

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор ІКБГІ НАН України,
академік НАН України


Микола КУЧУК

9 березня 2023 р.



РОБОЧА ПРОГРАМА НАВЧАЛЬНОЇ ДИСЦИПЛІНИ

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

для здобувачів вищої освіти ступеня доктора філософії

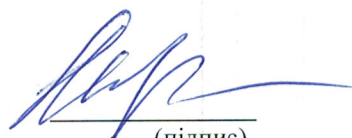
галузь знань 09 «Біологія»

спеціальність 091 «Біологія та біохімія»

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

Робоча програма навчальної дисципліни «Механізми регуляції експресії генів в еукаріотичних клітинах та їх застосування в сучасній біотехнології» для здобувачів вищої освіти ступеня доктор філософії галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія та біохімія» за профілями підготовки «Біотехнологія», «Цитологія, клітинна біологія, гістологія», «Радіобіологія».
7 березня 2023 року – 17 с.

Укладач програми:
Наталія ЩЕРБАК,
с.н.с. відділу генетичної інженерії
ІКБГІ НАН України, к.б.н.


(підпис)

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

В зв'язку з внесенням змін до переліку галузей знань і спеціальностей, за якими здійснюється підготовка здобувачів вищої освіти (постанова КМУ від 16 грудня 2022 р. № 1392), внесено відповідні зміни до робочої програми дисципліни «Механізми регуляції експресії генів в еукаріотичних клітинах та їх застосування в сучасній біотехнології», що схвалено на засіданні вченої ради ІКБГІ НАН України (протокол № 2 від 7 березня 2023 року).

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

Завідувач відділу акад. НАН України


(підпис) Микола КУЧУК

6 березня 2023 р.

ВСТУП

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

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

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

Завдання:

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

В результаті вивчення навчальної дисципліни аспірант повинен

знати:

- основні поняття, визначення, термінологію молекулярної біології, що стосується регуляції експресії генів;
- модулі еукаріотичного промотору РНК полімерази II, основні підходи, які використовуються при створенні штучних промоторів, можливості їх використання для проведення фундаментальних досліджень та для досягнення оптимального практичного результату;
- основні типи регуляторних послідовностей та принципи їх використання у векторах для генетичної трансформації та транз'єнтної експресії рекомбінантних білків у рослинах;

- особливості організації геному пластид та мітохондрій та особливості векторів, що використовуються для отримання транспластомних рослин;

вміти:

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

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

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

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

ПРОГРАМА НАВЧАЛЬНОЇ ДИСЦИПЛІНИ.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Лекцій – **30** годин

Семінари – **4** годин

Практичні заняття – **2** годин

Самостійна робота – **4** годин

ЗМІСТОВИЙ МОДУЛЬ 1.

Регуляція експресії генів на рівні транскрипції та трансляції.

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

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

Рекомендована література: [1-4, 13, 38, 43, 44, 50]

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

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

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

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

Рекомендована література: [3, 13, 16, 18, 20, 27, 33, 52, 61, 64, 65, 68, 69, 72]

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

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

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

Рекомендована література: [22, 23, 25, 30, 42]

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

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

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

Рекомендована література: [7, 8, 10, 14, 17, 34, 75]

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

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

Рекомендована література: [1, 4, 21, 35, 46-49, 56, 74]

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

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

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

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

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

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

ЗМІСТОВИЙ МОДУЛЬ 2.

Глобальна регуляція експресії генів в еукаріотичних клітинах.

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

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

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

Рекомендована література: [2, 4, 9, 11-12, 31, 36, 39, 40, 62, 71]

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

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

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

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

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

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

Рекомендована література: [1, 2, 6, 15, 26, 29, 36, 41, 45, 51, 54, 59, 63, 66, 67, 73,78]

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

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

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

Рекомендована література: [2, 5, 19, 28, 32, 60, 77]

Семінар 2. Залік. (2 години)

КОНТРОЛЬ ЗНАНЬ І РОЗПОДІЛ БАЛІВ, ЯКІ ОТРИМУЮТЬ ЗДОБУВАЧІ

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

Оцінювання за формами поточного контролю:

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

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

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

Шкала оцінювання академічної успішності аспіранта

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

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

Технічні засоби навчання Проектор мультимедійний; ноутбук.

Матеріальне забезпечення дисципліни Аудиторії, лабораторні приміщення відділу генетичної інженерії.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

Рекомендована основна література

1. Сиволоб А.В. Молекулярна біологія : підручник // А.В. Сиволоб. – К. : Видавничо-поліграф. центр “Київський університет”, 2008. – 384 с. ISBN 978-966-439-068-9.
2. Сиволоб А.В., Афанасьєва К.С. Молекулярна організація хромосом. К: Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет" / В. В. Барціховський, П. Я. Шерстюк. — К.: — ВСВ «Медицина», 2011. — 312 с. ISBN 978-617-505-146-7
3. Dey N, Sarkar S., Acharya S., Maiti I. B. Synthetic promoters in planta // Planta – 2015 – V. 242(5). – P. 1077-1094. DOI:10.1007/s00425-015-2377-2
4. Krebs J.E., Lewin B., Goldstein E.S., Kilpatrick S.T. Lewin's Genes XI. Jones & Bartlett Learning titles in biological science. Jones & Bartlett Publishers, 2014 - 940 p. ISBN: 978-1-4496-5985-1
5. Kumar S., Mohapatra T. Dynamics of DNA Methylation and Its Functions in Plant Growth and Development // Front. Plant Sci. – 2021 – V. 12:596236. doi: 10.3389/fpls.2021.596236
6. Saurabh S, Vidyarthi AS, Prasad D (2014). RNA interference: concept to reality in crop improvement // Planta – 2014 – V. 239 (3) – P. 543–64. doi:10.1007/s00425-013-2019-5
7. Woodson J.D., Chory J. Coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes // Nat. Rev. Genet. – 2008 – V. 9. - P. 383–395. doi: 10.1038/nrg2348.

8. Yagi Yu., Shiina T. Recent advances in the study of chloroplast gene expression and its evolution // *Front Plant Sci.* – 2014 – V. 5:61. doi: [10.3389/fpls.2014.00061](https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00061)

Рекомендована додаткова література

9. Abranches R., Shultz R.W., Thompson W.F. et al. Matrix attachment regions and regulated transcription increase and stabilize transgene expression // *Plant Biotechnol J.* – 2005. – V. 3(5). – P. 535–543.
10. Ahmad N., Michoux F., Lössl A.G., Nixon P.J. Challenges and perspectives in commercializing plastid transformation technology // *J Exp Bot.* – 2016 – V. 67(21). – P. 5945–5960. doi: [10.1093/jxb/erw360](https://doi.org/10.1093/jxb/erw360)
11. Allen G.C., Hall G.E., Michalowski S. et al. High-level transgene expression in plant cells: effects of a strong scaffold attachment region from tobacco // *Plant Cell.* – 1996. – V. 8(5). – P. 899–913.
12. Allen G.C., Spiker S., Thompson W.F. Use of matrix attachment regions (MARs) to minimize transgene silencing // *Plant Mol. Biol.* – 2000. – V. 43(2–3). – P. 361–76.
13. Aysha J, Noman M, Wang F et al. Synthetic Promoters: Designing the cis Regulatory Modules for Controlled Gene Expression // *Molecular Biotechnology* - 2018 – V. 60(8). – P. 608–620. <https://doi.org/10.1007/s12033-018-0089-0>
14. Barkan A. Expression of plastid genes: organelle-specific elaborations on a prokaryotic scaffold // *Plant Physiol.* – 2011. – V. 155(4). – P. 1520–1532. doi: [10.1104/pp.110.171231](https://doi.org/10.1104/pp.110.171231)
15. Baulcombe D. RNA silencing in plants // *Nature* – 2004 – V. 431(7006). – P. 356–363.
16. Benfey P.N., Ren L., Chua N.H. Tissue-specific expression from CaMV 35S enhancer subdomains in early stages of plant development // *EMBO J.* – 1990. – V. 9(6). – P. 1677–1684.
17. Berecz B., Zelenyánszki H., Pólya S., Tamás-Nyitrai C., Oszvald M. Plastid Molecular Pharming. Production of Oral Vaccines via Plastid Transformation // *Mini Rev Med Chem.* – 2017. – V. 17(13). – P. 1292–1315. doi: [10.2174/1389557516666161004161801](https://doi.org/10.2174/1389557516666161004161801).
18. Bevan M. Binary Agrobacterium vectors for plant transformation // *Nucleic Acids Res.* – 1984. – V. 12. – P. 8711–8721.
19. Bestor T. H. DNA methylation: Evolution of a bacterial immune function into a regulator of gene expression and genome structure in higher eukaryotes // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* – 1990 – 326. – P. 179–187.
20. Bhullar S. Chakravarthy S., Advani S. et al. Strategies for development of functionally equivalent promoters with minimum sequence homology for transgene expression in plants: cis-elements in a novel DNA context versus domain swapping // *Plant Physiol.* – 2003. – V. 132 (2). – P. 988–998.
21. Bouabe H., Fassler R., Heesemann J. Improvement of reporter activity by IRES-mediated polycistronic reporter system // *Nucleic Acids Res* – 2008 – V. 36(5):e28. doi: [10.1093/nar/gkm1119](https://doi.org/10.1093/nar/gkm1119)

22. Branton D., Deamer D. W., Marziali A., Bayley H., Benner S. A. The potential and challenges of nanopore sequencing // *Nature biotechnology*. — 2008 - V. 26, (10). — P. 1146–1153. doi:10.1038/nbt
23. Benes V., Castoldi M. Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available // *Methods* - 2010. — V. 50 (4). — P. 244—249. — doi:10.1016/j.ymeth.2010.01.026
24. Buchon N., Vaury C. RNAi: a defensive RNA-silencing against viruses and transposable elements // *Heredity* — 2006. — V. 96 (2). — P. 195—202. doi:10.1038/sj.hdy.6800789
25. Bumgarner R. Overview of DNA microarrays: types, applications, and their future // *Current Protocols in Molecular Biology*. — 2013-01-01. — T. Chapter 22. — C. Unit 22.1. doi:10.1002/0471142727.mb2201s101
26. Carrington J., Ambros V. Role of microRNAs in plant and animal development // *Science*. — 2003. — V. 301 (5631). — P. 336—338. doi:10.1126/science.1085242
27. Cazzonelli C. I., Velten J. In vivo characterization of plant promoter element interaction using synthetic promoters // *Transgenic Res.* — 2008. — V. 17 (3). — P. 437-457.
28. Chuong E. B., Elde N.C., Feschotte C. Regulatory activities of transposable elements: From conflicts to benefits // *Nat. Rev. Genet.* — 2017 - 18, 71–86.
29. Covey S., Al-Kaff N., Lángara A. et al. Plants combat infection by gene silencing // *Nature* -1997 – V. 385(6619):781–782.
30. Derveaux S., Vandesompele J., Hellemans J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR // *Methods* – 2010 – V. 50 (4), P. 227-230. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.11.001>
31. Dickinson, L. A., Joh, T., Kohwi, Y. and Kohwi-Shigematsu, T. (1992). A tissue-specific MAR/SAR DNA-binding protein with unusual binding site recognition // *Cell* – 1992 – V. 70, 631 -645.
32. Erdmann R., Picard C. RNA-directed DNA Methylation // *Plos Genetics* -2019 - <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009034>
33. Fang R. X., Nagy F., Sivasubramaniam S. Multiple cis regulatory elements for maximal expression of the cauliflower mosaic virus 35S promoter in transgenic plants // *Plant Cell*. – 1989. – V. 1 (1). – P. 141–150.
34. Fuentes P., Armarego-Marriott T., Bock R. Plastid transformation and its application in metabolic engineering // *Curr Opin Biotechnol.* – 2018 – V. 49. – P. 10-15. doi: 10.1016/j.copbio.2017.07.004.
35. Gallie D.R., Sleat D.E., Watts J.W. et al. Mutational analysis of the tobacco mosaic virus 5'-leader for altered ability to enhance translation // *Nucleic Acids Res* – 1988. – V. 16(3) P. 883–893. doi: 10.1093/nar/16.3.883
36. Gaszner, M., Felsenfeld, G. Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms // *Nat. Rev. Genetics.* – 2006. – Vol. 7. – P. 703–713
37. Gleba Y., Klimyuk V., Marillonnet S. Magniffection-a new platform for expressing recombinant vaccines in plants // *Vaccine*. – 2005.- V. 18 (23). – P. 2042-2048.

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

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

- cauliflower mosaic virus and the regulated mannopine synthase promoter // *Plant Mol Biol.* – 1990. – V. 14 (3). – P. 433-443.
69. Shakhmuradov I. A., Umarov R Kh, Solovyev V.V. TSSPlant: a new tool for prediction of plant Pol II promoters // *Nucleic Acids Res.* – 2017. - 45(8). doi: 10.1093/nar/gkw1353
70. Shamloul M., Trusa J., Mett V., Yusibov V. Optimization and Utilization of Agrobacterium-mediated Transient Protein Production in Nicotiana // *J. Vis. Exp.* – 2014. – (86):51204. doi:10.3791/51204.
71. Sidorenko L., Bruce W., Maddock S. et al. Functional analysis of two matrix attachment region (MAR) elements in transgenic maize plants // *Transgenic Res.* - 2003 – V. 12(2). – P. 137–154.
72. Venter M. Synthetic promoters: genetic control through cis engineering // *Trends Plant Sci.* – 2007. - V. 12, № 3. – P. 118-124.
73. Voinnet O. RNA silencing as a plant immune system against viruses // *Trends Genet* — 2001. — V. 17 (8). — P. 449—459. — doi:10.1016/S0168-9525(01)02367-8
74. Yamamoto H., Unbehaun A., Spahn C.M.T. Ribosomal Chamber Music: Toward an Understanding of IRES Mechanisms // *Trends Biochem Sci* – 2017 – V.8. – P. 655–668. doi: 10.1016/j.tibs.2017.06.002
75. Yihe Yu., Po-Cheng Yu., Chang W. et all. Plastid Transformation: How Does it Work? Can it Be Applied to Crops? What Can it Offer? // *Int J Mol Sci* – 2020 - 21(14). – P. 4854. doi: 10.3390/ijms21144854
76. Werner S., Breus O., Symonenko Yu., Marillonnet S., Gleba Yu. High-level recombinant protein expression in transgenic plants by using a double-inducible viral vector // *PNAS* - 2011 - V. 108 (34) – P. 14061–14066. doi:10.1073/pnas.1102928108/-/DCSupplementa
77. Zemach A., McDaniel I. E., Silva P., Zilberman D. Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation // *Science* -2010 – 328. – P. 916–919.
78. Zhang B., Pan X., Cobb G., Anderson T. Plant microRNA: a small regulatory molecule with big impact // *Dev Biol* — 2006. — V. 289 (1). — P. 3—16. doi:10.1016/j.ydbio.2005.10.036