

Федеральное Государственное Бюджетное Научное Учреждение Всероссийский
Научно-Исследовательский Институт
Сельскохозяйственной Биотехнологии

УДК 57.084.1

На правах рукописи

Шведова Анастасия Николаевна

**Водное растение *Wolffia arrhiza* в качестве продуцента терапевтических
рекомбинантных белков**

1.5.6 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

Хватков Павел Алексеевич

Кандидат биологических наук

Москва 2024

Содержание

Содержание	2
Введение	5
1.1 Биофарминг – прогрессивный метод получения терапевтических белков в растениях.....	10
1.2 Использование растений для биофарминга	13
1.3 Успехи генетической трансформации семейства Lemnaceae	20
1.4 Биологические особенности вольфии бескорневой (<i>Wolffia arrhiza</i>).....	23
1.5 Перспективы использования рясковых для вакцинации	25
1.6 Особенности культивирования <i>in vitro</i> растений <i>Wolffia arrhiza</i>	25
1.7 Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор человека (ГКСФ).....	28
1.8 Гирудин	30
1.9 Агробактериальный метод трансформации растений.....	32
1.10 Использование биореакторов для растительного биофарминга.....	35
1.11 Особенности культивирования рясковых в биореакторах	37
1.12 Заключение по обзору литературных источников	38
Глава 2. Экспериментальная часть	41
2.1 Материалы и методы	41
2.1.1 Объекты исследования	41

2.1.2 Подготовка и приготовление сред	41
2.2 Молекулярно-генетический анализ трансгенных образцов вольфии	41
2.2.1. Гистохимический анализ активности гена <i>gus (uidA)</i>	41
2.2.2 Выделение тотальной растительной ДНК.....	42
2.2.3 ПЦР-анализ трансгенных растений	43
2.2.4 Визуализация продуктов ПЦР	44
2.2.5 Саузерн-блот анализ образцов содержащих целевые белки	44
2.3 Количественный анализ содержания белка	45
2.3.1 Выделение тотального водорастворимого белка	45
2.3.2 ИФА (ELISA) Количественная оценка накопления гирудина и ГКСФ	46
2.4 Агробактериальная трансформация.....	47
2.4.1 Транзиентная агробактериальная трансформация	47
2.4.2 Агробактериальный штамм и бинарные вектора	49
2.4.3 Векторные конструкции с целевыми белками гирудина и ГКСФ.....	49
2.4.4 Методика стабильной агробактериальной трансформации вольфии	53
2.5 Расчет эффективности стабильной трансформации.....	54
2.6 Сравнение нескольких средних по критерию Дункана	54
2.7 Статистическая обработка данных.....	55
Глава 3. Результаты и обсуждение	56
3.1 Оптимизация условий транзиентной трансформации	56

3.2	Исследование влияния регуляторов роста (2,4-Д и ВА) на эффективность трансформации	57
3.3	Получение трансгенных регенерантов вольфии	62
3.4	Количественные показатели экспрессии генов гирудина и ГКСФ в трансгенных растениях <i>W. arrhiza</i>	64
3.4.1	Анализ растений, трансформированных плазмидой pCamHIR	64
3.4.2	Анализ растений, трансформированных плазмидой pCamGCSF	67
3.4.3	Экспрессия гирудина и ГКСФ в растениях вольфии бескорневой	70
3.5	Анализ накопления целового белка (ГКСФ) в культуральной среде.....	73
	Заключение	75
	Выводы	78

Введение

Актуальность темы. Спрос на вакцинацию увеличился за последние несколько лет из-за увеличения заболеваемости не только вирусными, но и бактериальными инфекционными заболеваниями. Наиболее перспективными в настоящее время являются рекомбинантные вакцины (Schillberg S., 2021; Rader R.A., 2015; LeBlanc Z., 2020). В связи с чем, возникает необходимость разработки экспрессионных систем, которые могли бы ускорить получение рекомбинантных вакцин и других терапевтических белков. Пандемия COVID-19 вызвала резкий рост спроса на вакцины и терапевтические средства, а стандартные системы производства (клетки млекопитающих, бактерий и дрожжей) не смогли в полной мере удовлетворить спрос на вакцины. Такая ситуация в фармацевтической промышленности говорит о недостатках цепочки «разработка-производство-поставка» для того что бы в короткие сроки удовлетворить нужды населения в биологических препаратах в чрезвычайных ситуациях (LeBlanc Z., 2020).

Одним из наиболее перспективных направлений современной биотехнологии является получение растений-продуцентов разнообразных рекомбинантных белков человека и животных, имеющих медицинское и ветеринарное назначение (Rader R.A., 2015; Walsh G., 2018; Heenatigala P.P.M., 2020). За последние 37 лет системы производства биопрепаратов на растительной основе достигли коммерческого применения благодаря возможности производить сложные гликозилированные молекулы со сравнительно низкими производственными затратами, высокой масштабируемостью и гибкостью производства. Чтобы стать эффективной экспрессионной системой растения-продуценты должны обладать определенными свойствами: высокое содержание белка в тканях, высокая скорость роста, наличие высокой регенерационной способности в условиях *in vitro* и другие (Савельева Н.В.,

2015; Dubey K.K., 2018; Schillberg S., 2021). Организация масштабного производства фармацевтических белковых препаратов требует создания высокоэффективных организмов-продуцентов. Перспективной растительной платформой могут стать растения семейства *Lemnaceae*. Растения этого семейства имеют небольшой размер, который позволяет культивировать данные растения в закрытых системах – биореакторах и имеют высокое содержание белка в тканях. Большинство видов содержат 15-45% белка, в зависимости от источника азота (Landolt and Kandeler, 1987) в процессе культивирования, благодаря чему рясковые используют в пищу людьми как высокобелковый продукт, широко применяют для кормления сельскохозяйственных животных (Appenroth K.J., 2017; Bog M., 2019). Такой ряд особенностей рясковых позволяет считать их перспективными продуцентами рекомбинантных белков.

Степень разработанности. В начале XXI века были получены первые трансгенные растения рода *Lemna* и *Spirodela*, экспрессирующие рекомбинантные терапевтические белки были получены (Stomp and Rajbhandary, 2000; Gasdaska, 2003). В 2008 году Rival с соавторами получили трансгенные растения *Spirodela oligorrhiza* экспрессирующие рекомбинантный аprotинин. На видах *Wolffia australiana* и *Wolffia globosa* была продемонстрирована транзистная наработка рекомбинантных белков (Boehm R. 2001; Kruse C. 2002; Friedrich A.S. 2005).

В 2015 году на базе нашей лаборатории Хватковым с соавт. впервые была продемонстрирована стабильная трансформация вольфии (вид *W. arrhiza*) (Khvatkov P. et al., 2015). Для переноса генетического материала в вольфию бескорневую первоначально использовался метод баллистической трансформации. Несмотря на высокий уровень транзистной экспрессии из-за низкого уровня пролиферации трансформированных клеток данный подход не увенчался успехом. Наиболее интересные результаты были получены при помощи агробактериальной трансформации. Она, несомненно, обладает рядом преимуществ: относительной

простотой и дешевизной, возможностью переноса больших фрагментов чужеродного генетического материала и его низкокопийная интеграция в растительный геном. В исследованиях было получено 4 трансгенные линии, устойчивые к антибиотику гигромицину и содержащие ген *uidA* (*gus*) (Khvatkov P. et al., 2015). Однако эффективность трансформации была довольно низка. Оптимизация условий трансформации, а также условий дальнейшего культивирования растений на питательной среде может позволить растениям вида *W. arrhiza* стать перспективным продуцентом терапевтических рекомбинантных белков или же выступить в роли «съедобной вакцины».

Цель и задачи исследования. Цель настоящего исследования состояла в разработке экспрессионной платформы на основе водного растения вольфии бескорневой для наработки терапевтических рекомбинантных белков: гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека и дисульфата гирудина-1.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Произвести оптимизацию транзientной трансформации вольфии для дальнейших исследований и возможности более быстрого получения стабильных трансформантов;
2. Интегрировать методом агробактериальной трансформации в геном *Wolffia arrhiza* конструкции с геном гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека (*hG-CSF*);
3. Интегрировать методом агробактериальной трансформации в геном *Wolffia arrhiza* конструкции с геном дисульфатогирудина-1 (*Hirudin*);
4. Провести анализ полученных линий на предмет содержания рекомбинантных белков в тканях *Wolffia arrhiza*;

5. Установить, способна ли *Wolffia arrhiza* стать эффективным растением-продуцентом в качестве экспрессионной платформы для наработки терапевтических белков.

Новизна и практическая значимость работы. Проведена оценка ряски вида *W. arrhiza* в качестве претендента на высокоэффективную растительную экспрессионную систему для наработки рекомбинантных белков. Впервые получены трансгенные растения вольфии бескорневой экспрессирующие гены терапевтических белков (гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека и гирудина).

Методология и методы диссертационного исследования. Диссертационная работа выполнена с использованием классических и современных методов культуры клеток и тканей, молекулярно-генетические и биохимические исследования проведены с использованием классических методов с применением сертифицированного оборудования. Подробно методология и методы исследования изложены в разделе «Материалы и методы».

Положения, выносимые на защиту:

1. Разработан баланс регуляторов роста и оптимизированы условия инокуляции (концентрация и тип агробактериального штамма, время кокультивации) для трансформации вольфии, которые повышают эффективность трансформации вольфии в 2 раза.
2. Впервые получены трансгенные линии вольфии, экспрессирующие рекомбинантный гирудин.
3. Впервые получены трансгенные линии вольфии, эффективно экспрессирующие гранулоцитарный колониестимулирующий фактор человека (ГКСФ).
4. Приведена оценка технологического потенциала использования полученных линий вольфии для трансфера белка в среду для культивирования.

5. Утверждение о перспективности использования вольфии бескорневой в качестве экспрессионной платформы для наработки рекомбинантных белков.
6. Утверждение о перспективности использования вольфии бескорневой в качестве экспрессионной платформы для наработки рекомбинантных белков.

Степень достоверности и апробации результатов. Результаты исследований представлены на: XIV и XV Молодежных научных конференциях, посвященных памяти академика РАСХН Г.С. Муромцева "Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» (Москва, 2014 и 2015 г); Plant genetics, genomics, bioinformatics and biotechnology. The 3rd International Conference, PlantGen, Novosibirsk, 2015; Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием, ИРНИТУ 85 (Иркутск, 2015); International Conference on Duckweed Research and Applications. 4th, Kerala, 2017; 18-й Всероссийской конференции молодых учёных «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии», ФГБНУ ВНИИСБ (Москва, 2018); VII международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика» (Севастополь, 2019).

Работа выполнена в лаборатории генной инженерии растений Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ), Москва, 127550 Россия.

Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю Хваткову П.А. за руководство, ценные советы, замечания и помощь; руководителю лаборатории Долгову С.В., всем сотрудникам лаборатории генной инженерии растений ВНИИСБ за помощь и дружескую поддержку, также всем соавторам по публикациям. Также большая благодарность моей семье, в частности мужу Кузнецову К.А., за терпение и дополнительные советы при написании статей и диссертации.

Глава 1. Обзор литературных источников

1.1 Биофарминг – прогрессивный метод получения терапевтических белков в растениях

В 1986 г Andrea Barta с соавторами показали, что с помощью трансгенных растений табака и подсолнечника можно производить химерный гормон роста человека (Barta A., 1986). Позже, в 1989 году, в трансгенных растениях табака был получен функциональный полноразмерный IgG1 мышей (Hiatt A. et al., 1989). Рекомбинантный сывороточный альбумин человека был экспрессирован в трансгенных растениях картофеля и табака, а также в культурах клеток табака, полученных из трансгенной линии (Sijmons P.C. et al., 1990). В обоих исследованиях рекомбинантные белки содержали N-концевые сигнальные пептиды, обеспечивающие правильную укладку белков для повышения их стабильности, что приводило к более высоким уровням накопления в растительных тканях (Schillberg S. et al., 1999). Эти пионерские исследования положили начало биофармингу, что подразумевает использование растений в качестве платформы для наработки фармакологических белков. Несмотря на то, что обычное биофармацевтическое производство включает небольшое количество хорошо зарекомендовавших себя платформ, таких как бактериальная (*Escherichia coli*), дрожжевая (*Saccharomyces cerevisiae*), клетки яичника китайского хомяка (CHO), мышинные клетки NS0 и Sp2/0 и клетки эмбриональной почки человека (HEK293), было предложено и много различных растительных платформ, включая табак, картофель, томат, люцерну, сафлор, морковь, салат, клубнику, мох, ряску, кукурузу, пшеницу, рис и другие. К развитию отрасли растительного биофарминга привел ряд факторов, представляющие растительные платформы привлекательными. Прежде всего, в растительных тканях нет риска загрязнения рекомбинантного белка вирусами животных и прионами (инфекционными белками). По качеству продукции растительные платформы не сильно уступают животным системам, хоть есть

незначительные различия в процессе гликозилирования и фолдинга белков (Войнов Н.А., 2009) (Рисунок 1)

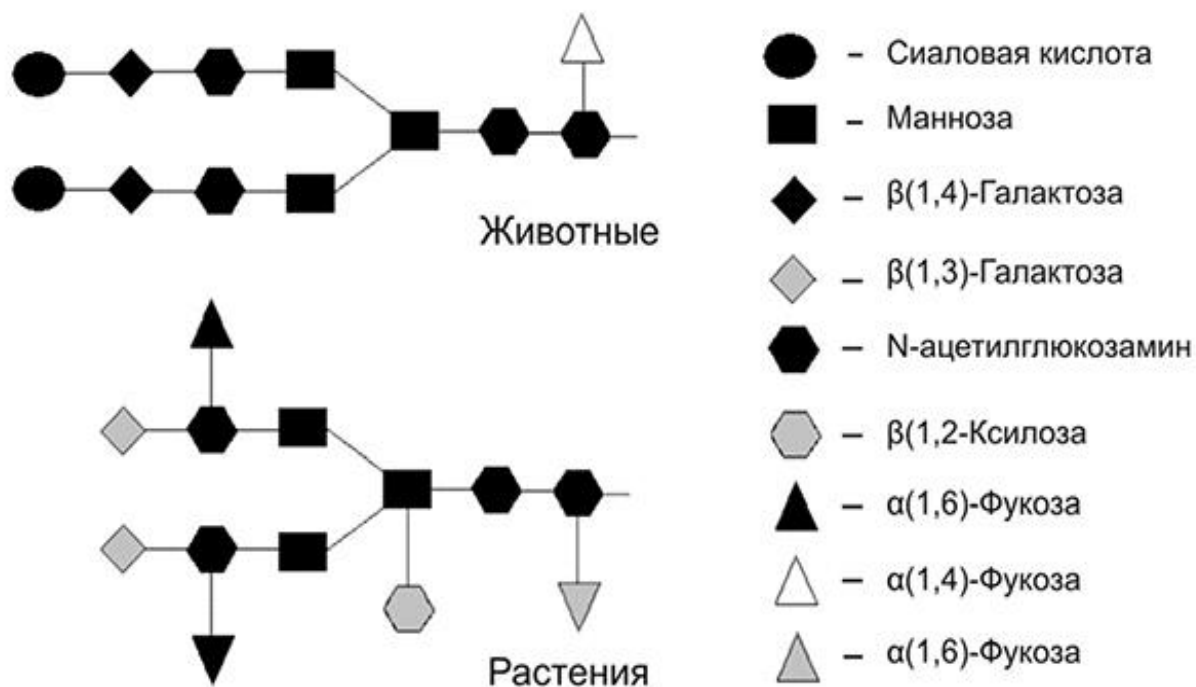


Рисунок 1. Общая схема гликозилирования белков в клетках животных и растений (Войнов Н.А., 2009)

Начиная с 2010 года отрасль биотехнологического производства рекомбинантных белков стала все более прибыльной. Аналитика компаний по производству биотехнологических продуктов показывает, что данная отрасль прибыльна (Rader R.A. 2015, Walsh G. 2018, Biopharmaceutical Sector Market Update - January 2022 (torreya.com)). Лидирующее место по распространенности систем экспрессии рекомбинантных белков и антител, одобренных в настоящее время, занимают экспрессионные системы на основе клеток млекопитающих и бактерий (Rader R.A. 2015). Тем не менее, одним из наиболее перспективных направлений современной биотехнологии становится получение растений-продуцентов разнообразных рекомбинантных белков человека и животных, имеющих

медицинское и ветеринарное назначение (Walsh G., 2018; Heenatigala P.P.M., 2020). Растительные платформы могут стать альтернативной системой для реализации современных потребностей в качественном и доступном рекомбинантном материале.

Несмотря на то, что гликозилирование в клетках высших растений сходно с клетками млекопитающих, имеются и отличия, которые могут повлиять на биологическую активность синтезируемых рекомбинантных белков в растительной системе. У растений гликопротеины имеют два углеводных остатка, не встречающихся у млекопитающих - $\beta(1,2)$ -ксилозу и $\alpha(1,6)$ -фукозу (рисунок 1). Эти олигосахаридные остатки могут стать аллергенами для человека, поскольку в некоторых экспериментах в крови подопытных животных обнаруживались специфические иммуноглобулины IgE, вырабатываемые против растительных углеводных детерминант. Различия в гликозилировании у растений и животных могут быть особенно важны при использовании в медицине антител, синтезированных в растениях (Войнов Н.А., 2009). В настоящее время целое направление, такое как гликоинженерия способно решать проблемы, связанные с конформацией белков (Розов С.М. 2018).

Разнообразие видов растений, систем, методов экспрессии и стратегий получения белков означает, что подходящая платформа, вероятно, будет доступна для любого доступного белкового продукта. Однако растительные системы не лишены недостатков, например, часто низкий уровень экспрессии перенесенных генов или же протеолиз чужеродных белков в цитоплазме растительной клетки (Войнов Н.А., 2009). Также, для производства нужного белка приходится проводить сравнение различных растительных платформ чтобы подобрать наиболее подходящую в каждом конкретном случае. Данный процесс является трудоемким и требует много времени, а отсутствие стандартной платформы затрудняет оптимизацию производства и последующей обработки. Таким образом, становится очевидно, что требуется универсальная растительная экспрессионная платформа.

