УДК 577.112 + 577.218 + 602.4:58.086.8

ТРАНЗІЄНТНА ЕКСПРЕСІЯ ТРАНСГЕНІВ: ШВИДКИЙ МЕТОД ОТРИМАННЯ ЦІЛЬОВИХ РЕКОМБІНАНТНИХ БІЛКІВ У РОСЛИННИХ СИСТЕМАХ

ЯНА СІНДАРОВСЬКА

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 148, Київ, 03143, Україна
E-mail: sindarovskaya@ukr.net

Рослини розглядаються як альтернативна експресійна система для продукції цінних рекомбінантних білків – біофармацевтиків. Метод транзієнтної експресії генів дозволяє отримувати високі рівні цільових рекомбінантних білків вже через один-два тижні після інфікування рослинних клітин. Проте експресія цільового трансгена та кінцевий вихід рекомбінантного білка залежать від багатьох чинників: ефективності роботи експресійної касети, яка містить трансген, стабільності цільового рекомбінантного білка в рослинній клітині, штаму бактерій, який доставляє трансген у рослинну клітину, виду рослини-продуцента рекомбінантного білка та її фізіологічного стану, впливу деяких хімічних речовин та фізичних умов навколишнього середовища. В огляді узагальнено та обговорено досягнення, присвячені питанню підвищення виходу цільових рекомбінантних білків у рослинних експресійних системах, а також наведено приклади цінних рекомбінантних білків, отриманих у рослинах за допомогою транзієнтної експресії генів.

Ключові слова: *рослинні системи експресії, транзієнтна експресія генів, рекомбінантні білки, біофармацевтики, фактори, що впливають на продукцію білка, генетичні конструкції, Nicotiana benthamiana*

Гетерологічні експресійні системи та продукція рекомбінантних білків

Сучасний ринок фармацевтичних препаратів білкової природи щороку зростає: за даними аналітиків прибуток від їх продажу за 2024 рік становив понад 440 млрд доларів США і прогнозується подальше стале збільшення попиту на ці препарати, що призведе до збільшення прибутку до 655 млрд доларів США до 2029 р. (https://www.researchandmarkets.com/report/protein-drugs?srsltid=AfmBOoqQZw3DyeNYbdM65OxU4yCt0gkGZvbT-HpO1E_cmfon6IBQWH8T Protein Drugs Market 2025, report). Збільшення обсягів продукції цінних фармацевтичних білків стало можливим завдяки створенню надійних штучних біологічних систем для синтезу протеїнів, які замінили природні джерела. Отримання білків, наприклад, таких, які в нормі синтезуються в організмі людини, з їхніх природних джерел походження може бути ускладненим процесом і нести ризики контамінації фармацевтичних препаратів небезпечними патогенами, або пріонними чи онкогенними послідовностями. Штучні експресійні системи, які називають гетерологічними, дозволяють подолати ряд перешкод при отриманні цільових білків. Гетерологічні системи представляють собою еукаріотичні або прокаріотичні клітини, які синтезують невластиві для них від природи (чужорідні) білки, які називають рекомбінантними. Здатність до синтезу цільових рекомбінантних білків набувається в результаті перенесення в клітину цільових чужорідних генів за допомогою генно-інженерних маніпуляцій, а далі – клітини використовують власний біосинтетичний апарат для продукції рекомбінантних білків. На даний час домінуючими гетерологічними системами, які використовуються комерційними фірмами для отримання низки рекомбінантних білків для фармацевтичної, хімічної, харчової та інших промисловостей, є клітини бактерій *Escherichia coli* (кишкової палички) та клітини ссавців CHO (Chinese hamster ovary cells – клітини яєчників китайського хом'яка) (Rosano et al., 2019; Walsh and Walsh, 2022). Сучасні гетерологічні системи експресії є більш економічно вигідними, ефективними та безпечними для продукції ряду цінних фармацевтичних білків. Серед рекомбінантних білків медичного призначення найбільшим попитом користуються моноклональні антитіла, інсулін,

© ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ НАН УКРАЇНИ, 2026

еритропоетин, гормон росту, фолікулостимулюючий гормон, інтерферон, які використовують для лікування онкологічних захворювань та розладів організму різного роду (метаболічних, імунологічних, гормональних, генетичних) (Walsh and Walsh, 2022). Хоча згадані гетерологічні системи мають ряд переваг, вони не можуть бути ідеальними хазяїнами для продукції всіх можливих рекомбінантних білків, до того ж існують певні недоліки та потенційні ризики при використанні цих систем. Тому увагу дослідників привертають також альтернативні системи для гетерологічної експресії генів, до яких належать і рослинні (табл. 1).

Рослини мають ряд переваг над експресійними системами, заснованими на культурах бактеріальних клітин або клітин ссавців, у тому числі вважається, що рослини можуть бути більш економічно вигідними та безпечними для продукції рекомбінантних білків. Однією з основних невирішених проблем, що перешкоджає отриманню біофармацевтиків у рослинних системах у промислових масштабах, є низький рівень виходу цільових білків, що

Таблиця 1. **Гетерологічні системи експресії для продукції рекомбінантних білків (модифікована та доповнена за Nosaki et al., 2021)**

Тип експресійної системи	
Переваги системи	Недоліки системи
Бактеріальні клітини	
Високий рівень накопичення цільових рекомбінантних білків. Швидкі темпи росту клітин та легкість їх культивування. Створені бактеріальні штами з пригніченою активністю протеаз (для збільшення виходу цільових білків). Прості і недорогі ростові живильні середовища. Легкість масштабування процесу у строго контрольованих умовах.	Можливе утворення нерозчинних тілець-включень, що вимагає рефолдінгу цільових білків і підвищує вартість продукту. Відсутність численних посттрансляційних модифікацій, які забезпечують утворення функціональної молекули білка. Препарати потенційно можуть бути забруднені небезпечними для людини ендотоксинами.
Клітини ссавців	
Рекомбінантні білки, що походять від ссавців, утворюються у формі, максимально наближеній до природного білка, включаючи коректні посттрансляційні модифікації білкової молекули. Ці клітини – основний продуцент рекомбінантних антитіл.	До складу ростових живильних середовищ для підтримання культури клітин входять дороговартісні компоненти. Препарати потенційно можуть бути забруднені небезпечними патогенами людини та тварин, онкогенами чи пріонами.
Клітини дріжджів	
Швидкий ріст та легкість масштабування процесу. Відносно недорогі ростові живильні середовища. Легкість різних генетичних маніпуляцій з клітинами. Здатність клітин до фолдінгу та посттрансляційних модифікацій білків. Клітини вільні від патогенів людини та бактеріальних токсинів.	Труднощі з руйнуванням клітин. Технічні потреби ферментації потребують високоякісного обладнання, що ускладнює масштабність виробництва. Гіперглікозилювання білків, яке може впливати на їхню функціональну активність.
Клітини комах, уражені бакуловірусами	
Високі рівні експресії білків. Можливість введення кількох генів або великих за розміром генів. Легкість масштабування процесу виробництва. Здатність клітин до фолдінгу та посттрансляційних модифікації білків за еукаріотичним типом	Дороговартісне виробництво. Специфічне посттрансляційне глікозилювання білків. Протеоліз білків. Експресія цільового гена падає після декількох пасажів клітин.

Продовження табл. 1

Тип експресійної системи	
Переваги системи	Недоліки системи
Клітини рослин	
Легкість масштабування процесу отримання цільових білків при вирощуванні рослин у польових або тепличних умовах. Можливість отримання цільових білків у строго контрольованих умовах при використанні культур in vitro: суспензійні культури, культури коренів, культури калюсів або рослин. Прості і недорогі ростові живильні середовища. Посттрансляційні модифікації білків відбуваються за еукаріотичним типом. Цільові білки утворюються у доступній розчинній формі. Рослинні системи вільні від небезпечних патогенів людини та бактеріальних токсинів. Можливість створення трансгенних рослин, що будуть використанні як «їстівні вакцини».	Низький рівень виходу цільових білків, особливо при стабільній ядерній трансформації рослин. Необхідність очищення препаратів білків від шкідливих вторинних метаболітів, присутніх у деяких видів рослин (н-д, у представників роду *Nicotiana*). Посттрансляційне глікозилювання білків відрізняється від такого у клітинах ссавців, що може призводити до зміни активності чи стабільності цільового білка або викликати алергічні реакції. Складнощі адаптації до умов належної виробничої практики (Good Manufacturing Practice) щодо рослин, вирощених у польових умовах.

особливо помітно для трансгенних рослин зі стабільно трансформованим ядерним геномом (Coates et al., 2022). Створення трансгенних рослин, культур клітин, тканин чи органів, у яких чужорідні гени (тобто трансгени або перенесені гени) будуть інтегровані в геном і передаватимуться нащадкам, процес довготривалий, який може займати від кількох місяців до років. Такі трансгени здатні стабільно (тобто постійно, неперервно) або під впливом індукуючого фактора експресуватись у клітинах рослин, що в результаті призводить до акумулювання цільового рекомбінантного білка. Проте зазвичай рівні акумулювання гетерологічних рекомбінантних білків у трансгенних рослинах невисокі (≤ 1–2 % від загальної кількості розчинних білків клітини) (Hiatt et al., 1989; Tremblay et al., 2010), оскільки за своєю природою це невластиві для рослинної клітини білки, і їх акумулювання перешкоджає нормальному функціонуванню рослинного організму та його клітин; крім того, трансген може вбудуватись в транскрипційно неактивну область генома або метилюватись в результаті дії захисних систем організму на появу чужорідного генетичного матеріалу, що також перешкоджатиме акумулюванню високих рівнів рекомбінантних білків. Вищий рівень цільових білків у рослинних системах може бути досягнутий завдяки стабільній трансформації генома пластид (до 20 % від загальної кількості розчинних білків клітини) (Daniell et al., 2005; Tremblay et al., 2010) або шляхом транзієнтної експресії трансгенів.

