УДК 57.085:57.088

Н.А. МАТВЕЕВА [1], Ю.И. КУДРЯВЕЦ [2], А.А. ЛИХОВА [2], А.М. ШАХОВСКИЙ [1], Н.А. БЕЗДЕНЕЖНЫХ [2], Е.Ю. КВАСКО [1]

[1] Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев
[2] Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, Киев
E-mail: joyna56@gmail.com

ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ЦИКОРИЯ И САЛАТА С ГЕНОМ ИНТЕРФЕРОНА-$\alpha 2b$ ЧЕЛОВЕКА

Изучена биологическая активность белковых экстрактов трансгенных растений Cichorium intybus L. и Lactuca sativa L. с геном интерферона-α2b человека по отношению к вирусу везикулярного стоматита. Экстракты из трансгенных корней цикория и салата, полученных после трансформации A. rhizogenes, обладали противовирусной активностью в пределах 1620–5400 МЕ/г массы, а экстракты из листьев растений цикория, трансформированных A. tumefaciens – до 9375 МЕ/г. Показана зависимость противовирусной активности растительных экстрактов из корней или листьев от вектора, использованного для трансформации растений. Противовирусной активностью обладали экстракты из корней растений, полученных при трансформации с помощью A. rhizogenes, в то же время такая активность у экстрактов из листьев отсутствовала.

© Н.А. МАТВЕЕВА, Ю.И. КУДРЯВЕЦ, А.А. ЛИХОВА, А.М. ШАХОВСКИЙ, Н.А. БЕЗДЕНЕЖНЫХ, Е.Ю. КВАСКО, 2012

Введение. Биологическая активность интерферонов направлена, как известно, на защиту организма от различных патогенов: вирусов, бактерий, простейших, чужеродных клеток и др. Все клетки организма (кроме тромбоцитов и эритроцитов) несут рецепторы к интерферонам (ИФН) и могут вырабатывать эти белки в ответ на соответствующие индукторы. Наряду с чрезвычайно высокой удельной антивирусной активностью в организме ИФН активно вовлечены в регуляцию иммунных реакций и клеточного гомеостаза: они активируют все звенья специфического и неспецифического иммунитета, а также естественные киллеры и макрофаги, стимулируют экспрессию антигенов гистосовместимости и активируют дендритные клетки, стимулируют пролиферацию Т-клеток памяти и активность Т-клеточных эффекторов. ИФН усиливают экспрессию рецепторов гормонов, регулируют продукцию ряда цитокинов и экспрессию их рецепторов, стимулируют дифференцировку и контролируют пролиферативный потенциал клеток, ограничивают очаги воспаления и подавляют опухолевый ангиогенез.

Интерфероны обладают выраженной противоопухолевой активностью, обусловленной их действием как на организм, так и на опухолевые клетки. Они подавляют канцерогенез, индуцированный различными агентами, ингибируют пролиферацию и метастазирование опухолевых клеток, подавляют в них экспрессию онкогенов и усиливают апоптоз, подавляют ангиогенез в опухолевой ткани, повышают ее чувствительность к терапевтическим воздействиям и т.д. Поэтому интерферонотерапия не случайно все чаще применяется при лечении больных злокачественными новообразованиями в различных режимах – как в режиме монотерапии, так и при комбинированном лечении [1–5].

Семейство интерферонов представлено тремя типами – I, II и III. Интерферон I типа человека включает несколько подтипов, основными из которых являются ИФН-альфа и ИФН-бета. В большинстве случаев ИФН обладают видовой специфичностью, т.е. проявляют антивирусную активность лишь в клетках того же вида, однако некоторые субтипы ИФН обладают и межвидовой активностью [6].

Установлено, что интерферон I типа человека может проявлять антивирусную актив-

ность в некоторых растениях, например, в листьях табака против вируса табачной мозаики (в 10–1000 раз выше, чем в клетках человека) [7]. Создание рекомбинантных технологий обусловило попытки перенесения генов ИФН человека в клетки растений не только как факторов противовирусной защиты растений, но и как альтернативу синтезу этого белка в бактериальных системах. Так, для этой цели использовали растения табака [8], картофеля [9], салата [10], риса [11], моркови [12], ряски [13], причем рекомбинантный ИФН, синтезированный в растениях, обладал биологической активностью [14]. Исследования показали, что клетки растений являются достаточно эффективными биореакторами для производства не только различных субтипов ИФН, но и других рекомбинантных белков, включая вирусные и бактериальные белки, некоторые гормоны и др. В последние десятилетия активно развивается новое направление биотехнологии, создание растений – «съедобных вакцин» [15–18]. Такие растения представляют собой трансформанты, несущие гены бактериальных антигенов, которые выступают в качестве иммуногенных белков [19–21].