1.2 Использование растений для биофарминга

Использование растений для биофарминга условно можно поделить на несколько направлений. Первое – когда растение употребляется в целом виде без выделения и очистки целевого продукта (создание съедобных вакцин), второе – получение антигенов, требующих очистки и выделение из растительных тканей для последующего введения инъекции. Важно отметить, что непосредственное получение любых необходимых рекомбинантных белков (трипсин, человеческий внутренний фактор активирующий витамин В12, липаза, инсулин, лактоферрин, коллаген и т.д) актуально для фармацевтической промышленности.

Одним из интересных направлений для биофарминга являются съедобные вакцины. Употребление вакцины в пищу, как способ иммунизации, является самым безопасным и доступным. Преимуществом вакцин на растительных платформах является то, что антигены, экспрессируемые в растениях, защищены растительными клеточными стенками от протеолиза при прохождении пищеварительного тракта и могут быть легко доставлены к клеткам слизистой оболочки кишечника (Firsov A. et al., 2015). Механизм иммунизации такими вакцинами основан на способности антигенов макрофагов тонкого кишечника млекопитающих активировать компоненты иммунной системы и специфически взаимодействовать с факторами иммунитета.

В результате представления В-клетками антигена на поверхности антиген-представляющих клеток происходит активация Т-лимфоцитов-хэлперов, которые в сочетании с антигеном активируют В-лимфоциты, синтезирующие специфические к антигену антитела, которые в свою очередь транспортируются на поверхность слизистых оболочек, где они связываются с чужеродными агентами и препятствуют их проникновению в организм (Walmsley and Arntzen, 2000). (Рисунок 2)

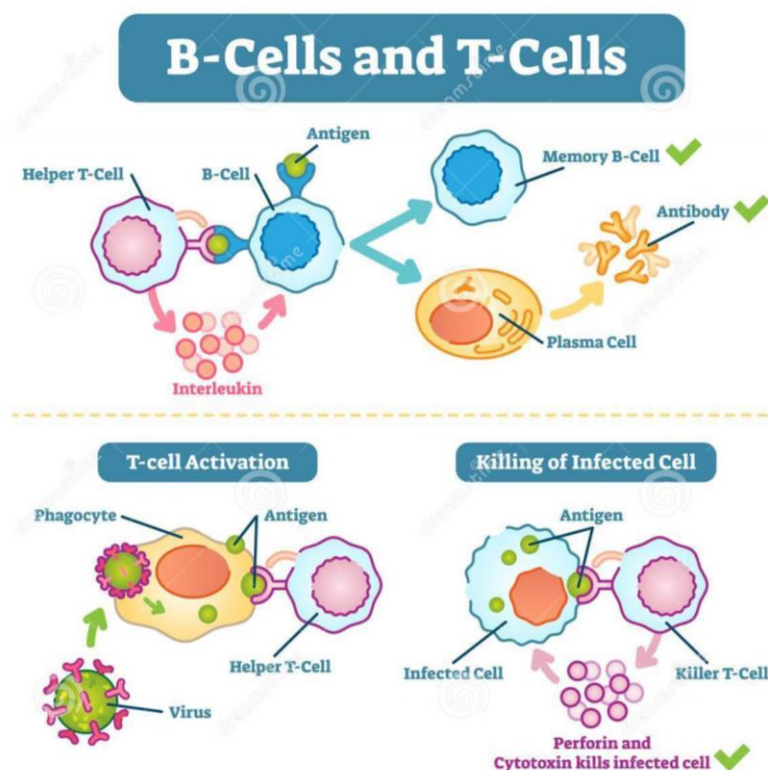


Рисунок 2. Схематическое изображение активации Т-лимфоцитов-хэлперов и дальнейшего клеточного ответа

(<https://kaleidoscopefightinglupus.org/lupus-b-cells-t-cells-and-the-immune-system/>)

Концепция съедобных вакцин была сформулирована в 1989 году Hiatt с соавторами. В 1990 году Arntzen представил концепцию использования трансгенных растений для производства и доставки субъединичных вакцин. Было показано, что производство съедобных вакцин осуществимо (Kurup M. V., 2020). А уже в 1992 году в работе Mason с соавторами (1992) была показана эта возможность на примере растений табака экспрессирующих антиген вируса гепатита В. Съедобные вакцины представляют лучший выбор преимущественно для развивающихся стран, поскольку они рентабельны, легко вводятся, не требуют хранения и безопасны для биоразнообразия. Пищевые вакцины обеспечивают активность слизистых оболочек наряду с гуморальным иммунитетом. Чаще всего в качестве модельных съедобных вакцин используют растения: картофель, рис, морковь, бананы, табак, томат и люцерну.

В 1998 году были получены растения картофеля, продуцирующие В-субъединицу холерного анатоксина. Исследователи давали этот картофель мышам и выявили у них выраженную защиту при инфицировании их холерой (Tacket C.O., 1998). Аналогичная вакцина против кори была получена в табаке (Arakawa T., 1998). В растениях картофеля возможно производить вакцины против столбняка, дифтерии, гепатита В и вируса Норуолк (Mason, H. S., 1996; Chikwamba R. K., 2003; Concha C., 2017). Основным преимуществом производства съедобной вакцины из картофеля является легкость трансформации и размножения данной культуры в условиях *in vitro*. Нет необходимости в холодильниках для хранения, но одним из основных недостатков является любая кулинарная термическая обработка, приводящая к денатурации антигенов.

Трансгенные растения обычно экспрессируют только небольшую антигенную часть патогена или токсина, тем самым избегая рисков инфекционной токсичности и снижая вероятность возникновения побочных реакций (Oszvald M., 2007).

На базе томата впервые была создана эффективная вакцина против острого респираторного синдрома, атипичной пневмонии, вызванной коронавирусом. Листья, стебли, плоды и другие ткани обладают способностью экспрессировать белки СТ-В из токсина *Vibrio cholera* В (Zhang X., 2006). Томаты также использовались для экспрессии HBsAg (поверхностный антиген вируса гепатита В). Была разработана эффективная вакцина против болезни Альцгеймера путем экспрессии бета-амилоидных белков. Вакцины против пневмонии, септицемии и бубонной чумы были наработаны в томатах. Данная культура быстро растет и может широко культивироваться, а высокое содержание витамина А в помидорах может повысить иммунный ответ, но хранение плодов требуют особых условий, что снижает привлекательность томата как платформы для биофарминга (Lou X. M., 2007; Srinivas, L., 2008). Однако, пандемия, вызванная COVID-19 обновила спрос на растительные вакцины. Buriev Z.T. с соавторами в 2024 году отметили, что съедобные вакцины на

растительной основе, обеспечивают двухуровневую защиту от коронавируса (SARS-CoV-2), превосходят используемые в настоящее время парентеральные типы вакцин, которые преимущественно вызывают системный иммунный ответ. Авторами было показано, что трансгенный генотип томата (TOMAVAC), который стабильно синтезировал антигенный белок S1 SARS-CoV-2 при двухкурсовом кормлении мышей $\approx 5,4$ мкг/мл обеспечивал положительную тенденцию к снижению заболеваемости данной инфекцией. Серьезных побочных эффектов у мышей не наблюдалось. (Buriev Z.T., 2024)

Для повышения перспективности трансгенных растений в качестве съедобных вакцин можно производить наработку белка в естественных запасающих тканях растений. Это гарантирует стабильность белка, что снижает затраты, связанные с хранением. Исследования Oszvald M. на рисе (*Oryza sativa*) показали, что трансгенный рис, содержащий LTB (В-субъединица термолабильного энтеротоксина *Escherichia coli*), слитый с белком PEDV (вируса эпидемической диареи свиней) действует как белок-носитель и адъювант, а также как вакцина. Из-за использования промотора, специфичного для эндосперма в исследовании, экспрессия белка наблюдалась только в эндоспермах трансгенных семян риса. В данном исследовании было продемонстрировано, что растения как система экспрессии рекомбинантных белков способна генерировать значительное количество антигена, что, позволяет успешно разработать съедобную вакцину (Oszvald M., 2007).

Трансгенные растения обычно экспрессируют только небольшую антигенную часть патогена или токсина, тем самым избегая рисков инфекционной токсичности и снижая вероятность возникновения побочных реакций (Oszvald M., 2007).

Вакцины на растительной основе сравнительно легче производить, в то время как для обычного производства вакцин требуются очень сложные и дорогостоящие технологии массового производства, как в случае с культурами клеток млекопитающих и микроорганизмов. К сожалению, массовому производству

пероральных вакцин препятствуют некоторые факторы, такие как сложность прохождения различных клинических фаз испытания вакцин. Вакцину, полученную именно из трансгенных растений должно одобрить общество, так как есть некоторые мнения, например, что генетически модифицированные продукты вредят обществу, а также окружающей среде (Schillberg S., 2021). При выращивании растений для производства съедобных вакцин необходим тщательный мониторинг, так как существует вероятность перекрестного опыления между генетически модифицированными и не модифицированными растениями. Поэтому необходимо создавать условия от разработки вакцины и прохождения всех уровней клинических испытаний, до реального выпуска препаратов. Тем не менее, клинические испытания с группами риска уже ведутся в некоторых лабораториях. Определение общего иммунного ответа на пищевые вакцины растительного происхождения имеет первостепенное значение. Возможно, в ближайшем будущем биофармацевтика выйдет на лидирующую роль промышленного производства вакцин на основе рекомбинантных белков, полученных из растений (Schillberg S., 2021).

Наиболее широкое применение биофарминг нашел в США. Согласно прогнозу журнала «Plant-based Biologics Market Report» (Plant-based Biologics Market Size 2031 | Revised in a New Report (researchdive.com)) объем мирового рынка биологических препаратов на растительной основе к 2031 году составит примерно 183 млн долларов США и будет расти со среднегодовым темпом роста 4,8% в течение прогнозируемого периода с 2022 по 2031 год. Таким образом, рынок растительных экспрессионных систем будет увеличиваться, хотя уже сейчас составляет примерно четверть от общей биофармацевтической промышленности. На сегодняшний день ряд препаратов на основе суспензионных культур каллуса табака, уже используется для вакцинации животных. Также, при помощи биофарминга производятся целые группы белков (Таблица 1): антитела, гормоны, структурные и транспортные белки, иммуномодуляторы и другие (Sohrab S. S., 2017).

Допущенные к использованию вакцины

Антиген	Трансгенные растения	Фаза клинических испытаний
Newcastle disease virus (Болезнь Ньюкасла)	Суспензия клеток табака	Одобрено Министерством сельского хозяйства США (применяется на практике)
Personalized anti idiotypе ScFVs (антитела)	Суспензия клеток табака	Фаза 1 (транзистентная экспрессия)
H5N1 influenza («птичий грипп»)	Суспензия клеток табака	Используется для вакцинации в Канаде
Антитела HBsAg scFV (Anti-HBsAg scFV)	Суспензия клеток табака	Доступно для вакцинации
Поверхностный антистрептококковый антиген (Anti-Streptococcus Surface antigen I/III)	Суспензия клеток табака	Одобрено EU (Евросоюзом) Проходит заключительные фазы испытаний

Один из самых успешных препаратов на растительной основе сегодня это зарегистрированный в 2012 году компанией Protalix Biotherapys of Israel препарат

Elelyso/Uplyso. С помощью генной инженерии были получены трансгенные клетки моркови, производящие талиглуцеразу альфа для лечения Болезни Гоше (Zimran, A. 2011). Производственная система основана на биореакторе и требует более низких первоначальных инвестиций и эксплуатационных расходов по сравнению с системами на основе клеток млекопитающих.

Важно отметить, что к настоящему моменту методами биофарминга на основе стабильно трансформированных растений разрабатывается несколько десятков вакцин медицинского и ветеринарного назначения. Это, в частности, вакцины против бешенства, различных изолятов ротавируса, энтеротоксичных штаммов *Escherichia coli*, холеры, чумы и многих других патогенов (Giorgi et al., 2010; Scotti and Rybicki 2013). Многие из них уже проходят различные этапы клинических испытаний. Это, в первую очередь, вакцины против эпидемических штаммов вируса гриппа типа А (фазы I и II клинических испытаний (Landry et al., 2010; Shoji et al., 2011), гепатита В (Pniewski 2013) и холеры (фаза I) (Takeyama et al., 2015). Вакцина ветеринарного назначения против ньюкаслской болезни птиц из растительных источников экспрессии уже разрешена к применению. Более того в растениях получен экспериментальный биологический препарат ZMapp, разрабатываемый для лечения лихорадки Эбола, состоящий из трех моноклональных антител, которые предотвращают распространения болезни в организме. Сейчас препарат находится на второй фазе клинических испытаний (PREVAIL II ClinicalTrials.gov number, NCT02363322). Из белков медицинского назначения у производителей наиболее популярны инсулин, лизоцим, лактоферрин, коллаген, липаза, антитела, вакцины и др. Трипсин, произведенный в трансгенных растениях уже можно купить у компании Sigma.

Организация масштабного производства фармацевтических белковых препаратов требует создания высокоэффективных организмов-продуцентов. Перспективной растительной платформой могут стать растения семейства *Legnaseae*. В издании Plant-based Biologics Market (researchdive.com) отмечается, что

именно рясковые открывают наиболее перспективный рынок биопрепаратов на растительной основе. Ряски используются в качестве модельных растений для изучения генетики, физиологии растений, мониторинга окружающей среды и экологии, а также являются инструментом для поиска противомикробных химических веществ. Особенности рясковых (растения семейства *Lemnaceae*), такие как высокая скорость прироста биомассы, высокое содержание белка в тканях, малый размер, позволяет считать их перспективными продуцентами рекомбинантных белков. (Plant-based Biologics Market Size 2026 (researchdive.com); Stomp A.M. 2000; Gasdaska J.R. 2003; Friedrich A.S. 2005; Khvatkov P. 2015; <https://www.who.int/home>)

1.3 Успехи генетической трансформации семейства *Lemnaceae*

Растительные системы являются перспективными экспрессионными платформами для наработки рекомбинантных белков. А поскольку в последние годы спрос на фармакологические белки увеличивается, необходимо правильно подобрать систему для наработки белков, которая будет отвечать следующим требованиям: биобезопасность производства, высокое качество и низкая стоимость продукции, легкость культивирования и высокая скорость прироста биомассы продуцента, предпочтительное накопление продуктов белкового синтеза (Mett et al. 2008). Поэтому при выборе объекта, который будет использован как платформа для получения вакцин необходимо, предусмотреть возможность крупномасштабного круглогодичного производства в полностью контролируемых условиях. Этим требованиям в большей степени удовлетворяют растения семейства Рясковые, у которых наблюдается большая прогрессия размножения (удвоение биомассы за 1–6 суток) при малых размерах самого растения и высокое содержание белков в сухой массе (до 45%). Наряду с высоким содержанием белка ряски обладают высокой экологической пластичностью и нетребовательностью к питательным средам, что позволяет получать большое

количество биомассы при относительно небольших затратах и в контролируемых условиях.

Основные усилия в области генной инженерии *Lemnaceae* были направлены на получение растений-продуцентов для производства рекомбинантных белков различного функционального назначения, в первую очередь медицинского. В настоящее время уже получены растения, экспрессирующие моноклональные антитела, вирусные и бактериальные антигены, различные терапевтические и промышленные белки. Их биологическая активность была подтверждена, и начались исследования в области получения и очистки целевых белков.

Первые работы по генетической трансформации рясковых были опубликованы в 1998 году. Edelman M. были получены первые растения *Spirodela punctata* стабильно экспрессирующие ген *gus*. (Edelman M. et al. 1998) В 2001-2005 годах были опубликованы работы, посвященные другим представителям растений семейства рясковые, таких как *Lemna minor*, *Lemna gibba*, *Wolffia columbiana*, *Wolffia globosa*. С этими видами были получены не только растения с транзientной экспрессией, но еще и стабильные линии, экспрессирующие ген *gus*. Первые стабильные линии с генами интерферона человеческого гормона роста Fab фрагментов и моноклональных антител были получены в 2003 году Gasdaska J.R. В 2015 на *Lemna minor* был получен слитый ген пептида антигенной детерминанты H5N1 вируса птичьего гриппа M2e - β -глюкуронидаза (Firsov et al., 2015, Firsov et al., 2018) Таблица 2.

Работы по стабильной генетической трансформации *Lemnaceae*

Вид	Трансформация	Авторы
<i>Spirodela punctata</i>	Стабильные линии с геном <i>gus</i>	Edelman M. et al. 1998
<i>Spirodela oligorrhiza</i>	Стабильные линии с геном <i>gfp</i>	Vunsh R. et al. 2007
<i>Spirodela oligorrhiza</i>	Стабильные линии с aprotinin synthetic gene	Rival S. et al. 2008
<i>Lemna gibba</i> <i>Lemna minor</i>	Стабильные линии с генами <i>gus</i> , р-гемоглобина и Р450-оксидазы	Stomp A.M. and Rajbhandari N. 2000
<i>L. gibba/L.minor</i> <i>Lemna minor</i>	Стабильные линии с геном <i>gus</i>	Yamamoto Y.T. et al. 2001 Mourenets L.Yu. and Dolgov S.V. 2002
<i>Lemna minor</i>	Стабильные линии с генами интерферона, человеческого гормона роста, Fab фрагментов и моноклональных антител	Gasdaska J.R. et al. 2003
<i>Lemna minor</i>	Слитый ген пептида антигенной детерминанты Н5N1 вируса птичьего гриппа М2е - β -глюкуронидаза и В субъединицей рицина в качестве адъюванта	Firsov et al., 2015 Firsov et al., 2018
<i>Lemna minor</i>	Линии с генами гирудина и β -глюкуронидазы	Firsov et al., 2019
<i>Wolffia arrhiza</i>	Стабильные линии с геном <i>gus</i>	Khvatkov et al., 2015

1.4 Биологические особенности вольфии бескорневой (*Wolffia arrhiza*)

Вольфия бескорневая — крохотное растение, представляющее собой плавающие на поверхности воды зелёные шаровидные структуры размером около 1 миллиметра.

Lemnaceae объединяет водные, свободноплавающие, большей частью многолетние, травянистые самые маленькие цветковые растения в мире (Landolt E., 1986; Wolff P., 1992). (Рисунок 3). В результате гидрофильной эволюции рясковые достигли крайней степени редукции всех своих органов, поэтому по простоте строения они занимают первое место среди цветковых растений. (Kuehdorf and Appenroth, 2012).



