

УДК 58.084.1:58.085

DOI: 10.20535/ibb.2017.1.1.112875

А.А. Петерсон^{1*}, В.Є. Досенко², В.О. Бідюк³, М.В. Коршевніук³, В.М. Ліновицька³, М.В. Кучук¹

¹Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ, Україна

²Інститут фізіології імені О.О. Богомольця НАН України, Київ, Україна

³КПІ ім. Ігоря Сікорського, Київ, Україна

ТРАНЗІЄНТНА ЕКСПРЕСІЯ У БІОМАСІ САЛАТУ *LACTUCA SATIVA* РЕКОМБІНАНТНОЇ МАЛОЇ ІНТЕРФЕРУЮЧОЇ РНК ДО мРНК δ -ІЗОФОРМИ ПРОТЕЇНКІНАЗИ С ЛЮДИНИ

Проблематика. Результати експериментів *in vitro* з використанням хімічно синтезованих молекул інтерферуючих РНК підтверджують перспективність досліджень застосування цих сполук у медичній практиці. Значна вартість виробництва РНК хімічним синтезом зумовлює важливість пошуку біотехнологічних методів виготовлення цих сполук. Перспективним напрямом створення біофармацевтичних препаратів є поєднання активної фармацевтичної субстанції з інноваційними засобами доставки – наприклад такими, як біоінкапсуляція у рослинних клітинах.

Мета дослідження. Тестування можливості та ефективності транзїєнтної експресїї гена, що кодує малу інтерферуючу РНК до мРНК δ -ізоформи протеїнкїнази С людини (міРНК РКС- δ) у біомасі їстівних у сирому вигляді рослин салату *Lactuca sativa*.

Методика реалїзації. Отримання біомаси, що накопичувала молекули міРНК РКС- δ , здійснювалось за методикою, яка була розроблена нами для експресїї генів, що кодують рекомбїнантні білки. Оцїнювання рївня накопичення малих інтерферуючих РНК здійснювалось методом зворотної транскрипції з подальшою полімеразною ланцюговою реакцією (ПЛР) у режимі реального часу.

Результати дослідження. Рївень накопичення цїльового продукту становить 22 фмоль/г сухої маси.

Висновки. Представлена методика транзїєнтної експресїї дає змогу отримувати біомасу салату *Lactuca sativa*, в якїї методом зворотної транскрипції з подальшою ПЛР у режимі реального часу фіксується наявність рекомбїнантної малої інтерферуючої РНК РКС- δ .

Ключові слова: рослинна експресїйна система; транзїєнтна експресїя; *Lactuca sativa*; рекомбїнантна мала інтерферуюча РНК; δ -ізоформа протеїнкїнази С людини.

Вступ

Надмірна експресїя гена δ -ізоформи протеїнкїнази С людини призводить до судинних дисфункцій, якї спричинюють артеріальну гіпертензію та діабет [1]. У попередніх дослідженнях було встановлено, що введення препарату малої інтерферуючої РНК до мРНК δ -ізоформи протеїнкїнази С лабораторним щурам зі спонтанною артеріальною гіпертензією сприяло нормалїзації артеріального тиску [2].

Малі інтерферуючі РНК є дволанцюговими молекулами РНК, якї в результаті процесингу ферментом Dicer та зв'язування з комплексом RISC створюють систему для деградації певної мРНК, що містить комплементарну до інтерферуючої РНК послїдовність. З моменту відкриття явища перенесення біохїмічно активних форм малих інтерферуючих РНК від рослин до клітин деяких видів нематод, якї харчуються цими рослинами, було зроблено багато спроб виявлення можливості передачі цих молекул із продуктами харчування до клітин ор-

ганїзмів ссавців. Серед таких продуктів досліджували молоко [3], яйця, рослини [4], що можуть бути вживані в сирому вигляді. На жаль, у багатьох публікаціях демонструється відсутність можливості потрапляння молекул інтерферуючих РНК у клітини органїзмів ссавців із їжею. Огляд негативних результатів подано у праці К.В. Уїтвера та К.Д. Хїрші [5]. Однак Л. Занг зі співавторами опублікували дані, якї свідчать про те, що в клітинах органїзмів лабораторних тварин вдавалось детектувати певний рївень наявності деяких рослинних малих інтерферуючих РНК [6]. Також є повідомлення про функціональну терапевтичну протиракову активність препарату малих інтерферуючих РНК, що були накопичені в рослинній біомасі [7]. Але відсутність добре документованих і стандартизованих методів проведення таких експериментів у поєднанні із застосуванням різними дослідниками аналітичних методів з різню аналітичною чутливістю, ймовїрно, досї залишається підґрунтям дискусїйності питання ефективності горизонтального переносу біологічно

*corresponding author: a.peterson@mail.ru

активних малих інтерферуючих РНК між рослинами та ссавцями.