Изучение биотехнологических аспектов синтеза полноценного биологически активного ИФН продемонстрировало очевидные преимущества наработки этого цитокина в растениях, которые выражаются не только в качестве белка, но и в экономичности его производства. Вместе с тем, несмотря на многолетние исследования, некоторые аспекты наработки ИФН млекопитающих в растениях остаются неисследованными. Прежде всего продолжается поиск растений, в клетках которых можно получить наиболее высокий уровень синтеза биоактивного ИФН, а также способов трансгенеза – введение генов ИФН в состав ядерной или хлоропластной ДНК с помощью различных методов и векторов. Остается также недостаточно изученной биологическая активность ИФН в составе клеток растений при прохождении желудочно-кишечного тракта и многие другие аспекты.

В настоящей работе изучена экспрессия гена интерферона-*α2b* в трансгенных растениях цикория и салата, полученных с помощью агробактериальной трансформации, а также функциональная активность этого цитокина из экстрактов трансгенных растений, созданных при использовании различных векторов.

Материалы и методы. Трансгенные растения цикория и салата получали путем трансформации листовых эксплантов с помощью бактерий *A. rhizogenes* (вектор pCB161 [12]) и *A. tumefaciens* (вектор pCB124 [22]). Векторные конструкции pCB161 и pCB124 имели целевой ген *ifn-α2b* под контролем соответственно корнеспецифичного промотора сахарной свеклы *Mll* и 35S промотора вируса мозаики цветной капусты, а также селективный ген *nptII* (неомицинфосфотрансферазы II) под контролем промотора гена нопалинсинтетазы и кальретикулиновый сигнал [23] перед кодирующей частью гена *ifn-α2b*. Растения культивировали в стерильных условиях при 16-часовом световом фотопериоде и температуре +24 °С.

Для исследования транскрибирования перенесенных генов в трансформированных линиях растений проводили полимеразную цепную реакцию, совмещенную с обратной транскрипцией (ОТ–ПЦР). Суммарную РНК выделяли по методике [24]. Препараты суммарной РНК, обработанные ДНКазой I (свободной от РНКазы), служили матрицей для синтеза первой цепи кДНК. Синтез кДНК осуществляли с помощью набора реактивов «Fermentas» (Литва) по методике, описанной в статье [25]. Амплификацию проводили праймерами, специфичными к генам *ifn-α2b* (5′-ttgatgctcctggcacag-3′, 5′-ttctgctctgacaacctc-3′, 396 п.н.) и *nptII* (5′-cctgaatgaactccaggacgaggca-3′ и 5′-gctctagatccagagtcccgctcagaag-3′, 622 п.н.). Отрицательным контролем на присутствие в пробе РНК остатков ДНК, которая может быть матрицей для ПЦР, служила реакционная смесь без обратной транскриптазы (5 мкл). Суммарную ДНК агробактерий, используемую как положительный контроль в ПЦР, экстрагировали по методике [26].

Для приготовления белковых экстрактов растительный материал (корни или листья) взвешивали, помещали в фарфоровую ступку, добавляли 100 мМ Tris-HCl, pH 8,0 (5 мМ Na_2ЭДТА, 100 мМ NaCl, 10 мМ меркаптоэтанола, 2,5 % поливинилпирролидона, 1 % сахарозы) и растирали на холоду. Затем ма-

териал переносили в центрифужную пробирку и цетрифугировали 5 мин при 10 000 g (+4 °С). Надосадочную жидкость отбирали, переносили в чистую пробирку и центрифугировали 25 мин при 16 000 g (+4 °С). В аликвоте полученного супернатанта определяли концентрацию белка по методу Бредфорда [27].

Противовирусную активность экстрактов трансгенных растений устанавливали с помощью микрометода по снижению цитопатического действия (ЦПД) вируса везикулярного стоматита (ВВС, штамм Индиана) в клетках почки быка линии MDBK, высокочувствительных к антивирусному действию ИФН-альфа человека [28]. Клеточная линия MDBK и ВВС штамма Индиана были предоставлены Клеточным банком линий из тканей человека и животных Института экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины.