Рисунок 3. Представители семейства Рясковые

Однако, таксономический статус самих *Lemnaceae* до сих пор до конца не определен. Так, многими систематиками (Stockey R.A., 1997; Davis J.I., 1995; Rothwell G.W., 2004) *Lemnaceae* рассматривается как обособленный таксон внутри родственного семейства *Araceae*. Согласно другим классификациям (Cronquist A.,

1988, Hutchinson J., 1973, Thorn R.T., 1992, Les et al., 2002, Appenroth K.J. et al., 2013, Sree K.S. et al., 2016) *Lemnaceae* присвоен статус самостоятельного семейства. Даже работы по изучению нуклеотидного полиморфизма последовательностей ядерного и цитоплазматических геномов (Les et al., 2002, Rotwell et al., 2004, Tippery et al., 2015), основанные на оценке вариабельности нескольких участков хлоропластного генома (последовательности генов *matK* и *rbcl*, интроны генов 5'*trnK*, 3'*trnK*, *rpl16* и спейсер *trnL-trnF*), не смогли дать однозначного ответа о положении *Lemnaceae* в систематике растений.

Растения этого семейства формируют один листоподобный орган (от 0.3 мм до 12 мм), называемый листецом (Li et al., 2004). Листецы рясковых одиночные или соединены короткими, или удлинёнными ножками, образованными суженной частью листеца, в небольшие группы по 2 или более либо в цепочки. Они представляют собой симметричную или асимметричную, большей частью зелёную пластинку, плоскую или уплощённую, реже сильно выпуклую с адаксиальной стороны (Landolt E. 1986; Wolff P., 1992; Les D.H. et al. 2002; Roche J. et al., 2016). Листецы состоят, в основном, из клеток хлоренхимы, разделённых большими межклеточными полостями, заполненными воздухом или другим газом, что обеспечивает плавучесть растения (Landolt E., 1986; Wolff P., 1992; Leng et al., 1995). Проводящая система у рясковых практически отсутствует. Корни отсутствуют (*Wolffella* и *Wolffia*) или слабо развиты и не достигают грунта (*Spirodela*, *Landoltia* и *Lemna*).

Размножаются ряски преимущественно вегетативно и способны удваивать массу популяции за 1–6 суток, а удвоение количества листецов происходит за 2–3 суток (Armstrong and Thorne, 1984, Li J. et al., 2004, Ziegler et al., 2015). Активизация научных исследований рясковых (Zhao H. et al., 2012; Lam E. et al., 2014; Appenroth K.J. et al., 2015) обоснована главным образом их высоким потенциалом для практического применения.

1.5 Перспективы использования рясковых для вакцинации

Из-за высокого содержания белка рясковые давно используются человеком для кормления домашних животных. Тотальное содержание белка варьируется у разных видов до 45% от сухой массы, крахмала – от 10 до 20%, жира – от 1 до 5%, а содержание клетчатки до 25%. Некоторые виды рода *Wolffia* традиционно используются в азиатских странах в качестве дополнительной белковой пищи в рационе человека (Bhanthumnavin and McGarry, 1971; Cheng and Stomp 2009). Из вольфии готовят различные блюда, например, салаты, омлеты, овощные подливы и т.д. Содержание незаменимых аминокислот близко к стандартам Всемирной организации здравоохранения. Содержание жира довольно низкое, но доля полиненасыщенных жирных кислот превышает 60% от общего количества жира (Appenroth, K. J., 2017). Виды рода *Wolffia* не содержат оксалаты в виде оксалата кальция, которые могут вызвать проблемы со здоровьем у людей (Landolt and Kandeler, 1988; Franceschi V. R., 2005). В некоторых исследованиях была показана возможность эффективного использования ряски для кормления домашних животных (Sree K.S. et al., 2016).

С помощью вольфии, благодаря апопластному обмену веществами, можно получать рекомбинантные белки без очистки из самого растения, а выделять из культивационной среды, что позволит сократить затраты и увеличит скорость производства вакцин или же терапевтических белков. Таким образом, все эти преимущества позволяют рекомендовать *Wolffia* в качестве перспективных растений-продуцентов для создания вакцин.

1.6 Особенности культивирования *in vitro* растений *Wolffia arrhiza*

Для успешного получения стабильных трансформированных растений, необходимо иметь высокоэффективную систему регенерации целых растений в условиях *in vitro* (Bregitzer P. et al., 1998). Как известно, регенерационная способность

является свойством генотипа, зависящим от вида, сорта или даже от отдельных растений (Козырева и Дунаева, 1994; Чернобровкина М.А. и др., 2004; Magnusson and Bornmann, 1985; Klcova L. et al., 2004; Filippov M. et al., 2006). Для реализации клеткой своего морфогенетического потенциала необходимо создать определенные условия *in vitro* (Войнов и др., 2009). Наиболее сложными культурами в этом плане являются однодольные растения. (Stiff C.M. et al., 1995; Lemaux P.G. et al, 1999; Altpeter F., 2000; Oldach K.H., 2001; Chang Y. et al, 2003). Рясковые являются однодольными культурами. Поэтому их генетическая трансформация довольно сложна.

Культивирование и трансформация растений рода *Wolffia* отличается от других представителей семейства *Lemnaceae*. В случае трансформации вольфии бескорневой используют промежуточную каллусную фазу, так называемую кластерную структуру. (Khvatkov P. et al, 2015) Рисунок 4. Термин «кластер» используют в данном случае как наиболее подходящий для описания частично дедифференцированных пролиферирующих, как правило, округлых структур, которые развиваются из почек или других меристематических тканей (Ziv M., 1999).

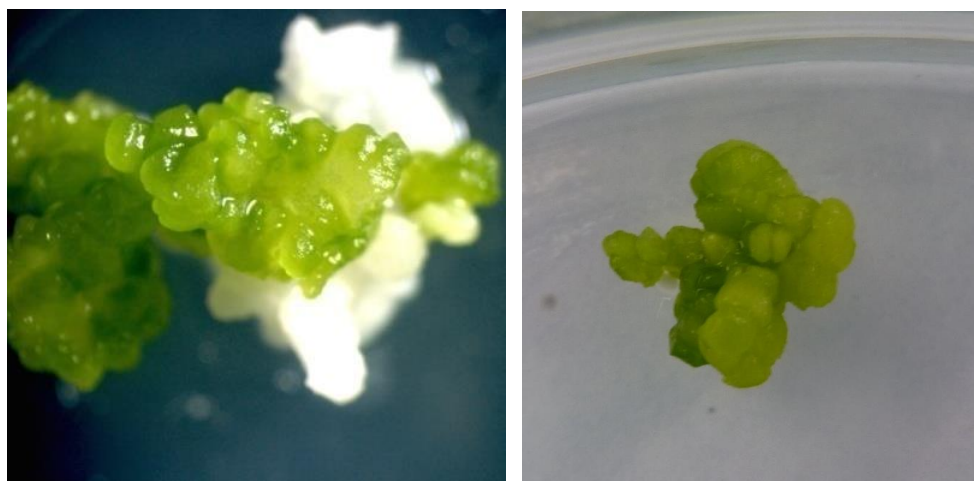


Рисунок 4. Промежуточная каллусная фаза вольфии бескорневой (кластерные структуры)

В случае трансформации вольфии бескорневой через промежуточную каллусную фазу используется следующая методика. Исходные растения ряски

культивируют в чашках Петри на агаризованной среде в течение 16 недель, содержащей регуляторы роста 2,4-Д совместно с ВА до образования кластеров. В дальнейшем их используют для агробактериальной трансформации.

Агробактериальную трансформацию вольфии осуществляют путем кокультивации кластерных структур с агробактерией в течение 72 часов. Затем инокулированные кластеры переносят на агаризованную среду, содержащую селективный агент (канамицин, гигромицин) и антибиотик для элиминации агробактерии (цефотаксим или тиментин). В процессе селекции кластеры периодически пассируют на свежую среду, в результате чего происходит его пролиферация и регенерация целых растений (Mourenets L., 2002; Khvatkov P. et al, 2015).

В работе Хваткова с соавторами 2015 года описана успешная индукция кластерных структур, которая происходила при использовании среды, содержащей в качестве источника углерода 1% сорбитола + 1% маннитола + 2% глюкозы. Данный состав среды отличается высокой степенью выровненности кластерных структур и выходом их на уровне 97-98%. Наряду с индукцией кластеров на данной среде было отмечено образование каллуса с частотой 2-3%. Также было отмечено, что необходимо использовать среду Шенка-Хильдебрандта (SH) с добавлением 5 мг/л 2,4-D + 0,5 мг/л ВА. В статье было описано, что прекультивирование эксплантов в течении 3-4 месяцев позволяет добиться индукции стабильных каллусных структур с частотой более 95%. Однако, максимальной эффективности пролиферации каллуса удалось достичь только при прекультивировании эксплантов на первом этапе каллусогенеза в течение 3,5 месяцев. Было отмечено, что поддержание каллуса в культуре *in vitro* более года приводит к практически полной потере морфогенных потенций (с 78% до 6%, т.е. в среднем 6% в месяц). (Khvatkov P. et al., 2015)

Данные исследования, проведенные с вольфией бескорневой, были взяты за основу для дальнейшего изучения и использования ее в качестве экспрессионной платформы для наработки целевых терапевтических белков.

1.7 Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор человека (ГКСФ)

Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (ГКСФ) — полипептидный цитокин, стимулирующий продукцию нейтрофилов из клеток предшественников. Этот цитокин способствует выживанию клеток-предшественников нейтрофильных гранулоцитов, стимулирует их деление, последующую дифференцировку и созревание, необходим и для активации зрелых нейтрофилов. ГКСФ состоит из 127 аминокислот с двумя участками гликозилирования. ГКСФ способен не только увеличивать количество нейтрофилов (гранулоциты, осуществляющие фагоцитоз патогенных микроорганизмов и продуктов распада тканей организма) но и усиливать их противоинфекционные свойства — хемотаксис и фагоцитоз. Обладая таким спектром активностей, ГКСФ широко применяется в онкологической практике и при трансплантации костного мозга. В литературном обзоре Anke Franzke в 2006 описывается множество функций человеческого ГКСФ Рисунок 5 (Franzk A., 2006).

ГКСФ был обнаружен у многих млекопитающих: человека, мыши, свиньи, крысы, кошки, овцы, лошади. Последовательности исследованных цитокинов показали высокий уровень сходства (65-90%) (Скрыпник К. А., 2004).

ГКСФ был оценен в клинических испытаниях в качестве адъюванта вакцины у ВИЧ-инфицированных пациентов. Предварительные результаты были многообещающими (Breitbach C.J., 2011).



Рисунок 5. Функции ГКСФ в организме человека (Franzk A., 2006 Mini review)

Рекомбинантный цитокин на сегодняшний день получают в основном двумя способами – синтезом в трансгенных дрожжах (Vacchelli E., 2013) или в клетках животных (Serova I.A., 2012); первый ограничен недостаточной точностью процессинга, а второй довольно дорог. Поэтому наработка рекомбинантного ГКСФ в растениях является одной из важных стратегий получения качественного материала медицинского назначения.

К сожалению, очень мало сообщений о получении рекомбинантного ГКСФ в растениях. Первая работа, посвященная экспрессии гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, была опубликована в 2002 году Shin-Young Hong с соавторами. В статье была показана возможность наработки рекомбинантного ГКСФ в каллусной суспензионной культуре *Nicotiana tabacum* модифицированной методом агробактериальной трансформации. (Hong S.Y., 2002). Выход рекомбинантного ГКСФ составил 105 мг/л. В 2012 году в статье Tabar M. S. с соавторами показали, что регенеранты, полученные из трансгенной суспензионной культуры растений табака, выращиваемые в тепличных условиях имели наследование гена ГКСФ соответственно

закону Менделя (3: 1). (Tabar M. S. et al, 2012). Вторая работа была опубликована теми же авторами 2013 году (Tabar M. S. et al, 2013). Корейскими учеными была показана возможность экспрессии рекомбинантного ГКСФ в суспензионной культуре риса. Наряду с подобными экспериментами не проводились.

1.8 Гирудин

Гирудин (лат. hirudin) — антикоагулянт, содержащийся в слюнных железах пиявок. Секрет слюнных желез пиявки содержит большое количество биологически активных веществ, в том числе группу изогирудинов – ингибиторов тромбина. Это семейство полипептидов включает три основных компонента (гирудин-1, гирудин-2 и гирудин-3) и более 17 их аналогов с различными аминокислотными заменами. Гирудин-1 является среди них самым сильным ингибитором тромбина (Clore G.M., 1987; Костромина М.А., 2012). Дисульфатогирудин-1 – высокоселективный ингибитор тромбина, секретируемый слюнными железами медицинских пиявок *Hirudo medicinalis*. Этот антикоагулянт прямого действия используется в качестве противотромботического средства при острой коронарной недостаточности, инфаркте миокарда, тромбозах глубоких вен нижних конечностей (Greinacher and Warkentin, 2008).

Все природные гирудины состоят из 64–66 аминокислотных остатков, обладают одинаковой пространственной организацией (N-концевой домен с тремя дисульфидными связями и кислый C-концевой домен) и содержат сульфогруппу на Tyr63. Гирудины являются бивалентными ингибиторами тромбина прямого действия, поскольку одновременно связывают два его сайта: их N-концевые области взаимодействуют с субстратсвязывающим участком активного центра тромбина, а отрицательно заряженные C-концевые домены – с анионсвязывающим экзосайтом тромбина (Fenton J.W., 1991, Mengwasser K.E., 2005). Для связывания гирудина с тромбином большое значение имеет наличие сульфогруппы на Tyr63, поэтому

несульфатированные рекомбинантные аналоги обладают сниженной антикоагулянтной активностью (Stone S.R, 1986). Были созданы многочисленные модифицированные аналоги с повышенной антитромботической активностью (Костромина М. А., 2012). Среди уже зарегистрированных медицинских препаратов – рекомбинантный гирудин (дезирудин, Iprivask, Canyon Pharmaceuticals) и лепирудин (Refludan, Bayer Schering Pharma, SanofiAventis и др.), содержащий две аминокислотные замены Val1Leu и Val2Thr (Narayanan K, 1991; Greinacher A., 2004; Iqbal O., 2005). Помимо существующего рекомбинантного аналога гирудина-1 (63-десульфатогирудина-1), медицинское значение имеют его модифицированные аналоги, обладающие повышенной активностью и стабильностью. (Костромина М. А., 2012)

В настоящее время промышленное производство рекомбинантного гирудина сосредоточено на лизатах клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (Niazi et al., 2015). Также используются различные экспрессионные системы на основе бактерий (*E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Lactococcus lactis* and *Streptomyces lividans*), нитчатых грибов (*Acremonium chrysogenum*, *Ogataea angusta*), метилотрофных дрожжей (*Pichia pastoris*) и трансгенных животных (Dodt et al., 1986; Rosenfeld et al., 1996; Radzio et al., 1997; Yen et al., 2008; Hu et al., 2009; Chen et al., 2012). Однако, эти исследования пока не получили дальнейшего развития, главным образом из-за невысокой активности рекомбинантного гирудина, а также низкого выхода.

Анализ литературных данных показал, что очень мало работ, посвященных наработке рекомбинантного гирудина в растительных системах. Первые работы появились в 1995-96 годах. Parmenter с соавторами (Parmenter D.L. et al., 1995) разработали экспрессионную систему на основе растений рапса масличного (*Brassica napus*), где гирудин экспрессировался в слиянии с олеозином, накопление слитого белка гирудин-олеозин достигало 1% общего белка семян (около 0,3% гирудина). Аналогичные результаты были получены при использовании эфиопской горчицы *Brassica carinata* и сафлора *Carthamus tinctorius* (Chaudhary S. et al. 1998). Основным

недостатком данной системы является необходимость ферментативного расщепления слитого белка гирудин-олеозин с последующей очисткой гирудина, что ведет к значительным дополнительным затратам.

Гирудин накапливается в клетках слюнных желез пиявки и является секретируемым белком (Bagdy D. et al., 1976). Гирудин экспрессируется в форме предшественника размером 85 аминокислот с отщепляемым N-концевым сигнальным пептидом длиной 20 а.о. (Harvey R.P. et al., 1988; Müller C. et al., 2016). Молекула зрелого гирудина стабилизирована тремя дисульфидными связями, тирозин в положении 63 сульфатирован. Гирудин является весьма стабильным пептидом, характеризуется высокой устойчивостью к повышенным значениям температуры, к воздействию денатурантов, стабильностью в широком диапазоне pH (1,47-12,9) (Chang, 1991). Кроме того, гирудин обладает свойствами ингибитора сериновых протеиназ (Chang, 1991). Эти его особенности представляют интерес изучения возможности экспрессии гирудина в растениях без белка-партнёра. Подобное исследование на растительных системах было произведено на примере *Lemna minor*. В статье Kozlov O. N. с соавторами описывали метод агробактериальной трансформации *Lemna minor* генами β -глюкоронидазы и гирудина-1. Было получено 8 трансгенных линий ряски, содержащих ген гирудина-1, при этом максимальное накопление гирудина составляло 0,02% от общего количества растворимого белка. (Kozlov O. N. et al, 2019).

Немногочисленные исследования по наработке рекомбинантного гирудина говорят о сложности его получения в растительных платформах.

