвітлює сучасні уявлення про механізми регуляції експресії генів на рівні транскрипції та трансляції; глобальну регуляцію експресії генів (модифікація гістонів, метилювання ДНК, РНК інтерференція); методологію використання різних регуляторних послідовностей у векторах для генетичної трансформації; застосування рослин для синтезу рекомбінантних білків та використання векторів з різними системами експресії для отримання оптимального результату. Навчальний курс пов'язаний з базовими дисциплінами «Молекулярно-біологічні основи функціонування про- та еукаріотичних організмів», «Культура клітин і тканин *in vitro* як методологічна база біотехнології рослин», що викладаються на 1 курсі аспірантури, а також з курсами «Генетичні основи біотехнології» та «Клітинна та генетична інженерія рослин», з якими вивчається паралельно.

ПРОГРАМА НАВЧАЛЬНОЇ ДИСЦИПЛІНИ.

Змістовий модуль 1. Регуляція експресії генів на рівні транскрипції та трансляції. (22 год)

Тема 1. Промотори як ключові послідовності регуляції експресії генів на рівні транскрипції. (2 години)

Загальна будова еукаріотичного промотора РНК-полімерази II. Основні модулі еукаріотичного промотора. ТАТА бокс. Формування транскрипційного комплексу та ініціація транскрипції. Поняття базової експресії та мінімального промотора. Базові фактори транскрипції РНКполімерази II та основні етапи ініціації транскрипції. Енхансери та сайленсери, їх роль в ініціації транскрипції. Енхансосома. Принципи модульності та кооперативності при взаємодії факторів транскрипції з еукаріотичними промоторами.

Тема 2. Основні типи промоторів та їх використання в генетичній інженерії рослин. (6 годин)

Перші вектори для генетичної трансформації та регуляторні послідовності, які в них використовувались. Конститутивні промотори вірусного походження, та їх використання в генетичній інженерії рослин. Класифікація промоторів: конститутивні, індукцибельні та тканиноспецифічні промотори. Переваги та недоліки використання конститутивних промоторів. Промотори, що використовуються у векторах для генетичної трансформації однодольних рослин. Метод промотор-трепінгу та його використання для визначення промоторних послідовностей. Криптичні промотори. Синтетичні промотори та основні підходи, що використовуються при їх створенні. Двонаправлені промотори. Бази даних, що містять інформацію про нуклеотидні послідовності промоторів та сайти зв'язування транскрипційних факторів.

Тема 3. Методи визначення «сили» промотора та рівня експресії перенесених генів в трансгенних рослинах. (4 години)

Репортерні маркери та методи детекції їх експресії в трансгенних рослинах. Порівняння ефективності промоторів за допомогою зеленого флуоресцентного білка (GFP). Якісне та кількісне визначення активності *gus* гена в трансгенних рослинах. Порівняння ефективності промоторів шляхом визначення активності β -глюкуронідази в трансгенних рослинах. Сучасні методи визначення мРНК та рівня експресії генів. ПЛР в реальному часі (qPCR) та її застосування для аналізу рівня експресії генів. Порівняльна геномна гібридизація на чіпах (CGH). Мікročіпи. Високопродуктивне паралельне секвенування РНК (RNA-Seq).

Тема 4. Особливості експресії генетичного матеріалу в пластидах та мітохондріях. (4 години)

Позаядерний генетичний матеріал в рослинних клітинах. Структура геному пластид та мітохондрій. РНК-полімерази пластид: бактеріального типу (PEP), що кодується в хлоропластах та фагоподібна РНК-полімераза (NEP), що кодується в ядрі. Оперони та моноцистронні гени хлоропластної ДНК. Особливості регуляції експресії генів пластид та мітохондрій. Транспластомні рослини. Переваги та недоліки генетичної трансформації пластид у порівнянні з ядерною трансформацією. Вектори та регуляторні послідовності, що використовуються для генетичної трансформації хлоропластного геному.

Тема 5. Регуляція експресії генів та рівні трансляції. (2 години).

Скануюча модель ініціації трансляції у еукаріот, її відкриття та основні положення. 5'-некодуючі послідовності та їх використання у векторах для генетичної трансформації. «Кеп»-незалежна ініціація трансляції, історія відкриття та розповсюдженість в еукаріотичних клітинах. Сайти внутрішньої посадки рибосом (IRES послідовності). Детекція та аналіз IRES послідовностей. Біцистронний тест. IRES послідовності vs криптичні помотори.