Субстрат-зависимые клетки MDBK рутинно культивировали в питательной среде DMEM («Sigma», США) с 10 % инактивированной сыворотки новорожденного теленка (СНТ) («Sigma», США), 40 мкг/мл гентамицина в увлажненной атмосфере с 5 % CO_2 при 37 °С. Пересев клеток осуществляли с помощью раствора версена.

В лунки 96-луночного планшета («Сантелаб», Украина) вносили по 200 мкл суспензии клеток MDBK в среде DMEM с 5 % СНТ из расчета $2 \cdot 10^4$ клеток на лунку. Через 24 ч в лунки планшета вносили исходный раствор образцов и титровали 5- или 2-кратными разведениями, используя четыре ряда параллелей для каждого образца. Через 24 ч в лунки вносили 100 ЦПД/50 ВВС в среде DMEM с 2 % СНТ. Результаты регистрировали через 24 ч визуально при 100 % ЦПД в контроле вируса, а также с помощью окраски клеток кристаллическим фиолетовым. За одну единицу активности ИФН принимали разведение образцов, при котором 50 % клеточного монослоя защищены от цитопатического действия ВВС. В качестве стандарта использовали международный стандарт интерферона-альфа, полученный из ВОЗ (2^{nd} WHO International Standard 1999. Interferon alpha 2b Human, rDNA E. coli derived-95/566, 70000 IU per ampoule). Средний титр ИФН определяли по Риду и Менчу и выражали в международных единицах (МЕ) на 1 мл экстракта (МЕ/мл), МЕ/г массы растения или МЕ/мг общего растворимого белка.

Результаты исследований и их обсуждение. Генетическую трансформацию с использованием бактерий рода *Agrobacterium* достаточно часто применяют для получения трансгенных растений, в том числе и с генами ИФН [12, 29], поскольку эти бактерии имеют природную способность переносить собственную ДНК в клетки растений (в природе это образование «корончатых галлов» при инфицировании *A. tumefaciens* или «бородатых» корней при заражении *A. rhizogenes*). Этот метод генетической трансформации является достаточно простым, не требует специального оборудования и может быть применен для трансформации разных видов растений [30].

В экспериментах использовали экстракты трансгенных растений цикория и салата, несущих ген интерферона, а также экстракты нетрансформированных растений в качестве контроля. Трансгенные растения получены нами ранее путем трансформации с помощью *A. tumefaciens* [22] или *A. rhizogenes* [25]. Методом ПЦР ранее было показано, что эти растения имели как селективный ген неомицинфосфотрансферазы *nptII*, так и целевой ген интерферона *ifn-α2b* [22, 25]. Вместе с тем известно, что при трансформации ядерной ДНК возникает так называемое явление «молчания» генов, при котором отсутствует синтез мРНК и, соответственно, не синтезируется целевой белок. Поэтому был проведен анализ полученных «бородатых» корней и регенерированных трансгенных растений с использованием ОТ-ПЦР. По результатам анализов в пяти из 9 исследованных линий цикория (четыре линии корней и регенерантов, трансформированных pCB161, и одна линия растений, трансформированных pCB124) была определена транскрипция гена *ifn-α2b* (таблица и рис. 1). В то же время у растений всех исследованных линий детектировали мРНК селективного гена *nptII*, что вполне объяснимо, так как селекция растений проводилась путем отбора линий, устойчивых к канамицину.

Анализ на противовирусную активность выявил, что экстракты из корней трех линий (вектор pCB161) цикория обладали противовирусной активностью по отношению к ВВС в пределах или 1620...2250 МЕ/г сырой массы растений, или 358...1203 МЕ/мг общего растворимого белка. Вместе с тем у растений одной линии, несмотря на наличие мРНК по данным ОТ-ПЦР анализа, активность против ВВС отсутствовала, что может быть результатом нарушения следующего за транскрипцией звена – процесса трансляции, посттрансляционных изменений или очень малого количества синтезируемого белка.

Из пяти исследованных линий pCB124 цикория в экстрактах только у одной выявлена противовирусная активность; ее уровень был значительно выше, чем в экстрактах «бородатых» корней, и составил 9327 МЕ/г массы

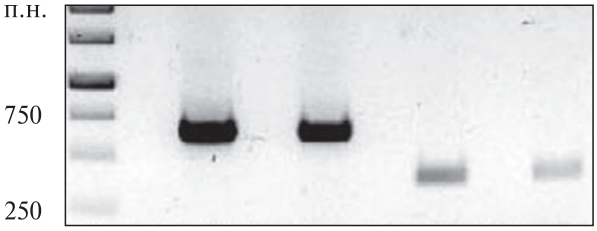

Рис. 1. Электрофореграмма результатов ОТ-ПЦР анализа трансгенных линий цикория (*1*, *2*, *5*, *6* – корни; *3*, *4*, *7*, *8* – листья), полученных с использованием вектора pCB161: *1–4 – nptII*; *5–8 – ifn-α2b*; четные треки – синтез обратных транскриптов в присутствии обратной транскриптазы, нечетные – без обратной транскриптазы

или 3291 МЕ/мг белка. Следует отметить, что у четырех линий растений, не содержащих ИФН-подобной биологической активности,

Противовирусная активность белковых экстрактов и результаты ОТ-ПЦР анализа трансгенных корней и растений цикория и салата

№ линии	Вектор	Образец	Активность		ОТ-ПЦР анализ	
			МЕ/г массы	МЕ/мг общего белка	*nptII*	*ifn-α2b*
		C. intybus				
161/6	pCB161(Mll::HuINFa-2b)	Корни	2250	358,34	+	+
		Листья	288	262,69	+	+
161/13	pCB161(Mll::HuINFa-2b)	Корни	1620	1203,56	+	+
		Листья	0	0	+	+
161/21	pCB161(Mll::HuINFa-2b)	Корни	0	0	+	+
		Листья	0	0	+	+
161/14	pCB161(Mll::HuINFa-2b)	Корни	2160	587,72	+	+
124/22	pCB124(35S::HuINFa-2b)	Листья	0	0	+	–
124/8	pCB124(35S::HuINFa-2b)	Листья	0	0	+	–
124/8/6	pCB124(35S::HuINFa-2b)	Листья	0	0	+	–
124/7	pCB124(35S::HuINFa-2b)	Листья	0	0	+	–
124/5	pCB124(35S::HuINFa-2b)	Листья	9327	3291,44	+	+
K	Контроль	Листья	0	0	–	–
		L. sativa				
161/1	pCB161(Mll::HuINFa-2b)	Корни	5400	2527,84	+	+
		Листья	0	0	+	+
161/3	pCB161(Mll::HuINFa-2b)	Корни	5400	17646,12	+	+
		Листья	0	0	+	+
161/10	pCB161(Mll::HuINFa-2b)	Корни	2250	1259,54	+	+
161/17	pCB161(Mll::HuINFa-2b)	Корни	2880	2730,55	+	+
K	Контроль	Корни	0	0	–	–

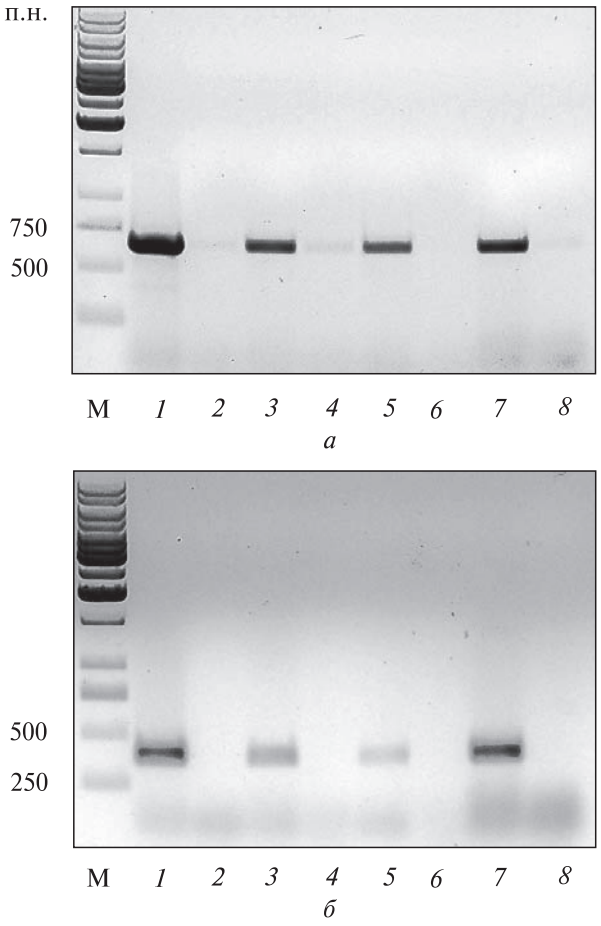

Рис. 2. Электрофореграмма результатов ОТ-ПЦР анализа трансгенных линий салата (*1–4* – корни; *5–8* – листья): *а* – *nptII*; *б* – *ifn-α2b*; нечетные треки – синтез обратных транскриптов в присутствии обратной транскриптазы, четные – без обратной транскриптазы