Існують суттєві обмеження при використанні трансгенних організмів як продуцентів рекомбінантних малих інтерферуючих РНК і продуктів харчування на основі цих організмів (включно з продуктами їх життєдіяльності) як засобів доставки цих молекул. Під час поїдання та при проходженні крізь шлунково-кишковий тракт – до всмоктувальної поверхні тонкої кишки – молекули малих інтерферуючих РНК мають бути захищені від фізико-хімічних факторів інактивації, що містяться у шлунково-кишковому тракті. Такі середовища, як молоко або яєчний жовток, не можуть слугувати ефективною протекторною системою, бо за своєю природою не здатні формувати захисних бар'єрів навколо молекул РНК, а можуть тільки слугувати захисним оточенням під час зберігання та лише частково екранувати молекули РНК від руйнівного фізико-хімічного оточення шлунково-кишкового тракту. Таким чином, рослинна клітина, яка має доведену здатність транспортувати до тонкої кишки ссавців біологічно активні рекомбінантні протеїни [8], залишається єдиною перспективною кандидатною системою біоінкапсуляції, що потенційно може забезпечити потрібний транспорт біологічно активних молекул малих інтерферуючих РНК.

Тестування біологічної активності біоінкапсульованих у рослинних клітинах та доставлених з їх допомогою до тонкої кишки лабораторних тварин молекул малих інтерферуючих РНК є багатостадійним процесом. Позитивний результат – як достовірна зміна рівня накопичення певного білка-мішені у клітинах певного типу лабораторних тварин – є інтегральним індикатором успішного здійснення ланцюга певних подій. До них включають накопичення у біомасі рослин-продуцентів необхідної концентрації цільових біологічно активних молекул РНК, використання ефективного способу підготовки рослинного матеріалу для годування лабораторних тварин, забезпечення поїдання лабораторними тваринами необхідної кількості рослинного матеріалу, доставку неушкоджених молекул малих інтерферуючих РНК крізь шлунково-кишковий тракт до тонкої кишки, всмоктування цільових молекул РНК та їх трансфер у кровотік, системне розповсюдження цих сполук по організму лабораторних тварин і досягнення ними клітин-мішеней у необхідній кількості. В ситуації, коли умови успішного та відтвореного здійснення кожного з цих етапів майже не описані в науковій літературі, необ-

хідно мати окремі методи контролю для кожного з цих етапів та здійснювати кожний етап як незалежний експеримент.

Першою подією з наведеної вище послідовності є накопичення необхідної концентрації цільових молекул у біомасі рослин-продуцентів. Питання з'ясування значення показника “необхідної кількості” залишається відкритим. Тому, на нашу думку, в таких умовах цей етап необхідно здійснювати, маючи на меті отримати рослинний матеріал із максимально можливим рівнем накопичення цільового продукту. Існують два основних типи функціонування (експресії) гетерологічних генів у рослинній клітині. Перший тип відбувається постійно та є наслідком вбудовування цільових генів у хромосоми ядра рослинних клітин або в пластом хлоропластів цих клітин. Другий тип – транзйентний – тимчасовий і є наслідком порівняно короткочасної наявності гетерологічного генетичного матеріалу в рослинних клітинах, при цьому цей генетичний матеріал не вбудовується в геном рослинних клітин і через деякий час повністю елімінується з клітин. Останній тип експресії в більшості випадків дає змогу отримувати рівні накопичення рекомбінантних білків у середньому в 10–100 разів вищі, ніж перший тип.

У роботі І.М. Герасименка зі співавторами [9] описано отримання ліній стабільно трансформованих рослин салату геном, що кодує малу інтерферуючу РНК до мРНК δ -ізоформи протеїнкінази С людини. Повідомлення у науковій літературі про транзйентну експресію у біомасі їстівних видів рослин малих інтерферуючих РНК до мРНК ссавців, за нашою інформацією, відсутні. Також, відповідно, порівняння рівнів накопичення малих інтерферуючих РНК при паралельному застосуванні обох типів експресії не описано. Тому можна припустити, що, за аналогією в різниці рівнів накопичення рекомбінантних білків, саме транзйентна експресія генів малих інтерферуючих РНК у рослинах потенційно теж має дати можливість отримувати вищі рівні накопичення цих молекул, ніж експресія вбудованих у геном рослини трансгенів.

Постановка задачі

Метою роботи є тестування можливості та визначення ефективності транзйентної експресії гена, що кодує малу інтерферуючу РНК до мРНК δ -ізоформи протеїнкінази С людини (мРНК РКС- δ) у біомасі рослин салату *Lactuca sativa*.

Матеріали і методи

Постановка експериментів з отримання біомаси, яка накопичувала цільові молекули міРНК РКС- δ , здійснювалась за методикою, розробленою нами для експресії генів, що кодують цільові рекомбінантні білки. Оцінка рівня накопичення цільових малих інтерферуючих РНК здійснювалась методом зворотної транскрипції з подальшою полімеразною ланцюговою реакцією (ПЛР) у режимі реального часу.

Експресійні вектори і штами агробактерій. В роботі використовували векторні конструкції рNPB0142, рICH5290 і рICH6692, що призначені для експресії в рослинах. Указані векторні конструкції були перенесені в штаму *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. Отримання векторної конструкції рNPB0142 описано в [9]. Конструкція була люб'язно надана к.б.н. І.М. Герасименко. Векторні конструкції рICH5290 і рICH6692, а також штаму *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 були люб'язно надані Icon Genetics GmbH (м. Халле, ФРН).

Векторна конструкція рICH5290 призначена для передачі від клітин *Agrobacterium tumefaciens* до клітин рослин гена, що кодує зелений флуоресцюючий протеїн (GFP), та описана в [10]. Векторна конструкція рNPB0142 призначена для передачі від клітин *Agrobacterium tumefaciens* до клітин рослин послідовності, що кодує малу інтерферуючу РНК до мРНК δ -ізоформи протеїнкінази С людини (міРНК РКС- δ). Векторна конструкція рICH6692 призначена для передачі від клітин *Agrobacterium tumefaciens* до клітин рослин гена, що кодує протеїн р19 вірусу затримки росту томатів TBSV (конструкція є структурним аналогом до рICH5290). Протеїн р19 часто використовується як інгібітор сайленсингу експресії гетерологічного генетичного матеріалу в рослинних клітинах [11].

Рослинний матеріал. У роботі використовували салат *Lactuca sativa* сорту "Уйсун" ("Ада-Сервіс", Україна). Рослини вирощувались із насіння протягом 3–4 тижнів на торф'яному субстраті № 4 ("Domoflor", Литва). До інфільтрації рослини культивувались в умовах кліматичної камери зі штучним світлодіодним джерелом світла. Питома густина світлового потоку 150 ± 20 мкМ фотонів $\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$; світла і темна фази доби – по 12 год; температура $20\text{--}24$ °С; відносна вологість повітря 60 ± 20 %.

Після інфільтрації рослини інкубувались у кліматичній камері за температури 21 ± 1 °С протягом доби за умови слабого люмінесцентного

освітлення. Питома густина світлового потоку 20 ± 10 мкМ фотонів $\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$; відносна вологість повітря 90 ± 10 %. Після цього інфільтровані рослини переносились до кліматичної камери з діодним джерелом світла та культивувались до накопичення максимальної кількості цільового продукту за температури $14\text{--}16$ °С, протягом 16-годинного світлового періоду та за відносною вологості повітря 60 ± 20 %. Питома густина світлового потоку 150 ± 20 мкМ фотонів $\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$.

Культивування агробактерій і приготування суспензій для інфільтрації рослин салату. Культивування агробактерій здійснювалось на середовищі АВ [12] за умови активного перемішування за температури 29 ± 1 °С. Після зберігання за температури -70 ± 1 °С 1 мл суспензії агробактерій асептично вносили у стерильну ємність об'ємом 1,7 л, що містила 0,5 л живильного середовища та магнітну мішалку. Після цього ємність встановлювали на магнітну мішалку в термостат. Культивування проводили протягом 70 ± 2 год. По закінченні культивування напрацьовані культури агробактерій, що несли кДНК до цільової міРНК РКС- δ і ген GFP, переливали в хімічні стакани об'ємом 0,5 л і використовували безпосередньо для інфільтрації рослин.

Підготовка суспензій із агробактеріями, що несуть ген супресора сайленсингу. Отримані культури агробактерій, що містили кДНК до цільової міРНК РКС- δ і ген GFP, змішували з культурами агробактерій, які містили ген супресора сайленсингу в пропорції 1:1. Отримані суспензії переливали в хімічні стакани об'ємом 0,5 л і використовували безпосередньо для інфільтрації рослин.

Вакуумна інфільтрація рослинної біомаси суспензіями агробактерій. Пул рослин салатів, що були одночасно вирощені в однакових умовах, ділили на три групи: основну, контрольну та інтактну. Кожну групу формували з не менш ніж 12 рослин. Надземні частини рослин з основної групи занурювали в стакани із сумішшю суспензій агробактерій, які містили кДНК до цільової міРНК РКС- δ і ген супресора сайленсингу, або тільки агробактерій, що містили кДНК до міРНК РКС- δ . Надземні частини рослин із контрольної групи занурювали в стакани із сумішшю суспензій агробактерій, які містили ген GFP і ген супресора сайленсингу, або тільки агробактерій, що містили ген GFP. Рослини з інтактною групою не інфільтрувались.

Рослини в зануреному стані переносили до вакуумної камери. Тиск у камері доводили

до $-0,095$ МПа та витримували цей показник протягом 5 хв. Після цього тиск у камері вирівнювали до атмосферного. Інфільтровані рослини та рослини з інтактною групи переносили до кліматичної камери.

Моніторинг процесу накопичення цільової малої інтерферуючої РНК у біомасі рослин салатів. Розвиток процесу транзйентної експресії та, відповідно, динаміку зміни рівня накопичення цільового продукту в рослинах салатів з основної групи оцінювали за допомогою візуального спостереження за рівнем накопичення репортерного зеленого флуоресцюючого протеїну в листі контрольної групи рослин (за флуоресценцією GFP при опроміненні рослин світлом із довжиною хвилі 395 ± 10 нм). При цьому нами робилось припущення, що максимальний рівень накопичення молекул міРНК РКС- δ у листі основної групи рослин буде відповідати максимальному рівню накопичення молекул GFP у листі контрольної групи рослин.

Підготовка рослинної біомаси для проведення визначення вмісту цільової малої інтерферуючої РНК. Після досягнення максимального рівня накопичення GFP у рослинах контрольної групи проводили збір листя з рослин основної групи. Також були зібрані листки з рослин контрольної групи, що накопичили максимальну кількість GFP, – як негативний контроль рослинного матеріалу, який був підданий тим самим процедурам, що й цільовий матеріал, але експресував інший гетерологічний генетичний матеріал. Крім цього, листя з інтактних рослин також було зібране для оцінки вмісту ендогенної мікроРНК 156а у рослинах салату, що не контактували з агробактеріями та не отримували від них гетерологічного генетичного матеріалу.

Із зібраного листя видаляли центральну жилку та заморожували його в низькотемпературному морозильнику за температури -70 ± 1 °С. Біомасу витримували в морозильнику протягом 3–4 діб та висушували ліофільно за допомогою ліофільної сушарки (Labconco, США). Висушений рослинний матеріал переносили в поліпропіленові центрифужні пробірки на 50 мл, додавали туди по 6–8 скляних кульок (діаметр 5 мм) і герметично закривали. До виділення міРНК пробірки зберігали в холодильнику при 4 ± 2 °С.

Визначення вмісту молекул малої інтерферуючої РНК анти-РКС- δ методом зворотної транскрипції з подальшою ПЛР у режимі реального часу. Для екстракції цільової малої інтерферуючої РНК із ліофільно висушеної рослинної сировини використовували фенолхлорофор-

мовий метод. Відбирали проби ліофільно висушеного і подрібненого рослинного матеріалу в кількості 10 мг. У кожену пробірку з пробою додавали по 250 мкл 6 М гуанідинтіоціанату (Sigma, USA) та 250 мкл буферного розчину фенолу (0,1 М розчин фенолу в цитратному буфері, рН $4,3 \pm 0,2$) (Sigma, USA). Вміст перемішували та витримували в холодильнику ($+4$ °С) 5 хв, періодично струшуючи пробірки. Після цього до вмісту пробірок додавали 100 мкл суміші хлороформу та ізоамілового спирту (49:1), перемішували і витримували на холоді ($+4$ °С) 5 хв, періодично струшуючи.

Після вистоювання екстракційної суміші вміст центрифугували при 14,5 тис. об/хв протягом 5 хв. З кожної пробірки відбирали 200 мкл супернатанту, до якого додавали рівний об'єм суміші хлороформу та ізоамілового спирту (49:1). Пробірки ретельно перемішували і переносили в морозильну камеру (-20 °С) на 30 хв. Після витримання на холоді проби центрифугували 15 хв при 14,5 тис. об/хв, супернатант видаляли. В пробірку з осадом додавали 500 мкл етилового спирту (75 %) та центрифугували 5 хв при 14,5 тис. об/хв, знову зливаючи супернатант. Пробірки з осадом ставили сушити при 65 °С протягом 5 хв. Після цього до осаду додавали 50 мкл деіонізованої води, ретельно перемішували та прогрівали ($+65$ °С, 5 хв) для розчинення мікроРНК у воді.

Пробірки з екстрагованою мікроРНК зберігали в морозильній камері при -20 °С безпосередньо до проведення ПЛР у режимі реального часу з використанням зворотної транскрипції (ЗТ-ПЛР).

Для зворотної транскрипції цільової малої інтерферуючої РНК використовували специфічні петльові праймери з TagMan®MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, США), приготовані за інструкцією виробника.

Кожна проба робилась у двох повторах, з урахуванням 3 проб на цільову мікроРНК, і контролю, в який замість препарату мікроРНК додавали деіонізовану воду. Препарати міРНК додавали до реакційної суміші для ПЛР, ретельно перемішували, центрифугували (900 об/хв) для стикання крапель суміші на дно та ставили в термоциклер 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, США). На термоциклері за інструкцією виробника виставляли стандартний режим для зворотної транскрипції.

Для проведення ПЛР у реальному часі використовували компоненти TaqMan®Universal PCR Master Mix II та специфічні праймери

Таблиця. Первинні результати реакцій ЗТ-ПЛР

Зразок	Транзйентна експресія цільового гена			
	Із супресором сайленсінгу		Без супресора сайленсінгу	
	СТ* мікроРНК-156а	СТ міРНК РКС-δ	СТ мікроРНК-156а	СТ міРНК РКС-δ
Рослини, інфільтровані кДНК міРНК РКС-δ	23,2 ± 2 %	32,4 ± 5 %	19,75 ± 3 %	26,2 ± 6 %
Рослини, інфільтровані рІСН5290	22,5 ± 1 %	37,5 ± 4 %	21,6 ± 2 %	37,5 ± 3 %
Інтактні рослини	16,7 ± 3 %	0	18,65 ± 3 %	34,85 ± 5 %

*СТ – кількість циклів, який повинен зробити ампліфікатор при ПЛР у режимі реального часу для того, щоб сила флуоресценції досягнула порогового рівня (над шумом). Таким чином, чим більше ампліфікатор зробить циклів до досягнення величини СТ, тим менша кількість ДНК була в початковому розчині.

(TaqMan@Small RNA, Applied Biosystems, США): ath-miR156a, ID 000333 (як ендегенний контроль), міРНК РКС-β Custom Assay CST95GM). ДНК-зонд, що використовувався для детекції, належить до групи FAM (Fluorescein amidite) флуоресцентних міток, що працюють у фазі елонгації ланцюга. Використовували воду без нуклеазної активності.

Режим для проведення ампліфікації: 10 хв при 95 °С (первинна денатурація) і 45 циклів 15 с при 95 °С (денатурація) та 60 с при 60 °С (відпал та елонгація ланцюга). Ампліфікація та подальший аналіз результатів проводилися детекторним модулем 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США).

Результати і їх обговорення

Результати проведення реакцій ЗТ-ПЛР наведено в таблиці.

Концентрація мікроРНК-156а, виражена у величині СТ, не є стабільною в рослин, що не піддавалися трансформації (інтактні групи). При цьому концентрація міРНК РКС-δ істотно вища в рослин, які не піддавалися коекспресії супресора сайленсінгу.

Після проведення розрахунку за методикою, що була застосована в попередній роботі [9], були отримані такі дані:

- рівень накопичення міРНК РКС-δ у ліпофільно висушеній біомасі салату, що була інфільтрована суспензією суміші агробактерій, які несли цільовий ген і ген супресора сайленсінгу, становив 12,7 фмоль/г;
- рівень накопичення малої інтерферуючої РНК міРНК РКС-δ у біомасі салату, що була інфільтрована суспензією агробактерій, які несли тільки цільовий ген, становив 22 фмоль/г.

Але в обох варіантах експерименту (з наявністю супресора сайленсінгу та без) результати ЗТ-ПЛР для ендегенної мікроРНК-156а у зразках, що були в контакті з агробактерією, відрізняються від даних для зразків, що не інфільтрувалися. Концентрація мікроРНК істотно зменшується після проведення транзйентної трансформації. Можливо, це спричинено тим, що мікроРНК є стресозалежною, тому її концентрація може значно варіювати в рослинах, вирощених у різних умовах та при використанні різних методик проведення трансформації.

Таким чином, можна припустити, що як ендегенну мікроРНК для постановки ЗТ-ПЛР було вибрано стресозалежну ендегенну мікроРНК. Відповідно, результати розрахунку відносного вмісту міРНК РКС-δ (відносно вмісту ендегенної мікроРНК-156а) у зразках біомаси салатів, що були під дією різних стресових умов, не можуть з достатньою точністю порівнюватися між собою.

Висновки

Запропонована методика транзйентної експресії дає змогу отримувати біомасу салату *Lactuca sativa*, в якій методом зворотної транскрипції з подальшим проведенням ПЛР у режимі реального часу фіксується наявність цільової рекомбінантної малої інтерферуючої РНК РКС-δ.

Застосування транзйентної коекспресії генів цільової міРНК РКС-δ і супресора сайленсінгу р19 значно знижує рівень накопичення цільового продукту. Застосування ендегенної мікроРНК-156а, концентрація якої в біомасі салатів не є постійною і, можливо, залежить від фізіологічного стану рослини (що видно з результатів ПЛР), як контрольної ендегенної мікроРНК для проведення ПЛР у режимі реально-

го часу та подальшого розрахунку відносного вмісту цільової міРНК РКС- δ не дає можливості порівнювати отримані результати з результатами, одержаними в попередній роботі [9].

Наведена методика транз'єнтної експресії дає можливість швидкого (протягом декількох тижнів) напрацювання необхідної кількості їстівної в сирому вигляді біомаси, що буде містити цільові малі інтерферуючі РНК. Висушений рослинний матеріал, що містить цільову

РНК, може бути використаний для попередніх експериментів на лабораторних тваринах з метою тестування різних варіантів конструкцій цільових малих інтерферуючих РНК. Подібне тестування може використовуватися перед проведенням робіт з отримання стабільно трансформованих ліній рослин і напрацювання необхідної кількості їх біомаси (що, як правило, тривають більше 6 місяців).

Список літератури

1. Fact or fancy: Does the high level of PKC-delta gene expression contribute to potassium channels malfunction at arterial hypertension and diabetes? / T. Novokhatska, K. Klymenko, V. Dosenko, A. Soloviev // *Pharmacology and Drug Toxicology*. – 2014. – № 1. – P. 78–84.
2. Correction of vascular hypercontractility in spontaneously hypertensive rats using shRNAs-induced delta protein kinase C gene silencing / T. Novokhatska, S. Tishkin, V. Dosenko [et al.] // *Eur. J. Pharmacol.* – 2013. – Vol. 718, № 1-3. – P. 401–407.
3. Uptake of dietary milk miRNAs by adult humans: a validation study / A. Auerbach, G. Vyas, A. Li [et al.] // *F1000Res*. – 2016. – Vol. 721, № 5. – P. 1–14.
4. Real-time quantitative PCR and droplet digital PCR for plant miRNAs in mammalian blood provide little evidence for general uptake of dietary miRNAs: Limited evidence for general uptake of dietary plant xenomiRs / K.W. Witwer, M.A. McAlexander, S.E. Queen, R.J. Adams // *RNA Biology*. – 2013. – Vol. 10, № 7. – P. 1080–1086.
5. Witwer K.W. Transfer and functional consequences of dietary microRNAs in vertebrates: Concepts in search of corroboration / K.W. Witwer, K.D. Hirschi // *BioEssays*. – 2014. – Vol. 36, № 4. – P. 394–406.
6. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA / L. Zhang, D. Hou, X. Chen [et al.] // *Cell Res*. – 2012. – Vol. 22, № 1. – P. 107–126.
7. A novel chemopreventive strategy based on therapeutic microRNAs produced in plants / S. Mlotshwa, G.J. Pruss, J.L. MacArthur [et al.] // *Cell Res*. – 2015. – Vol. 25, № 4. – P. 521–524.
8. Kwon K.-C. Oral delivery of protein drugs bioencapsulated in plant cells / K.-C. Kwon, H. Daniell // *Molecular Therapy*. – 2016. – Vol. 24, № 8. – P. 1342–1350.
9. Establishment of transgenic lettuce plants producing potentially anti-hypertensive shRNA / I.M. Gerasymenko, V.V. Kleschevnikov, V.R. Kedlian [et al.] // *Cytol. Genet.* – 2017. – Vol. 51, № 1. – P. 1–7.
10. Systemic Agrobacterium tumefaciens-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants / S. Marillonnet, C. Thoeringer, R. Kandzia [et al.] // *Nature Biotechnol.* – 2005. – Vol. 23, № 6. – P. 718–723.
11. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus / O. Voinnet, S. Rivas, P. Mestre, D. Baulcombe // *Plant J*. – 2003. – Vol. 83, № 4. – P. 949–956.
12. *Agrobacterium Protocols*. Vol. 1. *Methods in Molecular Biology* / Wang Kan, Ed. – New York : Springer-Verlag, 2006. – 484 p.

References

- [1] Novokhatska T, Klymenko K, Dosenko V, Soloviev A. Fact or fancy: Does the high level of PKC-delta gene expression contribute to potassium channels malfunction at arterial hypertension and diabetes? *Pharmacology and Drug Toxicology*. 2014;1:78-84.
- [2] Novokhatska T, Tishkin S, Dosenko V, Boldyriev A, Ivanova I, Strielkov I, et al. Correction of vascular hypercontractility in spontaneously hypertensive rats using shRNAs-induced delta protein kinase C gene silencing. *Eur J Pharmacol*. 2013 Oct;718(1-3):401-7. DOI 10.1016/j.ejphar.2013.08.003
- [3] Auerbach A, Vyas G, Li A, Halushka M, Witwer K. Uptake of dietary milk miRNAs by adult humans: a validation study. *F1000Res*. 2016 Apr 22;5:721. DOI 10.12688/f1000research.8548.1
- [4] Witwer KW, McAlexander MA, Queen SE, Adams RJ. Real-time quantitative PCR and droplet digital PCR for plant miRNAs in mammalian blood provide little evidence for general uptake of dietary miRNAs: Limited evidence for general uptake of dietary plant xenomi Rs. *RNA Biol*. 2013 Jul;10(7):1080-6. DOI 10.4161/rna.25246
- [5] Witwer KW, Hirschi KD. Transfer and functional consequences of dietary microRNAs in vertebrates: Concepts in search of corroboration. *Bioessays*. 2014 Apr;36(4):394-406. DOI 10.1002/bies.201300150
- [6] Zhang L, Hou D, Chen X, Li D, Zhu L, Zhang Y, et al. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Res*. 2012 Jan;22(1):107-26. DOI 10.1038/cr.2011.158

- [7] Mlotshwa S, Pruss GJ, MacArthur JL, Endres MW, Davis C, Hofseth LJ, et al. A novel chemopreventive strategy based on therapeutic microRNAs produced in plants. *Cell Res.* 2015 Apr;25(4):521-4. DOI 10.1038/cr.2015.25
- [8] Kwon KC, Daniell H. Oral delivery of protein drugs bioencapsulated in plant cells. *Mol Ther.* 2016 Aug;24(8):1342-50. DOI 10.1038/mt.2016.115
- [9] Gerasymenko IM, Kleschevnikov VV, Kedlian VR, Sakhno LO, Arbuzova IA, Sheludko YV, et al. Establishment of transgenic lettuce plants producing potentially anti-hypertensive shRNA. *Cytol Genet.* 2017;51(1):1-7. DOI 10.3103/s0095 452717010054
- [10] Marillonnet S, Thoeringer C, Kandzia R, Klimyuk V, Gleba Y. Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nature Biotechnol.* 2005 May;23(6):718-23. doi: 10.1038/nbt1094
- [11] Voinnet O, Rivas S, Mestre P, Baulcombe D. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* 2003 Mar;33(5):949-56. doi: 10.1046/j.1365-313X.2003.01676.x
- [12] Methods in molecular biology. In: Kan Wang, editor. *Agrobacterium Protocols*. New York: Springer-Verlag; 2016. 484 p.

A.A. Peterson, V.Ye. Dosenko, V.O. Bidiuk, M.V. Korshevniuk, V.M. Linovytska, M.V. Kuchuk

TRANSIENT EXPRESSION OF RECOMBINANT SMALL INTERFERING RNA TO MRNA OF δ -ISOFORM HUMAN PROTEIN KINASE C IN *LACTUCA SATIVA* BIOMASS

Background. The perspective of research of small interfering RNA (siRNA) application in medical practice was proved by its efficiency of chemically synthesized siRNA in the experiment *in vitro*. The high cost of RNA production through chemical synthesis determines the importance of searching the biotechnological methods of obtaining these compounds. A promising area of biopharmaceuticals creation is a combination of active pharmaceutical substances with innovative tools of delivery, such as bio-encapsulation in plant cells.

Objective. The aim of the paper is testing of capabilities and efficiency of transient expression of the gene encoding the small interfering RNA to mRNA δ isoform of human protein kinase C (anti-PKC δ) in edible raw plant biomass of lettuce *Lactuca sativa*.

Methods. Obtaining the biomass which accumulates anti-PKC δ small interfering RNA molecules was carried out by the method that was developed by our research group for the expression of genes encoding recombinant proteins. Evaluation of small interfering RNA accumulation was performed by a reverse transcription method with the subsequent Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR).

Results. The level of accumulation of target product is 22 fmol/g of lyophilized plant biomass.

Conclusions. The method of transient expression allows obtaining the lettuce *Lactuca sativa* biomass, which contains small interfering RNA recombinant anti-PKC δ (detected by a reverse transcription method with the subsequent Real-Time PCR).

Keywords: plant expression system; transient expression; *Lactuca sativa*; recombinant small interfering RNA; delta isoform of human protein kinase C.

A.A. Петерсон, В.Е. Досенко, В.А. Бидюк, М.В. Коршевніук, В.М. Линовицкая, Н.В. Кучук

ТРАНЗИЕНТНАЯ ЭКСПРЕССИЯ В БИОМАССЕ САЛАТА *LACTUCA SATIVA* РЕКОМБИНАНТНОЙ МАЛОЙ ИНТЕРФЕРИРУЮЩЕЙ РНК К МРНК δ -ИЗОФОРМЫ ПРОТЕИНКИНАЗЫ С ЧЕЛОВЕКА

Проблематика. Результаты экспериментов *in vitro* с использованием химически синтезированных молекул малых интерферирующих РНК подтверждают перспективность исследований применения этих соединений в медицинской практике. Значительная стоимость производства РНК химическим синтезом обуславливает важность поиска биотехнологических методов изготовления этих соединений. Перспективным направлением создания биофармацевтических препаратов является сочетание активной фармацевтической субстанции с инновационными средствами доставки – например такими, как биоинкапсуляция в растительных клетках.

Цель исследования. Тестирование возможности и эффективности транзientной экспрессии гена, кодирующего малую интерферирующую РНК к мРНК δ -изоформы протеинкиназы С человека (миРНК РКС- δ) в биомассе съедобных в сыром виде растений салата *Lactuca sativa*.

Методика реализации. Получение биомассы, которая накапливала молекулы малой интерферирующей РНК к мРНК РКС- δ , осуществлялась по методике, разработанной нами для экспрессии генов, кодирующих рекомбинантные белки. Оценка уровня накопления малых интерферирующих РНК осуществлялась методом обратной транскрипции с последующей полимерно-цепной реакцией (ПЦР) в режиме реального времени.

Результаты исследования. Уровень накопления целевого продукта составляет 22 фмоль/г лиофильно высушенной растительной биомассы.

Выводы. Представленная методика транзientной экспрессии позволяет получать биомассу салата *Lactuca sativa*, в которой методом обратной транскрипции с последующей ПЦР в режиме реального времени фиксируется наличие рекомбинантной малой интерферирующей РНК РКС- δ .

Ключевые слова: растительная экспрессионная система; транзientная экспрессия; *Lactuca sativa*; рекомбинантная малая интерферирующая РНК; δ -изоформа протеинкиназы С человека.

Reprinted from: *Naukovi Visti NTUU KPI.* 2017;3:64-70

Received 6 November 2017

Accepted 4 December 2017