Тема 6. Вірусні системи експресії генів та їх використання в біотехнології для синтезу рекомбінантних білків в рослинах. (4 години)

Транз'єнтна *Agrobacterium*-опосередкована експресія гетерологічних генів в рослинах. Білки – супресори сайленсингу та їх використання при транз'єнтній експресії. Вектори, які базуються на вірусних послідовностях, що кодують РНК-залежну РНК полімеразу і транспортний білок вірусу (система MagnICON). Регуляторні послідовності, які використовуються у векторах з вірусними полімеразами. Поєднання вірусної та індукцибельної системи експресії для оптимізації накопичення рекомбінантних білків в рослинах. Індукцибельні промотори. Переваги використання індукцибельних промоторів для біофармінгу.

Змістовий модуль 2. Глобальна регуляція експресії генів в еукаріотичних клітинах. (18 годин)

Тема 7. Організація хроматину в еукаріотичних клітинах. MAR та S/MAR послідовності та їх вплив на експресію гетерологічних генів. (4 години)

Рівні організації хроматину в еукаріотичних клітинах. Гістонові білки. Модифікації гістонів, їх роль в організації хроматину та вплив транскрипційну активність. Гістоновий код. Епігенетична спадковість. Еухроматин та гетерохроматин, транскрипційно-активні ділянки геному. Можливості керування

рівнем експресії перенесених генів при використанні MAR послідовностей та інсуляторів. Використання систем рекомбінації бактеріофагів в генетичній трансформації рослин для сайт-специфічної інтеграції трансгену.

Тема 9. РНК-інтерференція: історія відкриття, механізм реалізації та практичне застосування в біотехнології. (8 годин)

Поняття посттранскрипційного та посттрансляційного сайлесингу трансгенів. Відкриття РНК-інтерференції в трансгенних рослинах петунії. Сайлесинг генів, як механізм захисту рослини від вірусних інфекцій. Експерименти, які довели існування РНК-інтерференції в дослідках з *Caenorhabditis elegans*. Основні етапи та ферментні системи, завдяки яким реалізується явище РНК-інтерференції. Мікро РНК та короткі інтерферуючі РНК. Замовчування генів в трансгенних рослинах, що реалізується завдяки РНК-інтерференції. РНК-інтерференція як один з компонентів системи регуляції експресії генів та епігенетичної модифікації генома. РНК-інтерференція для пригнічення активності транспозонів у клітинах рослин та тварин (піРНК). РНК-інтерференція та адаптивна імунна система рослин. Зв'язок РНК-інтерференції з редагуванням РНК. Практичне застосування явища РНК інтерференції в медицині та біотехнології. Кільцеві РНК. Взаємодія кільцевих РНК з мікро РНК та короткими інтерферуючими РНК, вплив на експресію генів.

Тема 10. Метилування ДНК в рослинному геномі. (6 годин)

Метилування ДНК в клітині, сайти та механізм метилування. Метилування помоторів як один з механізмів регуляції експресії генів. Метилування гістонів та його роль в встановленні та підтриманні патерну метилування ДНК. Основні закономірності метилування ДНК у рослин. Білки сімейства MET - головні CG-специфічні ДНК метилтрансферази рослин. Хромометилтрансферази (хромометилази) - специфічні для рослин ДНК-метилтрансферази. DRM - *de-novo* ДНК-метилтрансферази рослин. Метилування залишків аденіну у рослинній ДНК. Малі інтерферуючі РНК як один механізмів, який направляє метилування ДНК.

**СТРУКТУРА НАВЧАЛЬНОЇ ДИСЦИПЛІНИ
ТЕМАТИЧНИЙ ПЛАН ЛЕКЦІЙ, СЕМІНАРІВ,
ПРАКТИЧНИХ ЗАНЯТЬ, САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ**