1.9 Агробактериальный метод трансформации растений

Агробактерии являются почвенными фитопатогенными бактериями семейства *Rhizobiaceae*, которые также включают азотфиксирующие симбиотические бактериальные роды, такие как *Rhizobium* и *Sinorhizobium*. (Zupan, 2000). За

прошедшие годы анализы, основанные на новых таксономических критериях, включая сравнение последовательностей 16S РНК и полных последовательностей генома некоторых штаммов, указали на близкое родство этих родов. Они настолько близки, что некоторые систематики ставят под сомнение уместность различия между *Agrobacterium* и *Rhizobium* и предлагают отменить это различие и перегруппировать эти виды под названием рода *Rhizobium*. Однако название *Agrobacterium* по-прежнему используется в большинстве публикаций и приложений по почвенной микробиологии, физиологии растений, а также молекулярной и клеточной биологии растений (Lacroix B. and Citovsky V., 2013). Классификация различных видов *Agrobacterium* основывалась на их фитопатогенных свойствах. Первоначально было описано три вида: *A. tumefaciens*, способный индуцировать корончатые галлы на широком спектре двудольных растений; *A. rhizogenes*, вызывающий заболевание косматый корень; и нефитопатогенный штамм *A. radiobacter*. Позднее были выделены другие виды *Agrobacterium*, которые имели весьма ограниченный круг хозяев и индуцировали пролиферацию растительных клеток лишь у некоторых видов растений. Так было с *A. vitis*, специфичным для виноградной лозы, *A. Rubi*, довольно специфичным для некоторых *Rubiaceae*, и *A. larrymoorei*, выделенным из *Ficus benjamina*. Эта классификация, однако, стала недействительной, когда было продемонстрировано, что фитопатогенность и круг хозяев агробактерий обусловлены наличием крупных трансмиссивных плазмид, называемых «Ti-плазмиды» (опухолеиндуцирующие) для *A. tumefaciens* и «Ri-плазмиды» (корнеиндуцирующие). С появлением секвенирования генома и новых методик изучения метаболических путей различные изоляты *Agrobacterium* были сгруппированы в три таксономических кластера или биовара, которые в конечном итоге можно было бы считать родами. I кластер - *Agrobacterium tumefaciens* C58 (Плазмиды кольцевой хромосомы вторичной линейной хромосомы), II кластер *Agrobacterium radiobacter* K84 (плазмиды с кольцевой хромосомой

4) и III кластер *Agrobacterium vitis* S4 (Плазмиды 5-й кольцевой хромосомы вторичной кольцевой хромосомы). Некоторые штаммы содержат дополнительные плазмиды, такие как pTar, которые несут гены, необходимые для использования тартрата, в избытке содержащегося в виноградной лозе, в *A. vitis* S4. Данные секвенирования подтвердили родство *Agrobacterium* и *Rhizobium*. В частности, кольцевые хромосомы (но не другие генетические элементы) демонстрируют значительную коллинеарность нуклеотидов и сохранение порядка генов между этими видами, поддерживая мнение, что *Agrobacterium* и *Rhizobium* имеют общих предков, которые разошлись после приобретения плазмид, придающих патогенность или симбиоз, соответственно (Lacroix B. and Citovsky V., 2013).

В конце 1970-х годов было обнаружено, что фенотипы растений, индуцируемые *Agrobacterium* обусловлены переносом определенного сегмента ДНК из бактерии в растительную клетку называемого Т-ДНК (от англ. Transferred – перенесенная). После стабильной интеграции в растительный геном элемент Т-ДНК кодирует растительные гормоны, которые приводят либо к недифференцированным опухолям, либо к разрастанию корней. (Montagu Van M., Zambryski P., 2017).

Ti-плазмиды имеют размеры порядка 200-250 kb и стабильно сохраняются в агробактериях. Т-ДНК может доставляться в клетки эукариот и экспрессироваться в них. На концах Т-ДНК находятся прямые высоко консервативные повторы (25 н. п.), составляющие так называемые левый (LB– left border) и правый (RB – right border) пограничные районы, которые необходимы для вырезания ее из состава плазмиды и интеграции в геном растений. Любая последовательность ДНК (не более 23 kb), помещенная между этими границами, может быть перенесена в растительную клетку. Также в состав Ti-плазмиды входят: Т-ДНК; онкогены (onc), ответственные за конститутивный синтез ауксинов и цитокининов; гены, кодирующие синтез и утилизацию опинов; локусы, контролирующие размножение плазмиды в бактериальной клетке, а также vir-область, несущая семь основных локусов: *virA*,

virB, *virC*, *virD*, *virE*, *virG* и *virH* и отвечающая за перенос Т-ДНК в клетки растения (Hoekema, 1984).

Вектора для трансформации растений на основе Ti-плазмид агробактерий должны содержать следующие структурные элементы:

- последовательности правой и левой границы Т-ДНК, а также последовательности, необходимые для переноса и встраивания области Т-ДНК в геном растительной клетки;
- последовательность гена селективного маркера, что позволит проводить селективный отбор трансгенных растений. В качестве селективного маркера могут использоваться гены устойчивости к антибиотикам (*nptII* — устойчивость к канамицину, *hpt*- устойчивость к антибиотику гигромицину), ген *bar* (устойчивость к гербициду фосфинотрицину (BASTA) и ген ALS (устойчивость к гербициду хлорсульфону), ген бета-глюкуронидазы (фермент расщепляющий субстрат X-Gluc) и ряд других;
- последовательности, облегчающие встраивание целевого гена (полилинкерные последовательности, интроны, промоторные и терминаторные последовательности);
- сайты инициации для репликации в бактериальных клетках.

1.10 Использование биореакторов для растительного биофарминга

Культивирование организмов для биотехнологических целей достаточно хорошо разработано для таких экспрессионных систем как животные (клетки яичника китайского хомяка (CHO), мышинные клетки NS0 и Sp2/0), бактериальные (*Escherichia coli*) и дрожжевые (*Saccharomyces cerevisiae*). Интенсивные исследования в области выращивания культур клеток растений начались сравнительно недавно. Суспензионные клеточные культуры на основе растений

привлекают внимание исследователей как перспективные потенциальные системы для наработки фармацевтически ценных белков.

В 2006 году фирме «Dow AgroSciences» США была выдана лицензия на способ получения вакцины против возбудителя болезни Ньюкасла (псевдочума, азиатская чума кур) полученной из суспензионной клеточной культуры табака. (Yusibov V. et al, 2008). С 2007 года компания «Protalix» (Израиль) разрабатывала клеточные культуры моркови, риса и табака, которые предполагалось к коммерческому использованию для наработки рекомбинантных белков, вакцин от флавивирuсов, а также антител для антиаллергенной иммунной терапии. (Martinez C.A. et al. 2012; Lienard D. et al, 2007). Преимуществом суспензионных клеточных культур как системы экспрессии для наработки рекомбинантных белков является то, что клеточные культуры можно унифицировать по ростовым характеристикам, размерам и типам клеток, в отличие от целых растений. Более того, клетки выращиваются в строго контролируемых условиях, при которых скорость накопления продукта не меняется от пассажа к пассажу, что является более технологичным и экологически безопасным процессом.

Однако приведенные примеры экспрессии чужеродных генов в суспензионных культурах относятся к транзистентному способу наработки белков. Использование транзистентных систем экспрессии лишь частично снимает экологические проблемы. Это связано с тем, что используются большие объемы агробактериальной суспензии (десятки и сотни кубометров), несущие самореплицирующиеся вирусные векторы; эта суспензия может случайно попасть в окружающую среду. Более того, при использовании систем транзистентной экспрессии остается актуальной проблема утилизации большого количества растительных отходов. Использование закрытых систем культивирования (биореакторов) позволяет полностью устранить указанные недостатки и тем самым повысить доступность целевых рекомбинантных белков для потребителей.

В настоящее время биореакторы используют не только для получения вторичных метаболитов в суспензионной культуре, а также для размножения растений путем соматического эмбриогенеза. Эта система применяется для ряда декоративных, овощных и ягодных культур таких как *Amaryllis hippeastrum*, *Araceae species*, *Coffea Arabica*, *Gladiolus grandiflorum*, *Lilium spp* и многих других (Takayama et al., 1991; Takahashi et al., 1992; Akita and Takayama, 1994; Ilan et al., 1995; Ziv et al., 1998; Ziv, 2005). Фотобиореакторы возможно использовать и для промышленной наработки терапевтических рекомбинантных белков из трансгенных растений.

1.11 Особенности культивирования рясковых в биореакторах

Фитобиореакторы в производстве использовались в основном для культивирования весьма мелких объектов для получения из них вторичных метаболитов или соматических эмбрионов в суспензионной культуре. Культивирование целых растений вызывает большие сложности.

В области генетической инженерии *Lemnasea* и коммерциализации полученных результатов лидирующую позицию занимала компания «Biolex» как часть компании «Bayer». Компания использовала генетические конструкции, которые позволили секретировать белки (α -2 β -интерферона и моноклональные антитела Fab) в апопласт. Таким образом получалось выводить рекомбинантный белок непосредственно в культуральную среду (Spenser et al., 2005; Stomp, 2005). В 2007 году компанией Biolex была разработана система по культивированию ряски в биореакторах. Данная система себя хорошо зарекомендовала, и на ее основе был запущен производственный цикл.

Культивирование ряски осуществляют в маленьких бассейнах глубиной до 15 см. Среднесуточный прирост зеленой массы вольфии под открытым небом за период с мая по октябрь составляет около 0,2 кг/м², или 60 т/га сырой массы в месяц. Из-за биологических особенностей вольфии бескорневой возможно ее глубинное

культивирование в биореакторах, что позволяет более рационально использовать культивационную площадь.

В работе Хваткова с соавторами 2013 года был подробно описан режим глубинного культивирования вольфии бескорневой в биореакторе (Хватков П.А. и др., 2013). Было показано, что предпочтительна гидродинамическая схема ферментации, а эффективность данной системы по наработке биомассы популяции в 2 раза выше по сравнению с механической схемой. Культивирование вольфии в модифицированном гидродинамическом биореакторе «Biostat PBR 2S» при использовании среды W3M и соблюдение специальных параметров (температура 27-29 °С, рН 5,7-6,0 фотопериод 24/0) позволило получить наибольшую продуктивность прироста биомассы популяции. Данные результаты были взяты за основу для проведения дальнейших исследований.

1.12 Заключение по обзору литературных источников

За последние годы в мире существенно возрос спрос на рекомбинантные белки. Особенно популярна область биотехнологии, связанная с биофармингом (использование растений в качестве платформы для наработки различных рекомбинантных белков). Растительные платформы привлекательны для исследований и производства, поскольку имеют ряд плюсов – в растительных тканях нет риска загрязнения рекомбинантного белка вирусами и прионами (инфекционными белками) животных, высокое качество продукции, возможность использования круглогодичных закрытых производственных систем (использование теплиц или ферментеров). Еще одно важное преимущество – скорость получения белков в транзистентных системах экспрессии, позволяющая производить рекомбинантные белки в течение нескольких дней. Растительные платформы подходят для производства экстренных вакцин и диагностических средств, например, в качестве контрмер против новых штаммов вируса гриппа и

SARS-CoV-2, которые необходимы к получению в течение нескольких недель или месяцев после подтверждения генетической последовательности вируса (Capell et al., 2020; Rosales-Mendoza et al., 2020). Растительные системы не лишены недостатков, например, часто низкий уровень экспрессии перенесенных генов или же протеолиз чужеродных белков в цитоплазме растительной клетки способны снижать рентабельность производства вакцин. Также серьезным препятствием для внедрения растительного биофарминга является неотработанный механизм интеллектуальной собственности и нормативно-правовой базы по сравнению с промышленными системами экспрессии клеток микробов и млекопитающих. Тем не менее растительные платформы остаются по-прежнему привлекательными для исследований. Организация масштабного производства фармацевтических белковых препаратов требует создания высокоэффективных организмов-продуцентов. Перспективной растительной платформой могут стать растения подсемейства *Lemnaceae*. Некоторые особенности рясковых, такие как высокая скорость прироста биомассы, высокое содержание белка в тканях, малый размер, позволяет считать их перспективными продуцентами рекомбинантных белков. Одна из важных особенностей растений рода *Wolffia* заключается в том, что в отличие от других представителей подсемейства *Lemnaceae* у них нет корневой системы. Это позволяет культивировать их глубинным способом в биореакторах в полностью контролируемых условиях, что может значительно повысить рентабельность производства рекомбинантных белков

В настоящее время существует проблема получения некоторых важных терапевтических белков, например, гирудина. Гирудин – секреторный белок слюнных желез пиявки, ингибитор тромбина. Используется в качестве противотромботического средства при острой коронарной недостаточности, инфаркте миокарда, тромбозах глубоких вен нижних конечностей (Greinacher and Warkentin, 2008). Сообщений о наработке гирудина в растительных системах очень

мало из-за сложной очистки его из растительных тканей. Данный антикоагулянт нарабатывается в лизатах клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, некоторых бактериальных системах, нитчатых грибах, также в трансгенных клетках животных, но эти исследования еще не получили дальнейшего развития из-за низкой активности рекомбинантного гирудина, а также небольшого выхода белка. В растительных системах реальных разработок по наработке гирудина и его модифицированных аналогов нет. ГКСФ (гранулоцитарный колониестимулирующий фактор человека) является полипептидным цитокином, стимулирующим продукцию нейтрофилов, применяется в онкологической практике и при трансплантации костного мозга. Нарботка рекомбинантного ГКСФ производится в настоящее время в дрожжевых и животных системах. Сообщений о работе и получении данного белка в растительных системах очень мало и в основном только на модельных объектах (табак и другие). Анализ литературных источников показал, что растения рода *Wolffia* могут стать многообещающей экспрессионной платформой для наработки терапевтических рекомбинантных белков.

Глава 2. Экспериментальная часть

2.1 Материалы и методы

2.1.1 Объекты исследования

Объектом исследования являлись растения вольфии бескорневой (*Wolffia arrhiza*), принадлежащей к семейству рясковых (*Lemnaceae*). В исследованиях использовались цельные одиночные растения вольфии, культивируемые на агаризованной среде Шенка-Хильдебрандта при 21°C, 65 $\mu\text{моль} / \text{м}^2 \text{ сек}$ интенсивности освещенности при 16 ч фотопериоде, которые в дальнейшем проходили период преультивации 4 месяца на среде SH (Schenk and Hildebrandt, 1972), содержащей 1% маннитола, 1% сорбитола, 2% глюкозы в качестве источников углерода и 5 мг/л 2,4-D совместно с 0,5 мг/л ВА (Khvatkov P. et al, 2015)

2.1.2 Подготовка и приготовление сред

В работе использовали питательные среды доведенные до соответствующего значения pH с помощью 2N KOH, далее среды стерилизовали автоклавированием при давлении в 1,9 атмосфер и температуре 121°C в течение 20 мин. Регуляторы роста и витамины стерилизовали холодным фильтрованием (фильтры Millipore, 0.22 мкм) и добавляли в остывшую до 50-60°C среду после автоклавирования.

2.2 Молекулярно-генетический анализ трансгенных образцов вольфии

2.2.1. Гистохимический анализ активности гена *gus (uidA)*

Гистохимическое окрашивание на предмет экспрессии гена *uidA* проводили согласно методу Jefferson et al. (1987). Как контрольные, так и предположительно

трансгенные экспланты подвергали вакуумной инфльтрации 0,1% X-Gluc (5-бром-4-хлор-3-индолил- β -D-глюкуроновой кислоты натриевой соли, Thermo Scientific, Литва) буфера, содержащего 100 мМ NaPO₄-буфера (0,2 М NaH₂PO₄ x 2H₂O; 0,2 М Na₂HPO₄; pH 7,0), 10 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТУ), 0,1% Тритон X-100 и 10 мМ KFe(CN)₆-буфера (0,1 М K₃[Fe(CN)₆]; 0,1 М K₄Fe(CN)₆ x 3H₂O) и инкубировали в темноте в течение 18 ч при 37 °C. Далее растения отмывали в 80%-ном растворе этанола.

2.2.2 Выделение тотальной растительной ДНК

Из регенерантов, прошедших отбор на селективной среде, выделяли ДНК по методу Эдвардса (в модификации) для дальнейшей идентификации вставки гетерологичного гена методом ПЦР-анализа.

Методика выделения геномной ДНК:

1. Гомогенизация растительной ткани производилась в жидком азоте. Навеска ткани составляла на каждый образец в пределах 100-200 мг. (Для выделения ДНК в препаративных количествах навеска ткани составляла 2 г на каждый образец).
2. Растертую ткань ресуспендировали 650 мкл буфера: 100 mM трис-HCl, pH 8,0; 500 mM NaCl; 50mM ЭДТА; 0,7 mM mercaptoetanol.
3. Далее добавляли 163 мкл 10% SDS и затем перемешивали.
4. Смесь центрифугировали 10 мин при $16,1 \times 10^3$ g.
5. Супернатант переносили в новую пробирку и добавляли 407 мкл 5М ацетата калия, затем перемешивали на вортексе и остужали при -20°C в течение 30 мин.
6. Смесь центрифугировали 10 мин при $16,1 \times 10^3$ g.
7. Надосадок объемом 1100 мкл отбирали в новую пробирку и добавляли 900 мкл изопропанола, затем перемешивали и остужали при -20°C в течение 20 мин.
8. Смесь центрифугировали 10 мин при $16,1 \times 10^3$ g.

9. Супернатант удаляли. Осадок промывали 70% этанолом, далее осадок подсушивали в течении 30 мин при температуре 35°C (Eppendorf ThermoStat plus).
10. Осадок растворяли в 300 мкл ТЕ-буфера (100 mM трис-HCl; 10mM ЭДТА).
11. Добавляли 300 мкл смеси фенол: хлороформ в соотношении 1:1, перемешивали.
12. Пробирки центрифугировали в течение 5 мин при $16,1 \times 10^3$ g.
13. Супернатант переносили в новую пробирку, добавляли 30 мкл 3М ацетата натрия и перемешивали на вортексе.
14. Далее добавляли 650 мкл 96% этанола, затем перемешивали и остужали при -20°C в течение 20 мин.
15. Смесь центрифугировали 10 мин при $16,1 \times 10^3$ g.
16. Супернатант удаляли. Осадок промывали дважды 70% этанолом. Затем подсушивали и растворяли в 100 мкл ТЕ-буфера.

2.2.3 ПЦР-анализ трансгенных растений

Наличие последовательности гетерологичных генов в тотальной ДНК образцов вольфии проводили с помощью ПЦР-анализа. При проведении ПЦР на наличие вставки целевых и селективных генов использовали следующие пары праймеров: ген *hpt* *hptf*: 5'-ACATTGTTGGAGCCGAAATC-3' и *hprr*: 5'-GACATTGGGGAGTTTAGCGA-3'; ген *Hirudin* HirXF: 5'-AGCTCTAGAATGGCCAAGAGGATTGC-3' и HirSR: 5'-TTCGAGCTCTCATTGGAGGTA CTCTTCAGG-3'; ген *GCSF* Gfr1for: 5'-GTCCTCTAGAATGGCGAAGAGGATCGCC-3' и Gfr2rev: 5'-ATGAGCTCTCACGGTTGGGCGAGATG-3'; для *virC* были *virC1*: 5' - GCACTATCTACCTACCGCTACGTCATC-3' и *virC2*: 5' - GTTGTGCGATCGGGACTGTAAATGTG-3'. (95°C- 5 мин (горячий старт -

денатурация), (93°C-45 сек (денатурация), 60°C-1 мин (отжиг), 72°C-45 сек (элонгация))X35, 72°C-5 мин).