не обнаружены и мРНК гена интерферона, что свидетельствует о «молчании» гена. Отсутствие экспрессии перенесенных генов обусловлено, как известно, разными причинами, и в ряде случаев это происходит при трансформации ядерной ДНК [31]. Закономерно, что нарушение экспрессии гена ИФН уже на уровне транскрипции соответствует и отсутствию биологического эффекта продукта этого гена – протививирусной активности.

Белковые экстракты из корней четырех проанализированных линий салата (вектор pCB161) обладали активностью в пределах 2250–5400 МЕ/г сырой массы растений или 1259–17646 МЕ/мг общего растворимого белка. Однако экстракты из листьев, регенерированных из «бородатых» корней салата, активностью против ВВС не обладали (таблица), хотя мРНК гена *ifn-α2b* и детектировались в этих растениях (рис. 2). Такой результат можно было ожидать, поскольку в векторе pCB161, использованном для трансформации, ген *ifn-α2b* находится под корнеспецифичным промотором *Mll* [32]. Вместе с тем ранее при использовании того же вектора установлено, что активный интерферон-*α2b* синтезировался не только в корнях, но и в листьях моркови [12]. Возможно, действие промотора *Mll* видоспецифично. Таким образом, использование корнеспецифичного промотора *Mll* нецелесообразно в том случае, когда целью работы является синтез целевых белков в надземной части растений салата и цикория. Однако промотор может быть успешно использован в векторах при трансформации растений этих видов для синтеза целевых продуктов в корнях.

Таким образом, уровень активности против ВВС полученных нами линий цикория составлял 1620–9327 МЕ/г сырой массы растений, салата – 2250–5400 МЕ/г, что является достаточно высоким показателем. Так, в ряде работ [33–35] продемонстрировано, что интерферон-*α2b* человека не только может синтезироваться в растительных клетках, но и обладает соответствующей биологической активностью. Уровень противовирусной активности экстрактов трансгенных растений колеблется в достаточно широких пределах. Например, в растениях салата с геном интерферона-*α2b* человека активность против вируса везикулярного стоматита составляла 448 МЕ/г массы растений [36], активность экстрактов из растений картофеля – 560 МЕ/г [9], 923–3029 МЕ/г [37] и 512–2048 МЕ/г ткани, растений табака (транзиентная экспрессия) – до 3200 МЕ/г сырой массы [38] и зависела от типа исходного материала (корни, листья, семена [11]), а также возраста материала (например, молодые или зрелые листья [12]).

Очень высокий уровень активности растительных экстрактов показан у трансгенных растений моркови, причем активность экс-

трактов из молодых листьев была выше, чем у зрелых, и составляла до 50 000 МЕ/г сырой массы [12].

Результаты проведенных экспериментов показали, что растения цикория и салата являются достаточно эффективной биотехнологической системой наработки рекомбинантного интерферона-*α2b*, поскольку клетки трансгенных растений, имеющие ген интерферона-*α2b* человека, могут синтезировать соответствующий белок. Экстракты, полученные из трансгенных растений, демонстрировали специфическую биологическую активность – подавляли действие цитопатогенного вируса ВВС в клеточной системе, высокоспецифичной для альфа-интерферона человека: как известно, клетки линии MDBK несут на своей поверхности рецепторы, которые с высокой эффективностью взаимодействуют именно с ИФН-альфа человека (одна единица активности ИФН в этой системе соответствует 1 МЕ).

Компоненты экстрактов растений могут содержать вещества, способные модифицировать действие ИФН на клетки – подавлять или, напротив, стимулировать его активность, или же обладать собственной антивирусной активностью неинтерферонового плана. Для выяснения этого обстоятельства мы определяли наличие антивирусной активности в экстрактах контрольных растений, а также контрольных образцах, в которые добавляли известное количество рекомбинантного интерферона-*α2b* человека. Установлено, что экстракты контрольных растений цикория не содержали веществ с антивирусной активностью, а также веществ, стимулирующих или ингибирующих действие рекомбинантного интерферона-*α2b*. Таким образом, нами показано, что биологическая (противовирусная) активность интерферона-*α2b* в клетках цикория и салата не подвергается какой-либо модификации другими компонентами растения, присутствующими в экстрактах.

Поскольку растения цикория и салата являются возможным объектом для генетической трансформации (легко культивируются *in vitro*, обладают высокой способностью к регенерации, легко трансформируются с помощью бактерий рода *Agrobacterium*), а экстракты трансгенных растений обладают биологической активностью, они могут быть использованы и для создания растений с другими генами, представляющими практический интерес. В связи с тем, что оба вида растений применяются в пищу без термообработки, трансгенные растения, демонстрирующие протививирусную активность, могут быть использованы в качестве «съедобных вакцин».

Выводы. Результаты исследований показали, что у линий салата и цикория, трансформированных векторами pCB124 и pCB161 и имеющих ген *ifn-α2b* человека, выявлена противовирусная активность по отношению к ВВС, т.е. перенесенный ген не только присутствует в геноме растения, но и активно функционирует. Вместе с тем у ряда растений обнаружено явление «молчания» гена и, соответственно, отсутствие ИФН-специфической биологической активности в экстрактах. У части линий, насмотря на синтез обратных транскриптов, биологическая активность экстрактов растений не обнаружена.

Наибольшая противовирусная активность выявлена у растений, полученных после трансформации вектором pCB124 с геном интерферона-*α2b* человека под 35S промотором вируса мозаики цветной капусты. Эксперименты показали, что корнеспецифичный промотор *Mll* также может быть использован для создания векторов при получении трансгенных корней и растений цикория, а также салата с геном интерферона-*α2b*, однако противовирусной активностью в этом случае обладают только трансгенные корни. Максимальная активность экстрактов растений цикория и салата составляла до 9327 и 5200 МЕ/г массы соответственно, что позволяет использовать растения для продуцирования биологически активного интерферона.

N.A. Matvieieva, Yu.I. Kudryavets, O.O. Lichova, A.M. Schachovsky, N.O. Bezdenezhnykh, O.Yu Kvasko

ANTIVIRAL ACTIVITY OF EXTRACTS OF TRANSGENIC CICHORY AND LETTUCE PLANTS WITH THE HUMAN INTERFERON ALPHA-*2b* GENE

Biological activity of protein extracts from transgenic plants of chicory *Cichorium intybus* L. and let-

tuce *Lactuca sativa* L. with human interferon *α2b* gene was investigated against vesicular stomatitis virus. It was shown that the extracts from the hairy roots of chicory and lettuce transformed by *A. rhizogenes* possess the antiviral activity 1620...5400 IU/g weight, and the extracts from leaves of the plants transformed by *A. tumefaciens* – till 9375 IU/g weight. Dependence of plant extract biological activity on the transformation vector was shown.

Н.А. Матвєєва, Ю.Й. Кудрявець, О.О. Лихова, А.М. Шаховський, Н.О. Бездєнєжних, О.Ю. Кваско

ПРОТИВІРУСНА АКТИВНІСТЬ ЕКСТРАКТІВ ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН ЦИКОРІЮ ТА САЛАТУ З ГЕНОМ ІНТЕРФЕРОНУ-*α2b* ЛЮДИНИ

Досліджено противірусну активність екстрактів трансгенних рослин цикорію *Cichorium intybus* L. та салату *Lactuca sativa* L. з геном інтерферону-*α2b* людини відносно вірусу везикулярного стоматиту. Показано, що екстракти з трансгенних коренів цикорію та салату, отриманих за допомогою *A. rhizogenes,* мають противірусну активність в 1620–5400 МЕ/г маси, а екстрактів з листків рослин цикорію, трансформованих *A. tumefaciens* – до 9375 МЕ/г. Встановлено залежність рівня біологічної активності рослинних екстрактів з коренів або листків від вектора, використаного для трансформації.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Goldstein D., Laszlo J.* The role of interferon in cancer therapy : A current perspective // Cancer J. Clin. – 1988. – **38**, № 5. – P. 258–277.
2. *Sievert W.* Management issues in chronic viral hepatitis: hepatitis C //J. Gastroenterol. Hepatol. – 2002 – **17**, № 4. – P. 415–422.
3. *Apisarnthanarax N., Talpur R., Duvic M.* Treatment of cutaneous T cell lymphoma: current status and future directions // Amer. J. Clin. Dermatol. – 2002. – **3**, № 3. – P. 193–215.
4. *Воронцова А.Л., Кудрявец Ю.И., Жильчук В.Е.* Интерфероны и их применение в клинической онкологии // Здоровье женщины. – 2003. – **4**, № 16. – С. 8–14.
5. *Воронцова А.Л., Кудрявець Ю.Й.* Цитокіни в терапії злоякісних новоутворень // Онкологія : Вибрані лекції для студентів і лікарів / За ред. В.Ф. Чехуна. – К.: Здоров'я України, 2010. – С. 597–612.
6. *Белоцкий С.М., Спивак Н.Я.* Интерфероны. Биологические и клинические эффекты. – Киев : Фитосоциоцентр, 2006. – 288 с.
7. *Orchansky P., Rubinstein M., Sela I.* Human interferons protect plants from virus infection (tobacco mosaic virus/enzyme-linked immunosorbent assay/glycosidases) // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1982. – **79,** № 7. – P. 2278–2280.
8. *Arlen P.A., Falconer R., Cherukumilli S., Cole A., Cole A.M., Oishi K.K., Daniel H.* Field production and functional evaluation of chloroplast-derived interferon-α2b // Plant Biotechnol. J. – 2007. – **5**, № 4. – P. 511–525.
9. *Ohya K., Matsumura T., Ohashi K. et al.* Expression of two subtypes of human IFN-α in transgenic potato plants // J. Interferon & Cytokine Res. – 2001. – **21**, № 8. – P. 595–602.
10. *Jing Lia, Min Chena, Xian-Wei Liua et al.* Transient expression of an active human interferon-beta in lettuce // Sci. Hort. – 2007. – **112**, № 3. – P. 258–265.
11. *Masumura T., Morita S., Miki Y. et al.* Production of biologically active human interferon-α in transgenic rice // Plant Biotechnol. – 2006. – **23**, № 1. – P. 91–97.
12. *Luchakivskaya Y., Kishchenko O., Gerasymenko I., Olevinskaya Z., Simonenko Y., Spivak M., Kuchuk M.* High-level expression of human interferon alpha-2b in transgenic carrot (*Daucus carota* L.) plants// Plant Cell Rep. – 2011. – **30**, № 3. – P. 407–415.
13. *De Leede L.G., Humphries J.E., Bechet A.C., Van Hoogdalem E.J., Verrijk R., Spencer D.G.* Novel controlled-release *Lemna*-derived IFN-alpha2b (Locteron): pharmacokinetics, pharmacodynamics, and tolerability in a phase I clinical trial // J. Interferon Cytokine Res. – 2008. – **28**, № 2. – P. 113–122.
14. *Tzy-Li Chen, Yi-Ling Lin, Yi-Ling Lee et al.* Expression of bioactive human interferon-gamma in transgenic rice cell suspension cultures // Transgenic Res. – 2004. – **13**, № 5. – P. 499–510.
15. *Streatfield S.J.* Mucosal immunization using recombinant plant-based oral vaccines// Methods. – 2006. – **38**, № 2. – P. 150–157.
16. *Aziz M. A., Singh S., Anand Kumar P., Bhatnagar R.* Expression of protective antigen in transgenic plants: a step towards edible vaccine against anthrax // Biochem. Biophys. Res. Communs. – 2002. – **299**, № 3. – P. 345–351.
17. *Rigano M.M., Walmsley A.M.* Expression systems and developments in plant-made vaccines // Immunol. Cell Biol. – 2005. – **83**, № 3. – P. 271–277.
18. *Tae-Geum Kim, Moon-Sik Yang.* Current trends in edible vaccine development using transgenic plants // Biotechnol. and Bioprocess Engineering. – 2010. – **15,** № 1. – P. 61–65.
19. *Franconi R., Di Bonito P., Dibello F., Accardi L., Muller A., Cirilli A., Simeone P., Dona M.G., Venuti A., Giorgi C.* Plant-derived human papillomavirus 16

E7 oncoprotein induces immune response and specific tumor protection // Cancer Res. – 2002. – **62**, № 13. – P. 3654–3658.
20. *Rigano M.M., Dreitz S., Kipnis A.P., Izzo A.A., Walmsley A.M.* Oral immunogenicity of a plant-made, subunit, tuberculosis vaccine // Vaccine. – 2006. – **24**, № 5. – P. 691–695.
21. *Young Sook Kim, Bang Geul Kim, Tae Geum Kim et al.* Expression of a cholera toxin B subunit in transgenic lettuce (*Lactuca sativa* L.) using *Agrobacterium*-mediated transformation system // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2006. – **87**, № 2. – P. 203–210.
22. *Матвєєва Н.А., Шаховський А.М., Герасименко І.М., Кваско О.Ю., Кучук Н.В.* Перенесення гена біосинтезу інтерферону-*α2b* в рослини цикорію (*Cichorium intybus* L.) методом агробактеріальної трансформації // Biopolym. and Cell. – 2009. – **25**, № 2. – С. 120–125.
23. *Borisjuk N., Borisjuk L., Logendra S., Petersen F., Gleba Y., Raskin I.* Production of recombinant proteins in plant root exudates // Nat. Biotechnol. – 1999. – **17**, № 5. – P. 466–469.
24. *Logemann J., Schell J., Willmitzer L.* Improved method for the isolation of RNA from plant tissues // Anal. Biochem. – 1987. – **163**, № 1. – P. 16–20.
25. *Матвєєва Н.А., Кіщенко О.М., Шаховський А.М., Кучук М.В.* Синтез інуліну в «бородатих коренях» цикорію, трансформованого за допомогою *Agrobacterium rhizogenes* // Біотехнологія. – 2011. – **4**, № 3 – С. 56–63.
26. *Армитидж Ф., Уолден Р., Дрейпер Дж.* Выделение тотальных препаратов нуклеиновых кислот из *A. tumefaciens* // Генная инженерия растений. – М.: Мир, 1991. – С. 76–78.
27. *Bradford M.M.* A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – **7**, № 72. – P. 248–254.
28. *Rubinstein S., Familletti Ph., Petska S.* Convenient assay for interferons // J. Virol. – 1981. – **37**, № 2. – P. 755–758.
29. *Chen T.L., Lin Y.L., Lee Y.L., Yang N.S., Chan M.T.* Expression of bioactive human interferon-gamma in transgenic rice cell suspension cultures // Transgenic Res. – 2004. – **13**, № 5. – P. 499–510.
30. *Tepfer D.* Genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes* // Physiol. Plant. – 1990. – **79**, № 1. – P. 140–146.
31. *Kooter J.M., Matzke M.A., Meyer P.* Listening to the silent genes: transgene silencing, gene regulation and pathogen control // Trends Plant Sci. – 1999. – **4**, № 9. – P. 340–347.
32. *Oltmanns H., Kloos D.U., Briess W. et al.* Taproot promoters cause tissue specific gene expression within the storage root of sugar beet // Planta. – 2006. – **224**, № 1. – P. 485–495.
33. *Jarosinski K.W., Jia W., Sekellick M.J., Marcus P.I., Schat K.A.* Cellular responses in chickens treated with IFN-alpha orally or inoculated with recombinant Marek's disease virus expressing IFN-alpha// J. Interferon Cytokine Res. – 2001. – **21**, № 5. – P. 287–296.
34. *Ohya K., Matsumura T., Itchoda N., Ohashi K., Onuma M., Sugimoto C.* Ability of orally administered IFN-alpha-containing transgenic potato extracts to inhibit Listeria monocytogenes infection// J. Interferon Cytokine Res. – 2005. – **25**, № 8. – P. 459–466.
35. *Zhen Zhu, Hughes K.W., Leaf Huang, Baolin Sun, Chunming Liu, Yuing Li.* Expression of human α-interferon cDNA in transgenic rice plants // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 1994. – **36**, № 2. – P. 197–204.
36. *Шелудько Ю.В., Герасименко И.М., Щербак Н.Л. и др.* Перспективы применения в ветеринарной медицине трансгенных растений, синтезирующих физиологически активный интерферон α2b человека // Ветеринар. медицина. – 2009. – **92**. – С. 528–532.
37. *Sawahel W.A.* The production of transgenic potato plants expressing human alpha-interferon using lipofectin-mediated transformation // Cell Mol. Biol. Lett. – 2002. – **7**, № 1. – P. 19–29.
38. *Sindarovska Y.R., Gerasymenko I.M., Sheludko Y.V., Olevinskaja Z.M., Spivak N.Y., Kuchuk N.V.* Production of human interferon alpha 2b in plants of *Nicotiana excelsior* by *Agrobacterium*-mediated transient expression // Cytol. Genet. – 2010. – **44**, № 5. – P. 313–316.

Поступила 08.04.11