№ з/п	Назва	Кількість годин			
		лекції	семінари	практичні	самостійна робота
Змістовий модуль 1					
Регуляція експресії генів на рівні транскрипції та трансляції.					
1.	Тема 1. Промотори, як ключові послідовності регуляції експресії генів на рівні транскрипції.	2	-	-	-
2.	Тема 2. Основні типи промоторів та їх використання в генетичній інженерії рослин.	4	-	-	2
3.	Тема 3. Методи визначення «сили» промотора та рівня експресії перенесених генів в трансгенних рослинах.	2	-	2	-
4.	Тема 4. Особливості експресії генетичного матеріалу в пластидах та мітохондріях.	4	-	-	-
5.	Тема 5. Регуляція експресії генів та рівні трансляції.	2	-	-	-
6.	Тема 6. Вірусні системи експресії генів та їх використання в біотехнології для синтезу рекомбінантних білків в рослинах.	2	2	-	-
Разом за змістовим модулем 1		16	2	2	2
Змістовий модуль 2					
Глобальна регуляція експресії генів в еукаріотичних клітинах.					
7.	Тема 7. Організація хроматину в еукаріотичних клітинах. MAR та S/MAR послідовності та їх вплив на експресію гетерологічних генів.	4	-	-	-
8.	Тема 8. РНК-інтерференція: історія відкриття, механізм реалізації та практичне застосування в біотехнології.	6	-	-	2
9.	Тема 9. Метилювання ДНК в рослинному геномі.	4	2	-	-
Разом за змістовим модулем 2		14	2	-	2
ВСЬОГО		30	4	2	4

Загальний обсяг –**40** годин (**1,34** кредити ECTS), у тому числі:

Лекцій – **30** годин

Семінари – **4** годин

Практичні заняття – **2** годин

Самостійна робота – **4** годин

ЗМІСТОВИЙ МОДУЛЬ 1.

Регуляція експресії генів на рівні транскрипції та трансляції.

ТЕМА 1. Промотори як ключові послідовності регуляції експресії генів на рівні транскрипції. (2 години)

Лекція 1. Промотори як ключові послідовності регуляції експресії генів на рівні транскрипції. (2 години)

Рекомендована література: [4 - 6, 13, 38, 43, 44, 50]

ТЕМА 2. Основні типи промоторів та їх використання в генетичній інженерії рослин. (6 годин)

Лекція 2. Нативні рослинні та вірусні промотори в генетичній інженерії рослин (2 години).

Лекція 3. Синтетичні промотори та основні підходи, що використовуються при їх створенні (2 години).

Самостійна робота (2 години). Ознайомитися з програмними комплексами та базами даних регуляторних послідовностей: Plant CARE (база даних PLACE), Softberry, TSSPlant та ін. Провести *in silico* аналіз та порівняння запропонованих послідовностей з регуляторними елементами рослинного геному. Провести передбачення рослинних промоторів РНК полімерази II у запропонованій послідовності.

Рекомендована література: [1, 6, 16, 18, 20, 27, 30, 33, 52, 61, 64, 65, 68, 69, 72]

Тема 3. Методи визначення «сили» промотора та рівня експресії перенесених генів в трансгенних рослинах. (4 години)

Лекція 4. Методи визначення «сили» промотора та рівня експресії перенесених генів в трансгенних рослинах. (2 години)

Практичне заняття 1. Визначення активності β-глюкуронідази в листках трансгенних рослин за допомогою флуориметричного методу. (2 години)

Рекомендована література: [1, 22, 23, 25, 42]

Тема 4. Особливості експресії генетичного матеріалу в пластидах та мітохондріях. (4 години)

Лекція 5. Позаядерний генетичний матеріал в рослинних клітинах. Структура геному пластид та мітохондрій. (2 години)

Лекція 6. Вектори та регуляторні послідовності, що використовуються для генетичної трансформації хлоропластного геному. (2 години)

Рекомендована література: [2, 9, 14, 17, 34, 75]

Тема 5. Регуляція експресії генів на рівні трансляції. Використання 5'-некодуючих та IRES послідовностей у генетичних векторах. (2 години)

Лекція 7. Регуляція експресії генів на рівні трансляції. Використання 5'-некодуючих та IRES послідовностей у генетичних векторах. (2 години)

Рекомендована література: [4, 5, 21, 35, 46-49, 56, 74]

Тема 6. Вірусні системи експресії трансгенів та їх використання в біотехнології для синтезу рекомбінантних білків в рослинах. (4 години)

Лекція 8. Вірусні системи експресії трансгенів та їх використання в біотехнології для синтезу рекомбінантних білків в рослинах. (2 години)

Семінар 1. Дизайн генетичного вектора та підбір регуляторних послідовностей для забезпечення бажаного рівня експресії трансгена. (2 години)

Завдання для семінару: Оберіть фармацевтичний білок та запропонуйте стратегію його синтезу в рослинах. Аргументуйте вибір системи експресії та регуляторних послідовностей у векторі.

Тест 1. Перевірка засвоєння матеріалу по темам 1-6.

Рекомендована література: [1, 37, 53, 57, 58, 70, 76]

ЗМІСТОВИЙ МОДУЛЬ 2.

Глобальна регуляція експресії генів в еукаріотичних клітинах.

Тема 7. Організація хроматину в еукаріотичних клітинах. MAR та S/MAR послідовності та їх вплив на експресію гетерологічних генів. (4 години)

Лекція 9. Модифікації гістонів, їх роль в організації хроматину та вплив на транскрипційну активність. Епігенетична спадковість. (2 години)

Лекція 10. MAR та S/MAR послідовності: використання в генетичних векторах та вплив на експресію гетерологічних генів. (2 години)

Рекомендована література: [5, 7, 8, 10-12, 31, 39, 40, 62, 71]

Тема 8. РНК-інтерференція: історія відкриття, механізм реалізації та практичне застосування в біотехнології. (8 годин)

Лекція 11. «Замовчування» генів в трансгенних рослинах – причини та шляхи вирішення проблеми. (2 години)

Лекція 12. РНК-інтерференція: історія відкриття та механізм реалізації в еукаріотичній клітині. (2 години)

Лекція 13. РНК-інтерференція як один з компонентів системи регуляції експресії генів та епігенетичної модифікації генома. (2 години)

Завдання для самостійної роботи (2 години): Самостійно по публікаціям опрацювати тему «Кільцеві РНК та їх взаємодія з siРНК».

Тест 2. Перевірка засвоєння матеріалу по темам 7, 8.

Рекомендована література: [3, 5, 15, 26, 29, 36, 41, 45, 51, 54, 59, 63, 66, 67, 73,78]

Тема 9. Метилування ДНК в рослинному геномі. (6 годин)

Лекція 14. Метилування ДНК - один з механізмів регуляції експресії генів. (2 години)

Лекція 15. Особливості метилування ДНК в рослинному геномі. (2 години)

Рекомендована література: [5, 19, 28, 32, 60, 77]

Семинар 2. Залік. (2 години)

КОНТРОЛЬ ЗНАНЬ І РОЗПОДІЛ БАЛІВ, ЯКІ ОТРИМУЮТЬ ЗДОБУВАЧІ

Контроль здійснюється за модульно-рейтинговою системою. У змістовий модуль 1 входять теми 1-6, у змістовий модуль 2 – теми 7-9. Види контролю - поточний і підсумковий. Поточний контроль здійснюється під час проведення навчальних занять і має на меті регулярну перевірку засвоєння слухачами навчального матеріалу. Форми проведення поточного контролю під час навчальних занять: усне опитування, тестовий контроль, самооцінювання.

Оцінювання за формами поточного контролю:

Максимальна кількість балів	Змістовий модуль 1		Змістовий модуль 2		Залік	Підсумкова оцінка
	Поточний контроль	Тест 1	Поточний контроль	Тест 2		
	10	20	10	20	40	100
Сума	30		30		40	100

Для аспірантів, які набрали за результатами поточного контролю у двох змістових модулях сумарно меншу кількість балів, ніж критичний мінімум - **20** балів, проходження додаткового тестування є обов'язковим для допуску до заліку.

Підсумковий контроль (залік) проводиться на останньому занятті-семінарі. Підсумкова оцінка складається із суми балів двох змістових модулів та заліку.

Шкала оцінювання академічної успішності аспіранта

Рівень досягнень (бали за освітню діяльність)	Оцінка ЄКТС/ECTS	Оцінка за національною шкалою (National grade)
90 – 100	A	відмінно (Excellent)
75 – 89	B	добре (Good)
60 – 74	C	задовільно (Satisfactory)
1 – 59	D	незадовільно (Fail)

Методи навчання Пояснювально-ілюстративні, частково-пошукові, проблемного викладання матеріалу, дослідницькі.

Технічні засоби навчання Проектор мультимедійний; ноутбук.

Матеріальне забезпечення дисципліни Аудиторії, лабораторні приміщення відділу генетичної інженерії.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

Рекомендована основна література

1. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. – М.: Мир, 2002. — 589 с. ISBN 5-03-003328-9
2. Даниленко Н.Г., Давыденко О.Г. Миры геномов органелл. – 2003 - Мн. – Тэхналогія. – 494 с. ISBN 985-458-077-6.
3. Миронова Л., Падкина М., Самбук Е. РНК. Синтез и функции // Эко-Вектор, 2017. - 288 с.
4. Льюин Б. Гены / Б. Льюин; пер. 9-го англ. изд. —М. : БИНОМ . Лаборатория знаний, 2011. —896 с. ISBN 978-5-94774-793-5
5. Сиволоб А.В. Молекулярна біологія : підручник // А.В. Сиволоб. – К. : Видавничо-поліграф. центр “Київський університет”, 2008. – 384 с. ISBN 978-966-439-068-9.
6. Dey N, Sarkar S., Acharya S., Maiti I. B. Synthetic promoters in planta // Planta – 2015 – V. 242(5). – P. 1077-1094. DOI 10.1007/s00425-015-2377-2
7. Dolgova A.S., Dolgov S.V. Matrix attachment regions as a tool to influence transgene expression // 3 Biotech – 2019 – V. 9:176. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1709-5>

Рекомендована додаткова література

8. Abranches R., Shultz R.W., Thompson W.F. et al. Matrix attachment regions and regulated transcription increase and stabilize transgene expression // Plant Biotechnol J. – 2005. – V. 3(5). – P. 535–543.

9. Ahmad N., Michoux F., Lössl A.G., Nixon P.J. Challenges and perspectives in commercializing plastid transformation technology // *J Exp Bot.* - 2016 –V. 67(21). – P. 5945-5960. doi: 10.1093/jxb/erw360
10. Allen G.C., Hall G.E., Childs L.C. et al. Scaffold attachment regions increase reporter gene expression in stably transformed plant cells // *Plant Cell.* Volume -1993 – V. 5(6). – P. 603–613
11. Allen G.C., Hall G.E., Michalowski S. et al. High-level transgene expression in plant cells: effects of a strong scaffold attachment region from tobacco // *Plant Cell.* – 1996. – V. 8(5). – P. 899–913.
12. Allen G.C., Spiker S., Thompson W.F. Use of matrix attachment regions (MARs) to minimize transgene silencing // *Plant Mol. Biol.* – 2000. – V. 43(2–3). – P. 361–76.
13. Aysha J, Noman M, Wang F et al. Synthetic Promoters: Designing the cis Regulatory Modules for Controlled Gene Expression // *Molecular Biotechnology* - 2018 –V. 60(8). – P. 608-620. <https://doi.org/10.1007/s12033-018-0089-0>
14. Barkan A. Expression of plastid genes: organelle-specific elaborations on a prokaryotic scaffold // *Plant Physiol.* – 2011. – V. 155(4). – P. 1520-1532. doi: 10.1104/pp.110.171231
15. Baulcombe D. RNA silencing in plants // *Nature* – 2004 – V. 431(7006). - P. 356–363.
16. Benfey P.N., Ren L., Chua N.H. Tissue-specific expression from CaMV 35S enhancer subdomains in early stages of plant development // *EMBO J.* – 1990. – V. 9 (6). – P. 1677–1684.
17. Berecz B., Zelenyánszki H., Pólya S., Tamás-Nyitrai C., Oszvald M. Plastid Molecular Pharming. Production of Oral Vaccines via Plastid Transformation // *Mini Rev Med Chem.* – 2017. – V. 17(13). – P. 1292-1315. doi: 10.2174/1389557516666161004161801.
18. Bevan M. Binary Agrobacterium vectors for plant transformation // *Nucleic Acids Res.* – 1984. – V. 12. – P. 8711-8721.
19. Bestor T. H. DNA methylation: Evolution of a bacterial immune function into a regulator of gene expression and genome structure in higher eukaryotes // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* – 1990 – 326. – P. 179–187.
20. Bhullar S. Chakravarthy S., Advani S. et al. Strategies for development of functionally equivalent promoters with minimum sequence homology for transgene expression in plants: cis-elements in a novel DNA context versus domain swapping // *Plant Physiol.* – 2003. – V. 132 (2). – P. 988-998.
21. Bouabe H., Fassler R., Heesemann J. Improvement of reporter activity by IRES-mediated polycistronic reporter system // *Nucleic Acids Res* – 2008 – V. 36(5):e28. doi: 10.1093/nar/gkml119
22. Branton D., Deamer D. W., Marziali A., Bayley H., Benner S. A. The potential and challenges of nanopore sequencing // *Nature biotechnology.* — 2008-10. — V. 26, (10). — P. 1146–1153. doi:10.1038/nbt

23. Brenner S., Johnson M., Bridgham J., Golda G., Lloyd D. H. Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays // *Nature Biotechnology*. — 2000. — V. 18, (6). — P. 630–634. doi:10.1038/76469
24. Buchon N., Vaury C. RNAi: a defensive RNA-silencing against viruses and transposable elements // *Heredity* — 2006. — V. 96 (2). — P. 195–202. doi:10.1038/sj.hdy.6800789
25. Bumgarner R. Overview of DNA microarrays: types, applications, and their future // *Current Protocols in Molecular Biology*. — 2013-01-01. — T. Chapter 22. — C. Unit 22.1. doi:10.1002/0471142727.mb2201s101
26. Carrington J., Ambros V. Role of microRNAs in plant and animal development // *Science*. — 2003. — V. 301 (5631). — P. 336–338. doi:10.1126/science.1085242
27. Cazzonelli C. I., Velten J. In vivo characterization of plant promoter element interaction using synthetic promoters // *Transgenic Res.* – 2008. – V. 17 (3). – P. 437-457.
28. Chuong E. B., Elde N.C., Feschotte C. Regulatory activities of transposable elements: From conflicts to benefits // *Nat. Rev. Genet.* – 2017 - 18, 71–86.
29. Covey S., Al-Kaff N., Lángara A. et al. Plants combat infection by gene silencing // *Nature* -1997 – V. 385(6619):781–782.
30. Dey N., Maiti I. B. Structure and promoter/leader deletion analysis of mirabilis mosaic virus (MMV) full-length transcript promoter in transgenic plants // *Plant Mol Biol.* – 1999. – V. 40 (5). – P. 771-782.
31. Dolgova A.S., Tikhonov M.V., Pushin A.S. et al. The use of artificial transcription terminators for creating transgenic plants with high-level expression of reporter gene // *Dokl Biochem Biophys* – 2015 – 464:305-7. doi: 10.1134/S1607672915040146
32. Erdmann R., Picard C. RNA-directed DNA Methylation // *Plos Genetics* -2019 - <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009034>
33. Fang R. X., Nagy F., Sivasubramaniam S. Multiple cis regulatory elements for maximal expression of the cauliflower mosaic virus 35S promoter in transgenic plants // *Plant Cell.* – 1989. – V. 1 (1). – P. 141–150.
34. Fuentes P., Armarego-Marriott T., Bock R. Plastid transformation and its application in metabolic engineering // *Curr Opin Biotechnol.* – 2018 – V. 49. – P. 10-15. doi: 10.1016/j.copbio.2017.07.004.
35. Gallie D.R., Sleat D.E., Watts J.W. et al. Mutational analysis of the tobacco mosaic virus 5'-leader for altered ability to enhance translation // *Nucleic Acids Res* – 1988. – V. 16(3) P. 883–893. doi: 10.1093/nar/16.3.883
36. Gavilano L., Coleman N., Burnley L. et. al. Genetic engineering of *Nicotiana tabacum* for reduced nicotine content // *J Agric Food Chem* — 2006. — V. 54 (24). — P. 9071—9078. doi:10.1021/jf0610458
37. Gleba Y., Klimyuk V., Marillonnet S. Magniffection-a new platform for expressing recombinant vaccines in plants // *Vaccine.* – 2005.- V. 18 (23). – P. 2042-2048.

38. Grünberg S., Hahn S. Structural insights into transcription initiation by RNA polymerase II // *Trends in Biochemical Sciences* – 2013 – V. 38 (12). – P. 603-611. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.09.002>
39. Halweg C., Thompson W.F., Spiker S. The Rb7 matrix attachment region increases the likelihood and magnitude of transgene expression in tobacco cells: a flow cytometric study // *Plant Cell*. - 2005 – V. 17(2). – P. 418–429.
40. Hily JM, Singer SD, Yang Y et al (2009) A transformation booster sequence (TBS) from *Petunia hybrid* functions as an enhancer-blocking insulator in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Cell Rep*. - 2009 – V. 28(7). – P. 1095–1104.
41. Holdt L. M., Kohlmaier A., Teupser D.. Molecular roles and function of circular RNAs in eukaryotic cells // *Cellular and Molecular Life Sciences*. — 2017. — v. 75. — P. 1071—1098. doi:10.1007/s00018-017-2688-5
42. Jefferson R. A., Kavanagh T. A., Bevan M. W. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants // *EMBO J*. – 1987. – V. 6 (13). - P. 3901–3907.
43. Juven-Gershon T., Kadonaga J.T. Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery // *Dev Biol* - 2010. – V. 339. – P. 225–229. DOI: 10.1016/j.ydbio.2009.08.009
44. Karin M. Too many transcription factors: positive and negative interactions // *New Biol. journal*. — 1990. — V. 2 (2). — P. 126—131.
45. Katiyar-Agarwal S., Morgan R., Dahlbeck D. et al. A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity // *PNAS* — 2006. — V. 103 (47). — P. 18002—18007. doi:10.1073/pnas.0608258103
46. Kozak M. A second look at cellular mRNA sequences said to function as internal ribosome entry sites // *Nucleic Acids Res*. – 2005 – V. 33(20):6593–6602. doi: 10.1093/nar/gki958
47. Kozak M. Regulation of translation via mRNA structure in pro- karyotes and eukaryotes // *Gene*. – 2005 – V. 361. – P. 13-37.
48. Kozak M. Lessons (not) learned from mistakes about translation // *Gene* -2007 – V. 403(1-2):194–203. DOI: 10.1016/j.gene.2007.08.017
49. Kurihara Y., Okubo-Kurihara E., Matsui M. Polycistronic expression of RNA silencing suppressor protects its own mRNA from RNA silencing // *Plant Biotechnology* – 2015 – V. 32:89–95. DOI: 10.5511/plantbiotechnology.15.0120b
50. Latchman D.S. Transcription factors: an overview // *Int. J. Biochem. Cell Biol*. — 1997. — V. 29 (12). — P. 1305—1312. DOI:10.1016/S1357-2725(97)00085-X.
51. Le L., Lorenz Y., Scheurer S., Fötisch K. et al. Design of tomato fruits with reduced allergenicity by dsRNAi-mediated inhibition of ns-LTP (*Lyc e 3*) expression // *Plant Biotechnol J* — 2006. — V. 4 (2). — P. 231—242. doi:10.1111/j.1467-7652.2005.00175
52. Lescot M., Déhais P., Thijs G. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences // *Nucleic Acids Res*. – 2002. – V. 30 (1). – P. 325-327.

53. Lindbo J. High-efficiency protein expression in plants from agroinfection-compatible Tobacco mosaic virus expression vectors // *BMC Biotechnology*.- 2007. - 7, Article number: 52.
54. Lucy A., Guo H., Li W., Ding S. Suppression of post-transcriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus // *EMBO J* — 2000. — V. 19 (7). — P. 1672—1680. doi:10.1093/emboj/19.7.1672
55. Maliga P. Plastid transformation in higher plants // *Annu Rev Plant Biol.* -2004. — V. 55. — P. 289-313. doi: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141633
56. Martinez-Salas E. Internal ribosome entry site biology and its use in expression vectors // *Curr. Opin. Biotechnol* - 1999 — V. 5:458–464. doi: 10.1016/s0958-1669(99)00010-5
57. Marillonnet S., Giritch A., Gils M., Kandzia R. et. al. In planta engineering of viral RNA replicons: Efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium* // *PNAS* — 2004. — Vol. 101, № 18 — P. 6852-6857.
58. Marillonnet S., Thoeringer C., Kandzia R. et al. Systemic *Agrobacterium tumefaciens*–mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants // *Nature Biotechnology*. — 2005. — V. 23. — P. 718-723.
59. Matzke M.A., Aufsatz W., Kanno T. et al. (2002) Homology-dependent gene silencing and host defense in plants // *Adv. Genet.* — 2002 — V. 46. — P. 235–275.
60. Matzke M., Kanno T., Matzke A. RNA-Directed DNA Methylation: The Evolution of a Complex Epigenetic Pathway in Flowering Plants // *Annual review of Plant Biol.* — 2015. — V. 66. — P. 243-267.
61. Mehrotra R., Gupta G., Sethi R. et al. Designer promoter: an artwork of cis engineering // *Plant Mol. Biol.* — 2011. - V. 75 (6). — P. 527-536.
62. Nanto K., Ebinuma H. Marker-free site-specific integration in plants // *Transgenic Res.* — 2008. — V. 17, № 3. P. 337-344.
63. Niggeweg R., Michael A., Martin C. Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid // *Nature Biotechnology* - 2004. — V. 22 (6). — P. 746—754. doi:10.1038/nbt966
64. Odell J. T., Nagy F., Chua N. H. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter // *Nature*. — 1985. — V. 313 (6005). — P. 810–812.
65. Potenza C., Aleman L., Gopalan C.S. Targeting transgene expression in research, agricultural and environmental applications: promoters used in plant transformation // *In Vitro Cellular and Developmental Biology. Plant* - 2004 — V.40. P. 1–22. doi.org/10.1079/IVP2003477.
66. Ratcliff F., Harrison B.D., Baulcombe D.C. A similarity between viral defense and gene silencing in plants // *Science* — 1997 — V. 276 (5318). - P. 1558–1560.
67. Ratcliff F., Harrison B.D., Baulcombe D.C. Gene silencing without DNA: RNA-mediated cross-protection between viruses // *The Plant Cell* — 1999. - V. 11(7):1207–1215.
68. Sanger M., Daubert S., Goodman R. M. Characteristics of a strong promoter from figwort mosaic virus: comparison with the analogous 35S promoter from

cauliflower mosaic virus and the regulated mannopine synthase promoter // *Plant Mol Biol.* – 1990. – V. 14 (3). – P. 433-443.

69. Shakhmuradov I. A., Umarov R Kh, Solovyev V.V. TSSPlant: a new tool for prediction of plant Pol II promoters // *Nucleic Acids Res.* – 2017. - 45(8). doi: 10.1093/nar/gkw1353

70. Shamloul M., Trusa J., Mett V., Yusibov V. Optimization and Utilization of Agrobacterium-mediated Transient Protein Production in *Nicotiana* // *J. Vis. Exp.* – 2014. – (86):51204. doi:10.3791/51204.

71. Sidorenko L., Bruce W., Maddock S. et al. Functional analysis of two matrix attachment region (MAR) elements in transgenic maize plants // *Transgenic Res.* - 2003 – V. 12(2). – P. 137–154.

72. Venter M. Synthetic promoters: genetic control through cis engineering // *Trends Plant Sci.* – 2007. - V. 12, № 3. – P. 118-124.

73. Voinnet O. RNA silencing as a plant immune system against viruses // *Trends Genet* — 2001. — V. 17 (8). — P. 449—459. — doi:10.1016/S0168-9525(01)02367-8

74. Yamamoto H., Unbehaun A., Spahn C.M.T. Ribosomal Chamber Music: Toward an Understanding of IRES Mechanisms // *Trends Biochem Sci* – 2017 – V.8. – P. 655–668. doi: 10.1016/j.tibs.2017.06.002

75. Yihe Yu., Po-Cheng Yu., Chang W. et all. Plastid Transformation: How Does it Work? Can it Be Applied to Crops? What Can it Offer? // *Int J Mol Sci* – 2020 - 21(14). – P. 4854. doi: 10.3390/ijms21144854

76. Werner S., Breus O., Symonenko Yu., Marillonnet S., Gleba Yu. High-level recombinant protein expression in transgenic plants by using a double-inducible viral vector // *PNAS* - 2011 - V. 108 (34) – P. 14061–14066. doi:10.1073/pnas.1102928108/-/DCSupplementa

77. Zemach A., McDaniel I. E., Silva P., Zilberman D. Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation // *Science* -2010 – 328. – P. 916–919.

78. Zhang B., Pan X., Cobb G., Anderson T. Plant microRNA: a small regulatory molecule with big impact // *Dev Biol* — 2006. — V. 289 (1). — P. 3—16. doi:10.1016/j.ydbio.2005.10.036