Транзієнтна експресія трансгенів (ТЕТ): базові принципи методу та фактори, які на нього впливають. Способи підвищення рівнів цільових рекомбінантних білків

Метод ТЕТ базується на тимчасовій (непостійній) експресії трансгенів, які були перенесені в рослинні клітини. РНК (або ДНК), яка містить трансгени, може бути розповсюджена по сусідніх клітинах чи по всій рослині, якщо є необхідні транспортні білки (Sindarovska and Kuchuk, 2021, 2023), проте при цьому трансгени не вбудовуються в геном рослини і не успадковуються нащадками. ТЕТ дозволяє уникнути ряду проблем, які виникають під час отримання цільових рекомбінантних білків у трансгенних рослинах чи культурах клітин. Основними перевагами методу ТЕТ є швидкість отримання цільових рекомбінантних білків (впродовж 3–20 діб) та можливість досягнення високого їх вмісту (до 1–4 мг/г сирої маси листків рослин або до 60–80 % від

загальної кількості розчинних білків клітини) (Nosaki et al., 2021, Sindarovska and Kuchuk, 2021, 2023, 2024; Yamamoto et al., 2018, Marillonnet et al., 2005). Значно скоротити час отримання рекомбінантних білків вдається завдяки тому, що працюють із рослинами дикого типу, які отримують із насіння, в результаті чого відсутні довготривалі процедури трансформації, регенерації та скринінгу, що супроводжують створення трансгенних рослин. При ТЕТ цільовий білок можна виявити починаючи з 2-4 доби після інфікування рослини генетичним вектором, який несе цільовий трансген (Sindarovska and Kuchuk, 2021). Високий вміст цільових білків при ТЕТ досягається завдяки відсутності позиційних ефектів, тобто залежності рівнів експресії від місця вбудовування в геном рослинної клітини, а також завдяки короткій тривалості усього процесу синтезу рекомбінантних білків: через кілька днів після інфікування, листя рослин збирають та виділяють білок, тому рослина не встигає розвинути довготривалу адаптивну відповідь на присутність чужорідного гена. Наші власні дослідження показали, що метод ТЕТ може бути використаний для отримання цільових рекомбінантних білків в асептичній культурі клітин та рослин (in vitro) (Sindarovska and Kuchuk, 2021). Продукцію рекомбінантних білків в асептичних умовах in vitro легше контролювати та стандартизувати, що є необхідною вимогою для виготовлення фармацевтичних препаратів згідно зі стандартами cGMP (current Good Manufacturing Practice, сучасної належної виробничої практики).

Хоча метод ТЕТ сам по собі дозволяє отримати значно більший вихід рекомбінантних білків порівняно з методом стабільної ядерної трансформації, існує цілий ряд факторів біотичної та абіотичної природи, які можуть плинути на продукцію цільового білка. Тому питанню оптимізації умов для проведення ТЕТ з метою підвищення кінцевого виходу цільових рекомбінантних білків присвячено чималу кількість робіт.

Для отримання рекомбінантних білків шляхом транзієнтної експресії необхідно спершу ввести цільовий трансген у рослинну клітину. Найбільш зручно це зробити з використанням природних хелперів – фітопатогенних вірусів (наприклад, з родів *Tobamovirus* або *Potyvirus*) (Gleba et al., 2007; Lico et al., 2008; Pogue et al., 1998; Vasques et al., 2019; Wagner et al., 2004) або ґрунтових бактерій (*Agrobacterium tumefaciens,* синонім *Rhizobium radiobacter*) (An et al., 1985; Bevan, 1984; Gelvin, 2003), здатних за своєю природою до інфікування рослинних клітин та перенесення в них власних генів або трансгенів, які знаходяться у складі штучно створених генетичних плазмід (векторів). Наразі, з метою ТЕТ різні експресійні генетичні вектори з цільовими трансгенами вводять у рослинні клітини за допомогою агробактерій (*A. tumefaciens*), оскільки саме бактеріальні гени дозволяють швидко і одночасно інфікувати велику кількість клітин та максимально синхронізувати процес інфікування рослинних клітин чужорідною ДНК, що важливо для швидкого синтезу цільового рекомбінантного білка. Проте, сучасні експресійні касети зазвичай мають лише деякі генетичні елементи агробактерій, такі як ліву та праву граничну послідовності, так звані бордери – важливі для перенесення експресійної касети з цільовим трансгеном в рослинну клітину, а також бактеріальні термінатори транскрипції (Eidenberger et al., 2022; Peyret et al., 2019; Poborilova et al., 2020). Крім бактеріальних послідовностей ДНК, рослинні експресійні касети містять різні генетичні елементи рослинного, вірусного або синтетичного походження для покращення експресії цільового трансгена та підвищення вмісту рекомбінантного білка. У ряді робіт було показано, що наявність у складі експресійних касет генетичних елементів фітопатогенних вірусів значно покращує ефективність експресії цільового трансгена та збільшує вміст рекомбінантного білка в рослинних клітинах (Kagale et al., 2012; Lindbo, 2007a; Peyret et al., 2019; Shi et al., 2019; Sindarovska and Kuchuk, 2023, 2024). Найбільш поширеними вірусами рослин, які використовують для створення ефективних генетичних векторів, є вірус тютюнової мозаїки (TMV, тобамовірус), Х-вірус картоплі (PVX), вірус мозаїки вігни (CPMV), вірус жовтої карликовості бобів (BYDV) та деякі інші (Abrahamian et al., 2021; Cacizares et al., 2006;

Chen et al., 2011; Dickmeis et al., 2014; Huang et al., 2009; Kagale et al., 2012; Lindbo, 2007a, 2007b; Marillonnet et al., 2005; Merwaiss et al., 2024; Nausch et al., 2012; Sindarovska and Kuchuk, 2023, 2024; Schulz et al., 2015; Yamamoto et al., 2018). Зазвичай до складу експресійних касет вводять лише окремі вірусні генетичні елементи, які здатні покращити експресію цільових трансгенів або їх розповсюдження. До таких генетичних елементів належать регуляторні елементи, такі як субгеномні промотори, енхансери та 3′- та 5′-UTR (нетрансльовані ділянки генома), а також гени, що кодують вірусні полімерази, супресори посттранскрипційного сайленсингу генів, білки руху тощо. Наші власні та дослідження інших науковців довели, що введення вірусних елементів може значно покращити експресію цільових трансгенів та підвищити кінцевий вихід як репортерних білків, так і цінних фармацевтичних білків (Gils et al., 2005; Hahn-Löbmann et al., 2019; Merwaiss et al., 2024; Nausch et al., 2012; Sindarovska et al., 2010, 2019; Sindarovska and Kuchuk, 2021, 2024; Schulz et al., 2015; Yamamoto et al., 2018). Зокрема, нам вдалось збільшити продукцію лейкоцитарного інтерферону людини у рослинах у 80 разів при використанні покращеної генетичної конструкції створеної на основі повного генома X-вірусу картоплі в порівнянні з базовою генетичною конструкцією, що містила цільовий трансген під контролем 35S- промотора вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV) та агробактеріального nos-термінатора (Sindarovska and Kuchuk, 2024). Інші дослідники показали, що коекспресія трансгена та вірусних генів, що кодують регуляторні білки Rep/RepA клітинного циклу геміні вірусу (вірусу жовтої карликовості тютюну, TYDV), дозволило принаймні вдвічі збільшити рівні репортерного білка β-глюкуронідази (Norkunas et al., 2018); а використання геміні вірусного вектора в поєднанні з подвійним термінатором покращило вихід цільового білка GFP до 3,7 мг/г сирої маси (Yamamoto et al., 2018). У роботі Marillonnet et al. (2005) показано, що використання вірусних генетичних векторів на основі TMV з численними інтронними послідовностями у 10^3 разів підвищило частку утворення активних репліконів у клітинах та значно підвищило кінцевий вміст білка GFP у рослинах. Використання тобамовірусних векторів дозволило отримати в рослинах до 1 мг/г сирої маси соматотропного гормону росту людини (Gils et al., 2005), а білків коліцинів різних класів від 0,5 до 5,0 мг/г сирої маси (Hahn-Löbmann et al., 2019; Schulz et al., 2015). Ниткоподібні віруси PVX та TEV (вірус гравіювання тютюну) були використані для створення наночастинок, які експонують на своїй поверхні варіабельні домени антитіл проти коронавірусу SARS-CoV-2: в результаті отримали функціональні білкові молекули, вміст яких досягав 0,1 мг/г сирої маси (Merwaiss et al., 2024). З іншого боку, при створенні генетичних векторів потрібно чітко відокремлювати суттєві та несуттєві елементи, оскільки збільшення розміру генетичного вектора може знизити його стабільність і зашкодити акумулюванню цільового білка. У роботі Larsen, Curtis (2012) було показано, що зменшення розміру генетичного вектора призвело до збільшення продукції білка β-глюкуронідази у суспензійній культурі рослинних клітин у понад 6 разів. Аналогічні результати були показані в роботі інших науковців, де зменшення розміру генетичного вектора за рахунок видалення несуттєвих послідовностей значно підсилило рівні експресії цільових трансгенів у рослинах (Sainsbury et al., 2009).

Іншим варіантом покращення синтезу цільового рекомбінантного білка є оптимізація кодонного складу: точкові модифікації його нуклеотидної послідовності, які не впливатимуть на сам амінокислотний склад цільового білка. Такі заміни можуть бути доцільними, якщо у нуклеотидній послідовності цільового білка часто зустрічаються рідкісні для даного виду рослин кодони, що може стати причиною дефіциту відповідних тРНК і сповільнювати синтез мРНК, що в подальшому знизить рівень цільового білка. Модифікації створюють із метою заміни рідкісних на більш притаманні даному виду рослин кодони. Так, оптимізація кодонів призвела до збільшення вмісту цитокіну людини SCF, продукованого в рослинах, у 20–30 разів (Wang et al., 2021). Проте, оптимізація кодонів не завжди призводить до підвищення вмісту цільового білка (Conley et al., 2009b).