Объем ПЦР смеси составлял 25 мкл, конечная концентрация dNTP-0,5mM, конечная концентрация праймеров – 0,4 pmol/μl, количество Taq-полимеразы на реакцию 2,5 ед., также смесь содержала 1X реакционный буфер. При проведении ПЦР применяли амплификатор MJMini Personal Thermal Cycler (Bio-Rad).

2.2.4 Визуализация продуктов ПЦР

Визуализацию продуктов ПЦР проводили методом электрофореза в 1,2% агарозном геле в электрофорезной камере фирмы "Bio-Rad" (США) в 0,5x TBE буфере (20 × TBE буфер: 0,89 М Трис-ОН, 0,89 М борная кислота, 50 мМ ЭДТА) с добавлением бромистого этидия в течение 40 мин при напряжённости электрического поля 80 В/см. В лунки вносили 5 мкл пробы, предварительно смешивая их с буфером для нанесения проб (0,25% бромфенолового синего, 0,25% ксилोलцианола, 30% глицерина в воде). Визуализацию ДНК проводили с помощью трансиллюминатора и фотографировали в проходящем ультрафиолетовом свете.

2.2.5 Саузерн-блот анализ образцов содержащих целевые белки

Для саузерн-блот анализа для выявления последовательности целевого гена ГКСФ использовали геномную ДНК трансформированных и нетрансформированных растений *Wolffia* (навеска весом 50 мкг). ДНК расщепляли при помощи эндонуклеазы рестрикции HindIII (100 единиц) которая разрезает Т-ДНК pCamGCSF (рисунок 7) в одном положении в течение 16 часов при 37 °С. Далее производился электрофорез в агарозном геле (0,8%). Продукты рестрикции были иммобилизованы на мембране Hybond + (Amersham, США) в соответствии с инструкциями производителя. ДНК-зонд был синтезирован на матрице плазмиды pCamGCSF

методом ПЦР с парой праймеров G1for и G1rev. Зонд (600 п.н.) метили щелочной фосфатазой с помощью набора AlkPhos Direct Labeling Kit (Amersham Bioscience, США). Сигналы на мембране детектировались с помощью реагента CDP Star в соответствии с инструкциями производителя (Amersham, Bioscience).

Саузерн-блот-анализ на предмет наличия искомой последовательности гирудина проводили на матрице геномной ДНК (40 мкг) трансгенных растений и растений *Wolffia* дикого типа. ДНК расщепляли эндонуклеазой рестрикции XbaI (100 ед.), которая разрезает Т-ДНК pCamHIR (рисунок 8) в одном положении при 37°C в течение 16 ч. Проводили электрофорез в агарозном геле (0,8%), продукты рестрикции иммобилизовали на мембране Hybond+ (Amersham, США) в соответствии с инструкциями производителя. ДНК-зонд был синтезирован на плазмидной матрице pCamHIR методом ПЦР с парой праймеров HirXF и HirSR. Зонд (294 п.н.) метили щелочной фосфатазой с использованием набора AlkPhos Direct Labeling Kit (Amersham Bioscience, США). Сигналы на мембране детектировали с помощью реагента CDP Star согласно инструкции производителя (Amersham Bioscience). Сигнал с мембраны накапливали на рентгеновских пленках (XBE blue чувствительный, Retina) в пленочной кассете при комнатной температуре (КТ) в течение 24 часов. Рентгеновские снимки сканировали на приборе Epson Perfection V750 PRO (EPSON).

2.3 Количественный анализ содержания белка

2.3.1 Выделение тотального водорастворимого белка

1. Гомогенизацию растительной ткани проводили в пробирке объемом 1,5 мл с помощью пестика-гомогенизатора. Навеска составляла 30 мг на каждый образец.

2. Растертую ткань ресуспендировали в 250 мкл фосфатного буфера; pH 9,0 (18 мМ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 8 мМ K_2HPO_4).
3. Смесь инкубировали 5 мин на водяной бане при 80 °С.
4. Смесь центрифугировали 10 мин при $18,0 \times 10^3 g$ и 21 °С. Супернатант объемом 150 мкл переносили в новую микропробирку.
5. Отбирали супернатант, добавляли к нему 1350 мкл 96% этанола и обрабатывали на вортексе.
6. Смесь оставляли при +4 °С на сутки.
7. Смесь центрифугировали 10 мин при $16,1 \times 10^3 g$.
8. Отбирали супернатант, осадок высушивали в течении часа при +30 °С.
9. Полученный осадок растворяли в 300 мкл. 0,1 N NaOH.

2.3.2 ИФА (ELISA) Количественная оценка накопления гирудина и ГКСФ

Образцы белка разводили в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) и загружали в 96-луночный планшет для ИФА [0,25; 0,5; 1,0; 2,0 мкг общего растворимого белка (TSP) на лунку], используя гирудин (Abcam, Великобритания) или рекомбинантный hG-CSF (Abcam, Великобритания) в качестве контроля. Сорбцию белка проводили в течение 2ч при комнатной температуре на шейкере, после отмывки (4 раза по 3 мин в PBS, содержащем 0,05% Tween 20) планшет блокировали в PBS, содержащем 0,05% Tween 20 и 2% бычий сывороточный альбумин (1 час при комнатной температуре).

В качестве первичных антител для гирудина использовали мышинные моноклональные антитела к гирудину в разведении 1:500 (AbCam, Великобритания), а в качестве вторичных - конъюгированные с пероксидазой хрена мышинные антитела IgG (BioRad, США) в разведении 1:2000.

Для ГКСФ использовали кроличьи поликлональные антитела против hG-CSF (Absam, Великобритания) разводили в соотношении 1:1000, а в качестве вторичных - конъюгированные с щелочной фосфатазой кроличьи антитела IgG, (Pierce, США) в соотношении 1:2000.

Гибридизацию с первичными антителами в обоих случаях проводили в течение 16 ч при температуре +4 ° С. После отмывки, добавляли вторичные антитела, проводили гибридизацию со вторичными антителами в течение 1 ч при комнатной температуре с последующей отмывкой и детектированием связанных антител. Планшеты проявляли в течение 30 мин при комнатной температуре с использованием субстрата TMB Peroxidase EIA (BioRad). Планшеты считывали при 405 нм, и количество экспрессируемого растениями гирудина оценивали на основе эталонных стандартов.

2.4 Агробактериальная трансформация

2.4.1 Транзиентная агробактериальная трансформация

Для проведения экспериментов по оптимизации генетической трансформации вольфии использовали три супервирулентных штамма *Agrobacterium tumefaciens*: ЕНА105 (Hood E.E., 1993), CBE21 (Bagyan I.L., 1995) и Agl0 (Lazo G.R., 1991) – содержащие конструкцию pVec035, в состав которой входит интронсодержащий ген β -глюкоронидазы *Escherichia coli* (*uidA*) (рис.6)

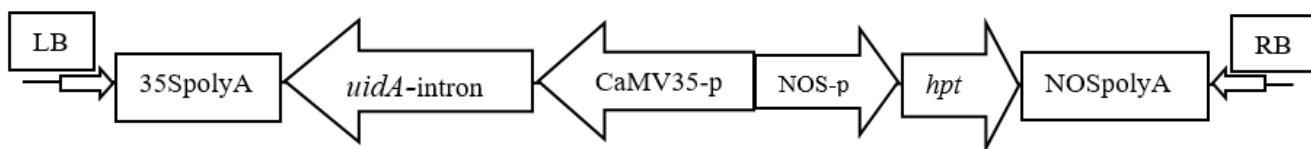


Рисунок 6. Схематическое представление области Т-ДНК вектора pVec035. CaMV35-p – промотор 35S субъединицы вируса мозаики цветной капусты; *uidA*-intron – интронсодержащий ген β -глюкоронидазы (*gus*); NOSpolyA – терминатор

нопалинсинтазы; *hpt* – белоккодирующая последовательность гена гигромицинофосфотрансферазы; NOS-p – промотор нопалинсинтазы; 35SpolyA – терминатор 35S вируса мозаики цветной капусты с сигналом полиаденилирования; LB, RB – соответственно левая и правая фланкирующие последовательности T-ДНК.

Всего в экспериментах по транзientной трансформации было задействовано порядка 3 750 эксплантов. Для трансформации использовали ночную культуру каждого штамма агробактерии, выращенную в шейкере-инкубаторе (180 об/мин) в течение 24 ч при 28°C в темноте в 50 мл жидкой среды YEP, дополненной соответствующими селективными антибиотиками: 100 мг/л канамицина (Km) для всех штаммов, совместно с 5 мг/л гигромицина (Hug) для штамма CBE21 или 50 мг/л рифампицина (Rif) для штаммов EHA105 и Agl0. Для инокуляции эксплантов использовали агробактериальные суспензии, разведенные стерильной дистиллированной водой до оптической плотности (OD_{600}) в диапазоне 0,2-1,0 с шагом 0,2 единицы (т.е. 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 и 1,0). В колбу объемом 250 мл помещали 20 г растительного материала и добавляли 150 мл бактериальной суспензии. Экспланты выдерживали в течение 30 мин на орбитальном шейкере (90 об/мин) и помещали для кокультивации на чашки Петри с безгормональной средой SH и размещенными на поверхности среды бумажными фильтрами. Кокультивацию эксплантов проводили на свету при 21°C. Пробы для гистохимического анализа отбирали каждые сутки (в трехкратных повторях для каждого варианта эксперимента) в течение последующих 6 суток кокультивации (24, 48, 72, 96, 120, 148 ч).

Эффективность трансформации (E) рассчитывали как частное от деления числа точек транзientной экспрессии (Ne) на общее число эксплантов в варианте (No), результат выражали в процентах (%): $E = (Ne/No) \times 100$.

2.4.2 Агробактериальный штамм и бинарные вектора

Для проведения экспериментов по генетической трансформации вольфии применяли обезоруженный супервирулентный штамм *Agrobacterium tumefaciens* ЕНА105 с интродукцией векторных конструкций pCamHIR и pCamGCSF (рисунок 7,8), содержащих в себе целевые гены, кодирующие дисульфатогирудин-1 и гранулоцитарный колониестимулирующий фактор человека.

Выращивание агробактерии проводили при 28 °С на агаризованной среде LB (Sambrook J. et. al, 1989), дополненной соответствующими селективными антибиотиками (100 мг/л канамицина и 50 мг/л рифампицина).

2.4.3 Векторные конструкции с целевыми белками гирудина и ГКСФ

Конструкции для агробактериальной трансформации вольфии бескорневой были подобраны следующим образом. Используя предположение о том, что кодонные последовательности *Lemna gibba*, принадлежащей тому же семейству *Lemnaceae*, что и *W. arrhiza*, существенно у двух этих видов не различаются, была произведена кодон-оптимизация целевых генов относительно частоты использования кодонов у *Lemna gibba*.

Векторная конструкция для ГКСФ. В экспериментах по агробактериальной трансформации вольфии была использована аминокислотная последовательность гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека (DrugBank: DB00099), соответствующая препарату Филграстим (Vacchelli, E., 2013) (рис.7).

Обратная трансляция и оптимизация кодонного состава нуклеотидной последовательности ГКСФ были выполнены с помощью программы Gene Composer (Lorimer и др., 2009).

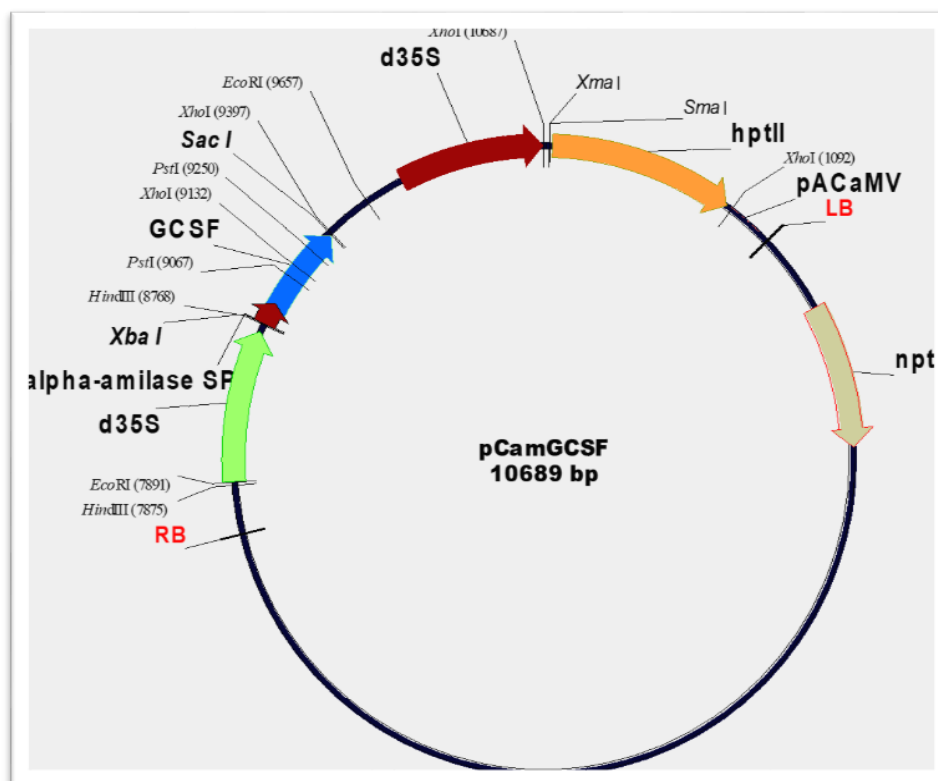


Рисунок 7. Карта бинарного вектора pCamGCSF, где LB, RB – левая и правая фланкирующие последовательности Т-ДНК; GCSF – нуклеотидная последовательность гена гранулоцитарного колониестимулирующего фактора; CAMV35S- 35S промотор вируса мозаики цветной капусты; D35S- двойной 35S промотор вируса мозаики цветной капусты; alpha-amylase SP- сигнальный пептид альфа-амилазы риса; hptII- гигромицинофосфотрансфераза II; npt – неомицинофосфотрансфераза; pACaMV- сигнал полиаденилирования вируса мозаики цветной капусты.

Для оптимизация кодонного состава была использована таблица частоты встречаемости кодонов у *Lemna gibba* (<http://www.kazusa.or.jp/codon>). Дизайн набора перекрывающихся олигонуклеотидов был выполнен с помощью программы Gene2Oligo (Rouillard и др., 2004). Нуклеотидная последовательность рекомбинантного ГКСФ была синтезирована методом ПЦР (Rouillard и др., 2004). Полученную в результате ПЦР последовательность амплифицировали с

использованием праймеров G1for (5'-GTCCAAGCTTATGGCGAAGAGGATCGCC-3') и G2rev (5'-ATGAATTCTCACGGTTGGGCGAGATG-3') в последовательности которых были добавлены сайты для клонирования HindIII и EcoRI. Полученный фрагмент клонировали в векторе pUC18 и секвенировали. В результате были отобраны клоны *E. coli*, содержащие вставки с ожидаемой нуклеотидной последовательностью. Далее, нуклеотидная последовательность ГКСФ была вырезана из pUC18 и клонирована по сайтам HindIII и EcoRI в растительный экспрессионный вектор pCamPPV_{ср} вместо гена белка оболочки вируса шарки сливы (Dolgov et al., 2010). Данная конструкция была привнесена в агробактериальный штамм *A. tumefaciens* EHA105 (Hood et al. 1993) и использована для трансформации вольфии.

Векторная конструкция для гирудина. Нуклеотидная последовательность рекомбинантного дисульфатогирудина-1 была синтезирована методом ПЦР (Rouillard и др., 2004). Полученную последовательность амплифицировали (1 мин, 94 ° C; 1 мин, 60 ° C; 30 сек, 72 ° C; 30 циклов) с использованием праймеров HirXF (5'-AGCTCTAGAATGGCCAAGAGGATTGC-3') и HirSR (5'-TTCGAGCTCTCATTTGGAGGTACTCTTCAGG-3'), в последовательности которых добавлены сайты для эндонуклеаз рестрикции XbaI и SacI. Полученный фрагмент ДНК был клонирован в вектор экспрессии растений pCamPPV_{ср} вместо гена белка оболочки вируса оспы сливы (Dolgov et al. 2010) и секвенирован. Полученную плазмиду pCamHIR (рис.8) переносили в штамм *A. tumefaciens* EHA105 (Hood et al. 1993) и использовали для трансформации вольфии.

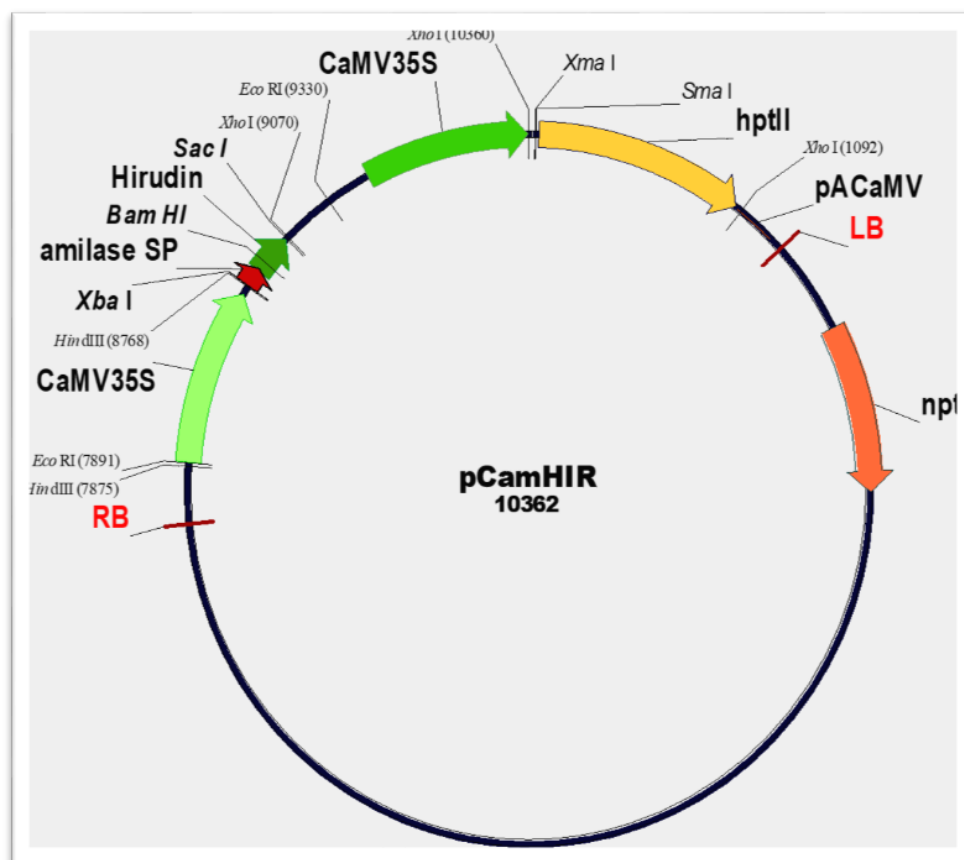


Рисунок 8. Карта бинарного вектора pCamHIR, где LB, RB – левая и правая фланкирующие последовательности Т-ДНК; Hirudin - нуклеотидная последовательность гена дисульфатогирудина-1; CAMV35S- 35S промотор вируса мозаики цветной капусты; D35S- двойной 35S промотор вируса мозаики цветной капусты; alpha-amylase SP- сигнальный пептид альфа-амилазы риса; hptII-гигромицинофосфотрансфераза II; npt – неомицинофосфотрансфераза; pACaMV-сигнал полиаденилирования вируса мозаики цветной капусты.

Для транспорта рекомбинантных белков (ГКСФ как и дисульфатогирудина-1) в ЭПР и далее в апопласт, N- концевой сигнальный пептид hG-CSF был заменён на соответствующий сигнальный пептид α -амилазы риса (GenBank: AAA33897.1).

2.4.4 Методика стабильной агробактериальной трансформации вольфии

Эксперименты проводили методом кокультивации эксплантов (кластеров) с суспензией агробактерии. Ночную культуру агробактерии наращивали в 50 мл жидкой среды YEB, дополненной канамицином (Km) 100 мг/л и рифампицином (Rif) 50 мг/л на орбитальном шейкере (180 об/мин) в течение 24 часов при 28 °C в темноте. Затем ее разбавляли стерильной дистиллированной водой, не содержащей фитогормонов, до финальной концентрации, соответствующей оптической плотности $OD_{600} = 0,4-0,6$.

В экспериментах использовались кластерные структуры вольфии, прошедшие прекультивацию. Для инокуляции 200 г растительного материала помещали в колбу общим объемом 1 л с 500 мл инокулюма и выдерживали его в течение 30 мин на орбитальном шейкере (100 об/мин). Подсушенные в потоке воздуха ламинар-бокса экспланты переносили на бумажные фильтры, помещённые на поверхность среды SH в чашках Петри, и кокультивировали на свету при температуре 21 °C в течение 72 ч. По истечении периода кокультивации экспланты отмывали жидкой безорганической средой SH с добавлением 300 мг/л тиментина и переносили на среды для культивирования эксплантов и элиминации агробактерии (100 мг/л тиментина). Для отбора трансгенного материала в состав питательной среды вводили селективный антибиотик гигромицин в концентрации 5 мг/л.

Для увеличения пролиферации тканей вольфии были использованы регуляторы роста 2,4-D совместно с ВА. В течение первых 2 недель культивирования протрансформированных эксплантов осуществлялось в присутствии в среде 2,4-D совместно с ВА. По истечении времени экспонирования на средах содержащих регуляторы роста экспланты переносили на безгормональную среду SH для индукции регенерации. В экспериментах было задействовано 25 вариантов комбинаций регуляторов роста 2,4-D и ВА (2,4-D в концентрациях 0,5–2,5 мг/л с

шагом 0,5 мг/л совместно с ВА в концентрациях 0,5–2,5 мг/л с шагом 0,5 мг/л) в трех повторах. Итого, было задействовано около 1 600 эксплантов с использованием 65 чашек Петри в каждом повторе.

2.5 Расчет эффективности стабильной трансформации

Эффективность трансформации рассчитывали, как частное от деления количества эксплантов сформировавших трансгенные популяции на общее количество эксплантов участвовавших в эксперименте, результат выражали в процентах. Под трансгенной популяцией понимаются растения, сформировавшиеся на одной чашке Петри в присутствии селективного антибиотика. Для того что бы трансгенная популяция была представлена одной трансгенной линией, отбирали 5 единичных растений, которые формировали изолированные самостоятельные популяции в присутствии селективного антибиотика в культивационной среде. Далее через 4 недели для анализов из пяти изолятов отбирался один, сформировавший наибольшую биомассу.

2.6 Сравнение нескольких средних по критерию Дункана

При сравнении нескольких средних можно проводить сравнение попарно. Однако для использования при сравнении полной информации о всех средних такое сравнение проводят при помощи множественного рангового критерия Дункана. Процедура состоит из серии попарных сравнений между средними значениями. Установив при помощи дисперсионного анализа значимость влияния данного фактора, выясняют при помощи рангового критерия Дункана, какие именно средние значения различны.

С математической точки зрения задача формулируется следующим образом. Имеется несколько средних \bar{x}_j , полученных по k подвыборкам объемом n_j .

Требуется выяснить, являются ли числа \bar{x}_j оценками одной и той же генеральной средней. Этой формулировке соответствует нулевая гипотеза

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_k, (2.8)$$

где μ_1, \dots, μ_k – генеральные средние подвыборок. Каждое сравнение выполняется на уровне значимости, определяемом количеством средних, разделяющих два сравниваемых средних (для разделяющих средних). Тесты выполняются последовательно, где результат теста определяет, какой тест выполняется следующим. Далее выборки ранжируются. Данные группируются на кластеры. Кластеры нам показывают сродство вариантов выборок. В нашем исследовании кластеры показывают наиболее подходящий вариант использования гормонов из 25 вариантов комбинаций.

2.7 Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных проводили с помощью дисперсионного анализа с последующим множественным сравнением частных средних и оценки их по критерию Дункана (Доспехов, 1979; Рокицкий, 1973; <https://www.statisticshowto.com/duncans-multiple-range-test/>) с использованием программы AGROS (разработчик д.б.н. Мартынов С.П.) (Мартынов С.П., 1999)

Глава 3. Результаты и обсуждение

3.1 Оптимизация условий транзientной трансформации

Для того чтобы использовать растения вольфии бескорневой в качестве экспрессионной платформы для биофарминга необходимо проводить исследования не только ее потенциала каллусогенеза и регенерации, но и оптимизации условий агробактериальной трансформации. Оптимизация условий транзientной трансформации являлась первым шагом. Были использованы 3 агробактериальных штамма (ЕНА105, СВЕ21, Agl10) в разных концентрациях (OD_{600} от 0,1 до 1,0). Все штаммы содержали конструкцию с геном *gus* (*uidA*). Гистохимический анализ проведен по методике R. Jefferson. Результаты оказались следующие:

1. После инокуляции эксплантов суспензией агробактериального штамма ЕНА105 с оптической плотностью 0,4 (OD_{600}) через 72 ч кокультивации эффективность транзientной экспрессии была максимальной на уровне 19% (рис. 9а).
2. Наибольшая эффективность транзientной экспрессии в варианте с использованием штамма СВЕ21 была отмечена при использовании инокулюма с оптической плотностью 0,8 (OD_{600}) через 4 суток кокультивации. В этом варианте эффективность трансформации составила 14% (рис. 9б).
3. При трансформации агробактериальным штаммом Agl10 только на 5 сутки можно было отметить точки окрашивания растений, максимальная эффективность составила всего 3% в концентрации (OD_{600}) инокулюма 1,0 (рис.9в).

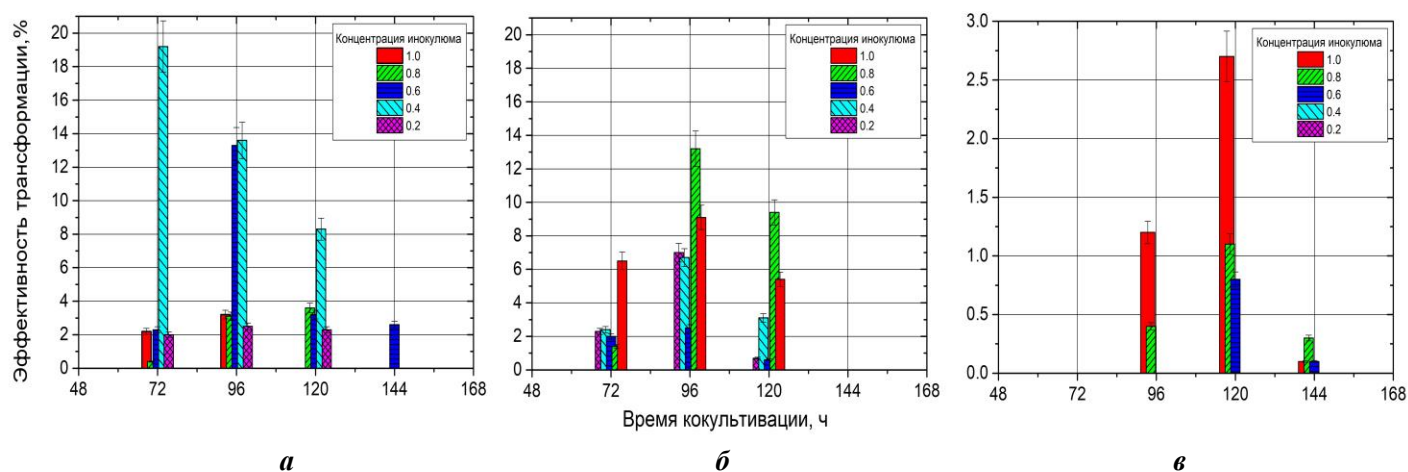


Рисунок 9. Эффективность транзientной экспрессии гена *uidA* в тканях эксплантов вольфии в зависимости от штамма агробактерии: ЕНА 105 (а), СВЕ 21 (б), Agl0 (в). Концентрации инокулюма указаны в оптических единицах при длине волны 600 нм (OD₆₀₀). Гистохимический анализ проведен по методике R. Jefferson.

Для достижения результата кокультивация кластеров вольфии со штаммами CBE 21 и Agl0 в ходе эксперимента занимала больше времени от 96 до 120 часов, при оптической плотности 0,8 и 1 соответственно, а эффективность транзientной трансформации при этом была ниже (14 и 3%), чем в варианте использования штамма ЕНА 105. Основываясь на полученных результатах данного эксперимента было решено использовать штамм ЕНА 105 в концентрации инокулюма (OD₆₀₀) 0,4, а предпочтительное время кокультивирования эксплантов с агробактерией - 72 часа, для дальнейших экспериментов.

3.2 Исследование влияния регуляторов роста (2,4-Д и ВА) на эффективность трансформации

Ранее в нашей лаборатории удавалось получать трансгенные популяции вольфии с интеграцией в геном различных векторных конструкций (Khvatkov P., 2015, 2018,

2021), но эффективность трансформации не превышала 0,4%. Было установлено, что для успешной трансформации вольфии бескорневой необходимо присутствие в среде 2,4-D совместно с ВА, а предпочтительное время культивирования эксплантов на среде с добавлением регуляторов роста составляет 2 недели. При более продолжительной культивации эксплантов на средах с добавлением 2,4-D совместно с ВА стабильной трансформации вольфии не наблюдалось. Исходя из полученных данных, вторым шагом было необходимо детально изучить влияние регуляторов роста на эффективность трансформации вольфии. Для проверки предположения о том, что регуляторы роста 2,4-Д и ВА в течение первых двух недель селекции и культивирования эксплантов влияют на эффективность трансформации был проведен эксперимент, результаты которого представлены в таблице 3 и таблице 4.

Таблица 3

Дисперсионный анализ результатов эксперимента по изучению влияния 2,4 – D и ВА на эффективность трансформации вольфии

Источник изменчивости	Сумма квадратов	Степени свободы	Средний квадрат	Fфакт.
Общая	2685,354	74	-	-
Варианты	2496,220	24	104,0092	27,496*
фактор 1 (концентрация 2,4 – D)	393,465	4	98,3664	26,004*
фактор 2 (концентрация ВА)	788,047	4	197,0117	52,083*
Взаимодействие 1X2	1314,708	16	82,1692	21,723*
Ошибки	189,134	50	3,7827	-

*-указывает на значимость факторов при $P=95\%$, $S_x=1,123$, $S_{x\%}=28,980\%$, НСР (для сравнения любых средних)=3,189; НСР (для средних по фактору 1)=1,426; НСР (для средних по фактору 2)=1,426. Данные преобразовывались через угол-арксинус $\sqrt{\text{процент}}$.

В эксперименте было задействовано 25 вариантов комбинаций регуляторов роста 2,4 – D и ВА (2,4 – D в концентрациях 0,5 – 2,5 мг/л с шагом 0,5 мг/л совместно с ВА в концентрациях 0,5 – 2,5 мг/л с шагом 0,5 мг/л) в трехкратной повторности по 65 чашек Петри (≈ 3250 эксплантов) каждый. Оптимизацию условий трансформации осуществляли на среде SH с добавлением тиментина 100 мг/л для элиминации агробактерии и гигромицина 5 мг/л для селекции трансгенной ткани. Первый пассаж (2 недели) эксплантов осуществляли на средах с добавлением 2,4-D и ВА, далее экспланты культивировали на безгормональной среде с добавлением соответствующих антибиотиков. Все растения, сформировавшиеся на одной чашке Петри, принимались за одну трансгенную популяцию.

Для сравнения множества комбинаций концентраций регуляторов роста 2,4-D и ВА в работе был использован критерий Дункана. В таблице 4 представлены результаты распределения величин наблюдаемых средних. Анализ данных эффективности трансформации вольфии показал, что, распределение величин, отличалось от нормального. При увеличении концентрации 2,4-D с 1,0 до 2,0 мг/л в присутствии 1,0 мг/л ВА эффективность трансформации была одинаковой, а при 2,5 мг/л 2,4-D снижалась. В присутствии ВА в концентрации от 1,5 мг/л, а 2,4-D до 2,5 мг/л эффективность повышалась. В присутствии 2,0 мг/л ВА эффективность трансформации повышалась при увеличении концентрации 2,4-D с 1,0 до 2,0 мг/л, но дальше не менялась. Средние показатели влияния ВА в результативных вариантах (в концентрациях 1.0, 1.5 и 2.0 мг/л) на эффективность трансформации вольфии статистически достоверными отличиями не обладали и составляли 0,2%. Средние показатели влияния 2,4-D на эффективность трансформации вольфии в результативных вариантах (1,0; 1,5; 2,0 и 2,5 мг/л) росли по мере увеличения концентрации этого регулятора роста, хотя четкой зависимости между вариантами не было выявлено (Шведова А.Н., 2022).

Таблица 4

Влияние различных концентраций 2,4-D и ВА, а также их комбинаций на эффективность трансформации *Wolffia arrhiza*

Эффективность трансформации*, %						
Концентрация 2,4-D, мг/л	Концентрация ВА, мг/л					Среднее
	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	
0.5	0.0 a	0.0 a	0.0 a	0.0 a	0.0 a	0.0
1.0	0.0 a	0.37 lm	0.08 cdef	0.10 defg	0.0 a	0.14
1.5	0.0 a	0.32 ijklm	0.11 efg	0.17 fghi	0.0 a	0.15
2.0	0.0 a	0.28 hijklm	0.21 ghijklm	0.36 jklm	0.0 a	0.21
2.5	0.0 a	0.05 bcde	0.54 m	0.37 klm	0.0 a	0.24
Среднее	0.0	0.20	0.19	0.20	0.0	

*Примечание: Различные буквы указывают на достоверную принадлежность данных к отдельному (в случае присвоения одной буквы) или множественному (в случае присвоения нескольких букв) кластеру согласно методике Дункана. Среднее – среднее значение эффективности трансформации по содержанию 2,4-D и ВА соответственно

Согласно анализу по критерию Дункана показано, что кластеру m (кластер родственных выборок в нашем исследовании) принадлежит 7 из 12 результативных вариантов комбинаций регуляторов роста. На основе этих данных было выдвинуто предположение, что для эффективной трансформации важна не столько концентрация каждого регулятора роста, как их баланс в среде для культивирования эксплантов. При анализе вариантов по показателю отношения 2,4-D/ВА установлено, что наибольшую эффективность стабильной трансформации вольфии статистически достоверно регистрировали при соотношении 1,67 (рисунок 10).

Таким образом, максимальная эффективность трансформации *Wolffia arrhiza* составила 0,54% при использовании для селекции и культивирования инокулированных эксплантов на первом пассаже среды SH с 2,5 мг/л 2,4-D и 1,5 мг/л ВА.

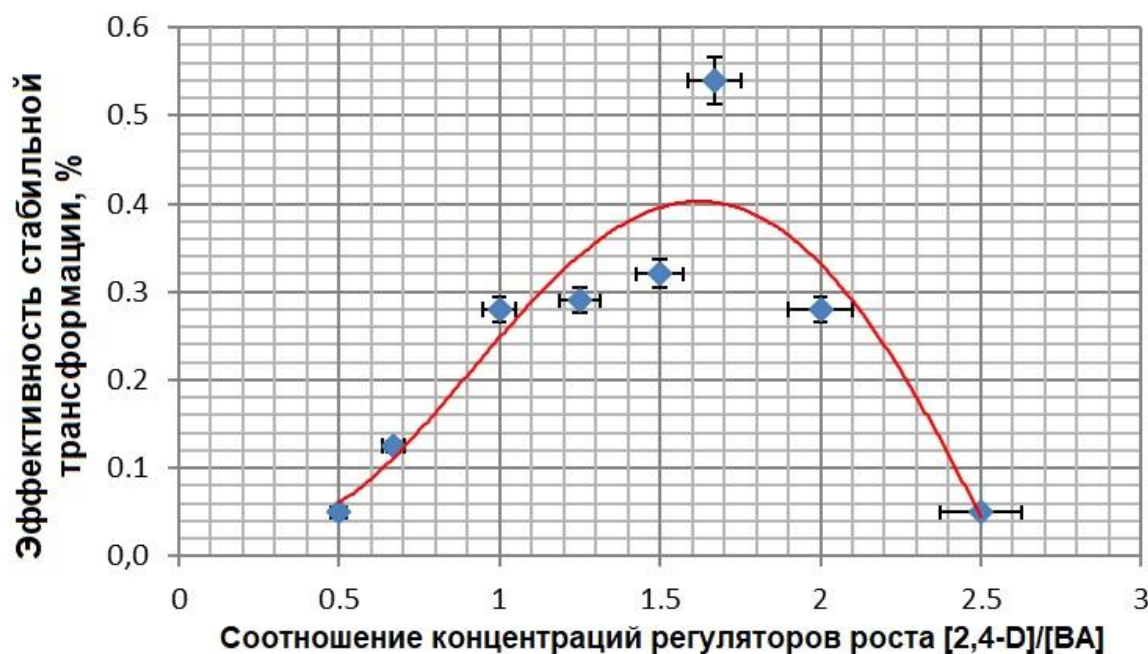


Рисунок 10. Влияние соотношения концентраций регуляторов роста ([2,4-D]/[BA]) на эффективность стабильной трансформации *Wolffia arrhiza*.

В ходе данного эксперимента было показано, что для эффективной стабильной трансформации наиболее важен именно баланс (соотношение) 2,4-D/ВА в среде для культивирования эксплантов. В результате проведенного исследования эффективность трансформации *Wolffia arrhiza* относительно исходного протокола (Khvatkov P., 2015) с 0,2% удалось повысить до 0,4-0,5% на 100 эксплантов.

3.3 Получение трансгенных регенерантов вольфии

Экспериментально показано, что для получения трансгенных растений вольфии бескорневой необходима культивация эксплантов в течение первых двух недель на среде SH содержащей 2,4-D в концентрации 2,5 мг/л совместно с ВА в концентрации 1,5 мг/л. Далее производился пассаж на среду SH с добавлением гигромицина в концентрации 5 мг/л и без добавления регуляторов роста. После 6 недель культивирования на среде SH без регуляторов роста на поверхности кластера появлялась зеленая меристематическая область, а из нее через 8-10 недель развивались изумрудно-зеленые глобулярные структуры, из которых затем развивались целые растения. При дальнейшем культивировании гигромицин-устойчивые и нетрансформированные растения *Wolffia* не различались ни морфологически, ни по скорости роста биомассы популяции.

Для агробактериальной трансформации *W. arrhiza* использовали агробактериальный штамм ЕНА105 содержащий плазмиду pCamGCSF. Всего в экспериментах по трансформации было использовано 8100 эксплантов. Эффективность трансформации составила 0,42 % на 100 эксплантов. Всего было получено 34 независимых линии *Wolffia*, которые развивались в присутствии в среде гигромицина. Эти линии были использованы для дальнейшего количественно и качественного анализа.

В экспериментах по агробактериальной трансформации вольфии штаммом ЕНА105 содержащим плазмиду pCamHIR было задействовано 8550 эксплантов. Эффективность трансформации составила 0,48% на 100 эксплантов. Всего было получено 41 независимая Нуг-устойчивая трансгенная популяция вольфии. Далее все линии были дополнительно проанализированы с помощью ПЦР, двадцать из них были проанализированы с помощью ELISA, десять - с помощью саузерн-блоттинга и три линии (с наибольшей экспрессией гирудина) - с помощью вестерн-блоттинга.

Результаты ПЦР-анализа. По данным ПЦР-анализа, почти все трансгенные линии содержали вставки целевых генов. Контаминации агробактериальными генами *vir* группы в проанализированных образцах не было (рисунок 11).

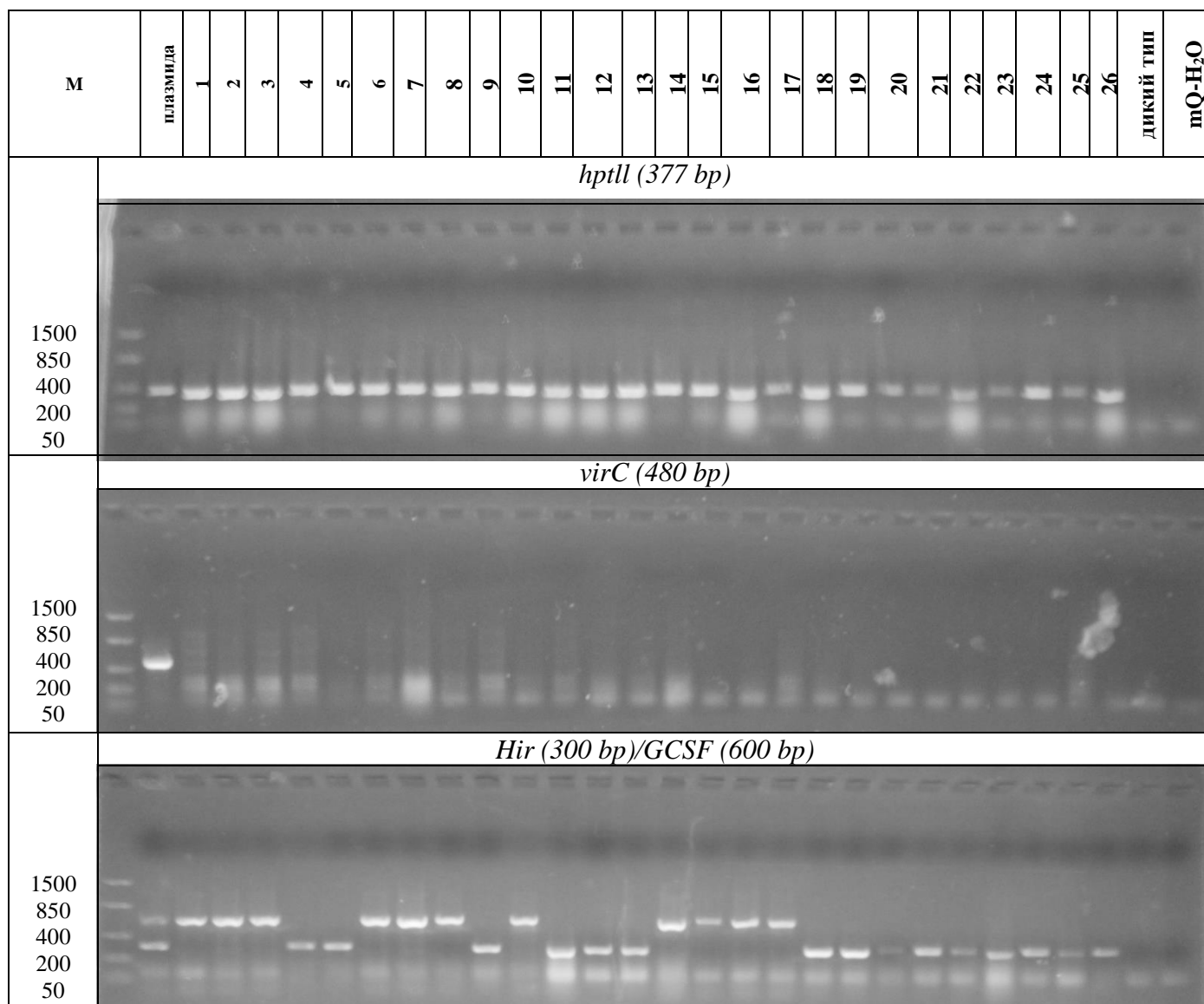


Рисунок 11. Электрофореграмма продуктов ПЦР, где М - маркер молекулярных масс, дикий тип – не трансгенное растение, mQ H₂O – отрицательный контроль для проверки чистоты реактивов, а 1-26 – анализируемые образцы.

Все 34 полученные гигромицин-устойчивые линии *Wolffia* содержали селективный ген *hptII* и целевую последовательность *hG-CSF*.

В результате ПЦР-анализа трансгенных линий вольфии содержащих целевую последовательность *Hirudin* и селективный ген *hptII* выяснилось, что 40 гигромицин-устойчивых линий содержали обе последовательности, а 1 линия только последовательность устойчивости к гигромицину.

3.4 Количественные показатели экспрессии генов гирудина и ГКСФ в трансгенных растениях *W. arrhiza*

3.4.1 Анализ растений, трансформированных плазмидой *pCamHIR*

Накопление рекомбинантного гирудина было изучено в 20 случайно отобранных независимых трансгенных линиях. По данным ИФА гирудин накапливался только в 3х линиях, а в остальных 17 линиях гирудин не детектировался. Значения оптической плотности, полученные в результате ИФА для этих линий, достоверно не отличались от соответствующих значений для нетрансгенного контроля (табл.5) Наибольшие уровни накопления гирудина наблюдались в линии Wh15 ($775,5 \pm 111,9$ нг / г FW), в линиях Wh09 и Wh19 накопление гирудина было ниже - $766,4 \pm 98,9$ и $534,5 \pm 109,6$ нг/г FW соответственно (табл.5). Следует отметить, что различия в накоплении гирудина в линиях Wh09, Wh15 и Wh19 статистически не существенны.

Линии с максимальной экспрессией гирудина были выбраны для вестерн-блот анализа. В результате анализа гирудин был обнаружен только у одной трансгенной линии (Wh15) из 3 исследованных.

Содержание гирудина в растительных клетках

Названия трансгенных линий	Содержание гена гирудина в растительных клетках	
	ОП пробы	нг/г зеленой массы
WH-01	0,045	-
WH-02	0,07	-
WH-03	0,062	-
WH-04	0,045	-
WH-05	0,045	-
WH-06	0,0655	-
WH-07	0,047	-
WH-08	0,0455	-
WH-09	0,125	766,4±99
WH-10	0,062	-
WH-11	0,0455	-
WH-12	0,044	-
WH-13	0,0425	-
WH-14	0,0425	-
WH-15	0,126	775,5±112
WH-16	0,0435	-
WH-17	0,0565	-
WH-18	0,0475	-
WH-19	0,0995	534,5±110
WH-20	0,0455	-
Контроль	0,0545	-

Гирудин в трансгенной вольфии мигрировал в геле с той же скоростью, что и контрольный белок. Это подтверждает расщепление N-концевого сигнального пептида α -амилазы риса и указывает на правильный процессинг прегирудина в

растениях *Wolffia*. В контрольном образце белка из растений дикого типа (не трансгенных) не наблюдали иммунореактивной полосы соответствующей гирудину.

Саузерн-блот анализа для растений, трансформированных плазмидой pCamHIR.

Десять трансгенных линий были проанализированы саузерн-блоттингом. Полученные результаты подтвердили интеграцию гена гирудина в геном *Wolffia*. В исследуемых образцах были обнаружены от 1го до 6 локусов интеграции в геном вольфии (рис.12).

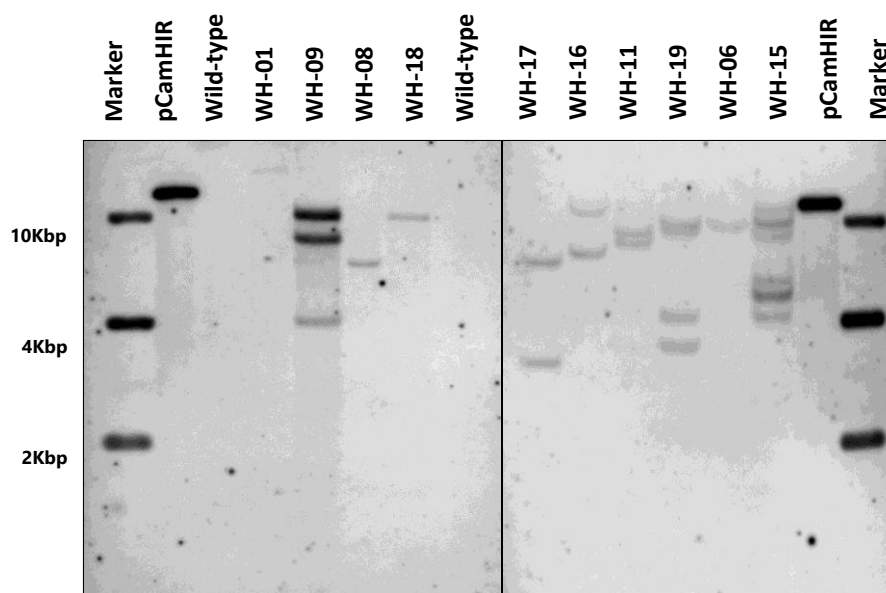


Рисунок 12. Саузерн-блот анализ линий вольфии с интеграцией гена гирудина

Таким образом, была показана возможность экспрессии рекомбинантного гирудина в геномно-трансформированных растениях *Wolffia*.

В результате исследования были впервые получены трансгенные растения *Wolffia*, экспрессирующие рекомбинантный гирудин человека. Максимальное накопление гирудина в линии Wh15 составило 775,5нг/г сырого веса, в линиях Wh09 766,4нг/г и Wh19 534,5 нг/г, что значительно выше, чем в большинстве экспериментов по экспрессии пептидов в растительных экспрессионных системах, но ниже, чем в некоторых случаях рясковых экспрессионных систем.

3.4.2 Анализ растений, трансформированных плазмидой pCamGCSF

Аккумуляция рекомбинантного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора была изучена в 34 трансгенных линиях. По данным ИФА ГКСФ накапливался в 33 из 34 трансгенных линий. Количественное определение целевого белка в трансгенных растениях *Wolffia* с использованием ИФА показало накопление от 0,36 до 35,5 мг на 1 кг зеленой массы *Wolffia* (таблица 6).

Самые высокие уровни накопления ГКСФ наблюдались в линиях WG-04 и WG-32 (33,9 и 35,5 мкг на кг зеленой массы).

Таблица 6

Количественное содержание ГКСФ в растительных тканях

Название трансгенных линий	Содержание ГКСФ в растительных тканях		
	Содержание целевого белка ОРБ (%)	мг/ 100 г сухой массы	мг/кг зеленой массы
1	2	3	4
WG-01	0.005 ± 0.002	1.97 a	0.95 a
WG-02	0.037 ± 0.017	13.69 ab	6.57 ab
WG-03	0.014 ± 0.006	5.18 ab	2.49 ab
WG-04	0.191 ± 0.052	70.67 de	33.85 de
WG-05	0.011 ± 0.006	4.07 a	1.95 a
WG-06	0.087 ± 0.070	32.19 bc	15.45 bc
WG-07	0.008 ± 0.004	2.96 a	1.42 a
WG-08	0.009 ± 0.001	3.33 a	1.60 a
WG-09	0.002 ± 0.001	0.74 a	0.36 a
WG-10	0.004 ± 0.003	1.48 a	0.71 a
WG-11	0.007 ± 0.002	2.59 a	1.24 a
WG-12	0.004 ± 0.003	1.48 a	0.71 a
WG-13	0.003 ± 0.001	1.11 a	0.53 a
WG-14	0.002 ± 0.001	1.07 a	0.36 a
WG-15	0.007 ± 0.004	2.59 a	1.24 a
WG-16	0.008 ± 0.002	2.96 a	1.42 a
WG-17	0.008 ± 0.004	2.96 a	1.42 a

1	2	3	4
WG-18	0.005 ± 0.002	1.85 a	0.89 a
WG-19	0.006 ± 0.001	2.22 a	1.06 a
WG-20	0.005 ± 0.003	1.85 a	0.89 a
WG-21	0.005 ± 0.002	1.85 a	0.89 a
WG-22	0.006 ± 0.001	2.22 a	1.07 a
WG-23	0.006 ± 0.004	2.22 a	1.0 a
WG-24	0.033 ± 0.021	12.21 ab	5.86 ab
WG-25	0.008 ± 0.001	2.96 a	1.42 a
WG-26	0.005 ± 0.003	1.85 a	0.89 a
WG-27	0.010 ± 0.001	3.70 a	1.78 a
WG-28	0.000 ± 0.000	0.00 a	0.00 a
WG-29	0.010 ± 0.004	3.70 a	1.78 a
WG-30	0.028 ± 0.008	10.36 ab	4.97 ab
WG-31	0.006 ± 0.004	2.22 a	1.07 a
WG-32	0.194 ± 0.060	71.78 e	34.45 e
WG-33	0.119 ± 0.023	44.03 c	21.13 c
WG-34	0.004 ± 0.003	1.48 a	0.71 a
Контроль	0.000 ± 0.000	0.00 a	0.00 a

Примечание* различные буквы в столбце указывают на существенные различия в данных вариантов согласно критерию Дункана.

Вестерн-блот с использованием антител к ГКСФ выявил: наличие полосы 20 кДа, соответствующей рекомбинантному hG-CSF в 33 из 34 исследованных трансгенных линиях вольфии (рисунок 13). В контроле не наблюдалось иммунореактивных полос. А максимальное накопление hG-CSF наблюдалась в линиях WG-04 и WG-32, в остальных линиях накопление целевого белка было существенно ниже.

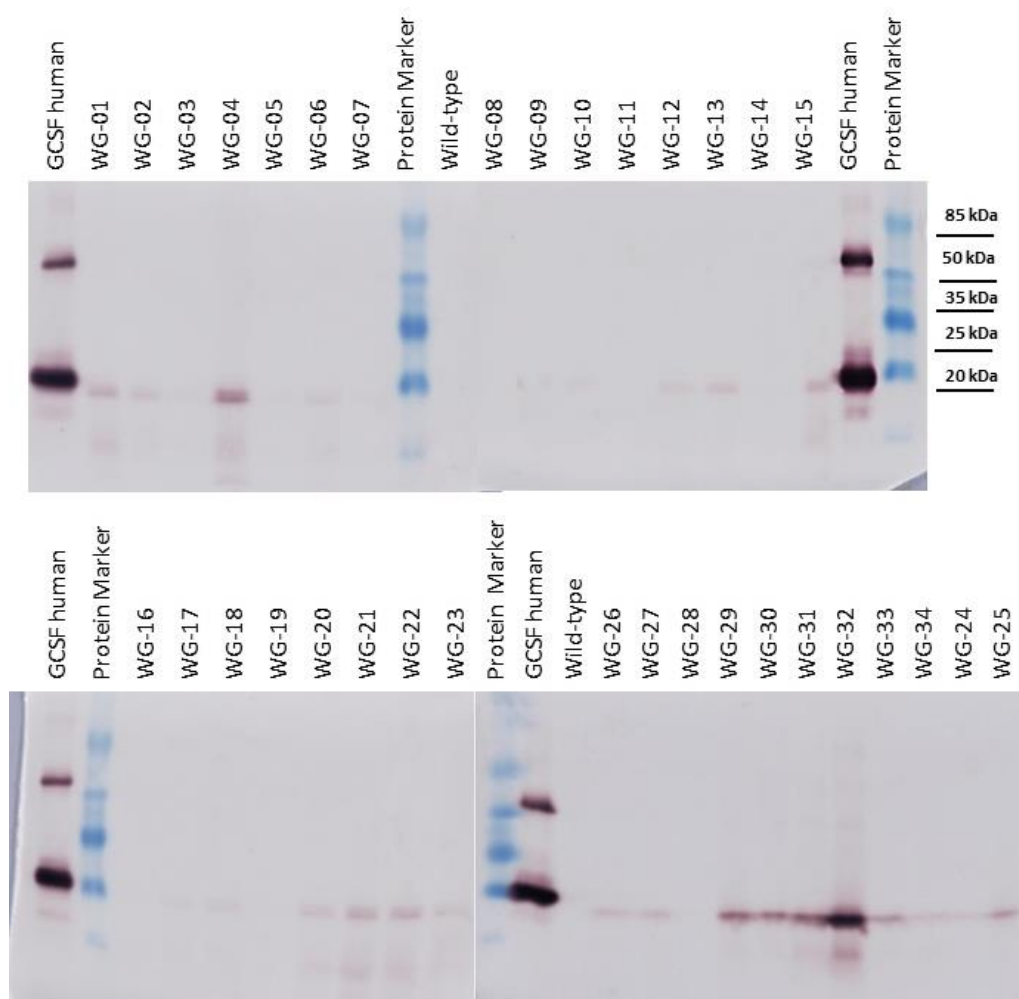


Рисунок 13. Вестерн-блот экспрессии ГКСФ в трансгенных линиях вольфии. Protein Marker - маркер молекулярного размера TS 26612 Protein MW Marker; GCSF human - рекомбинантный ГКСФ (200 нг; AbCam, Великобритания).

Результаты саузерн-блот анализа для растений, трансформированных плазмидой pCamGCSF. Саузерн-блот анализ был проведен для исследования 11 трансгенных линий. Были отобраны линии с различным уровнем экспрессии - нулевым, средним, высоким и низким (рис.14, 15).

Полученные результаты подтвердили интеграцию гена ГКСФ в геномную ДНК *Wolffia* (рис.14). В исследуемых образцах были обнаружены от 1-го до 7 локусов интеграции в геном вольфии. Один локус интеграции в образцах 2, 8, 24, и 27, два – в

образцах 17, 19, 28, четыре - в 6 и 33, пять – в 4, 7 локусов в 32 образце. Данная ситуация характерна для агробактериальной трансформации. ДНК нетрансформированных растений не удалось гибридизовать с зондом.

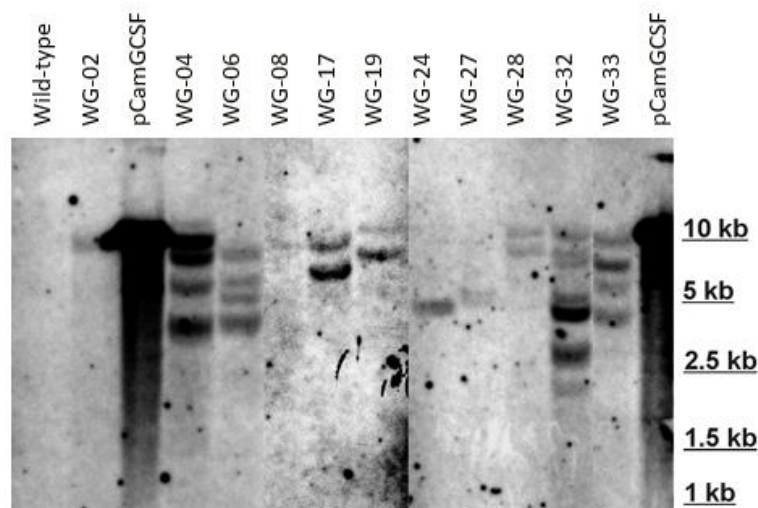


Рисунок 14. Результаты саузерн-блот анализа для 11 трансгенных линий вольфии с разным уровнем накопления ГКСФ

3.4.3 Экспрессия гирудина и ГКСФ в растениях вольфии бескорневой

Экспрессия гирудина в растениях вольфии бескорневой.

В проведенном исследовании накопление рекомбинантного гирудина в трансгенных растениях вольфии Wh15 составляло около 800 мкг / кг сырой массы (соответствует 0,02% от ОРБ), что значительно выше, чем в большинстве экспериментов по экспрессии пептидов в системах экспрессии растений, но ниже, чем в некоторых случаях экспрессии в системах ряски. (Firsov et al., 2015, 2018; Sun et al. 2007; Bertran et al. 2015) Нуклеотидные последовательности гена гирудина и регуляторные элементы, введенные в плазмиду pCamHIR, ранее использовали для трансформации ряски. Козлов и др. (2019) показали, что, вектор способен

обеспечить высокий уровень целевой мРНК в тканях *Lemna minor*. Учитывая сходство полученных результатов с данными других исследователей, которые использовали идентичную нуклеотидную последовательность гена гирудина, есть предположение, что последовательность способна обеспечить высокий уровень экспрессии целевого гена, а определяющий фактор для относительно низкого уровня накопления гирудина - это его нестабильность в тканях растений ряски, в частности, деградация за счет протеолитических ферментов в растении-продуcente. Возможно, условия пространства апопласта ряски, в том числе его протеолитический фон, не оптимальны для накопления рекомбинантного гирудина. Оптимизация продукции гирудина в тканях растений по-прежнему требует поиска эффективных гликоинженерных методов синтеза этого пептида. Накопление рекомбинантного гирудина в трансгенных растениях *Wolffia* может быть увеличено либо путем интеграции конструкций с сигналами локализации пептида в другие, более подходящие, клеточные компартменты, такие как эндоплазматический ретикулум, либо путем экспрессии в составе более стабильного слитого белка, как это было продемонстрировано Фирсовым и соавт. (2015) на примере пептида M2e, слитого с β -глюкуронидазой. Полученные результаты будут в дальнейшем использованы в исследованиях по совершенствованию генетических конструкций для экспрессии рекомбинантных пептидов.

Экспрессия ГКСФ в растениях вольфии бескорневой.

В исследовании была выявлена существенная вариабельность накопления целевого белка среди трансгенных линий. Вариации в экспрессии рекомбинантного белка между независимо полученными трансгенными линиями являются часто встречающимся явлением (Richter et al., 2000; Sharma and Sharma, 2009). Зачастую они связаны с различиями в количестве копий трансгена или в положении в геноме, в которое интегрировалась чужеродная ДНК (Долгова и др., 2015). Оба эти фактора могут быть применены к полученным трансгенным линиям *W. arriza* (рис. 15).

Саузерн-блот-анализ показал заметные различия между изученными линиями как по количеству трансгенных вставок, так и по местам их интеграции в геном растения. Довольно много исследователей придерживаются мнения, что мультикопийность трансгенных инсерций приводит к снижению уровня экспрессии привнесенных генов. Не смотря на поликопийность инсерций гена ГКСФ (рис. 15) в геноме наиболее продуктивных линий вольфии (WG-04 и WG-32), выход целевого продукта с 1 кг сырой массы продуцента был на уровне свыше 30 мг/кг сырой массы.

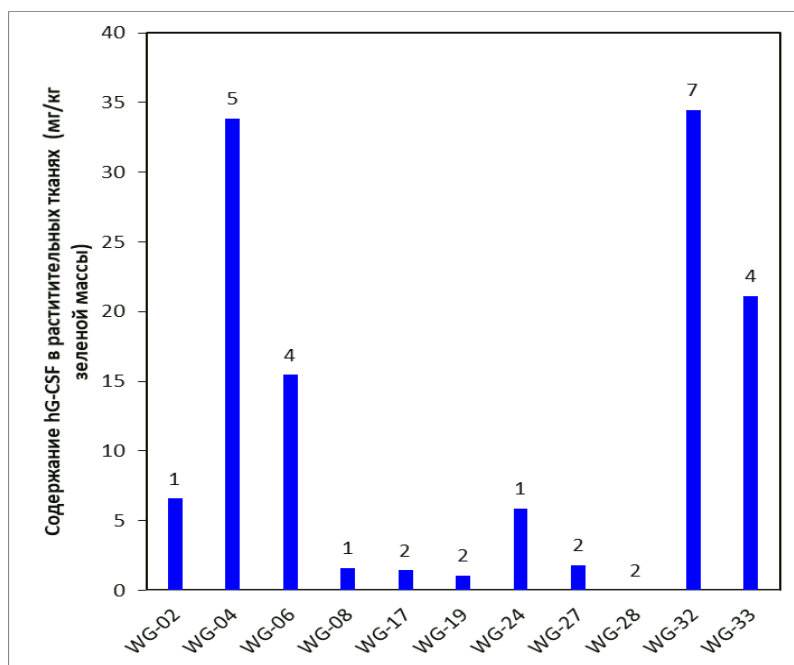


Рисунок 15. Результаты ИФА 11 трансгенных линий вольфии содержащих ген ГКСФ (цифры показывают количество инсерций гена ГКСФ в геном трансгенной линии)

В результате исследования были впервые получены трансгенные растения *Wolffia*, экспрессирующие рекомбинантный ГКСФ. В двух линиях - WG-04 и WG-32 - целевой белок накапливался на высоком уровне - примерно 35 мг рекомбинантного белка на 1 кг сырой массы *Wolffia*. Таким образом, на примере hG-CSF можно говорить о высоком потенциале вольфии бескорневой как продуцента рекомбинантных белков.

3.5 Анализ накопления целового белка (ГКСФ) в культуральной среде

Поскольку вольфию потенциально можно использовать как платформу для экспрессии и трансфера растениями белка в среду было произведено изучение культуральной среды в биореакторе. Для изучения накопления целевого белка ГКСФ в культуральной среде, из всех проанализированных линий растений, была выбрана линия WG-32. Высокое содержание белка в тканях (35,5 мкг на кг зеленой массы) делают ее весьма перспективной.

В результате наблюдений было отмечено, что рост содержания ГКСФ начинается только тогда, когда прирост растительной биомассы достигает половины от максимально возможного значения (рис.16). Что, по-видимому, является наиболее благоприятным условием для наработки белка в среду.

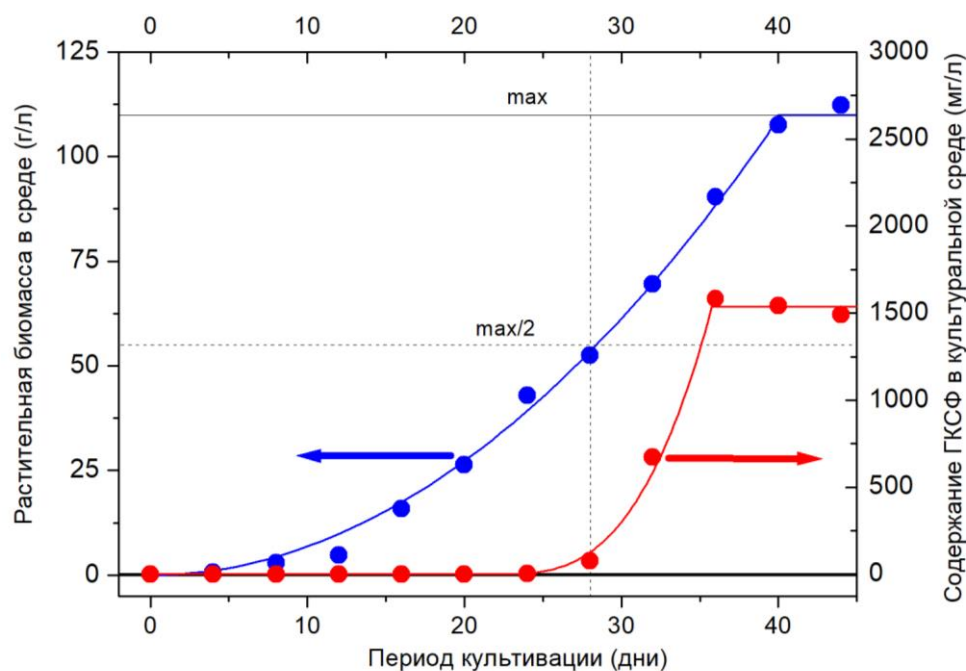


Рисунок 16. Динамика прироста биомассы *Wolffia arrhiza* (линия - WG-32) и динамика накопления hG-CSF в культуральной среде

Полученные зависимости для растительной биомассы и содержания ГКСФ аппроксимируются степенными зависимостями 2го и 3го порядка. Наблюдаемый рост

накопления биомассы может быть описан экспоненциальной функцией. От 0 до 12 дня с меньшей зависимостью, с 12 до 40 дня резкий прирост биомассы, а после 40 дня наблюдается насыщение. Порядка четверти всего нарабатываемого в вольфии ГКСФ успешно транспортировалось в среду культивирования, что позволяет говорить не только об эффективности использования вольфии в качестве платформы для биофарминга, но и предположить достаточную рентабельность производства лекарственных препаратов, с использованием получаемого ГКСФ, при коммерческой реализации данной работы.

Растения вольфии содержащие рекомбинантные белки могут быть перспективными в животноводстве. Поскольку возможно применение пассивной вакцинации домашних птиц и животных съедобными вакцинами.

В случае выделения белка в среду можно говорить о менее трудоемком процессе выделения и очистки рекомбинантных белков, чем из растительной ткани. А производство рекомбинантных вакцин на растительной основе, в частности вольфии бескорневой, может стать все более привлекательным в современном мире.

Заключение

В теоретической части работы были проанализированы основные тенденции развития отрасли растительного биофарминга. Эта отрасль всё больше привлекает внимание не только исследователей во всем мире, но и крупные фармацевтические компании, как следствие наблюдается повышение инвестиций в данную сферу. Увеличение заболеваемости вирусными и бактериальными инфекциями вызывает высокий спрос на вакцины и терапевтические средства, а растения-продуценты рекомбинантных белков помогают ускорить разработку и поставку фармакологических препаратов на рынок. Растения семейства *Legnaseae*, в частности вольфия бескорневая (*W. arrhiza*), способны стать эффективными продуцентами. Ряски уже используются в качестве модельных растений для изучения генетики, физиологии растений, мониторинга окружающей среды и экологии, а также являются инструментом для поиска противомикробных химических веществ. В первой главе также отмечается, что до сих пор не было в достаточном объеме описана эффективная растительная система для некоторых важных (гирудина и ГКСФ) терапевтических белков, а наработка на невысоком уровне осуществляется по-прежнему на модельных объектах. Для растительного биофарминга вольфия имеет большое количество плюсов как биологических, так и экономических. Всё это позволяет описать данные растения как перспективную платформу для экспрессии рекомбинантных белков.

В результате проведенных исследований по оптимизации транзientной трансформации вольфии установлено, что после инокуляции эксплантов суспензией агробактериального штамма ЕНА105 с оптической плотностью 0.4 (OD_{600}) через 72 ч кокультивации эффективность транзientной экспрессии была максимальной – на уровне 19%. На основе этих результатов, а также ранее разработанного протокола

была произведена оптимизация стабильной трансформации вольфии. Было показано, что для успешной трансформации вольфии бескорневой вольфии важен именно баланс 2,4-D/ВА в среде для культивирования эксплантов. Предпочтительное время культивирования эксплантов на среде с добавлением регуляторов роста 2.5 мг/л 2,4-D совместно с 1.5 мг/л ВА должно составлять не более двух недель. Таким образом, эффективность трансформации *Wolffia arrhiza* относительно исходного протокола (Khvatkov P., 2015) удалось повысить с 0,2% до 0,5% на 100 эксплантов.

В ходе работы было получено 34 трансгенных линии содержащих последовательность гена гранулоцитарного колониестимулирующего фактора и 40 линий, содержащих последовательность гена гирудина. Наибольший уровень накопления гирудина наблюдался в линии Wh15 и составил 766,4нг/г зеленой массы (соответствует 0,02% от ОРБ), что является довольно низким уровнем. Предполагается, что такая ситуация наблюдается вследствие нестабильности данного белка в тканях вольфии, в особенности деградация за счет протеолитических ферментов в растениях. Для оптимизации продукции гирудина в тканях растений требуется модификация белка для защиты от протеолитического фона самого растения, или механизмы, позволяющие как можно быстрее выводить данный белок из клетки в среду без его разрушения. Несмотря на сложность работы с данным белком, в исследованиях была продемонстрирована возможность его наработки в небольших количествах в качестве демонстрации вольфии как потенциальной экспрессионной платформы.

Отмечено, что трансгенные линии вольфии содержащие последовательность гена ГКСФ имеют довольно высокий уровень накопления данного белка. Накопление целевого белка на 1 кг зеленой массы *Wolffia* составило от 0,36 до 35,5 мг. Наибольший уровень содержания рекомбинантного ГКСФ наблюдался в двух линиях WG-04 и WG-32 (33,9 и 35,5 мкг на кг зеленой массы, соответствует 0,2% ОРБ). Дальнейшие исследования по накоплению целевого белка в среде, на примере

именно гранулоцитарного колониестимулирующего фактора показали, что порядка четверти всего нарабатываемого в вольфии ГКСФ успешно транспортировалось в среду культивирования, что подводит к потенциальной рентабельности производства лекарственных препаратов при коммерческой реализации данной работы.

Полученные результаты в ходе саузерн-блот анализа показали от 1-го до 7 локусов интеграции в геном вольфии (1-6 для гирудина и 1-7 для гксф). