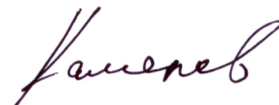


Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Биолого-почвенный институт

Дальневосточного отделения Российской академии наук

На правах рукописи



Каменев Дмитрий Геннадьевич

**Исследование рекомбинантного
силикатеина LoSilA1 и катепсина LoCath морской губки *Latrunculia oparinae***

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертация на соискание ученой
степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
к.б.н, доцент Шкрыль Юрий Николаевич

Владивосток 2015

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1. Биоминерализация и биосилификация в живых системах.....	10
1.2. Губки и спикулы.....	14
1.3. Силикатеины и катепсины.....	18
1.4. Экспрессионные системы.....	31
1.5. Кристаллы кремния.....	38
1.6. Фитосинтез наночастиц металлов.....	41
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	44
2.1. Губки.....	44
2.2. Получение амплифицированной кДНК.....	44
2.3. Получение генетических конструкций использованных в работе.....	44
2.4. Получение бинарного вектора для трансформации растений.....	47
2.5. Растения, использованные в работе.....	48
2.6. Среды для культивирования стерильных растений и клеточных культур.....	48
2.7. Получение и культивирование клеточных культур табака.....	50
2.7.1 <i>Получение стерильных растений табака</i>	50
2.7.2 <i>Получение клеточных культур</i>	50
2.8. Агробактериальная трансформация.....	51
2.9. Выделение РНК.....	52
2.10. Обратная транскрипция.....	53
2.11. Доказательство трансгенности.....	53
2.12. Полимеразная цепная реакция.....	54
2.13. Секвенирование.....	56
2.14. Детекция флуоресценции GFP методом конфокальной микроскопии... ..	56
2.15. Экстракция белков.....	56
2.16. SELDI.....	56
2.17. Перенос растений в почву.....	57
2.18. Получение и анализ наночастиц серебра.....	57

2.19. Выделение белка из бактерий и тест каталитической активности рекомбинантного силикатеина и катепсина	58
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	60
3.1. Определение уровней экспрессии силикатеина и катепсина роговой губки <i>L. oparinae</i>	60
3.2. Генетические конструкции несущие ген <i>LoSilA1</i> , <i>LoSilA1-EGFP</i> , <i>LoCath62</i>	
3.3. Кристаллы кремния и состав кристаллов (полимеризация кремния <i>in vitro</i>).....	64
3.4. Получение трансгенных каллусных линий, регенерация перенос трансгенных растений в почву.	70
3.5. Влияние силикатеина на процессы фитосинтеза наночастиц серебра	76
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	80
ВЫВОДЫ	83
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	84
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	85

ВВЕДЕНИЕ

Сложно переоценить важность роли кремния в современном мире. Этот элемент широко используется практически во всех отраслях промышленности. Особенно востребованы новые, необычные соединения и формы кремния для применения в активно развивающихся отраслях – оптике, электронике и вычислительной технике (Kisailus et al., 2006). Важными параметрами для кремнийсодержащих деталей является их размер и упорядоченность атомов кремния. Для современной промышленности большой интерес представляют наноструктуры кремния (Вознесенский и др., 2010). Однако большинство современных способов получения кремниевых наноструктур связано с использованием экстремальных температур, или сложных условий синтеза.

В последнее время интенсивно изучаются свойства природных нанокремниевых структур, таких как створки диатомовых водорослей и спикулы губок (Kroger et al., 2007, 2008). Это обусловлено тем, что в биологических объектах биосиликаты определенной формы формируются в условиях окружающей среды (Kroger et al., 2009). Биотехнологический подход, в данном случае – наиболее целесообразный способ в решении проблемы.

Особый интерес вызывают спикулы губок класса *Hexactinellida*, обладающие необычными физико-химическими свойствами: спикулы хорошо пропускают свет в видимом и ближнем ИК-диапазоне спектра электромагнитного излучения и, при модуле Юнга материала, близком к плавленому кварцу, обладают повышенной гибкостью, в сравнении с промышленными кварцевыми волоконными световодами. Настоящие спикулы при длине от 5 до 500 мкм представляют собой новый вид природных биоминеральных фотонных кристаллов. Однако эти губки обитают на больших глубинах, а культивирование их тканей сложный и трудоёмкий процесс. Эта особенность значительно затрудняет работу с данным объектом. Поэтому в настоящее время для изучения молекулярно-биологических основ формирования спикул у губок более широко используют представителей класса

Demospongia (роговые губки). Виды этого класса обитают на меньших глубинах и имеют более широкое распространение, чем Шестилучевые губки.

В конце XX века было установлено, что процесс биосилификации, ведущий к формированию спикул у губок, контролируют белки-гомологи цистеиновых протеаз, катепсинов, семейства L, относящихся к суперсемейству папаиновых протеаз (Shimizu et al., 1998). Эти белки получили название силикатеины. В каталитическом центре этих белков происходит полимеризация соединений кремния.

Разные виды роговых губок имеют различные по размерам и структуре спикулы, морфология которых является таксономическим признаком. Вероятно, это разнообразие отчасти определяется ферментативными особенностями силикатеинов у разных видов губок.

В ходе исследования силикатеина, выделенного из спикул, было показано, что белок, как нативный, так и рекомбинантный, способен конденсировать молекулы предшественника – тетраэтоксисилана (ТЕОС), с образованием кремниевых наноструктур определенной формы в обычных условиях окружающей среды (Cha et al., 1999). Широкие возможности применения этих белков делают необходимым исследование свойств новых силикатеинов из разных видов губок. Выделение белка напрямую из спикул возможно, но получить существенное количество белка не представляется возможным, ввиду сложной процедуры добычи губок и очистки продукта. Создание экспрессионной системы на основе бактерий или растений – наиболее целесообразный подход к созданию возобновляемого и доступного источника рекомбинантного белка.

Нами был выбран вид губок *L. oparinae*, принадлежащих к семейству роговых губок *Demospongia*, поскольку в отличие от стеклянных губок, этот класс обитает на меньших глубинах, что облегчает сбор материала. Кроме этого, не было опубликовано полной последовательности гена силикатеина в стеклянных губках, несмотря на наличие белка силикатеина в спикулах *Hexactinellida*. В качестве эукариотической системы для экспрессии

рекомбинантного белка был выбран табак *N. tabacum*. Это растение является модельной системой для множества работ в биотехнологии, легко подвергается генетической трансформации и легко переходит в культуру клеток. Бактерии *E. coli*. – классическая прокариотическая модельная система для экспрессии разнообразных рекомбинантных белков. Было показано, что у губок, в ходе созревания белка силикатеина он претерпевает ряд посттрансляционных модификаций, поэтому мы предполагаем, что силикатеин, экспрессированный в клетках растений может оказаться более активным, чем силикатеин, экспрессированный в прокариотических клетках.

Целью работы являлось получение и исследование каталитических свойств рекомбинантного силикатеина LoSilA1 и катепсина LoCath морской губки *Latrunculia oparinae*

В задачи исследования входило:

1. Определить относительный уровень экспрессии генов силикатеинов и катепсина в морской губке *Latrunculia oparinae*.
2. Получить генетические конструкции, несущие гены силикатеина *LoSilA1* и катепсина *LoCath* необходимые для трансформации бактерий и клеточных культур *Nicotiana tabacum*.
3. Получить бактерии *Escherichia coli*, экспрессирующие силикатеин *LoSilA1* и катепсин *LoCath*.
4. Провести выделение рекомбинантного силикатеина LoSilA1 и катепсина LoCath из *E. coli* и исследовать их каталитические свойства.
5. Получить стабильные трансгенные клеточные культуры и растения *N. tabacum*, экспрессирующие ген *LoSilA1*.
6. Исследовать влияние экспрессии гена *LoSilA1* в культурах *N. tabacum* на эффективность фитосинтеза наночастиц серебра.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Гены *LoSilA1* и *LoCath* являются наиболее активно экспрессирующимися формами семейства силикатеинов/катепсинов в морской губке *L. oparinae*.
2. Созданы экспрессионные генетические конструкции, содержащие ген силикатеина *LoSilA1*, ген катепсина *LoCath* и ген силикатеина *LoSilA1* слитый с *EGFP*.
3. Рекомбинантные белки - силикатеин *LoSilA1* и катепсин *LoCath*, полученные с помощью бактериальной системы экспрессии, способны формировать кристаллы оксида кремния из тетра-гидроксиэтил-ортосилана (ТГЕОС) *in vitro*.
4. Впервые получены трансгенные культуры клеток и растения *N. tabacum*, экспрессирующие ген силикатеина *LoSilA1*.
5. Установлено, что основные области локализации рекомбинантного белка *LoSilA1* в клетках *N. tabacum* – мембрана, ядро и цитоплазма устьиц.
6. Экспрессия силикатеина *LoSilA1* в трансгенных культурах клеток *N. tabacum* приводит к повышению эффективности фитосинтеза наночастиц серебра.

Научная новизна:

В результате работы впервые были получены генетические конструкции, несущие последовательность гена силикатеина *LoSilA1* слитого с *GFP*. Полученные конструкции могут быть использованы для дальнейшего исследования силикатеина. Впервые была установлена внутриклеточная локализация белка силикатеина, слитого с *EGFP* в каллусных культурах и трансгенных модельных растениях. Установлено, что основные места накопления силикатеина – цитоплазма клеток, мембраны клеток, а также тельца включения. Данные о местах накопления экспрессируемого рекомбинантного белка могут быть использованы для оптимизации методов выделения силикатеина, а также для создания эффективных культур-продуцентов. Нами впервые получены данные о формировании кристаллов оксида кремния с помощью рекомбинантного силикатеина *LoSilA1* и силикатеиноподобного катепсина *LoCath*. Ранее не было опубликовано работ, доказывающих

возможность формирования отдельно-лежащих кристаллов оксида кремния с помощью рекомбинантного силикатеина. Кроме того, способность катепсина к образованию структур из диоксида кремния показана впервые.

Нами был описан процесс формирования кристаллов диоксида кремния с помощью силикатеиноподобного катепсина *LoCath*. В этой работе впервые изучено влияние силикатеина на клеточные культуры растений и на регенерированные растения табака. Данные о способности катепсина *LoCath* формировать кристаллы диоксида кремния, подобно силикатеинам, ещё раз свидетельствуют о наличии эволюционной связи между этими белками, косвенно подтверждая существующую теорию происхождения силикатеинов (Müller et al., 2012).

Практическая значимость:

Полученные результаты вносят вклад в понимание фундаментальных процессов биосилификации и создают предпосылки для будущего использования рекомбинантных кремний-полимеризующих белков. Доказанное увеличение эффективности фитосинтеза при использовании экстрактов трансгенных культур, экспрессирующих ген силикатеина *LoSilA1*, может быть использовано для создания новых эффективных биотехнологических систем получения наночастиц серебра.

Апробация работы

Материалы диссертации были представлены на XII, XIII и XV Всероссийской молодежной школе-конференции по актуальным проблемам химии и биологии, МЭС ТИБОХ 2009, 2010, 2014, на 15ом симпозиуме: 15th International Biotechnology Symposium and Exhibition (Дэгу, респ. Корея, 2012), на международной конференции: LSBE International Conference on Life Science & Biological Engineering (Осака, Япония, 2013).

Личный вклад автора:

Соискателем был выполнен анализ литературных данных по теме исследования, планирование экспериментов, получена основная часть результатов, написаны статьи, подготовлены и представлены доклады на конференциях. Материал, положенный в основу диссертационной работы получен, проанализирован и обработан автором, в основном, самостоятельно.

Публикации:

По материалам работы автором опубликовано три статьи в рецензируемых журналах и шесть тезисов докладов конференций.

Структура и объём диссертации:

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, обсуждения результатов, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Список литературы содержит 125 публикаций. Диссертация изложена на 101 странице машинописного текста, содержит 6 таблиц и 22 рисунка.

Благодарности:

Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю Шкрыль Ю. Н. Автор выражает искреннюю признательность сотрудникам БПИ ДВО РАН: кандидату биологических наук Веремейчик Г. Н., кандидату биологических наук Горпенченко Т. Ю., кандидату биологических наук Тимофеевой Я. О., кандидату биологических наук Нарышкиной Н. Н. Автор благодарен сотрудникам ТИБОХ ДВО РАН: кандидату биологических наук Ковальчук С. Н. и кандидату биологических наук Голотину В. А.; а также сотруднику ИХ ДВО РАН, к.х.н. Постновой И. В. Автор благодарен всем сотрудникам лаборатории биоинженерии за помощь и поддержку при подготовке диссертационной работы.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Биоминерализация и биосилификация в живых системах

Явление биоминерализации широко распространено в природе (Cusack et al., 2008). Многие животные, такие как губки, членистоногие, радиолярии и кораллы способны к отложению солей кремния, кальция и сернокислого стронция для формирования опорных структур (Догель, 1981, Deckker et al., 2004). Различные соединения кремния встречаются во всех формах жизни (Skinner and Jahren, 2003; Юшкин и др., 2007). Благодаря этому процессу формируется костная ткань у позвоночных, карапакс членистоногих, раковины моллюсков. В костях основным органическим компонентом является коллаген. Молекулы коллагена представляют собой спираль, в которую в противоположном направлении откладываются молекулы гидроксиапатита. Сами кристаллы апатита в длину не превышают 70 нм, а в толщину - 1 нм. (Meysers et al., 2008). Биоминерализация также характерна для некоторых растений, например – диатомовых водорослей, риса, осок, кукурузы. У этих растений соли откладываются в листьях и стебле (Schröder et al., 2008).

В основе этого явления лежит контролируемый процесс отложения неорганических солей в органические полимерные соединения, например, – хитин, как при формировании карапакса членистоногих. Многие структуры, сформированные таким образом, имеют наномасштаб (Lowenstam et al, 1989). Кроме контролируемых процессов при биоминерализации не последнюю роль играют процессы самоорганизации (Müller et al., 1999, Müller et al., 2007, Kroger et al., 2007).

В 1985 году Аддади (см.: Meysers et al., 2008) была доказана стереоспецифичность отложения солей на органической матрице. Этот механизм позволяет организмам формировать необходимые, специфичные не только по химическому составу, но и по форме кристаллов, структуры. Одними из наиболее интересных примеров биоминерализации являются диатомовые водоросли и губки. Диатомовые водоросли способны контролировать

отложение кремния в клеточной стенке, формируя уникальные структуры различной формы. Эти структуры отличаются сложностью и упорядоченностью (Fischer, 1999). Было открыто несколько белков, участвующих в построении клеточной стенки. Один из белков, ответственных за отложения кремния в эпитеке и гипотеке диатомей, был назван силаффином (Luciano et al., 2008). Крёгер с соавторами (Kroger et al., 1999 Kroger et al., 2001) установили, что в диатомовых водорослях функционируют два небольших пептида (15 и 18 а.к.) – силаффин 1- α 1 и силаффин 1 α 2. В экспериментах *in vitro* оба белка оказались способны формировать наносферы диоксида кремния при смешивании с растворимыми источниками SiO₂. В этих белках ϵ -аминогруппы аминокислоты лизин были подвергнуты пост-трансляционным модификациям. Они были конъюгированы с линейными полипропиламинами. Было показано, что ключевую роль в захвате и преципитации ионов кремния играют именно положительно заряженные аминогруппы. Ещё один класс белков, способствующих биоминерализации в диатомеях – фрустулины. Эти кальцийсвязывающие гликопротеиды участвуют в формировании силифицированной клеточной стенки диатомовых водорослей. (Kröger et al., 1994, 1996, 1997). Всего известно 5 разновидностей фрустулинов, которые существенно различаются по молекулярной массе: α -фрустулин (75 кДа), β -фрустулин (105 кДа), γ -фрустулин (200 кДа), δ -фрустулин (35 кДа) и ϵ -фрустулин (140 кДа) (Scala and Bowler, 2001).

Плевралины – белки, локализованные на внутренней стороне эпитеки диатомовых водорослей (Kröger et al., 1997, 2000, 2001 Wenzler et al., 2001). Для плевралинов характерен пролин-богатый участок, как правило включающий в себя 87-89 аминокислот.

Ещё одна группа белков, косвенно способствующая биоминерализации и, в частности, биосилификации – транспортеры ионов кремния (Hildebrand et al., 1997, 1998). Открыто и изучено множество белков, способных захватывать и переносить ионы кремния (Yamaji and Ma, 2007). Основная часть этих белков была обнаружена в диатомовых водорослях, а некоторые из форм белков – в

покрытосеменных растениях, таких как ячмень, кукуруза и рис (Ma et al., 2004). Типичными представителями кремний-переносящих белков являются белки SIT1, выделенные из диатомовой водоросли *Cylindrotheca fusiformis*, и аквапорин NIP2, выделенный из риса обыкновенного *Oryza sativa*. Первый относится к семейству характерному только для разных видов диатомовых водорослей, второй – к семейству аквапоринов, которые входят в суперсемейство основных внутренних белков MIP.

К отдельной группе белков, способных к биоминерализации можно отнести специфическую группу белков - магнитосомные белки. Впервые они были выделены из бактерий, способных к накоплению соединений железа. В прокариотической клетке магнитосомные белки осуществляют синтез наноструктур, состоящих из оксидов и сульфидов железа от 10 до 200 нм, обладающих парамагнитными свойствами (FeO , Fe_2O_3 , Fe_3O_4 , Fe_3S_4).

Частицы магнетита накапливаются в специализированных мембранных органоидах – магнитосомах, открытых в 1975 году (Blakemore, 1975). Происхождение магнитосом до сих пор остаётся открытым вопросом, но, скорее всего, их следует считать эволюционным цитоплазматической мембраны (Schüler, 2008). Известны магнитосомы разнообразной формы. Существует предположение, что, магнитосомы интегрированы в структуру цитоскелета, (Schüler, 2008). В 2007 году группой авторов было показано, что что актин-подобный белок MamK способен к полимеризации соединений железа *in vitro* с образованием волокон (Таока et al., 2007) в которых MamK выполняет роль направляющей для протяжённых цепей магнитосом (Komeili et al., 2006). На сегодняшний день известно около 20 магнитосом-специфических белков, участвующих в формировании частиц магнетита и транспорте железа (Grünberg et al., 2004; Schüler, 2008). Кроме того, в моллюсках и одноклеточных водорослях рода *Coccolithophorids*, также были обнаружены кристаллические структуры (Голубев, 1981). Многими авторами описаны белки, гомологичные MamK (Young et al., 1999; Bäuerlein, 2003; Gotliv et al., 2003; Grünberg et al., 2004; Henriksen et al., 2004).

Ещё одна группа ферментов участвующая в процессах биосилификации и названная силиказы, была обнаружена у губок. Силиказы это ферменты, осуществляют деполимеризацию соединений кремния, разрушая ненужные или повреждённые спикулы (Schröder et al., 2003, 2007). Эти белки принадлежат к семейству угольных ангидраз (Müller et al., 2007, Geers and Gros 2000, Fischer et al., 1999), которые в свою очередь принадлежат к обширному классу цинк-зависимых металлоферментов (Sly and Hu, 1995). Механизм работы силиказы губки аналогичен механизму цинк-зависимых ферментов, и происходит по принципу гидролиза эфирной связи (Schröder et al., 2007). Экспериментально было показано, что экспрессия гена силиказы резко возрастает в ответ на искусственное увеличение концентрации кремния (Krasko et al., 2000). Белки, схожие по функциям и принципу действия, были обнаружены в силикатных бактериях. Эти белки с ферментативной активностью, ответственны за разрушение связей Si–O в кристаллических решетках глинистых минералов, и Si–C связей в кремнийорганических соединениях (Самсонова, 2005). Сравнение нуклеотидных последовательностей генов силиказы губки и угольной ангидразы человека II показывает, что существует значительное совпадение некоторых мотивов (Schröder et al., 2003, 2007), что говорит о высокой консервативности этих белков.

Процессы биоминерализации и биосилификации представляют большой интерес для потенциального применения в промышленности. Особенно перспективны для дальнейшего изучения процессы биоминерализации у губок, обеспечивающие образование спикул. В отличие от диатомовых водорослей, губки способны формировать кремниевые макроскопические структуры с необычными физико-химическими свойствами.

1.2. Губки и спикулы

Губки – одни из древнейших многоклеточных водных животных, с невыраженными органами и тканями, имеющие форму мешка или глубокого бокала. Почти все губки имеют сложный минеральный (CaCO_3 , SiO_2) или органический скелет. Губки были первыми организмами, размер тела которых превысил 5 мм. Исследование ископаемых губок показало, что уже 530 миллионов лет назад губки имели внутренний скелет для поддержания формы тела (Müller et al., 2012). Опорные структуры, формируемые стеклянными и роговыми губками, известны давно и были названы спикулами. Спикулы могут иметь разные размеры и представляют собой структуры правильной геометрической формы (Догель, 1981) (Рис. 1).

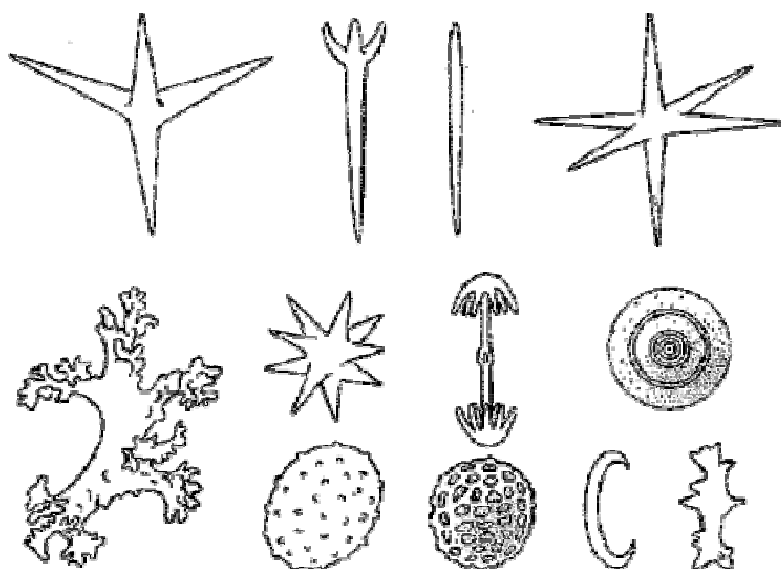


Рис. 1. Различные формы спикул (Догель 1981).

По современной классификации (Reiswig, 2002) тип *Spongia* включает пять классов: *Archaeocyatha*, *Demospongia*, *Stromatoporoidea*, *Calcarea*, *Hexactinellida*.

При изучении губок Thibaud с коллегами (Thibaud et al., 2004) установил, что некоторые из спикул морских губок представляют собой кремниевые стержни, несколько миллиметров в диаметре и длиной до трех метров. Кроме кремния и кислорода спикулы содержат множество химических элементов - Al, Ca, Cl, Cu,

Fe, K, Na, S, и Zn, которые могут влиять на физические свойства спикул. Спикулы могут составлять до 75% массы животного (Schröder et al., 2008). Они состоят из концентрических слоев кремния, окружающих аксиальный филамент. Каждый из слоев в толщину от 1 до 20 нм (Рис. 2).

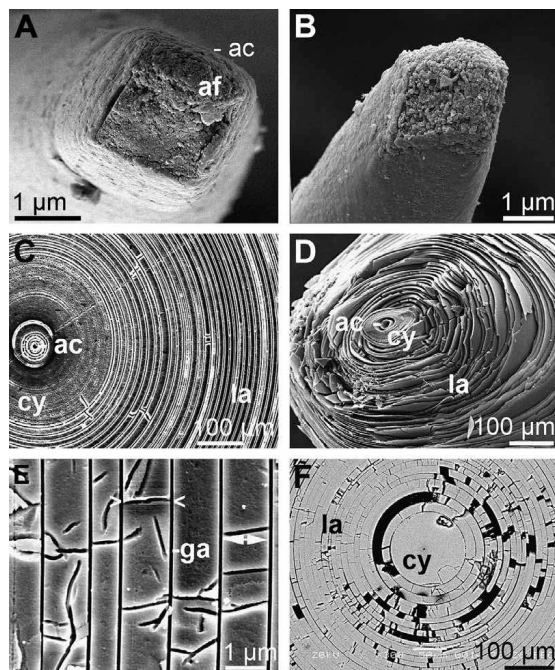


Рис. 2. Строение и ультраструктура спикул.

Ac-аксиальный канал, ga-промежутки между слоями кремния, af-аксиальный филамент, la-слои кремния, cy-аксиальный цилиндр (Müller et al., 2007).

На первых стадиях образования спикул, аксиальный филамент окружен специальными клетками - склероцитами, способными к отложению кремния (Weaver et al., 2003). Кремниевая кислота в виде иона SiO_3^{2+} , необходимая для получения кремния, поглощается склероцитами из внешней среды и, через цитоплазму, доставляется к поверхности аксиального филамента, где полимеризуется силикатеином. Поскольку концентрация кремниевой кислоты в морской воде гораздо ниже, чем в клетках, транспорт кремния является активным и требует затраты энергии. Переносчик кремниевой кислоты – молекула $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$. Принцип действия переносчика представлен на Рисунке 3.

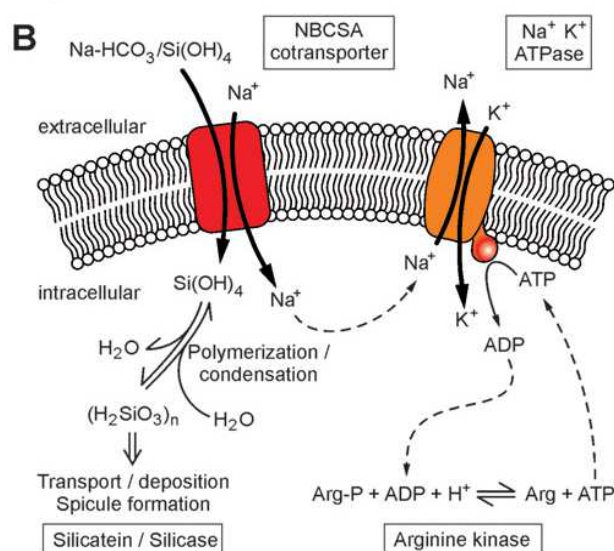


Рис. 3. Схематическое изображение транспорта кремния в клетках губок с участием Na⁺ в составе Na⁺/HCO₃⁻

Натрий по градиенту концентрации вместе с молекулой-переносчиком заходит в клетку, молекула кремниевой кислоты отщепляется, а натрий с помощью Na⁺K⁺АТФазы покидает клетку. При этом расходуется энергия АТФ (Schröder et al., 2008). Сборка самого аксиального филамента происходит внутри клетки, после чего он выделяется в межклеточное пространство. (Müller et al., 1999). Это подтверждается как современными исследованиями, так и анализом публикаций начала XX века. (Müller et al., 2012). В работе Калюзной (Kaluzhnaya et al., 2005) есть свидетельства, что аксиальный филамент лежит в аксиальном канале, диаметр которого около 4 нм. Однако есть данные о том, что спикулы имеют несколько другое строение – белок, полимеризующий кремний, чередуется со слоями уже отложенного кремния (Weaver and Morse, 2003). В 2013 году были получены данные, что антитела на силикатеин реагируют не только в центральной части спикулы, но и на её поверхности. (Müller et al., 2013) В 2010 году Natalio с коллегами (Natalio et al., 2010), при помощи электрон-дифракционной томографии показали, что на начальных этапах спикула роговых губок формируется, как кристаллическая структура внутри аксиального филамента. Было выяснено, что этот предшественник зрелой спикулы имеет слоистую структуру. Было высказано ещё одно

предположение о том, что необычная гибкость спикул не может быть объяснена только уникальной структурой кремниевых отложений. После серии экспериментов было обнаружено, что в спикулах стеклянных губок присутствует коллаген, придающий им гибкость (Ehrlich et al., 2010).

С физической точки зрения, спикулы губок обладают некоторыми интересными свойствами – они отличаются гибкостью и производят впечатление неразрушимого стекла, выдерживая скручивание до законченной окружности при длине около метра (Levi et al., 1989).

Кроме того, были обнаружены интересные оптические свойства спикул. Сотрудники Института автоматики и процессов управления ДВО РАН показали, что спикулы губок морских губок *Pheronema aspergillum* и *Hyalonema sieboldy* обладают выраженными свойствами фотонных кристаллов. Выявлен значительный рост интенсивности флуоресценции в длинноволновой области, с максимумом на длине волны 770 нм, насыщение и аномально большие времена флуоресценции, при возбуждении базальных спикул импульсами второй гармоники Nd:YAG - лазера (Кульчин и др., 2007).

Есть экспериментально подтверждённые данные о новом, ранее не известном свойстве спикул – они могут играть роль проводника фотонов, генерируемых люциферазой и улавливаемых цитохромом (Müller et al., 2013). Таким образом, можно сделать предположение, что роль спикул в губках – не только опорная, но и трофическая.

1.3. Силикатеины и катепсины

Установлено, что белком аксиального филамента, формирующим биосиликаты спикул губок, является силикатеин (Сао et al., 2007). Эти белки близки к белкам семейства протеаз — катепсинам, и проявляют протеазную активность (Shimizu et al., 2007). Катепсины – белки присутствующие у многих организмов и локализованные в лизосомах, необходимы для внутриклеточного пищеварения (Биологический..., 1989). Силикатеины отличаются от катепсинов лишь несколькими аминокислотами в каталитическом домене. Они формируются как профермент массой 36 кДа, затем они проходят посттрансляционную модификацию, в результате чего от профермента отщепляются сигнальный участок и пропептид. В итоге формируется зрелый фермент массой 23 кДа, в каталитическом домене которого располагаются 3 аминокислоты: серин, гистидин и аспарагин (Schröder et al., 2007) (Рис. 4).

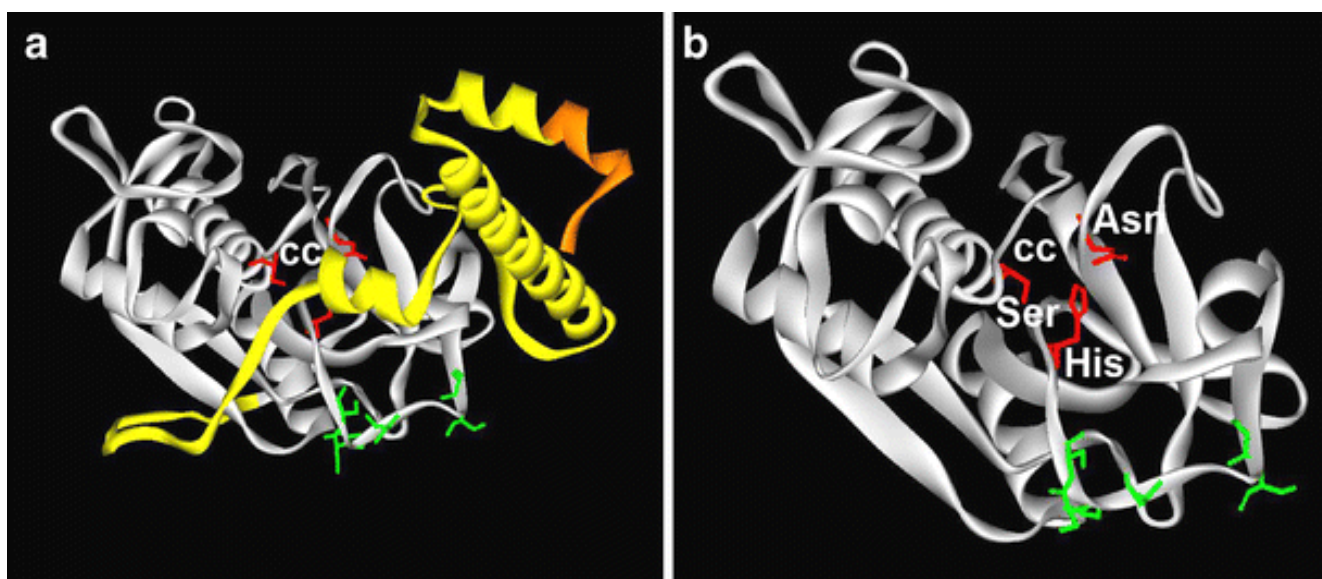


Рис. 4. Модель зрелого (b) и незрелого (a) силикатеина (Schröder et al., 2007).

Обозначены аминокислоты серин (Ser), гистидин (His), аспарагин (Asn). Так же указаны места расположения на белке сигнального участка и пропептида (Schröder et al., 2007).

Отличительной особенностью силикатеинов является аминокислота серин в каталитическом домене (цистеин у катепсинов) и наличие серин-богатого участка (Schröder et al., 2007) (Рис. 5).

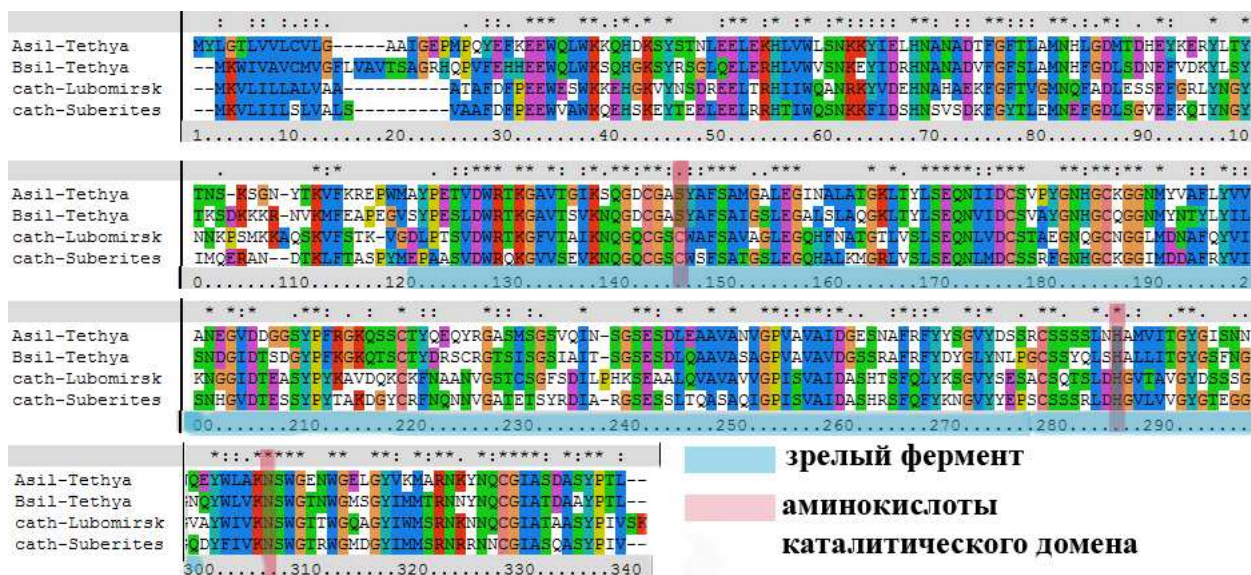


Рис. 5. Выровненные аминокислотные последовательности α - и β -силикатеинов *Tethya aurantia* и катепсинов *Suberites domuncula* и *Lubomirskia baicalensis*.

Обозначены аминокислоты, входящие в каталитический домен: серин (S) в силикатеинах и цистеин (C) в катепсинах, гистидин (H), аспарагин (N). Так же указаны места расположения на белке сигнального участка и пропептида (по: Schröder et al., 2007).

В 2006 году Шрёдер с коллегами (Schröder et al., 2006) показали, что кроме силикатеина в процессе образования спикул принимает участие ещё один белок – галектин. Он существенно ускоряет реакцию преципитации кремния *in vitro*. Было показано, что этот белок, играет важную роль в построении спикулы, и располагается в аксиальном филаменте. Галектин необходим для правильного построения спикулы в губках, и для формирования упорядоченных структур *in vitro*.

В 2013 году Müller исследовал регуляцию активности силикатеина. Было показано, что в активном состоянии силикатеин представляет собой пентамер. На примере силикатеинов морской роговой губки *Suberites domuncula* было

показано, что четыре молекулы силикатеина А формируют тетрамер, в центр которого встраивается молекулы силикатеина-В. После сборки силикатеин-А оказывается на поверхности, а силикатеин-В остаётся скрытым в центре пентамера. Сама же активность пентамеров силикатеина регулируется собственным пропептидом, который отщепляется от белка при его созревании. Как было показано в ходе экспериментов, пропептид ингибирует формирование пентамеров и препятствует образованию активного комплекса. Подобный принцип саморегуляции характерен для протеолитических ферментов, что ещё раз доказывает родственность силикатеинов и протеаз (Müller et al., 2013).

Также известно, что для образования спикул, кроме силикатеина необходимы ещё две формы вспомогательного белка силаффина – силаффин 1 и силаффин 2. Силаффин 1 связывается с силикатеином и способствует формированию стабильных филаментов, а силаффин 2 необходим для сборки силикатеина в процессе роста спикулы.

В 2010 году (Müller et al., 2010) описывает, что основываясь на современных данных, нельзя говорить о полном генетически-запрограммированном пути синтеза спикул в губках. Большая роль отводится процессам самоорганизации и эпигенетической регуляции.

Гены силикатеина обнаружены не только в роговых и стеклянных губках, но также и в бесспикульных и пресноводных губках (Калюжная, 2007, Belikov et al., 2005). Ранее в лаборатории биоинженерии был произведен поиск генов силикатеинов в кДНК бесспикульной губки *Acanthodendrilla sp.* Были обнаружены две формы силикатеинов — α -силикатеин (гомология с α -силикатеином *Tethya aurantia* составляет 67%) и β -силикатеин (гомология с β -силикатеином *Tethya aurantia* составляет 70%). На основе выравнивания аминокислотных последовательностей этих двух силикатеинов *Acanthodendrilla sp.* и известных силикатеинов и катепсинов других губок было построено филогенетическое дерево, из которого видно, что α -силикатеин *Acanthodendrilla sp.* типичен для группы α -силикатеинов, а β -силикатеин *Acanthodendrilla* типичен для группы β -силикатеинов (Рис. 6).

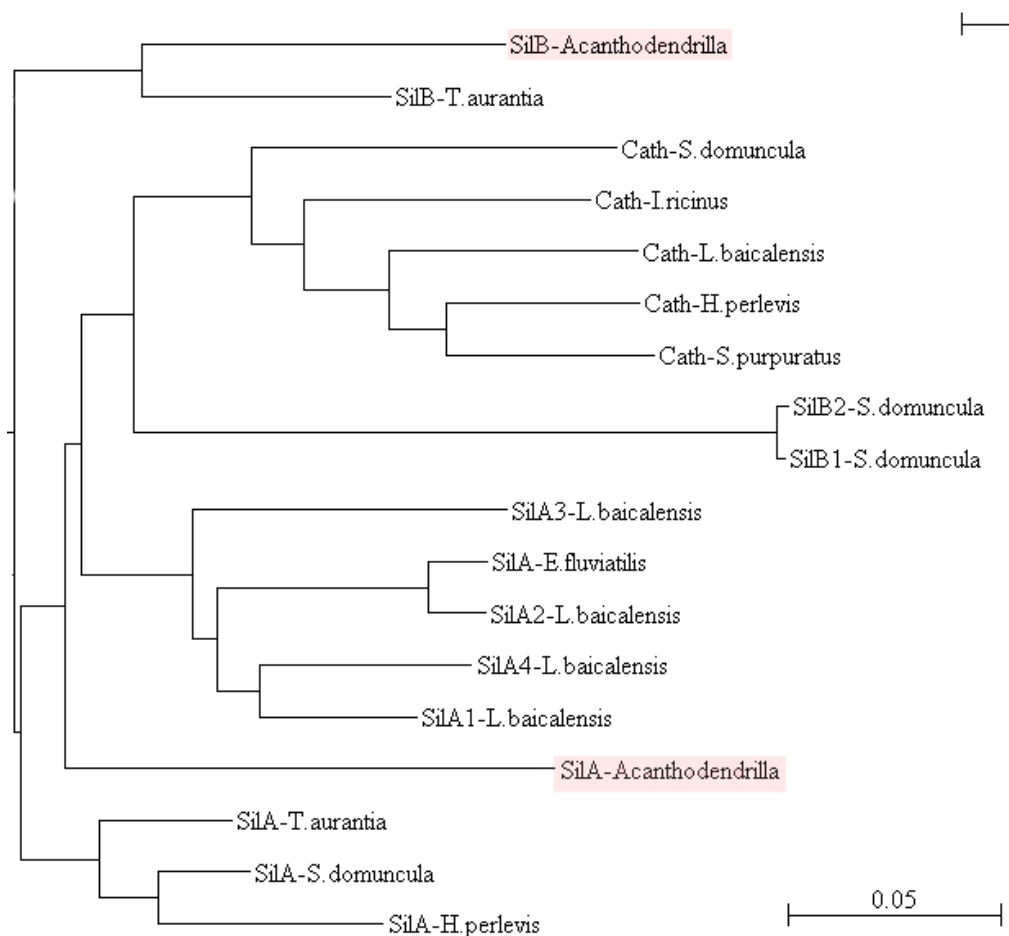


Рис. 6. Филогенетическое дерево, полученное методом объединения ближайших соседей на основе аминокислотных последовательностей силикатеинов/катепсинов губок с силикатеинами *Acanthodendrilla sp.*

Несмотря на то, что спикулы стеклянных губок являются самым популярным объектом для изучения бека силикатеина, до недавнего времени не было обнаружено гена, кодирующего этот белок у стеклянных губок. В лаборатории биоинженерии были обнаружены по две формы катепсинов и одну форму силикатеина губки *Aulosaccus schulzei* (Таблица 1)

Таблица 1. Количество проанализированных клонов силикатеинов/катепсина *Aulosaccus schulzei*

<i>Aulosaccus schulzei</i> Количество клонов (%)	<i>Bathydorus sp.</i> Количество клонов (%)	<i>Pheronema raphanus</i> Количество клонов (%)
Катепсины <i>AuCath1</i> 132 (65.7) <i>AuCath2</i> 3 (1.5) Катепсин-подобные последовательности 63 (31.3)	Катепсины <i>BoCath1</i> 90 (52) <i>BoCath2</i> 6 (3.5) Катепсин-подобные последовательности 77 (44.5)	Катепсины <i>PhrCath1</i> 59 (60) <i>PhrCath2</i> 39 (40)
Силикатеин <i>AuSil-Hexa</i> 3 (1.5)	Силикатеин Не обнаружено	Силикатеин Не обнаружено
Всего 201 (100)	Всего 173 (100)	Всего 98 (100)

Строение белка силикатеина стеклянной губки *Aulosaccus schulzei* несколько отличалось от строения силикатеинов роговых губок. Было показано, что серин активного центра силикатеина стеклянной губки *Aulosaccus schulzei* заменен на цистеин и имеется инсерция двух аминокислот непосредственно перед активным центром (Рис. 7). Не смотря на замену специфической для силикатеинов аминокислоты, данный белок относится к группе силикатеинов (Рис. 8).

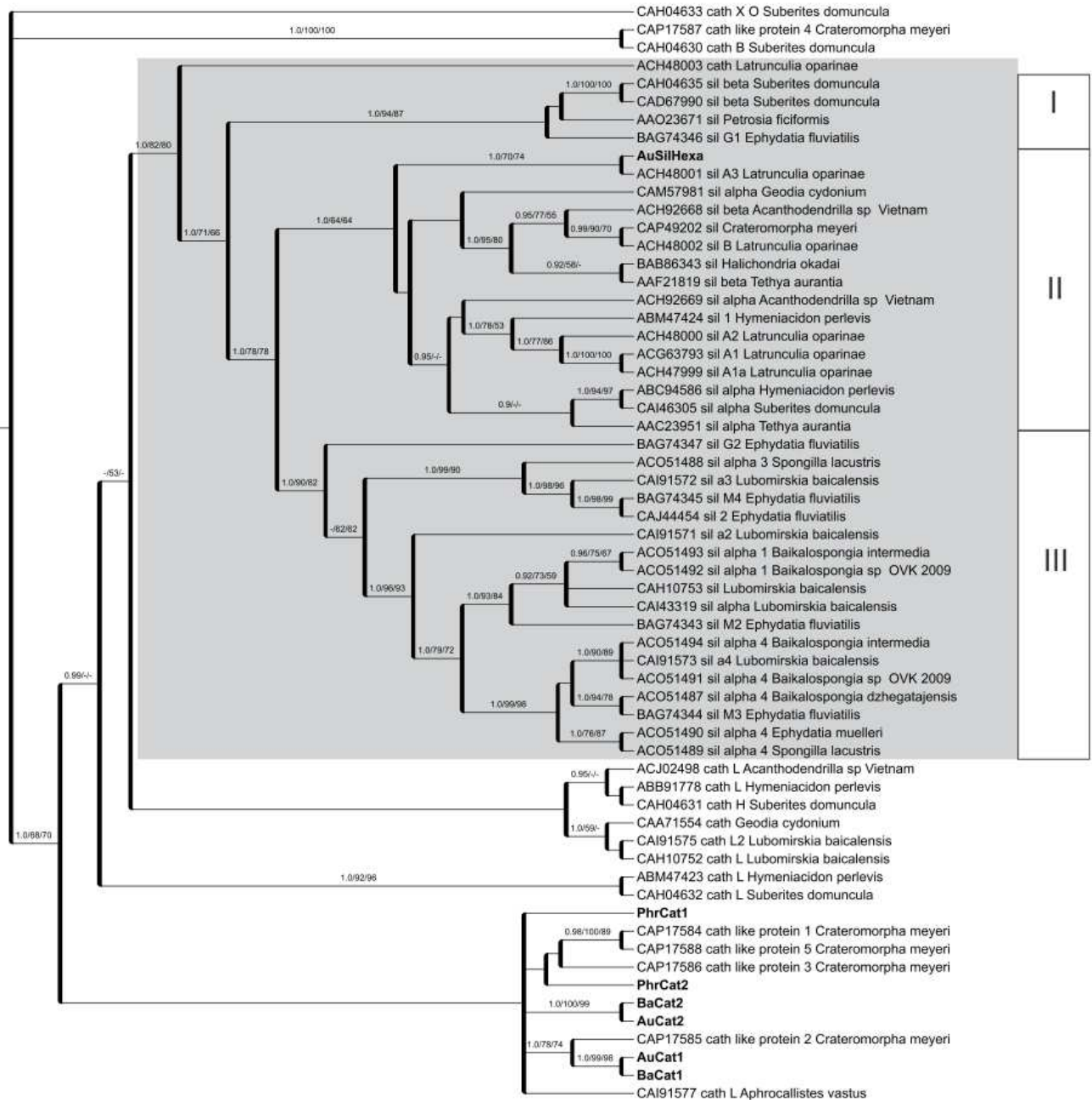


Рис. 8. Филогенетическое дерево, полученное методом объединения ближайших соседей на основе аминокислотных последовательностей силикатеинов/катепсинов губок с силикатеинами *Aulosaccus schulzei*.

В предыдущих исследованиях нами было проанализировано 62 клон бактерий, полученных с вырожденными праймерами к силикатеинам и катепсинам D1 и R1. Размер определенных последовательностей без учета праймеров составил 490 п.н. (Рис. 9, а) Секвенировав эти клоны, были обнаружены 3 формы α -силикатеинов (*LoSilA1*, *LoSilA2* и *LoSilA3*), 1 форму β -силикатеина (*LoSilB*) и 1 форму L-катепсина (*LoCathL*). С помощью метода быстрого определения концов кДНК (RACE) были определены полные нуклеотидные последовательности обнаруженных генов силикатеинов и катепсина (Рис. 9, б, в).

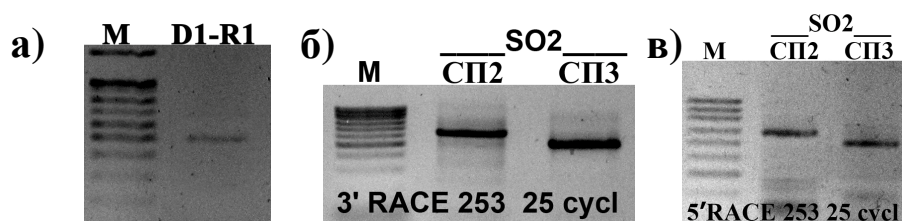


Рис. 9. Гель-электрофорез продукта амплификации генов силикатеинов/катепсина (а) *Latrunculia oparinae* с вырожденными праймерами D-R1; продуктов 3'RACE (б) и 5'RACE (в) гена силикатеина *Latrunculia oparini LoSilA1* со специфическими праймерами (СП) и смесью праймеров "step-out" 2; 25 циклов. М — синтетический маркер молекулярных весов ДНК.

Анализ аминокислотных последовательностей силикатеинов и L-катепсина, соответствующих зрелым белкам, показал, что аминокислотные последовательности двух α -силикатеинов *LoSilA1* и *LoSilA2* и β -силикатеина *LoSilB* являются типичными для этих групп силикатеинов. В аминокислотной последовательности силикатеина *LoSilA3* была обнаружена инсерция в 2 а.о. в непосредственной близости от каталитического центра — серина.

Аминокислотная последовательность L-катепсина *LoCathL* не позволяет отнести данный продукт строго к катепсинам (Рис. 10) — окружение

каталитического центра LoCathL цистеина имеет сходство с силикатеинами (Рис. 11). Более того, при сравнении аминокислотной последовательности LoCathL с последовательностями известных силикатеинов и катепсинов, последовательность этого белка имеет более высокую гомологию с силикатеинами, чем с катепсинами губок: *silicatein-G2 Ephydatia fluviatilis* — 56%, *silicatein-M4 Ephydatia fluviatilis* — 57% и *cathepsin L Suberites domuncula* — 51%. Но наличие в каталитическом центре цистеина определяет принадлежность этого белка к групп катепсинов.

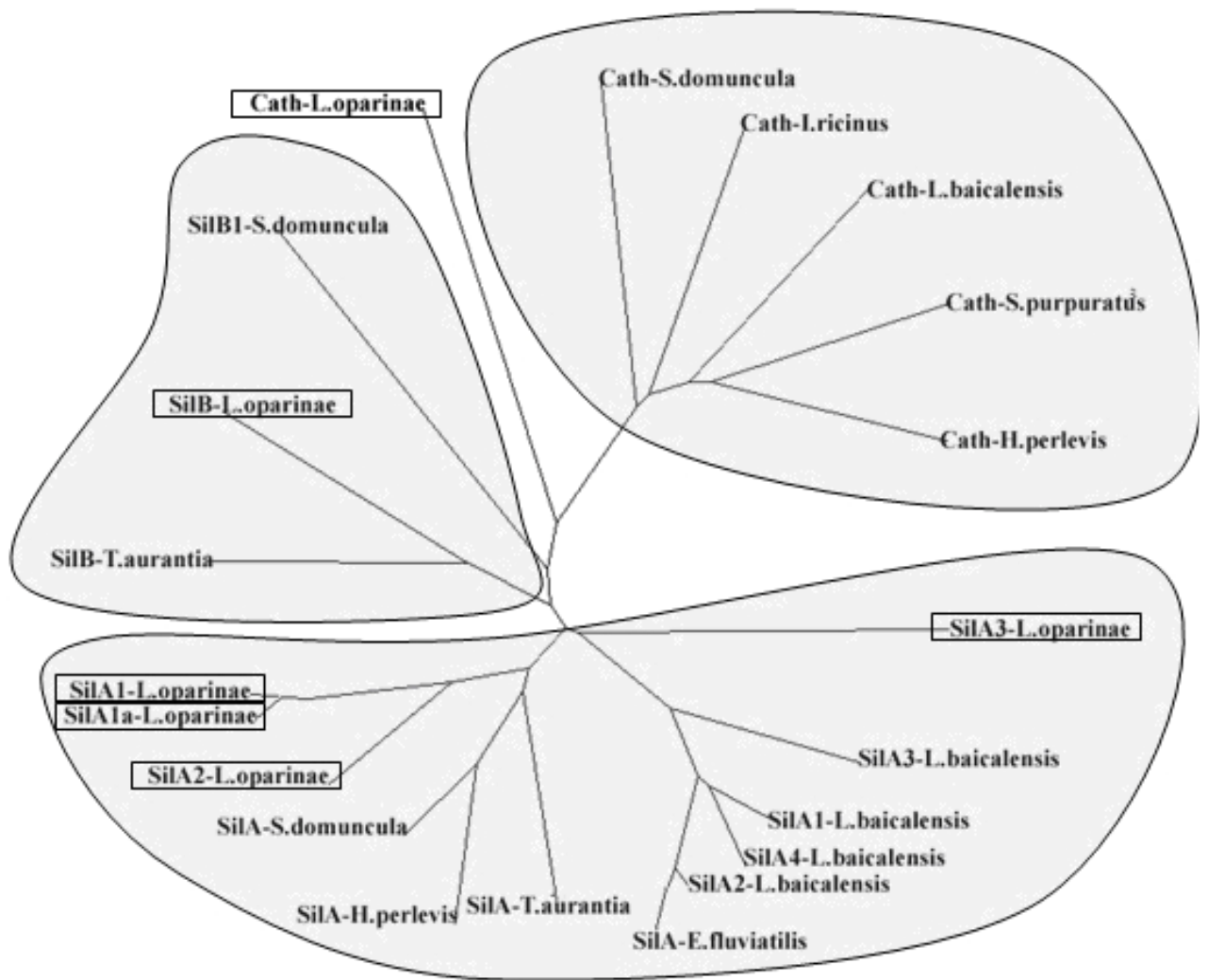


Рис. 10. Формы генов силикатеинов/катепсина *Latrunculia oparinae*: а) — Филогенетическое дерево, полученное методом объединения ближайших соседей на основе аминокислотных последовательностей силикатеинов/катепсинов губок с силикатеинами/катепсином *Latrunculia oparinae*

Майкл Фэйрхэд с коллегами (Fairhead et al., 2008) создал химерный белок на основе катепсина человека, где каталитический домен был заменен на каталитический домен силикатеина- α . Этот белок был способен полимеризовать предшественники оксида кремния, подобно силикатеину губок, однако функционировал медленнее. Обнаружено несколько изоформ силикатеинов – α , β , γ . Каждый из видов губок синтезирует как минимум два типа силикатеинов (Müller et al., 2007). Кроме того, было показано присутствие в геноме и экспрессия двух форм силикатеинов (α и β) у бесспикульной губки *Acanthodendrilla sp* (Шкрыль и др., 2008). Существуют различия в строении силикатеинов морских и пресноводных губок. Большинство известных в настоящий момент белков силикатеинов принадлежат морским губкам класса Demospongiae. Это сравнительно небольшие белки (в среднем 330 а.о.) массой 36 кДа (Schröder et al., 2007). В 2012 году группа авторов (Mi-Ran Ki et al., 2012) показала, что катепсиноподобный белок с замещением в каталитическом центре также способен к полимеризации кремния. В работе была показана способность химерного белка вызывать образование аморфных соединения кремния.

Клонирование силикатеинов из различных видов губок с целью изучения свойств этих белков представляет огромный интерес, как с точки зрения фундаментальной науки, так и для практического использования (Natalio et al., 2009). Большая часть работ в этой области выполнена на представителях класса Demospongiae, для которых разработаны условия культивирования регенерирующих тканей (Cao et al., 2007).

Ген силикатеина был клонирован впервые из морской губки *Tethya aurantia* (Shimizu et al., 1998). В дальнейшем было показано, что этот белок, даже вне организма губки, способен конденсировать молекулы предшественника – тетраэтоксисилана (ТЕОС), с образованием кремниевых наноструктур определенной формы в обычных условиях окружающей среды (Cha et al., 1999). Позже установили, что силикатеины разных видов губок способны к поликонденсации TiO_2 и ZrO_2 (Tahir et al., 2005). Примечательно,

что рекомбинантные силикатеины, сшитые с гистидиновым аминокислотным хвостом (Tahir et al., 2004) или с мембранным белком бактерий (Curnow et al., 2005), сохраняют свои свойства к поликонденсации предшественников, причем в этих работах использовали не весь белок, а лишь его активный домен: 113 а.о. — 330 а.о.

Однако, есть предположение, что силикатеин является одной из форм кремний-разрушающих ферментов - силиказ, а основная роль в полимеризации кремния отводится коллагену, который действует как матрица для направленного отложения кремния (Ehrlich et al., 2010).

Эксперименты *in vitro* свидетельствуют о том, что силикатеин способен к полимеризации оксида кремния. Кроме того, многие авторы считают, что благодаря своим уникальным свойствам, силикатеины морских губок могут быть использованы для модификации поверхности биоматериалов, протезирования костной ткани, тканевой инженерии человека, облицовки металлических имплантатов, для инкапсулирования лекарств или гормонов с контролируемым высвобождением этих молекул, а также для синтеза наноструктур – нановолокон, нанотрубок и нанокристаллов (Schröder et al., 2007). Всем этим соединениям уже найдено соответствующее применение в промышленности.

В 2012 году Mi-Ran Ki (Mi et al., 2012) с коллегами установили, что силикатеин теряет активность при контакте с твёрдыми поверхностями, например со стеклом или пластиком. Для решения этой проблемы исследователи использовали рекомбинантный силикатеин, слитый с GST меткой. Это предотвращало прямой контакт силикатеина с поверхностью стекла и сделало возможным использование силикатеина для иммобилизации белков, используя технологию «кремниевой сети».

1.4. Экспрессионные системы

Для исследования рекомбинантного белка необходимо получить его в достаточном количестве. Один из наиболее распространенных современных методов – экспрессия в различных организмах.

Растения на протяжении веков были источником важнейших молекул для человека, однако только в двадцатом веке появилась возможность использовать растения как производителей особых, гетерологичных белков. В настоящее время метод экспрессии рекомбинантных протеинов в растениях получил широкое распространение. Это связано с простотой культивирования и выделения белков из культур клеток растений. Метод имеет ряд преимуществ, перед получением рекомбинантных белков с помощью бактерий или дрожжей. Посттрансляционные модификации, происходящие в растениях, позволяют трансформированным клеткам синтезировать функциональные чужеродные белки. Это было подтверждено экспериментами по синтезу гемоглобина и секреторного иммуноглобулина (IgA) человека (Adachi et al., 1996). Культуры клеток растений имеют преимущество и перед культурами клеток млекопитающих и насекомых. Растительные клетки легче культивировать, и они не требуют сложных условий и дорогостоящих питательных сред (Plasson et al., 2009).

Первый, пригодный к медицинскому использованию белок – фактор роста человека, был экспрессирован в трансгенном растении табака в 1986 году. После этого множество других белков человека было экспрессировано в самых разнообразных двудольных и однодольных растениях. В 1989 году в растении табака был впервые экспрессирован антитела, что доказало способность клеток растений к успешной сборке сложных гликопротеидов, состоящих из нескольких субъединиц. Структурная аутентичность экспрессированных белков была подтверждена в 1992 году, когда растение было использовано, чтобы получить экспериментальную вакцину – поверхностный антиген вируса гепатита В. В дальнейших исследованиях сообщалось, что этот антиген,

синтезированный клетками трансгенного табака, вызывал иммунный ответ у мышей, что свидетельствует о его высокой степени схожести с нативным антигеном.

В клеточных культурах табака были экспрессированы: GFP (Pang et al., 1996), интерлейкины 2 и 4 человека (Plasson et al., 2009), поверхностный антиген гепатита В (Kumar et al., 2003., из Plasson et al., 2009), в 2007 году Lienard с коллегами добились экспрессии антигенов пылевых клещей в суспензионной культуре клеток табака (Lienard et al., 2007), в 2002 Merle (Merle et al., 2002) была получена культура клеток табака, экспрессирующая коллаген человека.

В настоящее время список белков, экспрессируемых трансгенными растениями включает как вещества необходимые для медицины, так и промышленности. При этом рекомбинантные белки сочетают в себе дешевизну и высокий выход продукта бактериальных клеток, а также надёжность и качество, свойственные культурам клеток животных. Многие фармацевтические препараты, изначально полученные из млекопитающих, сейчас экспрессируются в растениях. (Julian et al., 2004)

Для трансформации растений одним из наиболее широко распространённых методов переноса генов является агробактериальная трансформация.

Агробактериальная трансформация растений, нашедшая широкое применение в биотехнологии, является природным механизмом горизонтального переноса генов, при котором организм-донор (агробактерии) осуществляет метаболическую колонизацию растения (Тинланд, 2000).

Agrobacterium tumefaciens и *A. rhizogenes* представляют собой почвенные бактерии, которые вызывают заболевания двудольных растений, называемые соответственно "корончатым галлом" (crown gall) и "бородатым корнем" (hairy roots). Тот факт, что возбудителем "корончатого галла" является *A. tumefaciens* впервые показал еще в 1907 году Э. Смит и К. Таунсенд из министерства сельского хозяйства США (Хилтон, 1983). Как индукция опухоли, так и синтез опинов обусловлены бактериальными мегаплазмидами — Ti-плазмидами (от

англ. tumor inducing) в случае *A. tumefaciens* и Ri — плазмидами (от англ. root inducing) в случае *A. rhizogenes* (Valentine et al., 2003). В растительную ДНК может включаться одна или несколько копий T-ДНК. Место встраивания T-ДНК в растительную ДНК, по-видимому, случайно.

Контакт агробактерий с соединениями, выделяющимися из поврежденной ткани растения, приводит к транскрипции *vir*-области плазмиды. Эти области идентичны в Ti и Ri плазмидах (Sheng and Citovsky, 1996). Одно из химических веществ, высокоактивных в этом отношении, было идентифицировано как ацетосирингон. Считается, что при действии экссудата поврежденных растительных клеток или чистого ацетосирингона на агробактерии продукт гена *virA* (возможно, ассоциированный с мембраной) взаимодействует с ацетосирингоном, и передает этот внеклеточный сигнал внутрь клетки, что приводит к активации продукта гена *VirG*. Измененный белок *VirG* затем активирует остальные гены вирулентности (*VirB*, *C*, *D* и *E*), а так же повышает уровень транскрипции самого локуса *VirG* (Gelvin, 2000).

С помощью пока неизвестного механизма, который, возможно, аналогичен бактериальной конъюгации, T-ДНК переносится в клетку растения и стабильно встраивается в ядерную ДНК (Tinland and Hohn, 1995). Интересно отметить, что описанный механизм горизонтального переноса генетической информации является, по-видимому, универсальным. Так, показано, что агробактерии способны трансформировать клетки дрожжей (Piers et al., 1996), базидиальные грибы (Mikosch et al., 2001), эмбрионы морских ежей (Bulgakov et al., 2006) и даже клетки человека на примере опухолевой линии He-La (Kunik et al., 2001). Возможность такой трансформации в настоящее время показана только в экспериментальных условиях *in vitro*, однако известно, что в естественной среде вирулентные штаммы *Agrobacterium sp.* способны передавать свои плазмиды невирулентным штаммам агробактерий или бактериям других видов, за счет чего последние приобретают способность к трансформации (Broothaerts et al., 2005).

Для визуализации трансгенных белков в клетке используют различные технологии, одна из которых – слияние целевого белка с флуоресцентными белками. В 1962 г. О. Шимомура, Ф. Джонсон и Ю. Сайга (Shimomura et al., 2010) отметили разницу между цветом биолюминесценции живой эквореи и выделенного из нее комплекса светящегося вещества с экворином. Для живой медузы характерно зеленое свечение с максимумом 508 нм. А чистый комплекс, реагируя с ионами кальция, испускает синий свет с максимумом 465 нм. В светящихся энтодермальных клетках эквореи присутствует, кроме экворина, еще и другой – зеленый флуоресцирующий белок. При облучении его синим или ближним ультрафиолетовым светом (в спектре возбуждения максимум 395 нм, второй пик – 475 нм), он излучает зеленый свет с максимумом 508 нм. Была установлена аминокислотная последовательность GFP, молекулярная масса (28 кДа) и размер (238 а.о.). Энергия возбуждения экворина отчасти мигрирует на GFP безызлучательно благодаря непосредственному контакту с двумя молекулами GFP существующими в виде димера при одной молекуле экворина.

В 1992 г ген зеленого флуоресцирующего белка был клонирован и внедрен в геном кишечной палочки *E. coli*. GFP, в отличие от всех до того известных окрашенных и флуоресцирующих белков (хромопротеидов: фикобиллинов, фикоэритринов, каротенопротеинов), для обретения оптических свойств не нуждается в какой-либо внешней хромофорной группе или в солях тяжелых металлов. Извне для появления яркой зеленой флуоресценции требуется только молекулярный кислород. Детектируемая флуоресценция появляется через полтора часа после синтеза, а достигает максимума только через несколько часов. При созревании в пептидной цепи белка образуется р-гидроксibenзилиденимидазолиновое кольцо из трех аминокислотных остатков, следующих друг за другом: серина-65, тирозина-66 и глицина-67, которое служит хромофорной группой.

В ходе такой реакции тирозин-66 автокаталитически дегидрируется и окисляется молекулярным кислородом. Не вошедшая в состав хромофора часть

пептидной цепи белка скручивается в подобие бочки или клетки, внутри которой помещается хромофор. Стенки “бочки” образованы 11 β -складками, а крышка, дно и связи с хромофором - α -спиральными участками белковой молекулы (Рис. 12).

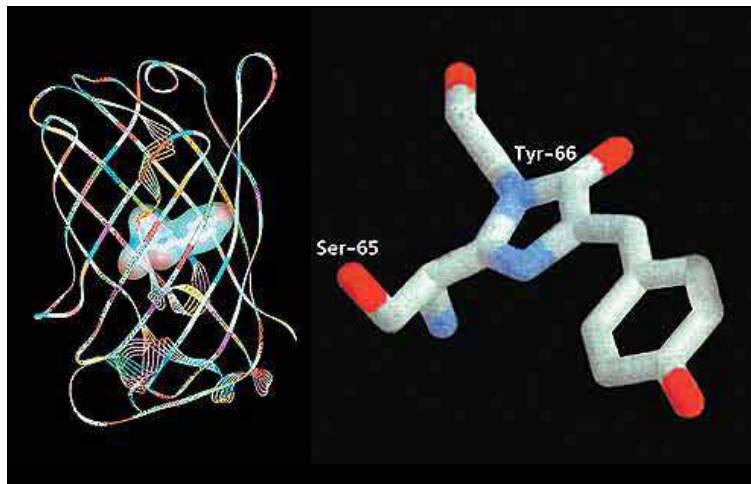


Рис. 12. Схема строения молекулы зеленого флуоресцирующего белка (справа) и ее хромофорной группы (по Лабас и др, 2003).

Молекула имеет форму бочки, внутри которой заключены аминокислоты серин-65, тирозин-66 и глицин-67, образующие хромофор.

После выделения, и клонирования гена *GFP* в кишечную палочку, он был внедрён в геномы кукурузы и клетки млекопитающих. При добавлении к таким клеточным культурам восстановленного субстрата целентеразина, проходящего благодаря своей гидрофобности сквозь клеточные мембраны, наблюдалось свечение, отражающее изменение концентрации цитоплазматического кальция. В качестве генетического маркера первым начали применять ген *GFP* из экворей, соединяя его с генами других белков или вводя его матричную РНК во всевозможные клетки. Таким способом можно сделать видимыми места и скорость экспрессии любых белков, проследить рост клеточных клонов (Лабас и др., 2003).

Для того чтобы трансформированный организм можно было использовать в качестве источника желаемых белков, необходимо добиться стабильной экспрессии генов при длительном культивировании, безопасности продукта, а также высокого выхода продукта (Stephen and Streatfield 2007). Одним из

подходов для выделения рекомбинантных белков из трансгенных организмов является добавление последовательности из нескольких аминокислот, так называемый «тэг». Впервые модификация несколькими повторяющимися аминокислотами была применена в 1984 году (Sassenfeld and Brewer 1984) и состояла из шести молекул аргинина. Таким способом был модифицирован С-конец мембранного белка бактерий. В результате чистота выделяемого белка возросла до 95%, а его количество до 44% от общего количества экспрессированного в трансгенной клетке белка. (Bucher et al., 2002). В 2002 году кристаллизовали мальтодекстрин-связывающий белок *Pyrococcus furiosus*. Кристаллы белка были визуальнo неотличимы от нативного, однако существенно отличались по оптическим свойствам. Полиаргининовый тэг был удалён с помощью карбоксипептидазы В. Nagai и Thogerson в 1987 установили, что такая процедура не очень эффективна в виду низкой чистоты продукта, а также наличия нежелательных побочных веществ из-за неспецифичности действия фермента. Кроме этого, модификация аргинином может быть использована для иммобилизации белков на различных субстратах – установили Нок с соавторами (Нок и др. в 1997). Другим распространённым подходом для выделения и очистки химерных белков является использование полигистидинового тэга. Включение в последовательность интересующего белка шести молекул гистидина позволяет эффективно выделять модифицированный белок из сложной смеси при помощи металл-аффинной хроматографии (Porath et al., 1975). Этот метод основан на том, что имидазольное кольцо, входящее в состав молекулы гистидина, вступает в очень сильные взаимодействия с ионами переходных металлов (Ni, Co), иммобилизованных на сефодексе. Таким образом, обеспечивается слипание молекул трансгенного белка с частицами синтетической смолы. Для повышения специфичности такого взаимодействия используют высокие концентрации имидазола, вещества, конкурирующего с гистидином за связи с ионами металла. Метод очистки белков таким способом был впервые описан Nochuli с коллегами в 1987. В 1997–2001 годах было показано, что

расположение гистидина на N- или C-конце белка оказывает существенное влияние на эффективность и чистоту выделения белка. Wu и Filutowicz 1999 предположили, что присоединение тэга может влиять на функциональную активность белков. Однако небольшой размер и слабый заряд гистидиновой метки сводят к минимуму возможное негативное влияние. На сегодняшний день гистидиновый тэг в сочетании с металл-аффинной хроматографией является одним из наиболее распространённых методов очистки белков (Terpe et al., 2003).

При экспрессии белков, несвойственных данному организму возможно возникновение проблем, связанных с наличием в клетках всех организмов протеасом. Эти органеллы отвечают за расщепление всех чужеродных белков, а также за убиквитин-зависимое расщепление белков, экспрессирующихся в клетке (Layfield et al., 2005, Rhonda et al., 2005). Некоторые белки расщепляются сразу после трансляции, а некоторые могут медленно деградировать в процессе их экстракции из тканей организма. На сегодняшний день деградация продуктов экспрессии трансгена представляет наибольшую проблему для экспрессии генов в трансгенных организмах. В настоящее время системы, расщепляющие чужеродные белки в растениях, остаются слабо изученными. Однако можно предположить, что механизм их действия схож с таковым у дрожжей и бактериальных клеток (Michaud et al., 2008).

Другим существенным ограничением для выделения рекомбинантных белков из клеток хозяина является их возможное накопление в тельцах включения – нерастворимой фракции белков. Для решения этой проблемы существуют несколько путей. Наиболее простой вариант – использование для выделения интересующего белка буферных растворов с высокой концентрацией денатурирующих агентов, например мочевины. Однако было показано, (Müller et al., 2012) что высокие концентрации мочевины негативно сказываются на активности силикатеина. Для увеличения растворимости чужеродных белков в цитоплазме были разработаны плазмиды, содержащие специальные гидрофильные последовательности GST тэга (Cabrita et al., 2006).

1.5. Кристаллы кремния

Сложно переоценить роль кремния и его соединений в современном мире. Практически все отрасли промышленности используют кремний.

В вычислительной технике соединения кремния используются как для передачи информации на очень большие дистанции, так и для передачи сигнала на сверхмалые расстояния. С развитием технологий анализа на микрочипах поднимается вопрос о постоянном уменьшении элементов. Для дальнейшего развития этой технологии требуются структуры наномасштаба. Благодаря тому, что соединения кремния проявляют свойства фотонных кристаллов, некоторые прототипы устройств уже были представлены.

Кроме того, было обнаружено, что с уменьшением размера частицы спектр излучения смещается в синюю часть спектра, а интенсивность излучения растёт. Квантовые свойства нанокристаллов оксида кремния придаёт им необычные свойства нелинейной оптической среды. С 2000 по 2015 год количество публикаций, посвященных изучению свойств кристаллов кремния выросло более чем в 5 раз. На сегодняшний день наибольший интерес вызывают следующие структуры, образованные оксидом кремния: нановолокна и планарные кристаллы. Они могут быть использованы для создания для солнечных батарей следующего поколения и для световых ловушек – структур, задерживающих световое излучение.

Было показано, что оксид кремния может формировать кристаллы различной формы. В природе наиболее распространены кристаллы в виде минерала кварца, а также кристобалита и тридимита.

Кварц принадлежит к кристаллам с тригональной сингонии. Кристаллы кварца — шестигранные псевдогексагональные призмы, с одного конца (реже с обоих) увенчанные шести- или трёхгранной пирамидальной головкой, сочетающей грани двух ромбоэдров. Часто по направлению к головке кристалл постепенно сужается. На гранях призмы характерна поперечная штриховка.

Кристобалит – кристаллы, характеризующиеся тетрагонально-трапецоэдрическим видом симметрии. В основном кристобалиты, встречающиеся в природе, являются псевдоморфозами высокотемпературного кристобалита. Для этих кристаллов характерна октаэдрическая, реже кубическая форма.

Тридимит – минерал, который может существовать в шести различных кристаллических формах (Таблица 2), принадлежащих к трём типам симметрии. Наиболее часто встречаются формы: α и β . α -тридимит может переходить в β -форму под действием высокой температуры.

Таблица 2. Формы и типы симметрии тридимита

Название формы	Симметрия
HP (β)	Гексагональная
LHP	Гексагональная
OC (α)	Орторомбическая
OS	Орторомбическая
OP	Орторомбическая
MC	Моноклинная
MX	Моноклинная

1.6. Фитосинтез наночастиц металлов

Возможность образования наночастиц металлов под действием различных агентов была известна еще в середине XX века, однако оборудование того времени не позволяло в полной мере изучить структуру и свойства образующихся материалов, а в промышленности не было задач, для решения которых могли понадобиться подобные структуры. Мощным толчком к изучению наночастиц металлов в последние десятилетия послужило открытие их уникальных физико-химических и биологических свойств, таких как каталитические, электрические, магнитные и биоцидные, позволяющие применять их в различных отраслях деятельности (химическая промышленность, микроэлектроника, оптика, медицина и др.). Благодаря этим исследованиям в настоящее время существует множество химических и физических методов синтеза наночастиц различных металлов (золото, серебро, цинк, медь, кобальт, никель и др.). Однако эти методы как правило характеризуются низкой продуктивностью, требуют высоких затрат и использования вредных для окружающей среды и человека веществ (Kowshik et al., 2003). Последнее в особенности ограничивает применение таких наночастиц в медицине, фармацевтической и пищевой промышленности. Поэтому в настоящее время большое внимание исследователей привлекают биотехнологические подходы синтеза наночастиц металлов.

В последние годы предложены новые экологически чистые способы получения наночастиц металлов с применением экстрактов растений и культур клеток растений («Фитосинтез»). Наиболее часто используемое название этого метода – «Green Synthesis of Metal Nanoparticles».

Возможность использования растений для биосинтеза наночастиц была впервые показана исследователем Gardea-Torresdey, который в 1999 году описал формирование наночастиц золота в биомассе люцерны *Medicago sativa*, предположив, что этот процесс носит биохимический характер (Gardea et al., 1999). Методом трансмиссионной электронной микроскопии было показано,

что размер наночастиц варьирует от 2 до 20 нм. В настоящее время изучен процесс биосинтеза наночастиц у целого ряда растений, относящихся к различным таксонам (Shankar et al., 2004; Huang et al., 2011; Nune et al., 2009). Параллельно была исследована возможность использования экстрактов из различных частей растения для получения наночастиц золота и серебра (Shankar et al., 2004; Maltzahn et al., 2007). Использование экстрактов растений оказалось высокоэффективным для синтеза наночастиц металлов, при этом появилась возможность управлять реакцией, варьируя концентрацией экстракта.

Механизм формирования наночастиц металлов с помощью экстрактов растений до сих пор остается неизвестным. Предполагают, что в этом процессе участвуют полисахариды (Richardson et al., 2006), белки (Li et al., 2007), гетероциклические соединения (Huang et al., 2011) и другие вещества. Обобщая данные различных работ, был сделан вывод, что основную функцию в биосинтезе наночастиц металлов у растений выполняют тиольные, сульфгидрильные, карбоксильные и аминогруппы различных соединений (Sinha et al., 2008).

Наночастицы серебра, сформированные таким образом могут быть использованы для подавления развития бактериальной инфекции. Было показано, что коллоидный раствор наночастиц серебра более эффективен для элиминации инфекции, чем антибиотики.

Наночастицы металлов, таких как серебро и золото, нашли широкое применение в различных отраслях промышленности (Shankar et al., 2004, Mohanpuria et al., 2008). В частности, они используются в фильтрах для очистки воды, для получения препарата противовирусного действия, для лечения хронической лейкемии, в лечебных кремах, медицинских устройствах и имплантатах, для пропитки биополимеров и тканевых материалов, в качестве покрытий поверхностей (технология Silver-NANO) холодильников, в стиральных машинах и спортивном оборудовании. Композитные наночастицы Ag–Au используются для конструирования энзимных электродов. Золотые и

серебряные наночастицы нашли применение в рамановской спектроскопии (Mohanpuria et al., 2008).

Получение наночастиц металлов является активно развивающейся отраслью нанотехнологий которая направлена на получение частиц различных размеров, формы и химического состава. Возможно получение наночастиц методом эрозионно-взрывного диспергирования металлов, но он имеет определенные недостатки, такие как полиморфность получаемых частиц, дороговизна и вредное влияние на окружающую среду.

Было показано, что силикатеин, иммобилизованный на кремниевой подложке или поверхности скикулы, способен образовывать наночастицы золота из раствора аурата (Schroder et al., 2009, Lange et. al., 2007).

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Губки

В работе использовали взрослых особей губок *Latrunculia oparinae*, собранных методом драгирования в районе Курильских островов на глубине 100 м. Губки были помещены в 70% раствор спирта, для сохранения РНК для дальнейшей работы.

2.2. Получение амплифицированной кДНК

РНК из губок выделяли методом с гуанидинизотиоционатом (Chomczynski and Sacchi, 1987), растворяли в воде и использовали для синтеза кДНК. Синтез первой цепи кДНК проводили в соответствии со стандартным протоколом (Amersham) в объеме 20 мкл в присутствии 20 пмольТ-праймера (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)30MN-3') в качестве затравки. На реакцию брали 1 мкг тотальной РНК. Полученную первую цепь кДНК амплифицировали в реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей 3 mM MgCl₂, dNTP (200 мкМ каждый), 1 ед. акт. Таq-полимеразы, 0,3 мкМ праймера "cap" (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3') и 15 нг кДНК с предыдущей стадии (Matz, 1999). Амплификацию проводили на приборе iCycler (BioRad, USA) в следующем режиме: денатурация ДНК — 95° С, 15 с, отжиг праймеров — 60° С, 15 с, синтез ДНК — 72° С, 2 мин; 20 циклов.

2.3. Получение генетических конструкций использованных в работе

Фрагменты кДНК, кодирующий активный центр силикатеина LoSilA1 и катепсина LoCath были получен с помощью полимеразной цепной реакции с следующими праймерами: SilA1-F, 5' –AGCTGGATCCTCCTA TCCTGAGTCCGTGGACTGGAG-3' (подчёркнут сайт рестрикции BamHI), и SilA1-R, 5'-AGCTAAGCTTTTAAAGAGTAGGGTAGGAGGCATCACTAGC-

3' (подчёркнут сайт рестрикции HindIII), Cath-F: 5'-AGC TGA GCT CGT CTG CCC AGA GGA AGT GGA CTG GAG GAC TAA GGG A-3' (подчёркнут сайт рестрикции SacI) и Cath-R: 5'-AGC TAA GCT TTT ATA TGG TAG TGT ACA TAG CCT TGG TTG-3' (подчёркнут сайт рестрикции HindIII). В качестве матрицы в каждом случае была использована тотальная кДНК. Для получения генетической конструкции pQE80-LoSilA1 продукт ПЦР был клонирован в экспрессионный вектор pQE80 (Qiagen, Germany) с помощью сайтов рестрикции BamHI (5'-конец) и HindIII (3'-конец), а для получения конструкции pET-40b-LoCath продукт ПЦР был клонирован с помощью сайтов рестрикции SacI (5'-конец) and HindIII (3'-конец).

На основе полученной последовательности кДНК гена *LoSilA1* были разработаны праймеры (Таблица 3) для слияния участка кДНК *LoSilA1*, соответствующего зрелому белку, с геном *GFP* и с последовательностью, кодирующей гистидиновый тэг. Все праймеры несут уникальные сайты рестрикции SacI, BamHI, EcoRI, ApaI.

Для создания генетической конструкции, несущей ген силикатеина без модификаций мы использовали пару праймеров 253D-SacI-253R-BamHI. Конструкции, обозначенные как S2 и S3, несли ген силикатеина с гистидиновым тэгом. Для их создания мы использовали следующие пары праймеров: Для S2, несущего тэг на N конце, была использована комбинация 253D-SacI-253R-BamHI-6H, а для генетической конструкции, названной S3 – с тэгом на C конце, мы использовали пару праймеров 253D-SacI-6H -253R-BamHI.

При помощи ПЦР с использованием указанных праймеров и амплифицированной кДНК *Latrunculia oparinae* был получен участок гена нужной длины. Ампликоны были очищены путем переосаждения в этаноле и подвергнуты рестрикции ферментами EcoRI, ApaI, SacI и BamHI согласно протоколу фирмы-производителя (СибЭнзим, Россия). Кассетный вектор pSAT6-MCS, содержащий промотер и терминатор гена 35S субъединицы рРНК вируса мозаики цветной капусты и полилинкер, а так же вектор pSAT6-EGFP в

полилинкере которого содержалась последовательность рекомбинантного зеленого флуоресцентного белка (*EGFP*), были подвергнуты рестрикции указанными ферментами. Рестрицированные ампликоны и соответствующие векторы были лигированы при помощи ДНК лигазы фага T4 по протоколу фирмы-производителя (СибЭнзим).

Полученной лигазной смесью трансформировали клетки *Escherichia coli* XL1Blue химическим способом с CaCl₂ (Маниатис и др., 1984). Отбор колоний проводили на бактериальной среде LB (NaCl – 10 гр/л, пептон - 10 гр/л, дрожжевой экстракт - 5 гр/л, pH 7,5), содержащей селективный антибиотик ампициллин (50 мг/л). Для скрининга полученных колоний использовали ПЦР с соответствующими праймерами. Колонии, давшие положительный результат, были пересажены на свежие питательные среды и использованы для выделения плазмидной ДНК методом щелочного лизиса (Маниатис и др., 1984). Для подтверждения успешности вставки, плазмиды были подвергнуты рестрикции.

Таблица 3. Использованные в работе праймеры

253D-SacI-6H	5'- TACACGAGCTCAATGCATCACCATCACCATCACT CSTATCCTGAGTCCGTG
253R-BamHI	5'-AGCAGGGATCCCCTAAAGAGTAGGGTAGGAGG
253D-SacI	5'-GCTGAGAGCTCAATGTCSTATCCTGAGTCCGTG
253R-BamHI-6H	5'- TATAAGGATCCTCTAATGGTGATGGTGATGGTGA AGAGTAGGGTAGGAGG
253SilD-EcoRI	5'-GAT GAA TTC ATG TCC TAT CCT GAG TCC GTG
253SilR-ApaI	5'-GTT GAG GGC CCA AGA GTA GGGT AGG AGG

2.4. Получение бинарного вектора для трансформации растений

В качестве бинарного вектора использовали плазмиду pPZP-RCS2, в состав которой входят:

- область T-ДНК, фланкированная 25 п.н. повторами (RB и LB);
- ген устойчивости к канамицину- Npt II (неомицин-фосфотрансфераза) под контролем промотора и терминатора генов опинового синтеза (pNos и Nos 3');
- селективный маркер устойчивости к спектиномицину (SpR) и стрептомицину (StR), кодируемый транспозоном кишечной палочки (Tn7).

В области T-ДНК вектора pPZP-RCS2 так же располагаются сайты рестрикции "homing" эндонуклеаз. Соответствующие сайты рестрикции фланкируют 35S промотор и терминатор в кассетном векторе pSAT6.

Вектор pPZP-RCS2, рекомбинантные векторы pSAT6-LoSilA1 и pSAT6-LoSilA1-EGFP, подвергали рестрикции при помощи "homing" эндонуклеазы PI-PspP I. Полученные фрагменты лигировали с использованием ДНК лигазы фага T4 по протоколу фирмы-производителя (СибЭнзим).

Полученной лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* XL1Blue химическим способом с CaCl_2 (Маниатис и др., 1984). Отбор колоний проводили на бактериальной среде LB, содержащей селективный антибиотик спектиномицин/стрептомицин (300/200 мг/л). Для скрининга полученных колоний использовали ПЦР с праймерами 253D-EcoRI и 253R-ApaI. Колонии, давшие положительный результат были пересажены на свежие питательные среды и использованы для выделения плазмидной ДНК методом щелочного лизиса (Маниатис и др., 1984). Для подтверждения успешности вставки, плазмиды были подвергнуты рестрикции.

При помощи электропорации рекомбинантный вектор pPZP-RCS2 переносили в клетки агробактерий *Agrobacterium tumefaciens* штамма EHA 105, которые в дальнейшем использовали для трансформации растений.

2.5. Растения, использованные в работе

В данной работе в качестве модельной системы использовали растения табака (*Nicotiana tabacum* L.), сорта Xanthi. Семена растения были предоставлены сотрудниками теплицы БПИ ДВО РАН и использовались для получения стерильных растений.

2.6. Среда для культивирования стерильных растений и клеточных культур

Использовали питательную среду для культивирования изолированной ткани растений, разработанную на основе среды Мурасиге и Скуга (Murashige and Skoog, 1962), следующего состава (Таблица 4).

Таблица 4. Компоненты питательной среды

Компонент	мг/л воды:
NH_4NO_3	400
KNO_3	1900
K_2HPO_4	170
$\text{CaCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	665
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	370
H_3BO_4	6,2
$\text{MnSO}_4 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	22,3
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{CoCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	8,6
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,25
KJ	0,83
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	27,8
$\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2 \text{H}_2\text{O}$	37,3
Мезо-инозит	100
Тиамин гидрохлорид	0,2
Никотиновая кислота	0,5
Пиридоксин гидрохлорид	0,5
Казеин гидролизат	100
Сахароза	30000
Агар	6000
Вода, дистиллированная	до 1 л

Перед автоклавированием pH среды 5,6 – 5,8 доводили при помощи КОН. Питательные среды стерилизовали в автоклаве при $t = 120^\circ\text{C}$ и давлении 0,8-1,0 атм. в течение 20 минут.

Для регенерации растений использовали среду на основе указанной выше, но с пониженным содержанием сахарозы – 10 г на литр среды и с половинным содержанием макросолей. Для инициации регенерации использовали гормон ИМК в концентрации 1 мг на литр среды.

2.7. Получение и культивирование клеточных культур табака

2.7.1 Получение стерильных растений табака

Все манипуляции производили в ламинар-боксе, используя стерильную посуду (чашки Петри, колбы Эрленмейера) и инструменты (скальпели, пинцеты).

Семена тщательно промывали под проточной водой в мыльном растворе. В стерильных условиях их помещали в колбу Эрленмейера и заливали 0,2% раствором диацида (на 200 мл воды 132 мг этанолмеркурхлорида и 264 мг Н-ацетилпиридинхлорид). Аккуратно перемешивали в течение 2-3 мин. Затем раствор диацида сливали, а семена пятикратно промывали в стерильной воде. Для отбора, семена центрифугировали 2 мин при 2000 g. Семена помещали в пробирки, содержащие среду ½ W-0 и проращивали при 25°C, световом режиме 16/8 (день/ночь) в течение 30 дней. Стерильные растения асептически разрезали скальпелем в участках междоузлья, и помещали на свежие питательные среды каждые 30-35 суток.

2.7.2 Получение клеточных культур

Стерильные растения из пробирок переносили на чашки Петри и стерильно разрезали на дольки по 1-2 см. Наносили микроповреждения для индукции каллуса. Экспланты помещали на питательные индуцирующие среды WB/A. Образование каллуса происходило в течение 40-50 дней при 25°C, относительной влажности воздуха 70 %, в темноте.

Каллусы выращивали в колбах Эрленмейера, содержащих 50 мл среды WB/A при 25°C в темноте, с периодом субкультивации 30-35 суток.

2.8. Агробактериальная трансформация

Для трансгенного переноса использовали бактерию *Agrobacterium tumefaciens* EHA105, несущую бинарную векторную систему, состоящую из плазмид:

1. pSAT-RCS2-LoSilA1+EGFP, получение которой описано выше.
2. pTiBo542, *vir*-хелперная плазида, осуществляющая перенос и встраивание T-ДНК в геном растения. Кодировывает полный состав *vir*-белков (a, b, g, c, d и e). Так же имеет маркер устойчивости к рифампицину и последовательность, обеспечивающую репликацию.

Бактериальные культуры выращивали на агаризованной среде LB. Для избегания контаминации культур посторонними бактериями и поддержания рекомбинантных плазмид в среду были добавлены селективные антибиотики: стрептомицин (200 мг на литр среды) и спектиномицин (300 мг на литр среды). Агробактерии выращивали при 28°C в темноте в течение двух суток.

Для трансформации использовали агробактерии, культивируемые в течение 12 часов при 28°C на чашках Петри с агаризованной средой LB. стерильные растения *N. tabacum*, полученные из семян дикорастущего растения, разрезали на органы: корень, стебель и лист. Стерильным скальпелем проводили по штриху свежей культуры бактерий в чашках Петри, и нарезали им кусочки экспланта на агрегаты диаметром 1-2 см. Этим же скальпелем наносили микроповреждения для индукции трансгенного каллуса. Экспланты, инокулированные агробактериями, переносили на агаризованную среду WB/A. Кокультивирование проводили в темной культуральной при температуре 25°C, в темноте в течение 3 суток. Далее экспланты пересаживали на среды того же состава с добавлением антибиотика цефотаксима ("Hoechst", Франция) до конечной концентрации 250 мг/литр среды и культивировали до

исчезновения агробактериальной контаминации. В течение 2-3 недель культивирования наблюдали индукцию каллусных агрегатов в местах нанесения повреждений. Для проведения селективного отбора трансгенных клеток, экспланты или отдельные каллусные агрегаты приносили на среды WB/A, содержащие антибиотик канамицин (“Синтез”, Россия). В первом пассаже селекции использовали концентрацию канамицина 100 мг/л. Во втором и третьем пассаже селекции использовали концентрацию 500 и 1500 мг/л канамицина, соответственно. Для пересадки использовали те каллусные агрегаты, которые имели активный рост на среде с селективным антибиотиком.

2.9. Выделение РНК

В буфер (ЦТАБ – 200 мг/10 мл., ПВП – 200 мг/10 мл., Трис 1М – 1 мл., ЭДТА 0.5 М – 500 мкл., NaCl – 1.17 г) добавляли меркаптоэтанол до 2% и подогревали до 65°C на водяной бане. 200 мг свежей ткани растирали с 1000 мкл буфера в обожженной ступке до гомогенного раствора. Смесь инкубировали на водяной бане при температуре 65°C в течение 5 мин. К смеси добавили один объем хлороформа с добавлением изоамилового спирта (24/1 Объем/объем) и перемешивали в шейкере десять минут. После этого пробирки со смесью центрифугировали при 20000 g десять минут. Верхнюю фракцию отбирали в новые пробирки и добавляли по 0.25 объёма 10 М LiCl. Смесь инкубировали при температуре 4°C в течение суток, после чего осаждали центрифугированием. Осадок растворяли в 50 мкл аптечной воды, добавляли 2.5 объёма 96% этанола и инкубировали 20 мин при температуре -20°C. После этого осаждали РНК и проверяли её качество методом электрофореза. Концентрацию РНК определяли с помощью программы для определения концентрации НК по поглощению OD 260, приведенной на сайте www.molbiol.ru, исходя из показаний спектрофотометра Shimadzu по соотношению OD 260/280.

2.10. Обратная транскрипция

Реакцию обратной транскрипции проводили при помощи набора для синтеза первой цепи кДНК (Силекс) согласно протоколу производителя. Реакцию проводили в объеме 50 мкл.

К 1-5 мкг РНК добавляли 0.5 мкг олиго(dT)₁₅ праймера, стерильной воды, свободной от РНКаз, и инкубировали при +70°C 5 минут. Затем пробирку охлаждали на льду и добавляли 5 мкл 10-кратного буфера для M-MLV, 8 мкл смеси dNTP с концентрацией 1.5 mM каждого и 1 мкл обратной транскриптазы M-MLV с концентрацией 200 ед.акт в мкл. Смесь инкубировали в течение 60 минут при +37°C. Реакцию останавливали прогреванием смеси в течение 10 минут при +70°C и охлаждали на льду. Полученные препараты кДНК непосредственно использовали для ПЦР.

2.11. Доказательство трансгенности

Для доказательства трансгенности полученных культур проводили ОТ-ПЦР реакцию со следующими парами праймеров:

pSAT-UTR 5'-TCA CCA TTT ACG AAC GAT AG-3' и 35STerm-R 5'-GAT TTG TAG AGA GAG ACT G-3';

253SiID-EcoRI 5'-GAT GAA TTC ATG TCC TAT CCT GAG TCC GTG-3' и

253SiIR-ApaI 5'-GTT GAG GGC CCA AGA GTA GGGT AGG AGG-3';

- pSAT-UTR 5'-TCA CCA TTT ACG AAC GAT AG-3' и 253-5'-R2 5'-GCC ATA ACC AGT CAC CAC-3'.

Для проверки нативности кДНК использовали пару праймеров на актин табака 5'-ATG GCA GAC GGT GAG GAT ATT CA-3' и 5'-GCC TTT GCA ATC CAC ATC TG-3'.

2.12. Полимеразная цепная реакция

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей 3 mM MgCl₂, dNTP (200 мкМ каждый), 1 ед. акт. Taq-полимеразы, прямой и обратный праймеры (0,25 мкМ каждый) и 1 мкл амплифицированной кДНК (разведение 1 к 40). ПЦР проводили на приборе iCycler (BioRad, USA) в следующем режиме: денатурация ДНК — 95°C, 20 с, отжиг праймеров — 50° С, 20 с, синтез ДНК — 72°C, 40 с; 30 циклов. Продукты ПЦР анализировали в 1% агарозном геле.

Для ПЦР в реальном времени использовали 2.5x кратную смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I (Синтол, Москва) согласно рекомендации производителя. Последовательности праймеров для определения уровня экспрессии генов *LoSilA1*, *LoSilA2*, *LoSilA3*, *LoSilB* и *LoCath* приведены в Таблице 5. Реакцию проводили в приборе CFX96 (Bio-Rad, USA), в следующем режиме: денатурация ДНК — 95°C, 20 с, отжиг праймеров — 60° С, 20 с, синтез ДНК — 60°C, 40 с; 35 циклов.

Таблица 5. Праймеры использованные для количественного ПЦР анализа

<i>Название гена и номер в генбанке (в скобках)</i>	Прямой праймер	Обратный праймер
<i>LoSilA1 (ACG63793)</i>	5'- GCAGTGGCTAATGTGG GTC-3'	5'- CATAGTTACCCCAGTTC TTG-3'
<i>LoSilA2 (ACH48000)</i>	5'- GACTCCTCCAGATGCT CCAG-3'	5'- GATGTAACCACTCTGTC CCC-3'
<i>LoSilA3 (ACH48001)</i>	5'- CGGTGGCACAGTGTAC AACG-3'	5'- CATCTTAGCCCCTCTGT TGTC-3'
<i>LoSilB (ACH48002)</i>	5'- TGGGTGTCAAGGTGGT AAC-3'	5'- CATCCACCCCTACAGCT ACT-3'
<i>LoCath (ACH48003)</i>	5'- GGACAATGGGGGAATA GACG-3'	5'- GATGATGAGAGTGTGA GTGAG-3'

2.13. Секвенирование

Секвенирование проб осуществляли в ЦКП "Биотехнологии и биоинженерии" БПИ ДВО РАН при помощи набора Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin-Elmer Biosystems, Foster City, USA) согласно протоколу фирмы-производителя. После очистки этанолом проводили секвенирование ДНК на ABI 310 Genetic Analyser (Perkin-Elmer Biosystems).

2.14. Детекция флуоресценции GFP методом конфокальной микроскопии

Для визуализации локализации экспрессии белка использовали инвертированный микроскоп Axiovert 200M с системой LSM-510META (Carl Zeiss). Облучение проводили аргоновым лазером при мощности 2%. Длина волны – 488 нм, длина волны испускаемого света 505-530 нм. Использовали лямбда-сканирование для исключения аутофлуоресценции.

2.15. Экстракция белков

Для выделения белков из трансгенных бактерий и культур клеток использовали систему автоматизированной двухстадийной аффинной очистки и обессоливания гистидин- (His-) и GST-меченых белков Profinia. (Profinia protein purification system, BioRad). Для выделения был использован стандартный протокол очистки.

2.16. SELDI

Для обнаружения силикатеина в образце использовали метод лазерной десорбции/ионизации SELDI (Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization) на приборе ProteinChip SELDI System изготовителя BioRad, с использованием чипов NP 20 фирмы BioRad. Для нанесения на чип использовали экстракт

белков, приготовленный в фосфатном буфере с 500 mM NaH_2PO_4 двухводный и 300 mM NaCl pH 8.0. Для анализа проб использовали стандартную программу Starter Kit.

2.17. Перенос растений в почву

Для укоренения использовали слабокислую почву (pH 6.5) для комнатных растений. Растения извлекали из пробирок, отмывали корневую систему от остатков питательной среды и переносили в сильно увлажнённую почву. Растение накрывали полиэтиленовым пакетом с отверстием для вентиляции и переносили в культуральную комнату. После семи дней культивации при температуре 25°C и искусственном освещении с фотопериодом 16/8 (день/ночь) проводили процедуру закаливания – экспонировали на открытом воздухе 1-2 часа, после чего снова помещали в условия культуральной комнаты. После трёх дней закаливания растения выращивали, поливая каждые 48 часов.

2.18. Получение и анализ наночастиц серебра

Экстракты нетрансгенной каллусной культуры табака (Nt) и культуры табака, экспрессирующей ген силикатеина *LoSilA1* (Nt-S1) смешивали с раствором AgNO_3 (ПЗЦМ-Втормет, ч.д.а.), выдерживали в течение суток при комнатной температуре и центрифугировали. Осадок промывали многократно дистиллированной водой для удаления остатков нитрата серебра. Эффективность синтеза наночастиц оценивали с помощью спектрофотометрии, по максимуму поглощения, характерному для наночастиц серебра, при длине волны - 450 нм. Полученные наночастицы серебра были исследованы при помощи методов сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), атомной силовой микроскопии (АСМ) и микрозондового анализа в центре коллективного пользования БПИ ДВО РАН.

2.19. Выделение белка из бактерий и тест каталитической активности рекомбинантного силикатеина и катепсина

Клетки бактерий были собраны с помощью центрифугирования при 5000 об/мин, в течение пяти минут при температуре 4°C. Бактериальный осадок был ресуспендирован в буфере для лизиса клеток (50 мМ Трис-HCl, pH 8.0, 100 мМ NaCl, 5 мМ ЭДТА, 0.5% Тритон-X100, 0.1 мМ ПМСФ и 1 мМ ДТТ). Клетки бактерий были разрушены с помощью ультразвука. После разрушения клеток, лизат был обработан ДНКазой (0.01 мг/мл) и лизоцимом (0.1 мг/мл) в течение двух часов при комнатной температуре. Очистку белка проводили методом аффинной хроматографии с помощью никелевой агарозы (Qiagen, Нидерланды). Очищенный белок был сконцентрирован с помощью ультрафильтров Amicon Ultra-4 (Millipore, Ireland).

Количество белка было определено по реакции Бредфорда (Bradford 1976). Качество очистки и молекулярная масса рекомбинантного катепсина и силикатеина была проверена с помощью ДСН/ПААГ электрофореза в 12% акриламидном геле по методике Лэммли (Laemmli, 1976).

Для исследования каталитической активности, рекомбинантный катепсин LoCath, рекомбинантный силикатеин *LoSill* и бычий сывороточный альбумин (БСА) (Sigma Aldrich USA) (50 мкг в 50 мМ Tris-HCl, pH 6.8, 100 мМ NaCl) были смешаны с равным объёмом ТГЕОС (ABCRC GmbH & Co. KG, Германия). Реакцию проводили при 25°C в течение 24 часов. Реакция была остановлена центрифугированием в течение 15 минут при 20000 g. Осадок был промыт этанолом и высушен для дальнейшего анализа.

Фотографии наночастиц были получены с помощью сканирующего электронного микроскопа (EVO 40, Carl Zeiss SMT) в ЦКП «Биотехнология и генетическая инженерия» БПИ ДВО РАН. Наночастицы были перенесены на алюминиевые держатели образцов с адгезивной углеродной плёнкой. Изображения кристаллов были получены при напряжении 20 – 23 кВ и рабочей дистанции 5.5 – 7 мм.

Элементный анализ кристаллов проводили с помощью метода энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭДС). ЭДС анализ был проведён с помощью Shimadzu EDX-800HS-P (Shimadzu EUROPA GmbH), с родиевой рентгеновской трубкой (напряжение 50 кВ, сила тока 100 мкА, время детекции 300 с. задержка 20%, коллиматор 10 мм). Данные были проанализированы в программе PCEDX Shimadzu в ЦПК БПИ ДВО РАН.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Определение уровней экспрессии силикатеина и катепсина роговой губки *L. oparinae*

Ранее нами было обнаружено несколько изоформ силикатеинов. Для определения уровней экспрессии мы использовали ПЦР в реальном времени с соответствующими праймерами. Был определен уровень экспрессии каждой из изоформ гена силикатеина и катепсина. Определение уровней экспрессии генов необходимо для выявления наиболее важных полимеризующих белков, которые будет целесообразно использовать в работе. Мы предполагаем, что гены с максимальным уровнем экспрессии играют ключевую роль в синтезе белков, важных для полимеризации кремния.

Показано, что наиболее активно экспрессирующейся формой является *LoSilA1* (Рис. 13). Именно эта форма была выбрана для клонирования в вектор и дальнейшей работы.

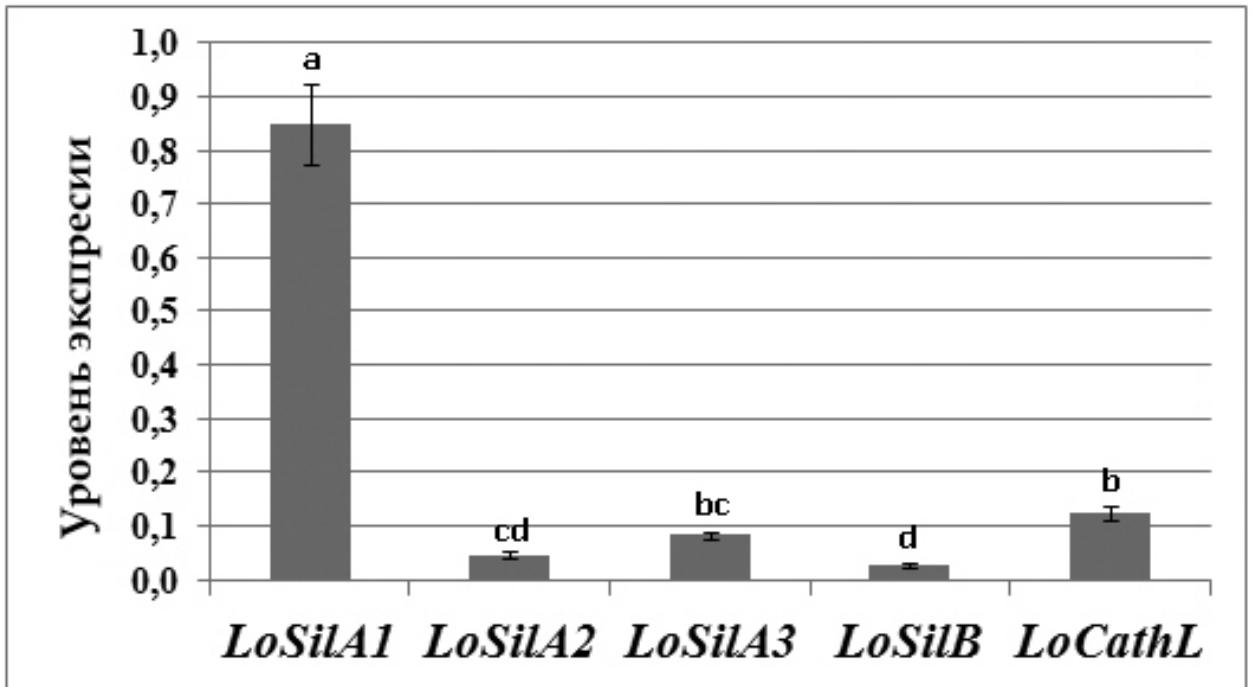


Рис. 13. Уровень экспрессии изоформ гена силикатеина и катепсина в роговой губке *L. oparinae*.

3.2. Генетические конструкции несущие ген *LoSilA1*, *LoSilA1-EGFP*, *LoCath*

В ходе работы нами были созданы четыре варианта генетических конструкций на базе вектора pSAT6, содержащих рекомбинантный силикатеин *LoSilA1*. Вариант S1 для экспрессии гена силикатеина в чистом виде, вариант SG для экспрессии гена силикатеина, слитого с геном *EGFP*, и два варианта для экспрессии силикатеина, слитого с “гистидиновым хвостом” для выделения белка –S2 и S3 с шестью а.о. гистидина на N- и C- концах, соответственно (Рис. 14). Также была создана конструкция на основе вектора pET-40, несущая ген катепсина *LoCath* морской роговой губки *Latrunculia oparinae*. Ген катепсина был слит с гистидиновым тэгом для дальнейшей аффинной очистки.

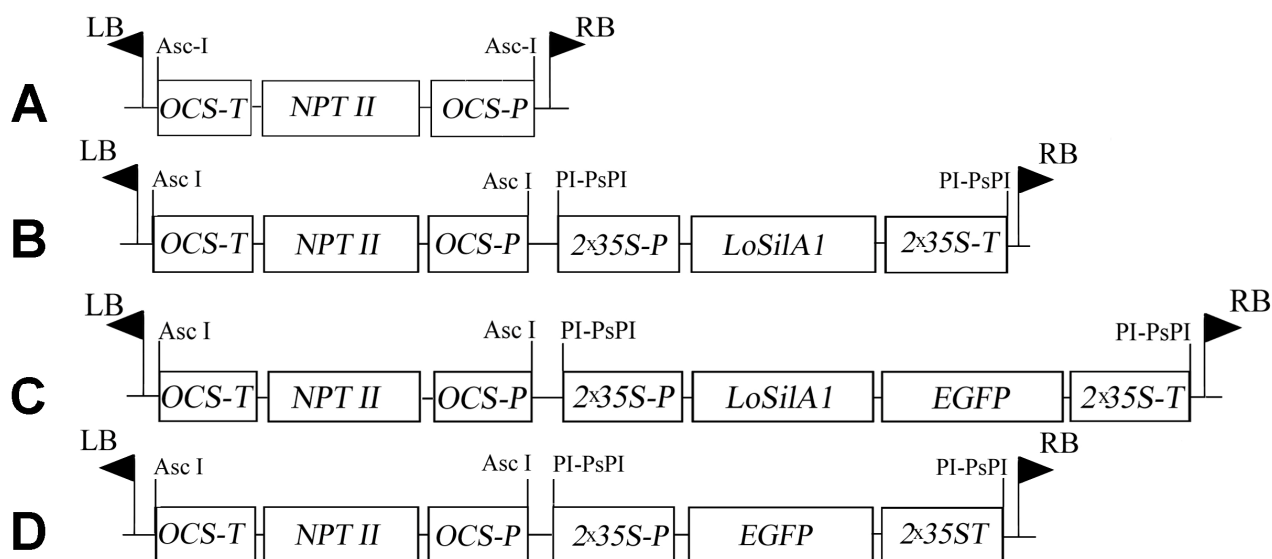


Рис. 14. Генетические конструкции, содержащие ген силикатеина.

Слева направо: А: вектор pSAT6, В – вектор pSAT6, несущий ген силикатеина *LoSilA1*, С – вектор pSAT6, несущий ген силикатеина *LoSilA1*, слитый с *GFP*, D – вектор pSAT6, несущий ген *GFP*

Используемый в данной работе ген *GFP* имеет модифицированную кодонную структуру, обеспечивающую повышенный уровень свечения белка (Enhanced

GFP) в трансгенных клетках. При этом рамка считывания задается стартовым кодоном (ATG) гена силикатеина. В процессе слияния генов рамка считывания не сбивается, что было подтверждено секвенированием участка соединения двух генов. Стоп кодон в последовательности гена силикатеина был элиминирован, окончание транскрипции обеспечивается стоп кодоном гена зеленого флуоресцентного белка (TAG). Полученный на основе такого химерного гена белок будет состоять из двух частей: на N-конце из зрелого белка силикатеина, а на C-конце из зеленого флуоресцентного белка. Такое взаимное расположение было разработано не случайно. В случае нарушения процессов транскрипции или трансляции, приводящего к неполному синтезу мРНК или биосинтеза белка, или при переносе неполной последовательности Т-ДНК, ложной флуоресценции обнаружено не будет. Тогда как при обратном расположении генов в случае такого нарушения может наблюдаться флуоресценция неполного белка, состоящего только из части EGFP. Слияние с GFP или с гистидиновым тэгом не должно повлиять на активность силикатеина, т.к ранее было показано, что этот белок способен сохранять активность в сшивке с различными белками (Curnow et al., 2005). На настоящий момент нет публикаций, описывающих создание генетической конструкции с EGFP и силикатеином.

Для получения силикатеина и катепсина в бактериальной системе экспрессии были получены конструкции на основе вектора pQE80 и pET40, соответственно. В полученных конструкциях гены *LoSilA1* и *LoCath* находились под контролем ИПТГ-индуцируемых промотеров фага T5 и T7 и были слиты с 6His-тэгом для проведения аффинной очистки.

3.3. Кристаллы кремния и состав кристаллов (полимеризация кремния *in vitro*)

Рекомбинантные белки силикатеин LoSilA1 и катепсин LoCath были экспрессированы в бактериях, и были очищены методом «batch» никелевой аффинной хроматографии. При этом LoSilA1 накапливался в тельцах включения, поэтому для его выделения использовали денатурирующие условия с последующим рефолдингом. Рекомбинантный LoCath удалось получить в растворимой фракции белков и для его выделения использовали нативные условия. Для исследования каталитических свойств рекомбинантных белков очищенный силикатеин и катепсин были смешаны с тетра-гидроксиэтил-ортосиланом (ТГЕОС). После смешивания растворов мы наблюдали различные реакции. Результаты взаимодействия растворов белков с предшественником оксида кремния, а также краткая характеристика контрольных растворов отражены в Таблице 6.

Таблица 6. Процесс формирования кристаллов кремния

	Формирование кристаллов	Примечания
Контроль 1-Вода	Нет изменений	Чистый раствор в течение 24 часов
Контроль 2-Буфер*	Нет изменений	Смесь становилась вязкой после 2 часов инкубирования, но оставалась текучей. Желирование наблюдалось после 24 часов инкубирования.
Контроль 3 - БСА + буфер*+ТГЕОС)	Триангулярные, ромбододекаэдрические кристаллы	После смешивания раствора белка и ТГЕОС наблюдали формирование белого осадка через 24 часа. Не наблюдали желирование раствора. Образовались бесформенные плёнки аморфного кремния и кристаллы.
Силикатеин (буфер*+ТГЕОС)	Гексагональные тетрагексаэдральные кристаллы	После смешивания раствора белка и ТГЕОС наблюдали немедленное формирование белого осадка. Не наблюдали желирования раствора. Образовались кристаллы.
Катепсин (буфер*+ТГЕОС)	Гексагональные, октаэдрические и β -тридимитовые кристаллы	После смешивания раствора белка и ТГЕОС наблюдали формирование белого осадка через 24 часа. Не наблюдали желирования раствора. Образовались кристаллы.

Буфер:* 25mM Tris-HCl, pH 6.8, GSH:GSSH (5mM:0.5mM), 0.1M NaCl

Мы обнаружили, что катепсин *LoCath* и силикатеин *LoSilA1* способны вызывать образование белого осадка в растворе ТГЕОС. При микроскопическом исследовании было обнаружено, что осадок состоит из аморфного кремния и

кристаллов различной формы и размеров. Было показано, что форма и размер кристаллов зависят от концентрации предшественников и времени инкубации.

В контрольном образце мы не наблюдали образования упорядоченных структур. В качестве контроля был использован 0.1% ТГЕОС. Для получения релевантных результатов мы использовали дополнительный контроль. В осадке, сформированном БСА и ТГЕОС, нами были обнаружены полигональные кристаллы и аморфные отложения оксида кремния. По данным электронной микроскопии размер кристаллов составлял от 100 нм до 1 мкм. Высокая гетерогенность форм и размеров может свидетельствовать о неферментативной природе поликонденсации кристаллов.

Для теста каталитической активности силикатеиноподобного катепсина LoCath использовали такие же концентрации фермента и предшественников, что и в случае с силикатеином (0,1 мкг/мкл катепсина и 1,17% ТГЕОС). Размер полученных кристаллов кремния варьировал от 10 до 100 мкм. В осадке нами были обнаружены два типа кристаллов – гексагональные и β -тридимитовые. Из всех исследованных нами белков силикатеин показал наибольшую способность к полимеризации ТГЕОС. При смешивании раствора силикатеина с ТГЕОС мы наблюдали мгновенное помутнение раствора и образование осадка. При исследовании осадка было обнаружено, что он преимущественно состоит из гексаоктаэдральных кристаллов от 300 до 400 нм.

При сравнительном анализе кристаллов, сформированных силикатеином и катепсином, было выявлено, что кристаллы, сформированные катепсином были значительно крупнее, а также гетерогенны по форме и размеру. Тот факт, что кристаллы формировались и в присутствии БСА, можно объяснить существованием неферментативного механизма реакции. Такой механизм был показан для многих лизин-богатых белков (Dickerson et al., 2008, Shiomi et al., 2005, Coradin et al., 2003). Учитывая, что октаэдральные кристаллы формировались как в контрольном, так и в экспериментальном образцах, можно сделать заключение, что эта форма связана с неферментативной поликонденсацией кремния.

В то же время гексагональные и β -тридимитовые кристаллы формировались только в растворе катепсина. По данным анализа аминокислотных последовательностей LoCath содержит Cys в каталитической триаде Cys-His-Asn (что характерно для катепсинов), однако окружение каталитического центра более характерно для силикатеинов (Tyr-Ala-Phe). Известно, что процесс полимеризации кремния происходит по механизму нуклеофильной атаки в активном сайте, состоящем из Ser-His and Cys-His (Cha et al., 1999). Было показано, что не только каталитический центр, но и окружение играет важную роль в полимеризации кремния (Fairhead et al., 2008). Интересно, что исследуемый катепсин LoCath обладает большей схожестью с силикатеином LoSilA1, чем с другими катепсинами (Kozhemyako et al., 2010). Всё это позволяет сделать предположение, что процесс полимеризации кремния идёт в согласно принятой на сегодняшний день теории (Cha et al., 1999, Müller et al., 2013).

Ранее было показано, что силикатеин может формировать α -кварцевые кристаллические структуры, которые принадлежат к семейству кристаллов гексагональной симметрии (Bawazer et al., 2012). β -тридимитовые кристаллы, сформированные катепсином также принадлежат к гексагональному семейству (Heany et al., 1994). Всё это позволяет предполагать наличие общего механизма полимеризации кремния в этих белках, что согласуется с существующей теорией (Ki et al., 2013). В данной работе мы впервые продемонстрировали возможность получения отдельнолежащих кристаллических структур с помощью рекомбинантного силикатеина. Ранее была описана возможность получения только аморфных отложений кремния (Bawazer et al., 2012) и друз кристаллов (Ki et al., 2013)

Результаты взаимодействия LoSilA1 и LoCath с ТГЕОС, а также состав и форма образовавшихся в ходе реакции кристаллов представлены на Рисунках 15 и 16.

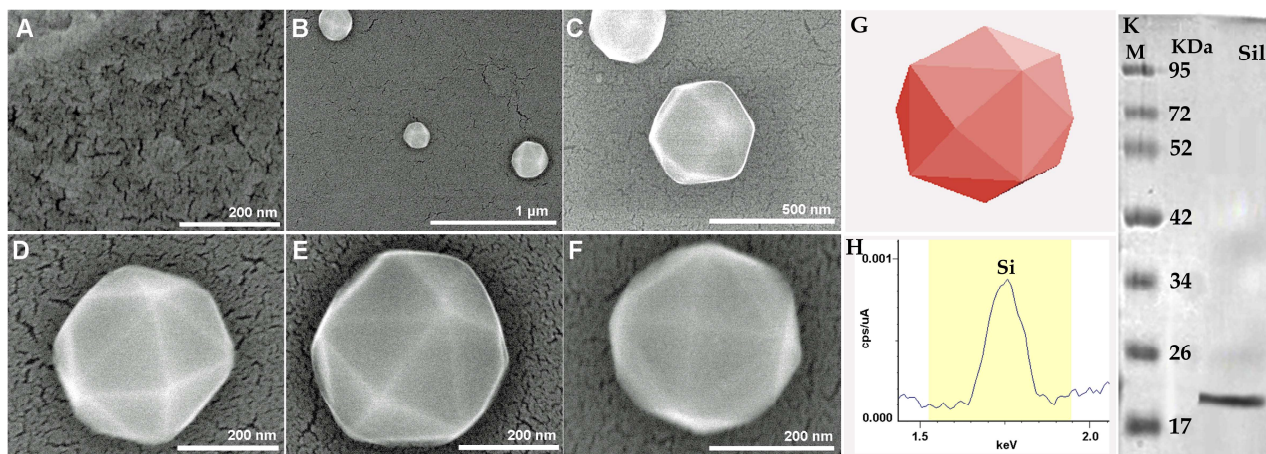


Рис. 15. Результаты взаимодействия раствора силикатеина LoSilA1 и ТГЕОС. А – контрольный образец, В-Ф – внешний вид кристаллов, С – схема кристалла, Н – EDX спектр кристалла, К – электрофореграмма очищенного рекомбинантного силикатеина.

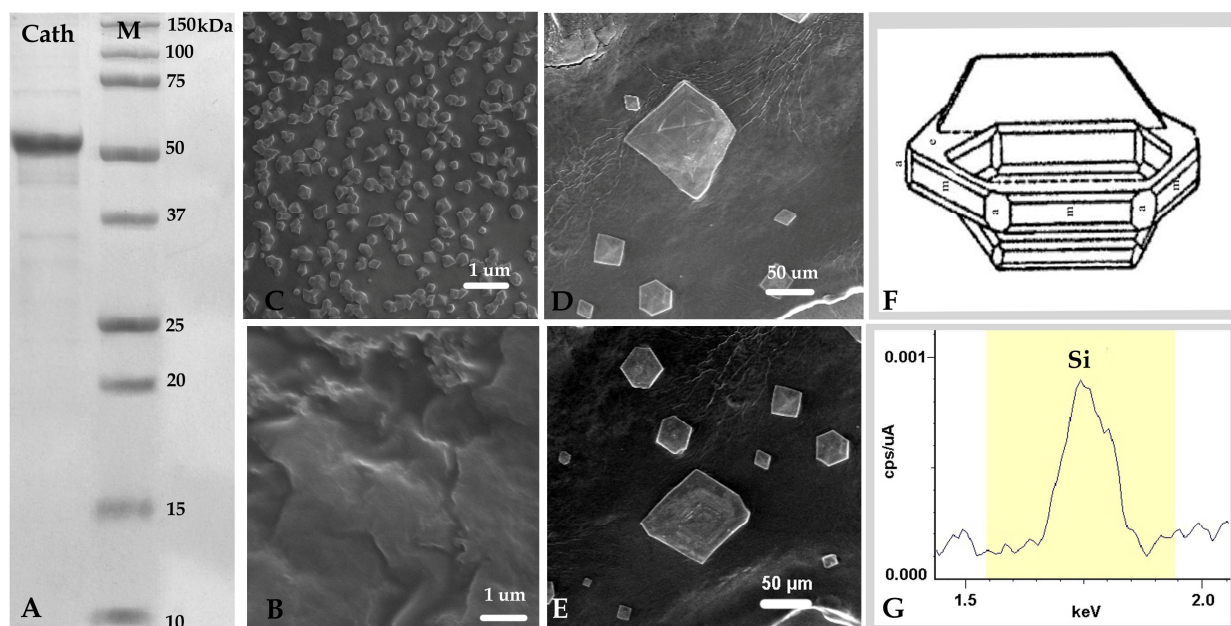


Рис. 16. Результаты взаимодействия раствора силикатеиноподобного катепсина LoCath и TGEOS. А – электрофореграмма очищенного рекомбинантного катепсина, В- контрольный образец, D,E – внешний вид кристаллов, F – схема кристалла, G – EDX спектр кристалла.

3.4. Получение трансгенных каллусных линий, регенерация перенос трансгенных растений в почву.

Нами был получен рекомбинантный силикатеин LoSilA1, выделенный из трансгенных бактерий *E. coli*. Однако известно, что в прокариотических клетках отсутствуют посттрансляционные модификации, необходимые для созревания многих белков. Мы предполагаем, что создание трансгенной культуры обеспечит синтез белка со свойствами близкими к нативным. В клеточных культурах табака были экспрессированы: *GFP* (Pang et al., 1998), интерлейкины 2 и 4 человека (Magnuson et al., 1998., Plasson et al., 2009), поверхностный антиген гепатита-B (Kumar et al., 2003., Plasson et al., 2009), в 2007 году Lienard с коллегами добились экспрессии антигенов пылевых клещей в суспензионной культуре клеток табака (Plasson et al., 2009), в 2002 Merle была получена культура клеток табака, экспрессирующая коллаген человека (Plasson et al., 2009). Всё это создаёт хорошие предпосылки для успешной экспрессии силикатеина в клетках растений.

С помощью метода агробактериальной трансформации нами были получены шесть трансгенных клеточных культур: Nt-S1 (клеточная культура, экспрессирующая “чистый” ген силикатеина *LoSilA1*), Nt-S2 и Nt-S3 (клеточные культуры, экспрессирующие ген силикатеина, слитый с “гистидиновым хвостом” на N- и C- концах, соответственно), Nt-SG (клеточная культура, экспрессирующая ген силикатеина *LoSilA1*, слитый с зеленым флуоресцентным белком GFP) и Nt-G (клеточная культура, трансформированная геном GFP, как контроль для Nt-SG) и Nt-pPZP (культура трансформированная “пустым” вектором) (Рис. 17). Селекцию проводили на средах, содержащих антибиотик канамицин. В качестве контрольной культуры использовали нетрансформированные каллусы табака. Полученные в ходе работы контрольные и трансгенные культуры табака представляют собой рыхлую каллусную ткань светло-кремового цвета. Значимых морфологических отличий

между культурами, также как и способности к спонтанному эмбриогенезу выявлено не было. Все культуры обладают стабильным ростом и минимальной изменчивостью по накоплению биомассы в течение длительного выращивания.

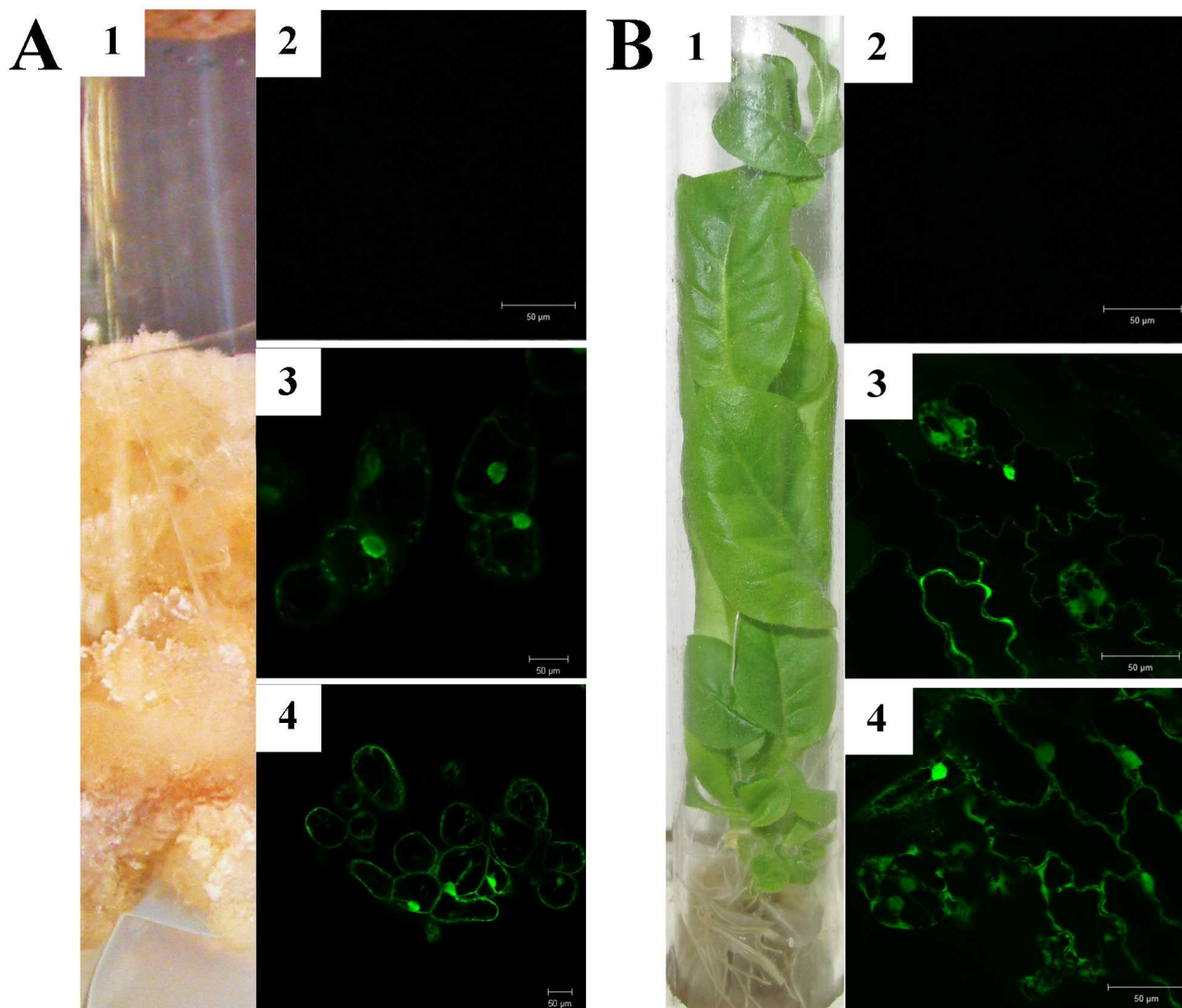


Рис. 17. А1 – внешний вид каллусной культуры, В1 – внешний вид регенерированного растения. 2-4 – данные конфокальной микроскопии. 2 – контрольный образец, 3 – GFP, 4 – Sil-GFP.

С помощью метода обратной транскрипции был доказан перенос гена силикатеина в растения и клеточные культурах табака. Качество РНК было проверено методом электрофореза. В нашей работе для проверки нативности кДНК мы использовали праймеры к гену актина табака. После подтверждения

нативности полученной кДНК и последующей амплификации была получена электрофореграмма, доказывающая экспрессию гена (Рис. 18). Сигналы на тот же ген в контроле отсутствовали.

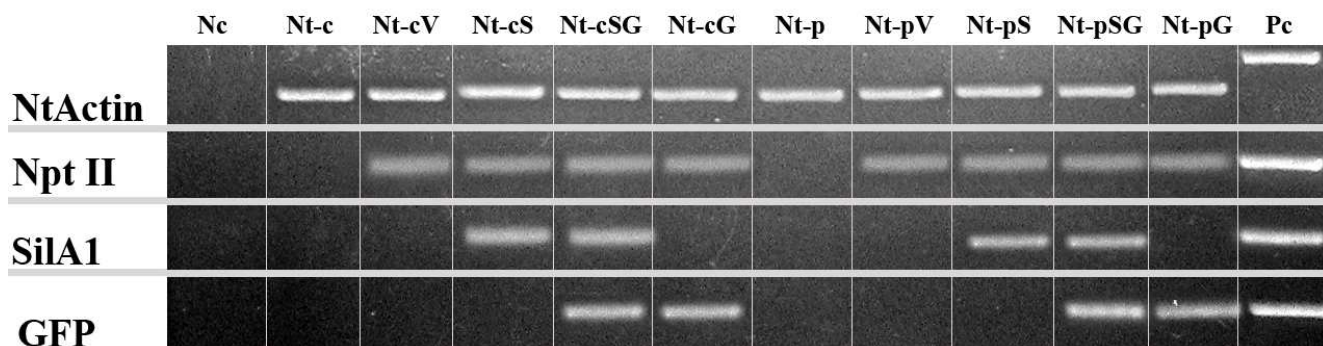


Рис. 18. Электрофореграмма амплифицированной кДНК, доказывающая трансгенность культур

Nc: отрицательный контроль; Nt-c – Nt-cSG: кДНК выделенная из каллусов *N. tabacum*, Nt-cV (культура трансформированная пустым вектором), Nt-cS (культура трансформированная *LosiA1*), Nt-cSG (культура трансформированная *LosiA1* с *GFP*), Nt-cG (культура трансформированная *GFP*), Ntp-NtpG: кДНК выделенная из растений *N. tabacum* Nt-pV (растение трансформированное пустым вектором) Nt-pS (растение трансформированное *LosiA1*), Nt-pSG (растение трансформированное *LosiA1* с *GFP*), Nt-pG (растение трансформированное *GFP*), Pc – положительный контроль.

Используя автоматизированную систему аффинной очистки Profinia (BioRad, США) и хроматографические колонки с никелевой агарозой (Ni-NTA Bio-Rad, США) был выделен рекомбинантный силикатеин из культур клеток, в нативных условиях (Рис. 19).

Масса выделенного белка, равная 24.92 кДа, а также отсутствие подобных белков в контрольной пробе, свидетельствует о том, что полученные нами культуры клеток *N. tabacum* экспрессируют ген силикатеина *LoSilA1*.

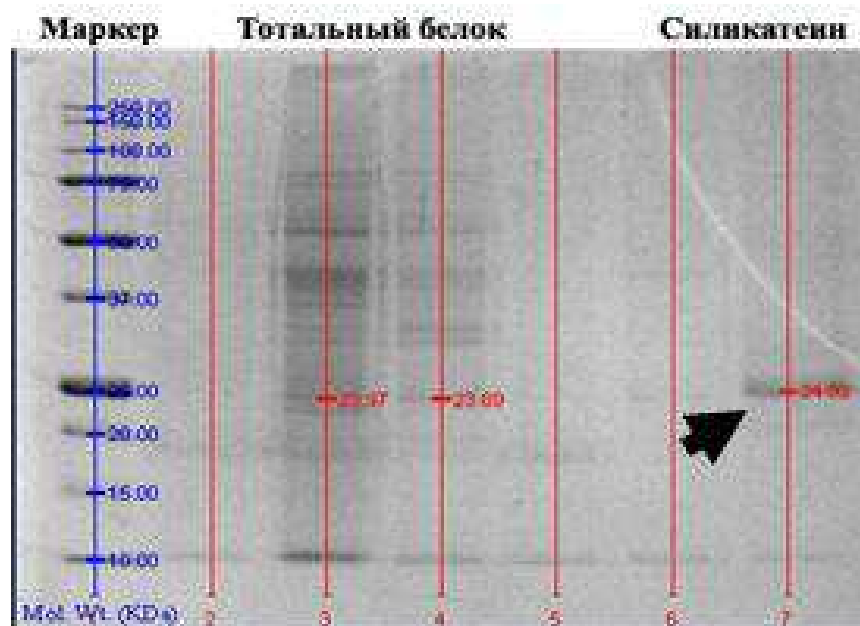


Рис. 19. Фотография электрофореза в полиакриламидном геле, белка, выделенного из культуры клеток Nt-S2. Стрелкой отмечена полоса, по молекулярной массе соответствующая силикатеину LoSilA1.

На настоящее время в литературных источниках нет данных о выделении рекомбинантного силикатеина *LoSilA1* морской роговой губки *Latrunculia oparinae* из эукариотической экспрессионной системы. Нами был выделен силикатеин в нативных условиях с помощью автоматизированной системы аффинной очистки Profinia. Это говорит о том, что в клетках трансгенных культур белок присутствует в растворимой форме. Несмотря на то, что экспрессия силикатеина в клетках растений была на высоком уровне, количество белка, составляло менее 1 мг/л. Это может быть вызвано действием защитных механизмов растений или быстрой деградацией белка при экстрагировании. В растениях системы, расщепляющие чужеродные белки, в настоящее время остаются слабо изученными. Однако можно предположить, что механизм их действия схож с таковым у дрожжей и бактериальных клеток (Michaud, 2008). Исследование влияния силикатеина на растения не менее интересно, чем получение культур клеток, экспрессирующих силикатеин. Мы предполагаем, что экспрессия силикатеина в растениях может придать им дополнительную устойчивость к биотическим и абиотическим факторам.

Предполагаемый механизм это может быть связан с ролью кремния, как неспецифического фактора защиты. В случае если силикатеин находится в клетке в растворимой форме, он может принимать участие в метаболизме кремния, увеличивая толерантность трансгенных растений (Kumar et al., 2011). Для получения трансгенных растений культуры пересаживали на среды для регенерации. После трёх недель культивирования в контролируемых условиях освещенности с фотопериодом 18 ч/6 ч (свет/темнота) и при относительной влажности 70%, появились первые побеги. Побеги не имели собственной корневой системы и не обладали характерной для нормального растения табака морфологией. Следующий пассаж проводился на средах, стимулирующих корнеобразование (состав указан в материалах и методах.) В итоге были получены 6 линий растений, регенерированных из трансгенных культур. Все растения по внешнему виду не отличались от контрольных растений, изменений в скорости роста также не было выявлено.

Методами конфокальной микроскопии впервые удалось детектировать свечение EGFP в трансгенных клетках и каллусах. Это является подтверждением того, что в трансформированных клетках идут процессы синтеза химерного белка. На фотографиях видно, что основные места локализации белка LoSilA1 – мембрана клеток, ядро, и цитоплазма клеток устьица. В мембранах клеток трансгенный белок распределяется не равномерно, а в виде небольших скоплений. По поверхности клетки силикатеин может распределяться как в виде упорядоченных структур, так и в виде отдельных скоплений. Можно сделать предположение, что основные места накопления силикатеина в растительных клетках это мембраны и тельца включения. Такая локализация силикатеина может объяснять небольшое количество выделенного белка. Вероятно, силикатеин может экспрессироваться в нерастворимой форме, поэтому оказывается изолирован в тельца включения (Michaud, 2008).

Регенерированные растения, выращиваемые *in vitro*, и экспрессирующие ген силикатеина являются существенным продвижением для создания

предпосылок к использованию силикатеинов в промышленности, однако такие условия культивирования далеки от условий окружающей среды. Кроме этого, растения табака, выращиваемые на питательных средах, не успевают перейти к стадии цветения, и погибают по причине отсутствия достаточного количества питательных веществ. Важное преимущество растений, выращенных в почве – это возможность исследовать процесс наследования гена силикатеина. В случае наследования гена следующими поколениями можно говорить о стабильности трансформации.

На настоящий момент нами получены растущие в почве контрольные растения табака, экспрессирующие первую форму гена силикатеина (*LoSilA1*) морской роговой губки *L. oparinae*, а также растения, экспрессирующие ген силикатеина, слитый с геном *EGFP* (SG). Дальнейшее изучение этих растений, а также растений, полученных из их семян, позволит понять влияние гена силикатеина на растения.

Растения были использованы для проверки устойчивости к заражению вирусами растений. Для этого мы использовали ВОМ (Вирус Огуречной Мозаики). Ранее было показано, что при стрессе растения накапливают больше кремния, поскольку он является фактором неспецифической защиты от стрессов (Ma et al., 2006). В литературе (Ma et al., 2006) приводятся данные о том, что даже те виды растений, которые в норме не накапливают кремний при абиотическом или биотическом стрессе могут значительно увеличить накопление кремния. Индукция стресса (заражение вирусом) может стимулировать накопление кремния и привести к увеличению его концентрации в клетке. Мы предполагаем, что, в свою очередь, увеличение концентрации ионов кремния в растении может способствовать формированию кремниевых структур.

3.5. Влияние силикатеина на процессы фитосинтеза наночастиц серебра

Известно, что водные экстракты многих растений при смешивании с раствором нитрата серебра способны вызывать агрегацию и восстановление молекул металла с получением наночастиц размером от 1 до 100 нм. Полученные коллоидные растворы наночастиц серебра, как было показано, обладают уникальными бактерицидными свойствами (Gardea et al., 1999). Нами было проведено несколько экспериментов с целью проверки гипотезы: Обладают ли экстракты культур, экспрессирующих силикатеин, повышенной способностью к образованию наночастиц. При смешивании раствора нитрата серебра с экстрактами клеточных культур табака получили наночастицы, которые анализировали при помощи СЭМ. В результате при смешивании раствора нитрата серебра с экстрактами клеточных культур табака получили коллоидные растворы наночастиц серебра, обладающих характерной окраской (Рис. 20). Растворы наночастиц, полученные с помощью трансгенной культуры имели более тёмную окраску, что обычно свидетельствует о большем количестве наночастиц в растворе.



Рис. 20. Внешний вид растворов наночастиц серебра, полученных с помощью экстрактов нетрансгенной культуры табака и культуры табака, экспрессирующей ген силикатеина. Слева направо: K – раствор нитрата серебра без добавления экстракта, Nt – экстракт не трансгенной культуры с

добавлением нитрата серебра, Nt S1 – раствор нитрата серебра, смешанный с экстрактом культуры, экспрессирующей силикатеин.

При смешивании нитрата серебра с экстрактом трансгенных культур табака NtS1 реакция образования наночастиц идёт быстрее, чем при использовании экстрактов контрольных культур. Принимая во внимание, что точный механизм формирования наночастиц металлов с помощью экстрактов растений до сих пор остается неизвестным (Richardson et al., 2006, Li et al., 2007, Huang et al., 2007), можно предположить, что силикатеин участвует в процессе агрегации атомов серебра.

График, представленный на Рисунке 21, демонстрирует сравнение спектров поглощения растворов наночастиц сформированных при участии экстрактов контрольной культуры (Nt) и трансгенной культуры (S1). Из графика видно, что количество наночастиц сформированных с помощью экстракта трансгенной культуры в 3 раза больше, чем с помощью контрольной культуры табака. Ранее было показано, что силикатеин способен реагировать с солями и оксидами металлов. Это позволяет сделать предположение, что силикатеин участвует в процессе образования наночастиц серебра из раствора нитрата серебра. Кроме того, это косвенно свидетельствует о том, что силикатеин находится в растворимой форме в трансгенной клетке.

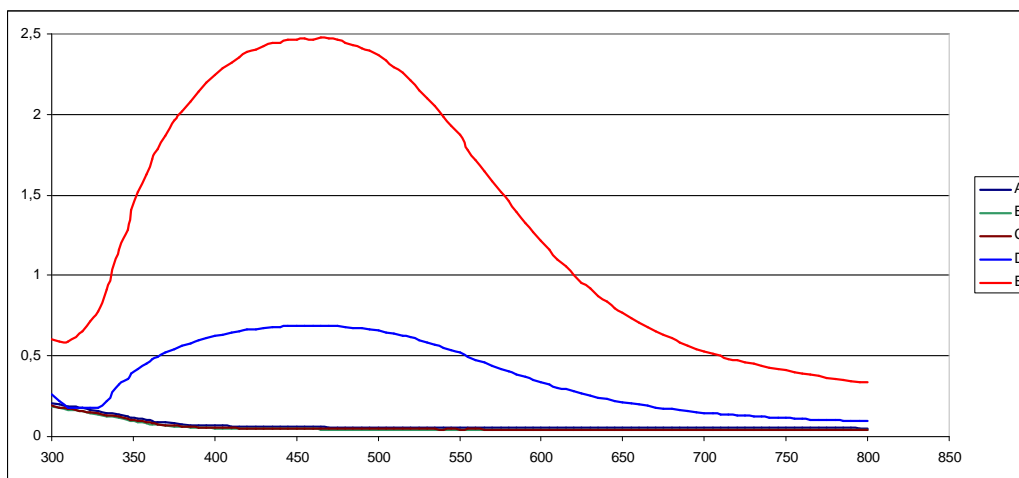


Рис. 21. Спектры растворов наночастиц сформированных с помощью Nt и S1.

A – пустая лунка планшета, B – вода, C – раствор AgNO_3 , D – Nt, E – NtS1

Для исследования состава наночастиц их осаждали из раствора, промывали водой и анализировали при помощи СЭМ и методов элементного анализа. На Рисунке 22 приведены результаты анализа частиц, полученных с экстрактами из клеток Nt и Nt-S1. Фитосинтез с применением культуры Nt приводил к образованию частиц размером около 100 нм, тогда как экстракт культуры Nt-S1 способствовал образованию более мелких частиц.

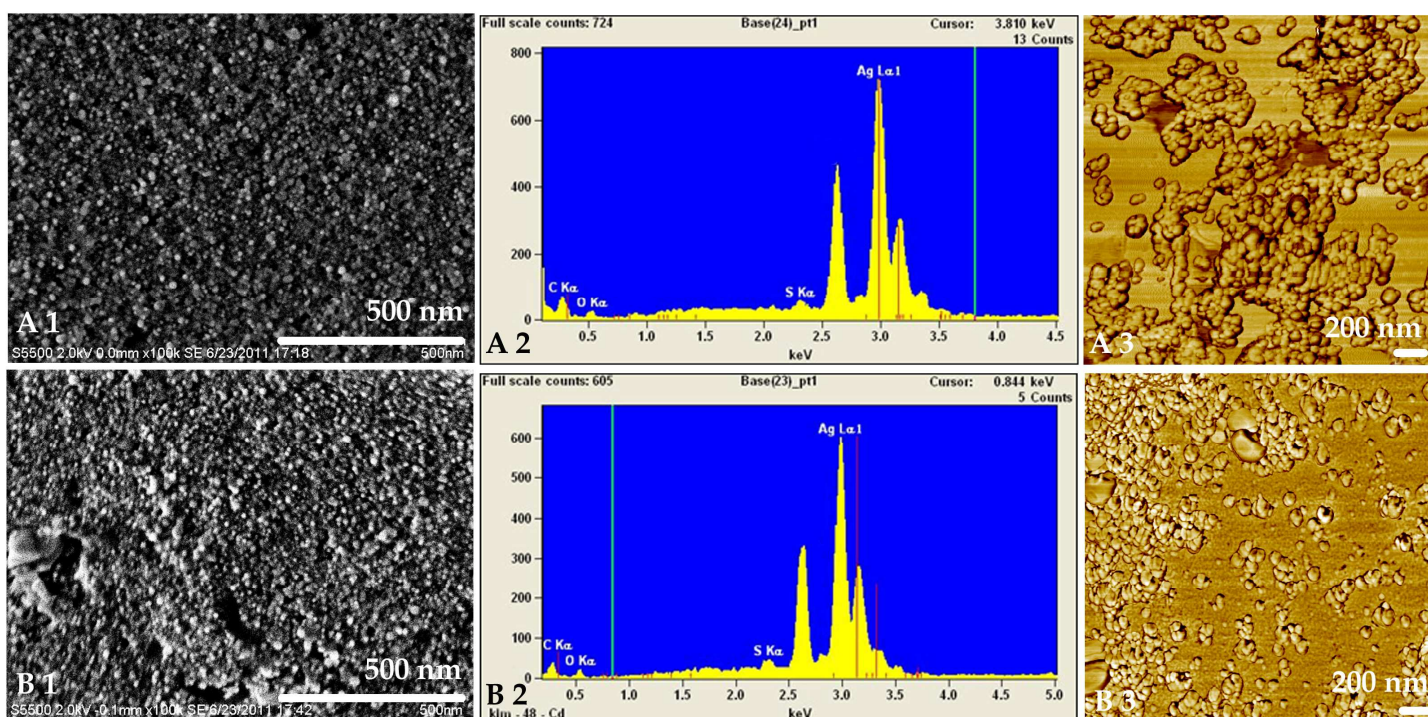


Рис. 22. Результаты анализа наночастиц серебра, полученных на основе экстрактов Nt (A) и Nt-S1 (B) 1- общий вид наночастиц, 2 – данные EDX анализа, 3 – данные АСМ исследования.

Проведенный элементный анализ показал, что полученные наночастицы действительно представляют собой частицы серебра (Рис. 21). Таким образом, было доказано, что экстракт трансгенной культуры табака, экспрессирующей *LoSilA1* ускоряет образование наночастиц серебра при смешивании с раствором AgNO_3 и вызывает образование более гомогенных мелких наночастиц в большем количестве, чем экстракт контрольной культуры табака. Этот факт

позволяет предположить, что использование культур клеток, трансформированных геном *LoSilA1* более перспективно для дальнейшего биотехнологического использования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Существующие способы получения соединений на основе оксида кремния оказались слишком энергоёмки, а кроме того, очень опасны для окружающей среды. Биомиметический способ получения упорядоченных структур на основе оксида кремния привлекает всё большее внимание, активно исследуют процессы биосилификации для создания новых материалов. Изучение механизма контролируемой полимеризации оксида кремния позволит создавать необходимые для промышленности структуры при минимальных затратах ресурсов и с наименьшим вредом для окружающей среды.

Особенно востребованы новые, необычные соединения и формы кремния для применения в активно развивающихся отраслях – оптике, электронике и вычислительной технике. Важными параметрами для кремнийсодержащих деталей является их размер и упорядоченность атомов кремния. В начале XXI века одними из наиболее перспективных белков для полимеризации кремния был признан силикатеин, формирующий спикулы губок. Было показано, что эти структуры обладают необычными физико-химическими свойствами: хорошо пропускают свет в видимом и ближнем ИК-диапазоне спектра электромагнитного излучения, обладают повышенной гибкостью, в сравнении с промышленными кварцевыми волоконными световодами и др. С точки зрения современной оптики и физики - спикулы при длине от 5 до 500 нм представляют собой новый вид природных биоминеральных фотонных кристаллов.

В ходе исследования спикул и силикатеинов было показано, что белок, как выделенный из спикулы, так и рекомбинантный, способен конденсировать молекулы предшественника – тетраэтоксисилана (ТЕОС), с образованием кремниевых наноструктур определенной формы в обычных условиях окружающей среды (Cha et al., 1999).

В данной работе описан процесс поиска и результаты клонирования гена силикатеина морской роговой губки *L. oparinae*, создание векторов для генетической трансформации бактерий и растений, а также получение

рекомбинантного белка силикатеина и результаты теста его каталитической активности. Был также изучен необычный силикатеиноподобный катепсин и сделаны предположения о происхождении и эволюции кремний-полимеризующих белков у морских губок.

Нами было впервые показано, что рекомбинантный силикатеин *LoSilA1* способен формировать отдельнолежащие кристаллы кремния, также как и силикатеиноподобный катепсин *LoCath*. Примечательно, что силикатеин способствует образованию редкой и практически не встречающейся в природе тетрагексаэдральной формы кристаллов оксида кремния. В работе нами было исследовано влияние силикатеина на культуры клеток, а также на растения *N. tabacum*. Была доказана экспрессия силикатеина в растительных клетках, а также впервые установлена локализация рекомбинантного белка в трансгенной клетке. Ранее не было известно о локализации рекомбинантного силикатеина в трансгенной клетке.

Полученные в ходе работы результаты позволяют заключить, что силикатеин *LoSilA1* может быть использован для биотехнологического пути синтеза упорядоченных кристаллических структур оксида кремния. Вероятно, что эволюционно он родственен катепсинам, что согласуется с существующей теорией.

Тот факт, что нам не удалось выделить белок из трансгенной культуры клеток, несмотря на высокие уровни экспрессии и подтверждённую локализацию в клетке может свидетельствовать о быстрой деградации после экстракции.

Кремний-полимеризующая активность катепсина также является ранее не известным свойством. Ранее была показана протеолитическая активность силикатеина, однако не было опубликовано данных о способности катепсинов формировать отдельно лежащие кристаллы оксида кремния. Мы предполагаем, что в основе этого процесса лежит общий для катепсина и силикатеин принцип формирования кремниевых структур.

Результаты исследования помогут создать предпосылки для начала биотехнологического использования кремний-полимеризующих белков, а также приблизят нас к пониманию фундаментальных процессов биоминерализации и, в частности, биосилификации.

ВЫВОДЫ

1. Определен относительный уровень экспрессии генов силикатеинов и катепсина морской губки *L. oparinae*. Установлено, что наиболее активно экспрессирующимися формами являются *LoSilA1* и *LoCath*.
2. Созданы генетические конструкции, содержащие ген силикатеина *LoSilA1*, ген катепсина *LoCath* и ген *LoSilA1* слитый с *EGFP*. Полученные конструкции могут быть использованы для эффективной трансформации бактериальных и растительных клеток.
3. Впервые было показано, что рекомбинантный силикатеин и катепсин, выделенный из прокариотической экспрессионной системы, способен формировать отдельнолежащие кристаллы кремния *in vitro*.
4. Получены трансгенные культуры клеток и растения *N. tabacum*, экспрессирующие силикатеин *LoSilA1*. Установлено, что основные области локализации рекомбинантного белка *LoSilA1* в клетках *N. tabacum* – мембрана, ядро и цитоплазма устьиц.
5. Впервые показано, что экспрессия силикатеина *LoSilA1* в трансгенных культурах *N. tabacum* приводит к повышению эффективности фитосинтеза наночастиц серебра.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

EDX – энергодисперсионный рентгенофлуоресцентный анализ

EGFP – Enhanced GFP

GFP – Green Fluorescent Protein

LB - Lysogeny broth (Литическая среда)

OD – Optical density (Оптическая плотность)

RB, LB – Right border, Left border (Левый и правый бордер)

SELDI - Surface-enhanced laser desorption/ionization (Поверхностная лазерная десорбция/ионизация)

А.О. – Аминокислотные остатки

АСМ – Атомный силовой микроскоп

АТФ – Аденозинтрифосфат

БСА – Бычий сывороточный альбумин

ВОМ – Вирус огуречной мозаики

ДНК – Дезоксирибонуклеиновая кислота

ДСН – Додecilсульфат натрия

ДТТ - Дитиотреитол

ИМК – индолилмасляная кислота

кДа – кило Дальтон

П.Н. – пары нуклеотидов

ПААГ - Полиакриамид

ПВП - поливинилпирролидон

ПМСФ - Фенилметилсульфонилфторид

СЭМ – Сканирующий электронный микроскоп

ТГЕОС - тетра-гидроксиэтил-ортосилан

ТЕОС - тетраэтилоротосилан

ЦКП – Центр коллективного пользования

ЦТАБ – Цетилтриметиламмония бромид

ЭДТА – этилен-диамин тетра-ацетат

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биологический энциклопедический словарь / Гл. ред. М .С. Гиляров. М ., "Сов. энциклопедия ", 1989. 864 стр., илл. [Электронная версия: Биологический энциклопедический словарь. - М.: ДиректМедия Паблишинг, 2006. - 9000 с.
2. Вознесенский С.С., Галкина А.Н., Кульчин Ю.Н., Сергеев А.А. Наноструктурированные морские биоминералы – перспективный прототип для биомиметического моделирования. // Российские нанотехнологии. 2010. Т. 5. № 1-2. С. 126-133.
3. Голубев С.Н. Реальные кристаллы в скелетах кокколитофорид. М.: Наука, 1981. 164 с.
4. Догель В.А. Д59 Зоология беспозвоночных: Учебник для ун-тов/Под ред. проф. Полянского Ю. И.—7-е изд., перераб. и доп. — М.: Высш. школа. 1981. с.606
5. Калюжная О.В. Поиск исследование силикатеинов пресноводных губок: автореф. дисс. канд. биол. наук. Владивосток: ТИБОХ ДВО РАН, 2007. 22 с.
6. Кульчин Ю.Н., Щербаков А.В., Дзюба В.П., Вознесенский С.С., Микаэлян Г.Т. Нелинейно-оптические свойства гетерогенных жидких нанофазных композитов на основе широкозонных наночастиц Al₂O₃. Квантовая электроника. 2008. Т. 58, № 1. 19 с.
7. Лабас Ю.А., Гордеева А.В., Фрадков А.Ф. Флуоресцирующие и цветные белки. // Природа. 2003. № 3.

8. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М., Мир, 1984, 480 стр.
9. Самсонова Н.Е. Роль кремния в формировании фосфатного режима дерново-подзолистых почв. // Агрoхимия. 2005. № 8. С. 11-18.
10. Тинланд Б. Интеграция Т-ДНК в геном растений: прототип и реальность (Т-ДНК агробактерий). // Физиология растений. 2000. - Т. 47. - №3.
11. Хилтон М.Д. Перенос новых генов в клетки растений. // В мире науки. 1983. № 8. С. 17.
12. Юшкин Н.П. и др. Происхождение биосферы и коэволюция минерального и биологического миров. ИГ Коми НЦ УрО РАН, 2007. 202 с.
13. Adachi K, Pang J, Konitzer P, Surrey S. Polymerization of recombinant hemoglobin F gamma E6V and hemoglobin F gamma E6V, gamma Q87T alone, and in mixtures with hemoglobin S. // Blood. 1996. 87(4):1617-1624.
14. Bäuerlein E. Biomineralization of unicellular organisms: an unusual membrane biochemistry for the production of inorganic nano- and microstructures. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2003. Vol. 10. № 42. P. 614-641.
15. Bawazer L., Izumi M., Kolodin D., Neilson J., Schwenzer B., Morse D., Evolutionary selection of enzymatically synthesized semiconductors from biomimetic mineralization vesicles. // Proc. Natl. Acad. Sci., 2012 Vol. 109, P. 1705

16. Belikov S.I., Kaluzhnaya O.V., Schöder H.C., Krasko A., Müller I.M., Müller W.E. Expression of silicatein in spicules from the Baikalian sponge *Lubomirskia baicalensis*. // Cell Biol. Int. 2005. Vol. 29. P. 943-951.
17. Blakemore P.R. Magnetotactic bacteria. // Science. 1975. Vol. 190. № 4212. P. 377-379.
18. Bradford M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.
19. Broothaerts W., Mitchell H.J., Weir B, Kaines S, Smith L.M., Yang W., Mayer J.E., Roa-Rodríguez C., Jefferson R.A. Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. // Nature. 2005;433(7026):629-633.
20. Bucher M.H., Evdokimov A.G., Waugh D.S. Differential effects of short affinity tags on the crystallization of *Pyrococcus furiosus* maltodextrin-binding protein. // Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2002. 58(Pt 3):392-397.
21. Bulgakov V.P., Kiselev K.V., Yakovlev K.V., Zhuravlev Y.N., Gontcharov A.A., Odintsova N.A. Agrobacterium-mediated transformation of sea urchin embryos. // Biotechnol J. 2006. 454-461.
22. Cabrita D., Dai W., Bottomley S. A family of *E. coli* expression vectors for laboratory scale and high throughput soluble protein production. // BMC Biotechnology. 2006.
23. Cao X., Fu W., Yu X., Zhang W. Dynamics of spicule production in the marine sponge *Hymeniacidon perlevis* during in vitro cell culture and seasonal development in the field. // Cell Tissue Res. 2007.

24. Cha J., Shimizu K., Zhou Y., Christiansen S., Chmelka B., Stucky G., Morse D., Silicatein filaments and subunits from a marine sponge direct the polymerization of silica and silicones in vitro. // Proc. Natl. Acad. Sci., 1999 Vol. 96. P 361.
25. Cha J.N. Shimizu K, Zhou Y., Christiansen S.C., Chmelka B.F., Stuck G.D., Morse D.E. Silicatein filaments and subunits from a marine sponge direct the polymerization of silica and silicones in vitro. // PNAS. 1999. № 96. P. 361-365.
26. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. // Anal Biochem. 1987. Vol. 162 № 1. P. 156-159.
27. Coradin T., Coupe A., Livage J., Sol-Gel Biopolymer/Silica Nanocomposites in Biotechnology. // Colloid. Surface. B., 2003 Vol. 29, P. 189.
28. Curnow P., Bessette P., Kisailus D., Murr M., Daugherty P., Morse D. Enzymatic synthesis of layered titanium phosphates at low temperature and neutral pH by cell-surface display of silicatein- α . J. // Am. Chem. Soc. 2005. V. 127. P. 15749-15755.
29. Cusack M., Freer A. Biomineralization: elemental and organic influence in carbonate systems. // Chem. Rev. 2008. № 108. P. 4433-4454.
30. De Deckker P. On the celestite-secreting Acantharia and their effect on seawater strontium to calcium ratios. // Hydrobiologia. 2004. № 517. P. 1-13.
31. Ehrlich H., Demadis K.D., Pokrovsky O.S., Koutsoukos P.G. Modern views on desilicification: biosilica and abiotic silica dissolution in natural and artificial environments. // Chem. Rev. Article ASAP. 2010.

32. Fairhead M., Johnson K.A., Kowatz T., McMahon S.A., Carter L.G., Oke M., Liu H., Naismith J.H. Walle C.F. Crystal structure and silica condensing activities of silicatein α -cathepsin L chimeras. // ChemComm. P.1765-1767.
33. Fischer H., Robl I., Sumper I., Kroger N. Targeting and covalent modification of cell wall and membrane proteins heterologously expressed in the diatom *Cylindrotheca fusiformis* (BACILLARIOPHYCEAE). // J. Phycol. 1999. Vol. 35. №1. P. 113-120.
34. Fischer Z.S. Neutron structure of human carbonic anhydrase II: implications for proton transfer. // Biochem. 2010. Vol. 49 №3. P. 415-421.
35. Gardea-Torresdey J.L., Tiemann K.J., Gamez G, Dokken K. J. Hazard Mater Effects of chemical competition for multi-metal binding by *Medicago sativa* (alfalfa). // Journal of Hazardous Materials. Vol. 69. №1. P. 41.
36. Geers C., Gros G. Carbon dioxide transport and carbonic anhydrase in blood and muscle. // Physiol. Rev. 2000. Vol. 80. № 2. P. 681-715.
37. Gelvin S.B. Agrobacterium and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. // Annu rev plant physiol plant mol biol. 2000. 51:223-256.
38. Gotliv B.A. Addadi L., Weiner S. Mollusk shell acidic proteins: in search of individual functions. // Chem. Biochem. 2003. Vol. 4. P. 522-529.
39. Grünberg K., Müller E.C., Otto A., Reszka R., Linder D., Kube M., Reinhardt R., Shuler D. Biochemical and proteomic analysis of the magnetosome membrane in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. // Appl. Environ. Microbiol. 2004. Vol. 70. № 2. P. 1040-1050.

40. Heaney P.: Reviews in Mineralogy. // Mineralogical Society of America, Washington, D.C., 1994 Vol. 29.
41. Henriksen K. Young J., Bown, Stipp, S.L.S. Coccolith biomineralisation studied with atomic force microscopy. // Palaeontology. 2004. № 47. P. 725-743.
42. Hildebrand M. Dahlin K., Volcani B.E. Characterization of a silicon transporter gene family in *Cylindrotheca fusiformis*: sequences, expression analysis, and identification of homologs in other diatoms. // Mol. Gen. Genet. 1998. Vol. 260. P. 480-486.
43. Hildebrand M. Volcani B.E., Gassmann W., Schroeder J.I. A gene family of silicon transporters. // Nature. 1997. Vol. 385. P. 688-689.
44. Hochuli E, Döbeli H, Schacher A.J. New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. // Chromatogr. 1987 Vol. 18 №411 P. 177-184.
45. Huang Y, Hsu L, Chang Y. J Comprehensive characterization of ambient nanoparticles collected near an industrial science park: particle size distributions and relationships with environmental factors. // Environ Sci (China). 2011. Vol. 23 №8 P. 1334-1341.
46. Julian K.M., Pascal M.W., Drake C., Paul Christou. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. // Nature reviews, Genetics V.4., 2003
47. Kaluzhnaya O.V., Belikov S.I., Schroder H.C., Rothenberge M. Zapf S., Kaandorp J.A., Borejko A., Müller I.M., Müller W.E.G. Dynamics of skeleton

formation in the Lake Baikal sponge *Lubomirskia baicalensis*. Part I. Biological and biochemical studies. // *Naturwissenschaften*. 2005. Vol. 92. P. 128 – 133

48. Ki M.R., Jang E.K., Pack S., Expression, reconstruction and characterization of codon-optimized carbonic anhydrase from *Hahella chejuensis* for CO₂ sequestration application. // *Process Biochem.*, 2013 Vol. 49 P. 95.
49. Kisailus D, Truong Q, Amemiya Y, Weaver J.C., Morse D.E. Self-assembled bifunctional surface mimics an enzymatic and templating protein for the synthesis of a metal oxide semiconductor. // *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 Vol. 103 №15 P. 5652
50. Komeili A. Magnetosomes are cell membrane invaginations organized by the actin-like protein MamK. // *Science*. 2006. Vol. 311. № 5758. P. 242-245.
51. Kozhemyako V.B., Veremeichik G., Shkryl Y., Kovalchuk S., Krasokhin V., Rasskazov V., Zhuravlev Y.N., Bulgakov V.P., Kulchin Y.N., // *Mar. Biotechnol.*, 2010 Vol. 12, P. 403.
52. Krasko A., Lorenz B., Batel R., Schröder H.C., Müller I.M., Müller W.E. Expression of silicatein and collagen genes in the marine sponge *Suberites domuncula* is controlled by silicate and myotrophin. // *Eur. J. Biochem.* 2000. Vol. 267. P. 4878-4887.
53. Kroger C., Lutz K., Brunner E. Biomolecular Self-assembly and its Relevance in Silica Biomineralization. // *Eur J Cell Biol.* 2007. Vol. 86. P. 473-487.
54. Kröger N., Bergsdorf C., Sumper M., A new calcium binding glycoprotein family constitutes a major diatom cell wall component. // *EMBO J.* 1994. № 13. P. 4676-4683.

55. Kröger N., Bergsdorf C., Sumper M., Frustulins: domain conservation in a protein family associated with diatom cell walls. // *Eur. J. Biochem.* 1996. № 239. P. 259-264.
56. Kröger N., Deutzmann R., Bergsdorf C., Sumper M., Species-specific polyamines from diatoms control silica morphology. // *PNAS.* 2000. Vol. 97(26). P. 14133-14138.
57. Kröger N., Deutzmann R., Sumper M. Silica-precipitating peptides from Diatoms. The chemical structure of silaffin-1A from *Cylindrotheca fusiformis*. // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276, № 28. P. 26066-26070.
58. Kröger N., Deutzmann R., Sumper M., Polycationic peptides from diatom biosilica that direct silica nanosphere formation. // *Science.* 1999. Vol. 286. P. 1129–1132.
59. Kröger N., Lehmann G., Rachel R., Sumper M. Characterization of a 200-kDa diatom protein that is specifically associated with a silica-based substructure of the cell wall. // *Eur. J. Biochem.* 1997. Vol. 250. № 1. P. 99-105.
60. Kröger N., Poulsen N. Diatoms - from cell wall biogenesis to nanotechnology. // *Ann. Rev. Genet.* 2008. № 42. P. 83-107.
61. Kröger N., Prescribing diatom morphology: toward genetic engineering of biological nanomaterials. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2007. № 11. P. 662-669.
62. Kröger N., The molecular basis of nacre formation. // *Science.* 2009. № 325. P. 1351-1352.

63. Kröger N., Wetherbee R. Pleuralins are involved in theca differentiation in the diatom *Cylindrotheca fusiformis*. // *Protist*. 2000. № 151. P. 263-273.
64. Kumar S.P., Darshit P., Ankita P., Palak D., Ram Pr. Pradip P. Kaliaperumal S. Biogenic synthesis of silver nanoparticles using *Nicotiana tobaccum* leaf extract and study of their antibacterial effect. // *African Journal of Biotechnology* 2011 Vol. 10 №41, P. 8122-8130
65. Kunik T., Tzfira T., Kapulnik Y., Gafni Y., Dingwall C., Citovsky V. Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*. // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001. Vol. 98 №4 P. 1871-1876.
66. Laemmli U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage // *Nature*. 1970. V. 227. P. 680–685.
67. Layfield R., Lowe J., Bedford L. The ubiquitin-proteasome system and neurodegenerative disorders. // *Essays Biochem*. 2005 Vol. 41 P. 157-171.
68. Levi C., Barton J. L., Guillemet C., Le Bras E., Lehuede P. A remarkably strong natural glassy rod: the anchoring spicule of the *Monorhaphis* sponge. *Journal of materials science letters*. 1989 Vol. 8. P. 337-339
69. Liénard D., Sourrouille C., Gomord V., Faye L. Pharming and transgenic plants. // *Biotechnol Annu Rev*. 2007 Vo. 13 P. 115-147.
70. Lowenstam H.A, Weiner S. *On biomineralization*. N.Y.; // Oxford University Press. 1989.

71. Luciano G.F, Timothy R.R., Haynes P.A., Hildebrand M. Identification of Proteins from a Cell Wall Fraction of the Diatom *Thalassiosira pseudonana*. // Molecular & Cellular Proteomics. 2008 Vol. 5. P. 182-193
72. M. Dickerson, K. Sandhage, R. Naik, Protein- and peptide-directed syntheses of inorganic materials. // Chem. Rev., 2008 Vol. 108, P. 4935.
73. Ma J.F. N.Yamaji. Silicon uptake and accumulation in higher plants. Research Institute for Bioresources. // TRENDS in Plant Science, Abiotic stress series. 2006 Vol.11 No.8
74. Matz, M., Shagin, D., Bogdanova, O., Lukyanov, S., Diatchenko, L., and Chenchik, A., Amplification of cDNA ends based on template-switching effect and step-out PCR. // Nucleic Acids Res. 1999 Vol. 2 P. 1558-1560.
75. Merle C., Perret S., Lacour T., Jonval V., Hudaverdian S., Garrone R., Ruggiero F., Theisen M.. Hydroxylated human homotrimeric collagen I in *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transient expression and in transgenic tobacco plant. // FEBS Lett. 2002. Vol. 515 P. 114.
76. Meyers M.A., Chen P.Y., Lin A.Y.M., Seki Y. Biological materials: Structure and mechanical properties. // United States Progress in Materials Science. 2008 Vol. 53. №1 P. 206.
77. Michaud D. V., Thierry C., Gomord V., Faye L., Stability of Recombinant Proteins in Plants. // Methods in Biotechnology. Humana Press Inc. 2008
78. Mikosch T.S., Lavrijssen B., Sonnenberg A.S., van Griensven L.J. Transformation of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* (Lange) using T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens*. // Curr Genet. 2001 Vol. 39 №1 P 35-39

79. Mohanpuria P. Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications. // *J Nanopart Res.* 2008. Vol. 10. P. 507-517.
80. Müller W., Boreiko A, Xmachera U. Schlo, Wangb Xiaohong., Fractal-related assembly of the axial filament in the demosponge. // *Biomaterials.*, 1999 Vol. 27. P.569–574.
81. Müller W., Boreiko A., Wang X., Belikov S., Weins M., Grebenjuk V., Schlobmacher U., Schroder H. Silicateins, the major biosilica forming enzymes present in demospoges: Protein analysis and phylogenetic relationship. // *Gene.* 2007a. V. 395. P. 62-71.
82. Müller W.E., Schröder H.C., Pisignano D., Markl J.S., Wang X. Metazoan circadian rhythm: toward an understanding of a light-based zeitgeber in sponges. // *Integr Comp Biol.* 2013 Vol. 53 №1 P. 103-117.
83. Müller W.E.G., Mugnaioli E., Heinz C., Schloßmacher U., Giovine M., Kolb U., Wang X. Hierarchical composition of the axial filament from spicules of the siliceous sponge *Suberites domuncula*: from biosilica-synthesizing nanofibrils to structure and morphology-guiding triangular stems. // Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012.
84. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. // *Physiol Plant.* 1962 Vol. 15 №3 P 473-497.
85. Nagai K, Thogersen H.C. Synthesis and sequence-specific proteolysis of hybrid proteins produced in *Escherichia coli*. // *Methods Enzymol.* 1987 Vol. 153 P. 461-481.

86. Natalio F., Mugnaioli E, Wiens M, Wang X, Schröder HC, Tahir MN, Tremel W, Kolb U, Müller WE. Silicatein-mediated incorporation of titanium into spicules from the demosponge *Suberites domuncula*. // *Cell Tissue Res.* 2010 Vol. 339 №2 P. 429-436.
87. Nune S.K., Chanda N., Shukla R., Katti K., Kulkarni R.R., Thilakavathi S., Mekapothula S., Kannan R. Green Nanotechnology from Tea: Phytochemicals in Tea as Building Blocks for Production of Biocompatible Gold Nanoparticles. // *J Mater Chem.* 2009 Vo. 19 №19 P. 2912-2920.
88. 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., Fromm M.E. An improved green fluorescent protein gene as a vital marker in plants. // *Plant Physiol.* 1996 Vol. 112 №3 P. 893-900.
89. Piers K.L., Heath J.D., Liang X., Stephens K.M., Nester E.W. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of yeast. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Vol. 93 №4 P. 1613.
90. Plasson C., Michel R., Lienard D., Saint-Jore-Dupas C., Sourrouille C., de March G.G., Gomord V. Production of Recombinant Proteins in Suspension-Cultured Plant Cells. // *Methods in Molecular Biology.* 2009. Vol. 483. P. 145-161.
91. Porath J., Carlsson J., Olsson I., Belfrage G. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. // *Nature.* 1975 Vol. 258 №5536 P. 598-599.
92. Reiswig H.M. Class Hexactinellida Schmidt 1870. *Systema Porifera: A Guide to the Classification of Sponges.* NY. 2002.
93. Rhonda L. *The Ubiquitin-Proteasome System.* // Portland Press, London, 2005

94. Richardson H.H., Hickman Z.N., Govorov A.O., Thomas A.C., Zhang W., Kordesch M.E. Thermo-optical properties of gold nanoparticles embedded in ice: characterization of heat generation and melting. // *Nano Lett.* 2006 Vol. 4 P. 783-738.
95. Schroder H. Silicateins, the major biosilica forming enzymes present in demosponges: Protein analysis and phylogenetic relationship. // *Gene.* 2007. Vol. 395. P. 62-71.
96. Schroder H., Boreiko A., Korzhev M., Tahir M N., Tremel W., Eckert C., Ushijima H., Müller M., Werner E., Müller G., Matrix – guided formation of siliceous spicules in the marine demosponge *Suberites domuncula*. Co-expression and Functional Interaction of Silicatein with Galectin. // *The journal of biological chemistry.*, 2006 Vol. 281, P.12001–12009.
97. Schroder H., Brandt D., Schlobmacher U., Wang X., Tahir M.N., Tremel W., Belikov S., Müller W. Enzymatic production of biosilica glass using enzymes from sponges: basic aspects and application in nanobiotechnology (material sciences and medicine). // *Naturwissenschaften.* 2007. Vol. 94. P. 339-359.
98. Schröder H.C. Krasko A, Le Pennec G, Adell T, Wiens M, Hassanein H, Müller IM, Müller WE. Silicase, an enzyme which degrades biogenous amorphous silica: contribution to the metabolism of silica deposition in the demosponge *Suberites domuncula*. // *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 2003. № 33. P. 249-268.
99. Schröder H.C. Krasko A, Brandt D, Wiens, Tahir M, Tremel W, Müller W. E.G.. Silicateins, silicase and spicule-associated proteins: synthesis of demosponge silica skeleton and nanobiotechnological applications. // *Biodiversity, Innovation and Sustainability.* 2007. P. 581-592.

100. Schröder H.C. Silicatein: Nanobiotechnological and Biomedical Applications . Biosilica in Evolution, Morphogenesis and Nanobiotechnology. // Progress in Molecular and Subcellular Biology, Marine Molecular Biotechnology. 2009. № 47.
101. Schroder H.C., Xiaohong W., Tremel W., Ushijima H., Müller W. Biofabrication of biosilica-glass by living organisms. // Natural Product Report. 2008. Vol. 25. P. 433-636.
102. Schüler D. Genetics and cell biology of magnetosome formation in magnetotactic bacteria. // FEMS Microbiol Rev. 2008. Vol. 32. № 4. P. 654-672.
103. Shankar S.S., Rai A., Ankamwar B., Singh A., Ahmad A., Sastry M. Biological synthesis of triangular gold nanoprisms. // Nat Mater. 2004 Vol. 7 P. 482-488.
104. Sheng J., Citovsky V.. Agrobacterium-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel. // Plant Cell. 1996 Vol. 10 P.1699-1710.
105. Shimizu K., Cha J., Stucky G., Morse D. Silicatein α : Cathepsin L-like protein in sponge biosilica. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. Vol. 95. P. 6234-6238.
106. Shimomura O. Kaibogaku Z. Is green fluorescent protein (GFP) a gift of heaven? 2010 Vol. 85 №3 P. 99-106.
107. Shiomi T., Tsunoda T., Kawai A., Chiuku H., Mizukami F., Sakaguchi K., Synthesis of protein-silica hybrid hollow particles through the combination of protein catalysts and sonochemical treatment. // Chem. Commun. 2005 Vol. 14. P. 5325.

108. Sinha A., Mishra T., Ravishankar N.. Polymer assisted hydroxyapatite microspheres suitable for biomedical application. // *J Mater Sci Mater Med.* 2008 Vol. 19 №5.
109. Skinner H.C.W., Jahren A.H. Biomineralization. // *Treatise on Geochemistry.* Elsevier. 2003. Vol. 8. P. 117-184.
110. Sly W.S., Hu P.Y. Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies. // *Ann. Rev. Biochem.* 1995. № 64. P. 375-401.
111. Smith J.C., Derbyshire R.B., Cook E, Dunthorne L, Viney J, Brewer S.J., Sassenfeld H.M., Bell L.D. Chemical synthesis and cloning of a poly(arginine)-coding gene fragment designed to aid polypeptide purification. // *Gene.* 1984. 32(3):321-327.
112. Stephen J. Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants. // *Plant Biotechnology Journal.* 2007 Vol. 5. P. 2–15.
113. Tahir M.N., Theato P., Müller W., Schroder H., Borejko A., Faib S., Janshoff A., Huth J., Tremel W. Formation of layered titania and zirconia catalysed by surface-bound silicatein. // *Chem. Commun.* 2005. P. 5533-5535.
114. Tahir M.N., Theato P., Müller W., Schroder H., Janshoff A., Zhang J., Huth J., Tremel W. Monitoring the formation of biosilica catalysed by histidine-tagged silicatein. // *Chem. Commun.* 2004. P. 2848-2849.
115. Taoka A., Asada R., Wu L.F., Fukumori Y. Polymerization of the actin-like protein MamK, which is associated with mag-netosomes. // *J. Bacteriol.* 2007. Vol. 189. № 23. P. 8737-8740.

116. Terpe K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. // *Appl Microbiol Biotechnol.* 2003 Vol. 60 №5 P. 523-533.
117. Terpe K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. // Springer-Verlag 2002
118. Thibaud C., Lopez P.J., Gautier C., Livag J. From biogenic to biomimetic silica. // *Palevol.* 2004. Vol. 3. P. 443 - 452.
119. Tinland B., Hohn B. Recombination between prokaryotic and eukaryotic DNA: integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA into the plant genome. // *Genet Eng* 1995 Vol. 17. P. 209-229.
120. Valentine L. *Agrobacterium tumefaciens* and the plant: the David and Goliath of modern genetics. // *Plant Physiol.* 2003. Vol. 133 №3 P. 948-955.
121. Venediktova A.A., Falameeva O.V., Kolosova N.G., Sadovoj M.A., Korolenko T.A. Cathepsin K and matrix metalloproteases activities in bone tissue of the OXYS and Wistar rats during the development of osteoporosis. // *Biochem. Suppl. Ser. B. Biomed. Chem.* 2009. Vol. 3. № 4. P. 393-398.
122. Von Maltzahn G, Harris T.J., Park J.H., Min D.H., Schmidt A.J., Sailor M.J., Bhatia S.N. Nanoparticle self-assembly gated by logical proteolytic triggers. // *J Am Chem Soc.* 2007 Vol. 129 №19 P. 6064-6065.
123. Weaver J.C., Morse D.E. Molecular biology of demosponge axial filaments and their roles in biosilicification. // *Microsc Res Tech.* 2003 Vol. 62 №4 P. 356-367.

124. Wu J., Filutowicz M. Hexahistidine (His₆)-tag dependent protein dimerization: a cautionary tale. // *Acta Biochim Pol.* 1999 Vol. 46 №3 P. 591-599.

125. Young J.R., Davis S.A., Bown P.R., Mann S. Coccolith ultrastructure and biomineralisation. *J. Struct. Biol.* 1999. № 126. P. 195-215.