Зазвичай високі рівні акумулювання цільових білків при ТЕТ спостерігали для репортерних білків, у першу чергу для зеленого флуоресцентного білка GFP, отриманого із медузи *Aequorea victoria* та модифікованого для успішного синтезу в рослинних клітинах (Chiu et al., 1996; Pang et al., 1996). Проте досягти високого вмісту рекомбінантних білків, які мають практичне застосування, наприклад, для медицини (біофармацевтики) чи ветеринарії, виявилось набагато складніше. Одна із ключових проблем полягає у природних властивостях самого цільового білка, який опиняється у невластивому для нього оточуючому середовищі рослинної клітини і стикається з великою кількістю нових біомолекул, зокрема рослинних протеаз, які можуть налічуватись в клітинах сотнями (Jutras et al., 2020), та його здатності протидіяти шкідливому впливу цих біомолекул. GFP (та його модифікований варіант) виявився досить стійким до дії ряду хіміко-біологічних факторів, в тому числі до дії протеолітичних ферментів (Chiang et al., 2001; Leffel et al., 1997). Інші рекомбінантні білки, особливо з природною амінокислотною послідовністю без будь-яких модифікацій, здатних стабілізувати цільовий білок, зазвичай набагато чутливіші до дії рослинних протеаз і швидше руйнуються не лише в самій клітинні, але й під час екстрагування білків із рослинних тканин. З метою зменшення деградації, цільові білки можна спрямовувати у певні компартменти клітини: хлоропласти, вакуолі, ендоплазматичний ретикулум, або в апопластний простір клітин (Marin Viegas et al., 2015, 2017, Nausch et al., 2012; Ocampo et al., 2016), де рекомбінантні білки можуть мати більшу стійкість до тих чи інших класів рослинних протеаз. Наприклад, Gils et al. (2005) у своїй роботі показали, що спрямування рекомбінантного білка гормону росту людини в апопласт у 1000 разів підвищує його кінцевий вихід у порівнянні з білком, що накопичувався в цитозолі. А в роботі Ocampo et al. (2016), навпаки, спрямування антитіла 14D9 у ендоплазматичний ретикулум чи вакуоль збільшувало його вміст у 10 і 15 разів, відповідно, у порівнянні вмістом, отриманим при спрямуванні цього ж білка в апопласт. В іншому варіанті, можна створити трансляційно злиті білки: де цільовий білок об'єднують із допоміжним білком/ пептидом, який сприяє підвищенню кінцевого виходу цільового білка, його стабільності в розчині чи розчинності. Було показано, що злиття еластин-подібного поліпептиду (розміром 11 кДа) з цільовими рекомбінантними білками: GFP, людським інтерлейкіном-10, мишачим інтерлейкіном-4 або природним спідроїном 2, еритропоетином призвело до збільшення їх рівнів акумулювання в рослинах тютюну принаймні на порядок у порівнянні з рівнями акумулювання цих самих незлитих білків (Conley et al., 2009a; Patel et al., 2007). Проте, загалом такі маніпуляції не повинні шкодити функціональності та безпечності цільового білка. Убіквітин-подібний модифікатор SUMO (від англ. small ubiquitin-like modifier, розміром 12 кДа) – ще один із пептидів, здатних покращувати рівні акумулювання цільового білка. Показано, що злиття домена SUMO з антимікробними пептидами дозволило отримати високі рівні (до 5–7 мг/г біомаси листя) цільових фізіологічно активних пептидів, які мали низьку токсичність по відношенню до клітин ссавців (Chaudhary et al., 2023). Також було показано, що злиття з невеликим (розміром 10 кДа) поверхнево-активним білком гідрофобіном, що синтезується нитчастими грибами та може змінювати гідрофобність злитого з ним білка, підвищили рівень акумулювання фрагмента гемаглютиніну майже у 2,5 рази. При цьому цільовий білок не втрачав своєї функціональної активності й індукував вироблення нейтралізуючих антитіл в результаті імунізації мишей (Jacquet et al., 2014). Додавання іншого поліпептидного тегу у вигляді 5–32 тандемних повторів амінокислотного мотиву серин-пролін (Ser-Pr) до послідовності цільового білка GFP також збільшувало його кінцевий вихід максимально до 16 разів (Dolan et al., 2014). Також для успішної продукції цільового рекомбінантного білка важливо, щоби цей білок не мав токсичного впливу на саму рослинну клітину. Наприклад, профермент наттокінази (ферменту, який сприяє розчиненню кров'яних згустків), продукований внаслідок ТЕТ, утворював сильний витік електролітів із рослинних клітин, в той час як зріла форма білка не виявляла такої дії (Wang et al., 2025).

Серед інших прикладів підвищення вмісту цільових рекомбінантних білків у рослинній клітині є коекспресія цільових генів з генами, що кодують транскрипційні фактори. Так, коекспресія гена транскрипційного фактора bZIP28 з геном еритропоетину людини запобігала пошкодженню тканин рослин, посилювала експресію та збільшувала розчинність цільового білка (Wagner et al., 2024). Інша група дослідників визначала вплив коекспресії цільових генів із генами, що кодують інгібітори протеаз. Скринінг 29 різних інгібіторів протеаз виявив, що 4 інгібітори здатні підвищувати вміст фармацевтичних білків (галактозидази, еритропоетину та IgG-антитіла) у 4–10 разів (Grosse-Holz et al., 2018). У ще одному варіанті для підвищення вмісту білків GFP та фактора росту нервів використали нокдаун стрес-асоційованих генів рослини-хазяїна (Kopertekh, 2024). Також був запропонований підхід, при якому змінювали проникність плазмодесм рослини для покращення розповсюдження вірусних векторів із цільовими трансгенами, що призводило до збільшення акумулювання білків GFP та вакцинних антигенів на 60 % (Wang et al., 2023).

Потрапляючи у рослинну клітину, трансгени піддаються дії захисних систем рослинного організму, одним із проявів якого є посттрансляційний сайленсинг трансгенів (ПТСГ). В результаті запуску процесу ПТСГ трансгенні нуклеотидні послідовності гідролізуються до коротких фрагментів, і синтез цільового рекомбінантного білка припиняється. Для уникнення ПТСГ при ТЕТ використовують фітовірусні супресори сайленсингу. Супресори сайленсингу – це природні вірусні білки (або їх модифікації), які дозволяють трансгенам уникати розпізнавання та гідролітичного розщеплення захисними системами рослинного організму. Відомо декілька супресорів сайленсингу, які сприяють акумулюванню цільових рекомбінантних білків. Так достовірного збільшення рівнів активності білка β-глюкуронідази вдалось досягти при коекспресії гена цільового білка та генів, які кодують білки p19 TBSV (вірусу кущистої карликовості томатів, англ. tomato bushy stunt virus), CMV 2b (усічений) (вірусу мозаїки огірка, англ. cucumber mosaic virus) та сумісної дії обох супресорів сайленсингу (Norkunas et al., 2018). Позитивний вплив супресора ПТСГ HC-Pro був також показаний у роботі Wydro et al. (2006): вміст рекомбінантного GFP подвоювався у присутності даного супресора. А у роботі Wroblewski et al. (2005) супресори ПТСГ (HC-Pro та p19 TBSV) позитивно впливали на вміст рекомбінантного GFP, проте не мали очевидного впливу на вміст β-глюкуронідази. В роботі Arzola et al. (2011) також було доведено, що додавання супресорів ПТСГ, таких як p1 (найкращий результат), p21, p25 та p19, підвищувало вміст білка-приманки рецептора сибірської виразки (CMG2-Fc).

Хоча структура та фізико-хімічні параметри цільового білка є важливою складовою для його стабілізації в рослинній клітині, рівні акумулювання і, відповідно, кінцевий вміст цього білка, визначаються також багатьма іншими чинниками. На вміст рекомбінантних білків, отриманих методом *Agrobacterium*-опосередкованої ТЕТ, впливають фактори пов'язані із бактеріальною інфекцією, такі як агробактеріальний штам та оптична густина бактеріальної суспензії. У своїй роботі Norkunas et al. (2018) показали, що бактеріальні штами AGL1 та C58C1 були більш ефективними для отримання цільового білка β-глюкуронідази шляхом ТЕТ, ніж штам LBA4404. А у роботі Wydro et al. (2006) показано, що серед досліджених 4 агробактеріальних штамів: EHA105, AGL0, AGL1 та LBA4404, найкращим для продукції рекомбінантного GFP шляхом ТЕТ був штам AGL0. Wroblewski et al. (2005) перевіряли 19 агробактеріальних штамів (дикого типу та лабораторних) на 4 видах рослин (салат-латук, томат, різушка Таля та *Nicotiana benthamiana*) і показали, що різні види мають різну чутливість до одних і тих же штамів агробактерій. Загалом, високі рівні цільового білка β-глюкуронідази отриманого шляхом ТЕТ спостерігали при використанні штаму C58C1 (лабораторний). Проте деякі штами дикого типу, такі як A281, 692B1, K12, 1D1108, 1D1249, 15955, також показали гарні результати для окремих видів рослин. Хоча слід відмітити, що найчастіше в науковій літературі зустрічається використання для ТЕТ агробактеріального штаму GV3103. Також визначено, що вміст цільового білка значно падає, якщо оптична щільність бактеріальної

суспензії при довжині хвилі 600 нм (OD600) була нижче ніж 0,1. Зазвичай, щільність бактеріальної суспензії, яку використовують для ТЕТ, знаходиться в межах 0,5-1,5 оптичних одиниць (Norkunas et al. 2018, Wydro et al., 2006).

Наші власні та дослідження інших науковців показали, що таксономічний вид рослини-продуцента, в якому відбуватиметься ТЕТ, суттєво впливає на кінцевий рівень цільових білків. У роботі Sindarovska et al. (2014) ми порівняли акумулювання цільового репортерного білка β-глюкуронідази, отриманого шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої ТЕТ, в культурах клітин 248 видів однодольних та дводольних рослин із 49 родин. Результати показали, що з поміж інших два роди *Senecio* (родина *Compositae*, Айстрові) та *Nicotiana* (родина *Solanaceae,* Пасльонові) відзначались більшим акумулюванням цільового білка. Порівняння різних видів роду *Nicotiana* (тютюн), як продуцентів рекомбінантних білків через *Agrobacterium*-опосередковану ТЕТ, показало, що найбільш придатним видом є *N. benthamiana*, а також деякі інші види, наприклад, *N. tabacum, N. excelsior, N. cavicola* (Conley et al., 2011; Nausch et al., 2012; Sheludko et al., 2007; Sindarovska et al., 2005, 2010, 2019). Наразі *Nicotiana benthamiana* (австралійський представник роду), який несе у своєму геномі природну мутацію у гені *rdrp1*, – є основним продуцентом рекомбінантних білків через ТЕТ (Bally et al., 2018; Yang et al., 2004). Даний вид рослин має високу чутливість до широкого спектру фітовірусів, а також сприйнятливий до агробактеріальної інфекції. Проте тютюни містять значну кількість шкідливих вторинних метаболітів, зокрема алкалоїдів, які можуть викликати звикання (Moghbel et al., 2017). Тому, біофармацевтики, які отримують з тканин тютюнів, потрібно ретельно очищувати від небажаних речовин. У своїй роботі Conley et al. (2011) визначили сорти тютюнів *N. tabacum*, які мали найменший вміст алкалоїдів. До таких сортів належать 81V9 та TI95, а також вид *N. benthamiana*. Слід відмітити, що вміст вторинних метаболітів та їх співвідношення для виду *N. benthamiana* коливається в залежності від генотипу. Виявилось, що менш шкідливі вторинні метаболіти утворюються у генотипі *N. benthamiana*, який несе в геномі природну мутацію гена *rdrp1* (Ranawaka et al., 2023). З метою спрощення процедури очищення біофармацевтиків від шкідливих рослинних метаболітів, ведеться пошук нових продуцентів рекомбінантних білків серед їстівних видів рослин. Вже показано, що рослини деяких видів (салат-латук, буряк, редька, базилік, томат, баклажан, амарант, полуниця тощо) здатні накопичувати високу кількість цільового рекомбінантного білка (Hoshikawa et al., 2019; Kitajima et al., 2020; Lai et al., 2012; Sindarovska and Kuchuk, 2023, 2024; Spolaore et al., 2001; Torti et al., 2021; Wroblewski et al., 2005; Yamamoto et al., 2018; Yaroshko and Kuchuk, 2021). Ще одним із напрямків покращення продуцентів рекомбінантних білків є створення трансгенних рослини *N. benthamiana*, з нокдауном генів, які кодують ферменти β-1,2-ксилозилтрансферазу та α-1,3-фукозилтрансферазу. Ці ферменти при N-глікозилюванні приєднують до білкових молекул ксилозу та фукозу – гліканові залишки, властиві лише рослинним клітинам. Використання трансгенних рослин дозволило отримати рекомбінантне антитіло 2G12 практично без ксилозних та фукозних залишків (Strasser et al., 2008). Невластиві глікозидні залишки можуть впливати на фізіологічну активність біофармацевтиків, отриманих у гетерологічних системах або їх алергенність для пацієнтів. Така технологія дозволяє отримати рекомбінантні білки (глікопротеїни), які за своїми посттрансляційними модифікаціями стають ближчими до природних глікопротеїнів тваринного походження.

Фізіологічний стан рослини-продуцента та вік його листків, в яких відбувається експресія трансгена, також важливі для продукції цільових білків. Наприклад, занадто молоді рослини та рослини, які вже почали утворювати квіти, продукують менше цільового білка, ніж дорослі, розвинуті рослини до початку репродуктивної стадії (Sheludko et al., 2007). Молоді повністю розкриті листки накопичують більше білка, ніж старі листки, в яких синтез біологічних речовин знижується або практично зупиняється і речовини частіше піддаються деградації, ніж у молодих листках (верхні листки, які знаходяться ближче до апікальної меристеми). У рослин *N. benthamiana* найбільш придатними для ТЕТ є 1–4 листок від апікальної

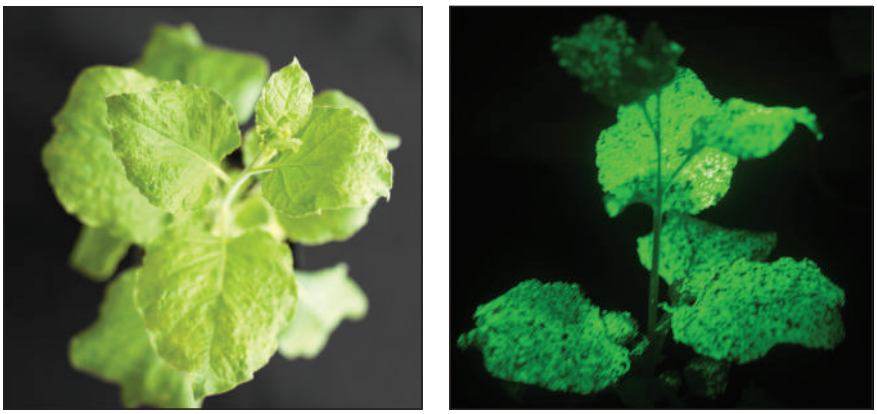


Рис. 1. Рослина виду *Nicotiana benthamiana*, яка продукує рекомбінантний білок GFP внаслідок транзієнтної експресії цільового трансгена. Для інфікування рослин використали генетичну векторну конструкцію з цільовим трансгеном (pICH27566), створену на основі генома Х-вірусу картоплі (Sindarovska and Kuchuk, 2021). Ліворуч – вигляд при денному освітленні, праворуч – при УФ. Яскравий зелений колір при УФ освітленні вказує на високий рівень акумулювання GFP

меристеми (рис. 1) (Goulet et al., 2019; Sheludko et al., 2007; Sindarovska and Kuchuk, 2021; Wroblewski et al., 2005; Wydro et al., 2006). У роботі Dodds et al. (2006) показано, що блокуючи рецептор-подібну кіназу *Nb*CORE рослин *N. benthamiana*, яка взаємодіє з агробактеріальним пептидом і викликає захисну реакцію у рослин, можна значно підвищити вміст цільового білка GFP у дорослих листках, які мають більшу біомасу.

На вміст цільового білка також можуть впливати різні фізико-хімічні фактори. До того ж, нерідко вплив тих чи інших хімічних речовин є дозозалежним і мати протилежні ефекти при зміні концентрації речовини. У багатьох роботах по ТЕТ в якості індуктора агробактеріальних *vir* генів, що відповідають за процес перенесення трансгенів у рослинну клітину, використовують екзогенний ацетосирингон, який додають до інфільтраційного буферу у діапазоні концентрацій від 100 до 500 мкМ. Деякі роботи доводять, що ця речовина справді покращує *Agrobacterium*-опосередковану ТЕТ. В роботі Norkunas et al. (2018) показано достовірне зростання рівнів акумулювання рекомбінантного білка β-глюкуронідази при додаванні до буфера від 300 до 600 мкМ ацетосирингону. Схожі результати показано і в роботі Wydro et al. (2006): найвищі рівні рекомбінантного GFP отримали при додаванні до буфера від 450 до 600 мкМ ацетосирингону. Хоча в роботі Wroblewski et al. (2005) вказується, що додавання ацетосирингону або зміна pH інфільтраційного буфера (в діапазоні від 5,5 до 8,5) не впливали не вміст цільового білка. Додавання до інфільтраційного буферу поверхнево-активної речовини плуронік F68 (Pluronic F68) у дуже малих концентраціях (0,002 %) підвищувало відносну активність цільового білка β-глюкуронідази, в той же час збільшення концентрації речовини до 0,2 % достовірно знижувано його рівні. Аналогічно, додавання ліпоєвої кислоти у невисоких концентраціях (5 та 10 мМ) підвищувало активність β-глюкуронідази, в той час як додавання високих концентрацій (100 мМ) достовірно її пригнічувало. Додавання полівінілпіролідону навіть у малих кількостях (0,1 та 0,5 г/л) дещо знижувало відносну активність β-глюкуронідази, а додавання аскорбінової кислоти навіть у високих концентраціях до 100 мМ не позначилось на вмісті цього ж білка (Norkunas et al., 2018). За даними Wroblewski et al. (2005), додавання амінокислот L-цистеїну в концентрації понад 25 мМ, L-глутаміну в концентрації понад 100–150 мМ та азасерину в концентрації понад 0,5 мМ інгібувало експресію трансгена при ТЕТ. Наші дослідження впливу екзогенних регуляторів росту (цитокінінів та ауксинів) на ТЕТ показали, що індоліл-оцтова кислота (у концентраціях 0,5, 1, 5, 10

та 50 мг/л), 2,4-D (у концентраціях 0,1, 0,2, 1 та 2 мг/л) та кінетин (у концентраціях 1 та 2 мг/л) не впливали на вміст рекомбінантного GFP. Додавання екзогенного метилжасмонату (у концентрації 100 мкМ) або його інгібіторів фенідону (у концентраціях 0,1 та 0,5 мМ) або діетилдитіокарбамат натрію (у концентрації 1 мМ) також достовірно не змінювали вміст GFP (Sindarovska et al., 2012). У роботі Goulet et al. (2019) показано, що обробка проростків *N. benthamiana* цитокініном (бензиламінопурином, 6-БАП) збільшувала вміст цільового гемаглютиніну (НА) опосередковано, впливаючи на приріст біомаси. Проте інші дослідники показали, що додавання 6-БАП у живильне середовище, на якому росли рослини, зменшувала загальну кількість листкової біомаси на 31 %, що в результаті впливало на зменшення вмісту НА (Bilotta et al., 2024).

Ще одним чинником, який впливає на ТЕТ, є навколишні умови. Було показано, що температура впливає на перенесення Т-ДНК при *Agrobacterium*-опосередкованому інфікуванні рослин: 19–22 °С найкраще підходили для цього процесу (Fullner et al., 1996). В ряді досліджень доведено, що температура є важливим фактором для *Agrobacterium*-опосередкованої ТЕТ: найчастіше використовують діапазон температур від 21 до 25 °С. Наші власні спостереження показали, що підвищення температури з 25 до 30 °С помітно знижувало акумулювання білка GFP при використанні PVX експресійної системи (Sindarovska and Kuchuk, 2021). Зміна температури впливала на швидкість акумулювання та вміст рекомбінантного НА вірусу грипу: при 26 °С білок накопичувався швидше, ніж при 21 °С, але при цьому досягав втричі вищих рівнів при 20 °С ніж при 25 °С (Matsuda et al., 2012; Pruksarojanakul et al., 2025). З іншого боку, за даними Norkunas et al. (2018) короткочасний тепловий шок (при 37 °С впродовж 30 хв) через 1–2 дні після інфікування рослин достовірно підвищив рівні цільового білка β-глюкуронідази. Дані про вплив інтенсивності освітлення на ТЕТ неоднозначні і швидше свідчать про опосередкований вплив на вміст рекомбінантного білка. Matsuda et al. (2012) у своїй роботі показали, що інтенсивність освітлення (100 чи 300 одиниць щільності потоку фотосинтетичних фотонів, PPFD) не впливала на вміст рекомбінатного НА в рослинах *N. benthamiana*. Інші автори доводять, що інтенсивність освітлення та тривалість фотоперіоду опосередковано впливали на вміст НА в рослинах завдяки впливу цих чинників на ріст листків, особливо тих, що формувались на молодих бічних пагонах: режим 24-годинного освітлення з 160 PPFD збільшував вміст НА на 60 % у порівнянні з режимом 16-годинного освітлення з 80 PPFD (Goulet et al., 2019). Matsuda et al. (2019) також виявили вплив інтенсивності освітлення, при якому рослини росли до інфікування трансгеном, на вміст цільового білка: при 400 PPFD спостерігали найбільший вихід НА, що корелювало із збільшенням біомаси листя в перерахунку на рослину. Збільшення освітлення вдвічі (28 моль/м^2*с) з одночасним додаванням екзогенного цитокініну (10 мкМ 6-БАП) до живильного ростового середовища збільшило вміст цільового H1 антигена НА на 71 % (Bilotta et al., 2024). На вміст цільового білка можуть впливати й інші фактори. У роботі Bilotta et al. (2024) показано, що рівень продукції H1 антигена НА залежав від щільності посадки рослин на одиницю площі. Збільшення кількості з 36 до 61 рослини/м^2 негативно вплинуло на розвиток листків бічних пагонів, що призвело до зменшення загального виходу цільового білка на 39 %. Вплив щільності посадки рослин на вміст цільового НА доведено і в іншій роботі: порівняно з низькою щільністю посадки (100 рослин/ м^2) при щільнішій посадці (400 рослин/ м^2) спостерігали нижчий вміст НА в молодих листках, які зазвичай мають високі рівні акумулювання цільових білків, також спостерігали зменшення біомаси молодих листків (Fujiuchi et al., 2017).

Зазвичай, *Agrobacterium*-опосередковау ТЕТ виконують шляхом інфільтрації рослин, вирощених у тепличних умовах, за допомогою інсулінового шприца без голки (лабораторний метод для малої кількості рослин) або за допомогою вакуумної інфільтрації (метод, що може бути використаний для масштабного виробництва цільових білків). У своїй роботі ми розробили методику, яка дозволяє отримувати рекомбінантні білки шляхом ТЕТ в строго

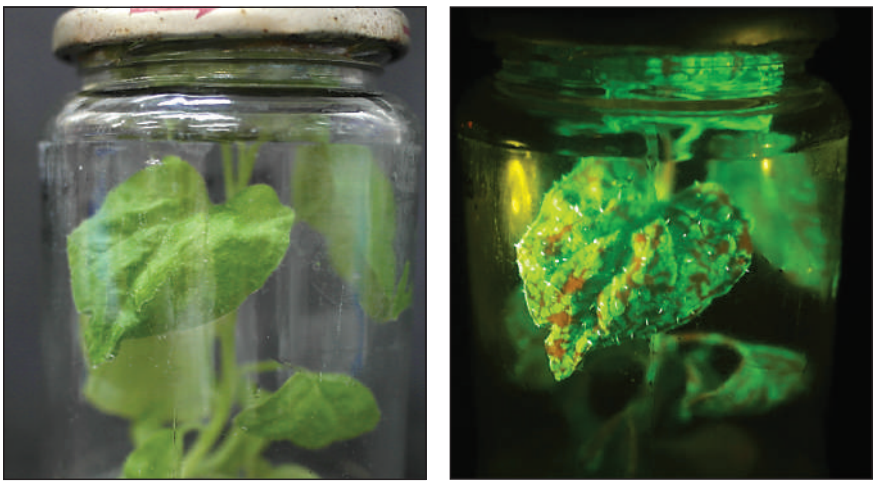


Рис. 2. Рослина *Nicotiana benthamiana*, яка продукує білок GFP внаслідок транзієнтної експресії цільового трансгена в культурі *in vitro*. Для початкового інфікування рослин використали генетичну векторну конструкцію з цільовим трансгеном (pICH27566), створену на основі генома Х-вірусу картоплі (Sindarovska and Kuchuk, 2021). Ліворуч – вигляд при денному освітленні, праворуч – при УФ. Яскравий зелений колір при УФ вказує на високий рівень акумулювання GFP

контрольованих асептичних (стерильних) умовах *in vitro* (Sindarovska and Kuchuk, 2021, рис. 2), що узгоджується з дотримання міжнародних вимог cGMP та знижує ризик потрапляння трансгена у навколишнє середовище. Ми отримали рослини *N. benthamiana* (вільні від агробактерій) в культурі *in vitro*, які накопичували високі рівні цільового білка GFP (до 47 % СРБ), що досягалось завдяки генетичній векторній конструкції, створеній на основі генома Х-вірусу картоплі (PVX-based). Окрім цільового трансгена, PVX-based генетична конструкція містила гени вірусних білків руху, які забезпечували її системне поширення між клітинами та по провідних тканинах рослин, що призводило до довготривалої продукції GFP, а також дозволяло за допомогою мікроклонального розмноження отримувати велику кількість нових рослин, що продукують GFP. При регулярних пасажах культура рослин (клітин) зберігала здатність продукувати GFP на високих рівнях понад 6 місяців.

Рекомбінантні білки, отримані у рослинах шляхом ТЕТ (табл. 2)

Таблиця 2. **Приклади рекомбінантних білків, отриманих у рослинах шляхом ТЕТ**

Цільовий білок та його застосування	Вид рослини-продуценту та вміст цільового білка
Зелений флуоресцентний білок (GFP): для візуалізації клітинних процесів; для пошуку нових видів-продуцентів та визначення впливу різних факторів на рівні цільових білків; для визначення взаємодії між білками тощо.	*Nicotiana benthamiana*: до 47 % від сумарних розчинних білків клітини (СРБ) або 2 мг/г сирої маси (СМ). *Ocimum basilicum*, до 20–30 % СРБ або 1–3 мг/г СМ (Sindarovska, Kuchuk, 2021, 2023).
Інтерферон альфа 2b: для лікування вірусних захворювань, в т. ч. гепатитів В та С, та при комплексній терапії онкологічних захворювань.	*N. benthamiana*: до 9 % СРБ або 1,2 мг/г СМ; *O. basilicum*: до 0,15 % СРБ або 0,02 мг/г СМ (Sindarovska, Kuchuk, 2024).
Соматотропін (гормон росту): для лікування затримки росту у дітей.	*N. benthamiana*: до 10 % СРБ або 1 мг/г СМ (Gils et al., 2005).
Антигенні детермінанти Ag85 та ESAT-6 туберкульозної палички: для створення вакцинних та діагностичних препаратів.	*Nicotiana tabacum*: 0,5–1,0 % СРБ (Zelada et al., 2006), *N. benthamiana*: 22 мкг/г СМ (Kim et al., 2020).

Продовження табл. 2

Цільовий білок та його застосування	Вид рослини-продуценту та вміст цільового білка
Гемаглютинін (або його фрагмент) вірусу грипу: для створення вакцинних препаратів для боротьби зі спалахами респіраторних хвороб.	*N. benthamiana*: 8,6 % СРБ (Jacquet et al., 2014), 0,25 М одиниць/г СМ (Goulet et al., 2019), 6–8 мг/г сухої маси (Pruksarojanakul et al., 2025).
Коровий антиген вірусу гепатиту В: для створення вакцинних препаратів.	*N. benthamiana*, 0,8 мг/г СМ (Huang et al., 2009).
Химерні моноклональні антитіла проти вірусу Ебола: для лікування гострої геморагічної лихоманки.	*N. benthamiana*, дані про вміст цільового білка відсутні (Zeitlin et al., 2011).
Нанотіла для зв'язування з доменом вірусу SARS-CoV2: для створення діагностичних та вакцинних препаратів.	*N. benthamiana*, 0,1 мг/г СМ (Merwaiss et al., 2024).
Коліцини та сальмоцини: антимікробні протеїни проти бактерій кишкової палички та сальмонел.	*N. benthamiana*, коліцини – 0,5–5,0 мг/г СМ, сальмоцини – 0,1–1,7 мг/г СМ (Hahn-Löbmann et al., 2019; Schulz et al., 2015).
Еритропоетин: для лікування анемії, виявляє захисні властивості для тканин.	*N. tabacum* сорт TI 95, 36 нг/мг СРБ, *N. benthamiana*, 11,4 нг/мг СРБ (Conley et al., 2011).
Гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор: для лікування нейтропенії, апластичної анемії, для зменшення інфекцій при трансплантації кісткового мозку.	*N. benthamiana*, 2 % СРБ (Zhou et al., 2006).

Дотримання етичних стандартів. Дослідження на тваринах або людях не проводились.

Конфлікт інтересів. Автор заявляє про відсутність конфлікту інтересів

Фінансування. Дана робота не отримала спеціального фінансування.

TRANSIENT TRANSGENE EXPRESSION: A FAST METHOD FOR OBTAINING TARGET RECOMBINANT PROTEINS IN PLANT SYSTEMS

Yana Sindarovska

Department of Genetic Engineering, Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of NAS of Ukraine, akad. D.K. Zabolotnogo 148, Kyiv, 03143, Ukraine

E-mail: sindarovskaya@ukr.net

Plants are considered as an alternative expression system for the production of valuable recombinant proteins–biopharmaceuticals. The transient gene expression method allows obtaining high levels of target recombinant proteins within one to two weeks after infection of plant cells. However, the expression of the target transgene and the final yield of the recombinant protein depend on many factors: the efficiency of the expression cassette containing the transgene, stability of the target recombinant protein in a plant cell, *Agrobacterium* strain used to deliver a transgene into a plant cell, the host plant species producing the recombinant protein and its physiological state, exposure to certain chemicals and physical environmental conditions. The review summarizes and discusses achievements related to the issue of increasing the yield of the target recombinant proteins, along with examples of valuable recombinant proteins obtained through transient gene expression.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

Abrahamian, P., Hammond, J., and Hammond, RW., Development and optimization of a pepino mosaic virus-based vector for rapid expression of heterologous proteins in plants, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2021, vol. 105, no. 2, pp. 627–645. https://doi.org/10.1007/s00253-020-11066-0

An, G., Watson, B.D., Stachel, S., Gordon, M.P., and Nester, E.W., New cloning vehicles for transformaton of higher plants, *EMBO J.*, 1985, vol. 4, no. 2, pp. 277–284. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1985.tb03626.x

Arzola, L., Chen, J., Rattanaporn, K., Maclean, J.M., and McDonald, K.A., Transient co-expression of post-transcriptional gene silencing suppressors for increased *in planta* expression of a recombinant anthrax receptor fusion protein. *Int. J. Mol. Sci.*, 2011, vol. 12, no. 8, pp. 4975–4990. https://doi.org/10.3390/ijms12084975

Bally, J., Jung, H., Mortimer, C., Naim, F., Philips, J.G., Hellens, R., Bombarely, A., Goodin, M.M., and Waterhouse, P.M., The rise and rise of *Nicotiana benthamiana*: a plant for all reasons, *Annu. Rev. Phytopathol.,* 2018, vol. 56, pp. 405–426. https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417-050141

Bevan, M., Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation, *Nucleic Acids Res.*, 1984, vol. 12, no. 22, pp. 8711–8721. https://doi.org/10.1093/nar/12.22.8711

Bilotta, S., Éthier, G., Laliberté, A.C., Goulet, M.C., Martel, M., Michaud, D., and Pepin, S., Synergetic light and cytokinin treatments mitigate the recombinant protein yield depression induced by high-density cultivation of hydroponically-grown *Nicotiana benthamiana*, *Biotechnol. Bioeng.*, 2024, vol. 121, no. 10, pp. 3319–3328. https://doi.org/10.1002/bit.28781

Cacizares, M.C., Liu, L., Perrin, Y., Tsakiris, E., and Lomonossoff, G.P., A bipartite system for the constitutive and inducible expression of high levels of foreign proteins in plants, *Plant Biotechnol. J.*, 2006, vol. 4, no. 2, pp. 183–193. https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2005.00170.x

Chaudhary, S., Ali, Z., Tehseen, M., et al., Efficient in planta production of amidated antimicrobial peptides that are active against drug-resistant ESKAPE pathogens, *Nat. Commun.*, 2023, vol. 14, no. 1, Article number 1464. https://doi.org/10.1038/s41467-023-37003-z

Chen, Q., He, J., Phoolcharoen, W., and Mason, H.S., Geminiviral vectors based on bean yellow dwarf virus for production of vaccine antigens and monoclonal antibodies in plants, *Hum. Vaccin.*, 2011, vol. 7, no. 3, pp. 331–338. https://doi.org/10.4161/hv.7.3.14262

Chiang, C.F., Okou, D.T., Griffin, T.B., Verret, C.R., and Williams, M.N., Green fluorescent protein rendered susceptible to proteolysis: positions for protease-sensitive insertions, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2001, vol. 394, no. 2, pp. 229–235. https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2537

Chiu, W., Niwa, Y., Zeng, W., Hirano, T., Kobayashi, H., and Sheen, J., Engineered GFP as a vital reporter in plants, *Curr. Biol.*, 1996, vol. 6, no. 3, pp. 325–330. doi: 10.1016/S0960-9822(02)00483-9

Coates, R.J., Young, M.T., and Scofield, S., Optimising expression and extraction of recombinant proteins in plants, *Front. Plant Sci.*, 2022, vol. 13, Article number 1074531. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1074531

Conley, A.J., Joensuu, J.J., Jevnikar, A.M., Menassa, R., and Brandle, J.E., Optimization of elastin-like polypeptide fusions for expression and purification of recombinant proteins in plants, *Biotechnol. Bioeng.*, 2009a, vol. 103, no. 3, pp. 562–573. https://doi.org/10.1002/bit.22278

Conley, A.J., Mohib, K., Jevnikar, A.M., and Brandle, J.E., Plant recombinant erythropoietin attenuates inflammatory kidney cell injury, *Plant Biotechnol. J.*, 2009b, vol. 7, no. 2, pp.183–199. https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2008.00389.x

Conley, A.J., Zhu, H., Le, L.C., Jevnikar, A.M., Lee, B.H., Brandle, J.E., and Menassa, R., Recombinant protein production in a variety of *Nicotiana* hosts: a comparative analysis, *Plant Biotechnol. J.*, 2011, vol. 9, no. 4, pp. 434–444. https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2010.00563.x

Daniell, H., Chebolu, S., Kumar, S., Singleton, M., and Falconer, R., Chloroplast-derived vaccine antigens and other therapeutic proteins, *Vaccine*, 2005, vol. 23, no. 5, pp. 1779–1783. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.11.004

Dickmeis, C., Fischer, R., and Commandeur, U., Potato virus X-based expression vectors are stabilized for long-term production of proteins and larger inserts, *Biotechnol. J.*, 2014, vol. 9, no. 11, pp. 1369–1379. https://doi.org/10.1002/biot.201400347

Dodds, I., Chen, C., Buscaill, P., and van der Hoorn, RAL., Depletion of the NbCORE receptor drastically improves agroinfiltration productivity in older *Nicotiana benthamiana* plants, *Plant Biotechnol. J.*, 2023, vol. 21, no. 6, pp. 1103–1105. https://doi.org/10.1002/biot.201400347

Dolan, M.C., Wu, D., Cramer, C.L., and Xu, J., Hydroxyproline-O-glycosylated peptide tags enhance recombinant protein yields in tobacco transient expression. *Process Biochem.*, 2014, vol. 49, no. 3, pp. 490–495. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.12.010

Eidenberger, L., Eminger, F., Castilho, A., and Steinkellner, H., Comparative analysis of plant transient expression vectors for targeted N-glycosylation, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2022, vol. 10, article number 1073455. https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1073455

Fujiuchi, N., Matsuda, R., Matoba, N., and Fujiwara, K., Effects of plant density on recombinant hemagglutinin yields in an *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system using *Nicotiana benthamiana* plants, *Biotechnol. Bioeng.*, 2017, vol. 114, no. 8, pp. 1762–1770. https://doi.org/10.1002/bit.26303

Fullner, K.J., and Nester, E.W., Temperature affects the T-DNA transfer machinery of *Agrobacterium tumefaciens*, *J. Bacteriol.*, 1996, vol. 178, no. 6, pp. 1498–1504. https://doi.org/10.1128/jb.178.6.1498-1504.1996

Gelvin, S.B., *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the «gene-jockeying» tool, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2003, vol. 67, no. 1, pp. 16–37, https://doi.org/10.1128/mmbr.67.1.16-37.2003

Gils, M., Kandzia, R., Marillonnet, S., Klimyuk, V., and Gleba, Y., High-yield production of authentic human growth hormone using a plant virus-based expression system, *Plant Biotechnol. J.*, 2005, vol. 3, no. 6, pp. 613–620. https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2005.00154.x

Gleba, Y., Klimyuk, V., and Marillonnet, S., Viral vectors for the expression of proteins in plants, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2007, vol. 18, no. 2, pp. 134–141. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.03.002

Goulet, M.C., Gaudreau, L., Gagné, M., Maltais, A.M., Laliberté, A.C., Éthier, G., Bechtold, N., Martel, M., D'Aoust, M.A., Gosselin, A., Pepin, S., and Michaud, D., Production of biopharmaceuticals in *Nicotiana benthamiana*–axillary stem growth as a key determinant of total protein yield, *Front. Plant Sci.*, 2019, vol. 10, article number 735. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00735

Grosse-Holz, F., Madeira, L., Zahid, M.A., Songer, M., Kourelis, J., Fesenko, M., Ninck, S., Kaschani, F., Kaiser, M., and van der Hoorn, R.A.L., Three unrelated protease inhibitors enhance accumulation of pharmaceutical recombinant proteins in *Nicotiana benthamiana*, *Plant Biotechnol. J.*, 2018, vol. 16, no. 10, pp. 1797–1810. https://doi.org/10.1111/pbi.12916

Hahn-Löbmann, S., Stephan, A., Schulz, S., Schneider, T., Shaverskyi, A., Tusé, D., Giritch, A., and Gleba, Y., Colicins and salmocins – new classes of plant-made non-antibiotic food antibacterials, *Front. Plant Sci.*, 2019, vol. 10, article number 437. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00437

Hiatt, A., Caffferkey, R. and Bowdish, K., Production of antibodies in transgenic plants, *Nature*, 1989, vol. 342, pp 76–78. https://doi.org/10.1038/342076a0

Hoshikawa, K., Fujita, S., Renhu, N., Ezura, K., Yamamoto, T., Nonaka, S., Ezura, H., and Miura, K., Efficient transient protein expression in tomato cultivars and wild species using agroinfiltration-mediated high expression system, *Plant Cell Rep.*, 2019, vol. 38, no. 1, pp. 75–84. https://doi.org/10.1007/s00299-018-2350-1

Huang, Z., Chen, Q., Hjelm, B., Arntzen, C., and Mason, H., A DNA replicon system for rapid high-level production of virus-like particles in plants, *Biotechnol. Bioeng.*, 2009, vol. 103, no. 4, pp. 706–714. https://doi.org/10.1002/bit.22299

Jacquet, N., Navarre, C., Desmecht, D., and Boutry, M., Hydrophobin fusion of an influenza virus hemagglutinin allows high transient expression in *Nicotiana benthamiana*, easy purification and immune response with neutralizing activity, *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 12, article number e115944. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115944

Jutras, P.V., Dodds, I., and van der Hoorn, R.A., Proteases of *Nicotiana benthamiana*: an emerging battle for molecular farming, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2020, vol. 61, pp. 60–65. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.10.006

Kagale, S., Uzuhashi, S., Wigness, M., Bender, T., Yang, W., Borhan, M.H., and Rozwadowski K., TMV-Gate vectors: Gateway compatible tobacco mosaic virus based expression vectors for functional analysis of proteins, *Sci. Rep.*, 2012, vol. 2, article number 874. https://doi.org/10.1038/srep00874

Kim, H., Kwon, K.W., Park, J., Kang, H., Lee, Y., Sohn, E.-J., Hwang, I., Eum, S.-Y., and Shin, S.J., Plant-produced N-glycosylated Ag85A exhibits enhanced vaccine efficacy against *Mycobacterium tuberculosis* HN878 through balanced multifunctional Th1 T cell immunity, *Vaccines*, 2020, vol. 8, no. 2, article number 189. https://doi.org/10.3390/vaccines8020189

Kitajima, S., Miura, K., and Yasuda, J., Radish sprouts as an efficient and rapidly available host for an agroinfiltration-based transient gene expression system, Plant Biotechnol. (Tokyo), 2020, vol. 37, no. 1, pp. 89–92. https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.19.1216a

Kopertekh, L., Improving transient expression in *N. benthamiana* by suppression of the *Nb-SABP2* and *Nb-COI1* plant defence response related genes, *Front. Plant Sci.*, 2024, vol. 15, article number 1453930. https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1453930

Lai, H., He, J., Engle, M., Diamond, M.S., and Chen, Q., Robust production of virus-like particles and monoclonal antibodies with geminiviral replicon vectors in lettuce, *Plant Biotechnol. J.*, 2012, vol. 10, no. 1, pp. 95–104. https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2011.00649.x

Larsen, J.S., Curtis, W.R., RNA viral vectors for improved *Agrobacterium*-mediated transient expression of heterologous proteins in *Nicotiana benthamiana* cell suspensions and hairy roots, *BMC Biotechnol.*, 2012, vol. 12, article number 21. https://doi.org/10.1186/1472-6750-12-21

Leffel, S.M., Mabon, S.A. and Stewart, C.N. Jr., Applications of green fluorescent protein in plants, *BioTechniques*, 1997, vol. 23, no. 5, pp. 912–918, https://doi.org/10.2144/97235bi01

Lico, C., Chen, Q., and Santi, L., Viral vectors for production of recombinant proteins in plants, *J. Cell. Physiol.*, 2008, vol. 216, no. 2, pp. 366–377. https://doi.org/10.1002/jcp.21423

Lindbo, J.A., High-efficiency protein expression in plants from agroinfection-compatible *Tobacco mosaic virus* expression vectors, *BMC Biotechnol.*, 2007a, vol. 7, article number 52. https://doi.org/10.1186/1472-6750-7-52

Lindbo, J.A., TRBO: a high-efficiency tobacco mosaic virus RNA-based overexpression vector, *Plant Physiol.*, 2007b, vol. 145, no. 4, pp. 1232–1240. https://doi.org/10.1104/pp.107.106377

Marillonnet, S., Thoeringer, C., Kandzia, R., Klimyuk, V., and Gleba, Y., Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants, *Nat. Biotechnol.*, 2005, vol. 23, pp. 718–723. https://doi.org/10.1038/nbt1094

Marin Viegas, V.S., Acevedo, G.R., Bayardo, M.P., Chirdo, F.G., and Petruccelli, S., Production of the main celiac disease autoantigen by transient expression in *Nicotiana benthamiana*, *Front. Plant Sci.*, 2015, vol. 6, article number 1067. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01067

Marin Viegas, V.S., Ocampo, C.G., and Petruccelli, S., Vacuolar deposition of recombinant proteins in plant vegetative organs as a strategy to increase yields, *Bioengineered*, 2017, vol. 8, no. 3, pp. 203–211. https://doi.org/10.1080/21655979.2016.1222994

Matsuda, R., Tahara, A., Matoba, N., and Fujiwara, K., Virus vector-mediated rapid protein production in *Nicotiana benthamiana*: effects of temperature and photosynthetic photon flux density on hemagglutinin accumulation, *Environ. Control Biol.,* 2012, vol. 50, pp. 375–381. https://doi.org/10.2525/ecb.50.375

Matsuda, R., Ueno, A., and Fujiwara, K., Effects of environmental conditions before gene transfer on the amount of influenza hemagglutinin transiently expressed in *Nicotiana benthamiana* leaves, *J. Agricult. Meteorol.*, 2019, vol. 75, no. 3, pp. 129–136. https://doi.org/10.2480/agrmet.D-18-00050

Merwaiss, F., Lozano-Sanchez, E., Zulaica, J., Rusu, L., Vazquez-Vilar, M., Orzáez, D., Rodrigo, G., Geller, R., and Darrs, J.A., Plant virus-derived nanoparticles decorated with genetically encoded SARS-CoV-2 nanobodies display enhanced neutralizing activity, *Plant Biotechnol. J.*, 2024, vol. 22, no. 4, pp. 876–891. https://doi.org/10.1111/pbi.14230

Moghbel, N., Ryu, B., Ratsch, A., and Steadman, K.J., Nicotine alkaloid levels, and nicotine to nornicotine conversion, in Australian *Nicotiana* species used as chewing tobacco, *Heliyon*, 2017, vol. 3, no. 11, article number e00469. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2017.e00469

Nausch, H., Mikschofsky, H., Koslowski, R., Meyer, U., Broer, I., and Huckauf, J., High-level transient expression of ER-targeted human interleukin 6 in *Nicotiana benthamiana*, *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 11, article number e48938. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048938

Norkunas, K., Harding, R., Dale, J., and Dugdale, B., Improving agroinfiltration-based transient gene expression in *Nicotiana benthamiana*, *Plant Methods*, 2018, vol. 14, article number 71. https://doi.org/10.1186/s13007-018-0343-2

Nosaki, S., Hoshikawa, K., Ezura, H., and Miura, K., Transient protein expression systems in plants and their applications, *Plant Biotechnol.* (Tokyo), 2021, vol. 38, no. 3, pp. 297–304. https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.21.0610a

Ocampo, C.G., Lareu, J.F., Marin Viegas, V.S., Mangano, S., Loos, A., Steinkellner, H., and Petruccelli, S., Vacuolar targeting of recombinant antibodies in *Nicotiana benthamiana*, *Plant Biotechnol J.*, 2016, vol. 14, no. 12, pp. 2265–2275. https://doi.org/10.1111/pbi.12580

Pang, S.Z., DeBoer, D.L., Wan, Y., Ye, G., Layton, J.G., Neher, M.K., Armstrong, C.L., Fry, J.E., Hinchee, M.A., and Fromm, M.E., An improved green fluorescent protein gene as a vital marker in plants, *Plant Physiol.*, 1996, vol. 112, no. 3, pp. 893–900. https://doi.org/10.1104/pp.112.3.893

Patel, J., Zhu, H., Menassa, R., Gyenis, L., Richman, A., and Brandle, J., Elastin-like polypeptide fusions enhance the accumulation of recombinant proteins in tobacco leaves, *Transgenic Res.*, 2007, vol. 16, no. 2, pp. 239–249. https://doi.org/10.1007/s11248-006-9026-2

Peyret, H., Brown, J.K.M., and Lomonossoff, G.P., Improving plant transient expression through the rational design of synthetic 5′ and 3′ untranslated regions, *Plant Methods,* 2019, vol. 15, article number 108. https://doi.org/10.1186/s13007-019-0494-9

Poborilova, Z., Plchova, H., Cerovska, N., Gunter, C.J., Hitzeroth, I.I., Rybicki E.P., and Moravec, T., Transient protein expression in tobacco BY-2 plant cell packs using single and multi-cassette replicating vectors. *Plant Cell Rep.*, 2020, vol. 39, 1115–1127. https://doi.org/10.1007/s00299-020-02544-w

Pogue, G.P., Lindbo, J.A., Dawson, W.O., and Turpen, T.H., Tobamovirus transient expression vectors: tools for plant biology and high-level expression of foreign proteins in plants, in *Plant Molecular Biology Manual*, Gelvin, S.B., Schilperoort, R.A., Eds., Dordrecht: Springer, 1998, pp 67–93. https://doi.org/10.1007/978-94-011-5242-6_5

Pruksarojanakul, P., Atsumi, K., Oh, Y., Matoba, N., and Matsuda, R., Effects of air temperature on transient expression of influenza hemagglutinin in *Nicotiana benthamiana*: analysis of transgene transcription and plant stress responses, *Biotechnol. Bioeng.*, 2025, vol. 122, no. 5, pp.1142–1152. https://doi.org/10.1002/bit.28942

Ranawaka, B., An, J., Lorenc, M.T., et al., A multi-omic *Nicotiana benthamiana* resource for fundamental research and biotechnology, *Nat. Plants*, 2023, vol.

9, no. 9, pp. 1558–1571. https://doi.org/10.1038/s41477-023-01489-8 Erratum in: *Nat. Plants*, 2024, vol. 10, no. 1, p. 193. https://doi.org/10.1038/s41477-024-01618-x

Rosano, G.L., Morales, E.S., and Ceccarelli, E.A., New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update, *Protein Sci.*, 2019, vol. 28, no. 8, pp. 1412–1422. https://doi.org/10.1002/pro.3668

Sainsbury, F., Thuenemann, E.C., and Lomonossoff, G.P., pEAQ: versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants. *Plant Biotechnol. J.*, 2009, vol. 7, no. 7, pp. 682–693. https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2009.00434.x

Schulz, S., Stephan, A., Hahn, S., Bortesi, L., Jarczowski, F., Bettmann, U., Paschke, A.K., Tusé, D., Stahl, C.H., Giritch, A., and Gleba, Y., Broad and efficient control of major foodborne pathogenic strains of *Escherichia coli* by mixtures of plant-produced colicins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2015, vol. 112, no. 40, article number E5454–E5460. https://doi.org/10.1073/pnas.1513311112

Sheludko, Y.V., Sindarovska, Y.R., Gerasymenko, I.M., Bannikova, M.A., and Kuchuk, N.V., Comparison of several *Nicotiana* species as hosts for high-scale *Agrobacterium*-mediated transient expression, *Biotechnol. Bioeng.*, 2007, vol. 96, pp. 608–614. https://doi.org/10.1002/bit.21075

Shi, X., Cordero, T., Garrigues, S., Marcos, J.F., Daròs, J.A., and Coca, M., Efficient production of antifungal proteins in plants using a new transient expression vector derived from tobacco mosaic virus, *Plant Biotechnol. J.*, 2019, vol. 17, no. 6, pp. 1069–1080. https://doi.org/10.1111/pbi.13038

Sindarovska, Y., and Kuchuk, M., Construction of viral-based expression vectors for high-level production of human interferon alpha 2b in plants, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2024, vol. 108, article number 229. https://doi.org/10.1007/s00253-024-13069-7

Sindarovska, Y., and Kuchuk, M., Long-term potato virus X (PVX)-based transient expression of recombinant GFP protein in *Nicotiana benthamiana* culture in vitro, *Plants (Basel)*, 2021, vol. 10, no. 10, article number 2187. https://doi.org/10.3390/plants10102187

Sindarovska, Y., and Kuchuk, M., Viral-based expression cassettes ensure high level production of recombinant green fluorescent protein (GFP) in sweet basil (*Ocimum basilicum*) plants, *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.*, 2023, vol. 154, pp. 121–130. https://doi.org/10.1007/s11240-023-02516-4

Sindarovska, Y.R., Gerasymenko, I.M., Kuchuk, M.V., and Sheludko, Y.V., Influence of exogenous phytohormones, methyl jasmonate and suppressors of jasmonate biosynthesis on *Agrobacterium*-mediated transient expression in *Nicotiana excelsior*, *Biopolym. Cell*, 2012, vol. 28, pp. 357–362. http://dx.doi.org/10.7124/bc.000072

Sindarovska, Y.R., Gerasymenko, I.M., Sheludko, Y.V., Olevinskaya, Z.M., Spivak, N.Y., and Kuchuk, N.V., Production of human interferon alpha 2b in plants of *Nicotiana excelsior* by *Agrobacterium*-mediated transient expression, *Cytol. Genet.*, 2010, vol. 44, pp. 313–316. https://doi.org/10.3103/S0095452710050099

Sindarovska, Y.R., Golovach, I.S., Belokurova, V.B., Gerasymenko, I.M., Sheludko, Y.V., and Kuchuk, M.V., Screening of plant cell culture collection for efficient host species for *Agrobacterium*-mediated transient expression, *Cytol. Genet.*, 2014, vol. 48, pp. 208–217. https://doi.org/10.3103/S0095452714040070

Sindarovska, Y.R., Olevinskaya, Z.M., Demchenko, O.A., Spivak, N.Y., and Kuchuk, N.V., *Nicotiana cavicola* as a host for production of recombinant proteins by *Agrobacterium*-mediated transient gene expression, *Biopolym. Cell*, 2019, vol. 35, no. 5, pp. 340–348. http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A11

Sindarovska, Y.R., Sheludko, Y.V., Gerasymenko, I.M., Bannikova, M.A., Komarnytskyy, I.K., and Kuchuk, N.V., Transgenic plants regenerated from hairy roots of *Nicotiana benthamiana*: a promising host for transient expression of foreign proteins, *Cytol. Genet.*, 2005, vol. 39, pp. 9–14. https://cytgen.com/articles/3960009a.pdf

Spolaore, S., Trainotti, L., and Casadoro, G., A simple protocol for transient gene expression in ripe fleshy fruit mediated by *Agrobacterium*, *J. Exp. Bot.*, 2001, vol. 52, no. 357, pp. 845–850. https://doi.org/10.1093/jexbot/52.357.845

Strasser, R., Stadlmann,. J, Schähs, M., Stiegler, G., Quendler, H., Mach, L., Glцssl, J., Weterings, K., Pabst, M., and Steinkellner, H., Generation of glyco-engineered *Nicotiana benthamiana* for the production of monoclonal antibodies with a homogeneous human-like N-glycan structure, *Plant Biotechnol. J.*, 2008, vol. 6, no. 4, pp. 392–402. https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2008.00330.x

Torti, S., Schlesier, R., Thümmler, A., et al., Transient reprogramming of crop plants for agronomic performance, *Nat. Plants*, 2021, vol. 7, pp. 159–171. https://doi.org/10.1038/s41477-021-00851-y

Tremblay, R., Wang, D., Jevnikar, A.M., and Ma, S., Tobacco, a highly efficient green bioreactor for production of therapeutic proteins, *Biotechnol. Adv.*, 2010, vol. 28, , no. 2, pp. 214–221. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.11.008

Vasques, R.M., Lacorte, C., da Luz, L.L., Aranda, M.A., and Nagata, T., Development of a new tobamovirus-

based viral vector for protein expression in plants, *Mol. Biol. Rep.*, 2019, vol. 46, , no. 1, pp. 97–103. https://doi.org/10.1007/s11033-018-4449-4

Wagner, B., Fuchs, H., Adhami, F., Ma, Y., Scheiner, O., and Breiteneder, H., Plant virus expression systems for transient production of recombinant allergens in *Nicotiana benthamiana*, *Methods*, 2004, vol. 32, no. 3, pp. 227–234. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2003.08.005

Wagner, N., Musiychuk, K., Shoji, Y., Tottey, S., Streatfield, S.J., Fischer, R., and Yusibov, V., Basic leucine zipper transcription activators – tools to improve production and quality of human erythropoietin in *Nicotiana benthamiana*, *Biotechnol. J.*, 2024, vol. 19, no. 5, article number e2300715. https://doi.org/10.1002/biot.202300715

Walsh, G., and Walsh, E., Biopharmaceutical benchmarks 2022, *Nat. Biotechnol.*, 2022, vol. 40, pp. 1722–1760. https://doi.org/10.1038/s41587-022-01582-x

Wang, K., Mason, H., Hall, K., Slone, E., Tackett, K., and Wang, N., Transient expression of full-length and mature nattokinase in *Nicotiana benthamiana* reveals early necrosis from full-length form and functional activity of the mature enzyme, *Front. Plant Sci.*, 2025, vol. 16, article number 1631697. https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1631697

Wang, X., Karki, U., Abeygunaratne, H., UnnoldCofre, C., and Xu, J., Plant cell-secreted stem cell factor stimulates expansion and differentiation of hematopoietic stem cells, *Process Biochem.*, 2021, vol. 100, pp. 39–48. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.09.029

Wang, X., Prokhnevsky, A.I., Skarjinskaia, M., Razzak, M.A., Streatfield, S.J., and Lee, J.Y., Facilitating viral vector movement enhances heterologous protein production in an established plant system, *Plant Biotechnol. J.*, 2023, vol. 21, no. 3, pp. 635–645. https://doi.org/10.1111/pbi.13977

Wroblewski, T., Tomczak, A., and Michelmore, R., Optimization of *Agrobacterium*-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and *Arabidopsis*, *Plant Biotechnol. J.*, 2005, vol. 3, pp. 259–273. https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2005.00123.x

Wydro, M., Kozubek, E., and Lehmann, P., Optimization of transient *Agrobacterium*-mediated gene expression system in leaves of *Nicotiana benthamiana*, *Acta Biochim. Pol.*, 2006, vol. 53, no. 2, pp. 289–298.

Yamamoto, T., Hoshikawa, K., Ezura, K., Okazawa, R., Fujita, S., Takaoka, M., Mason, H.S., Ezura, H., and Miura, K., Improvement of the transient expression system for production of recombinant proteins in plants, *Sci. Rep.*, 2018, vol. 8, no. 1, article number 4755. https://doi.org/10.1038/s41598-018-23024-y

Yang, S.J., Carter, S.A., Cole, A.B., Cheng, N.H., and Nelson, R.S., A natural variant of a host RNA-dependent RNA polymerase is associated with increased susceptibility to viruses by *Nicotiana benthamiana*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 2004, vol. 101, no. 16, pp. 6297–6302. https://doi.org/10.1073/pnas.0304346101

Yaroshko, O.M., Kuchuk, M.V., Transient expression of reporter genes in cultivars of *Amaranthus caudatus* L., *Biotechnologia Acta*, 2021, vol. 14, no. 4, pp. 53–63. https://doi.org/10.15407/biotech14.04.053

Zeitlin, L., Pettitt, J., Scully, C., Bohorova, N., Kim, D., Pauly, M., Hiatt, A., Ngo, L., Steinkellner, H., Whaley, K.J., and Olinger, G.G., Enhanced potency of a fucose-free monoclonal antibody being developed as an Ebola virus immunoprotectant, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011, vol. 108, no. 51, pp. 20690–20694. https://doi.org/10.1073/pnas.1108360108

Zelada, A.M., Calamante, G., de la Paz Santangelo, M., Bigi, F., Verna, F., Mentaberry, A., and Cataldi, A., Expression of tuberculosis antigen ESAT-6 in *Nicotiana tabacum* using a potato virus X-based vector, *Tuberculosis (Edinb)*, 2006, vol. 86, no. 3–4, pp. 263–267. https://doi.org/10.1016/j.tube.2006.01.003

Zhou, F., Wang, M.L., Albert, H.H., Moore, P.H., and Zhu, Y.J., Efficient transient expression of human GM-CSF protein in *Nicotiana benthamiana* using potato virus X vector, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, vol. 72, no. 4, pp. 756–762. https://doi.org/10.1007/s00253-005-0305-2

Надійшла в редакцію 03.02.2026
Після доопрацювання 10.04.2026
Прийнята до друку 18.07.2026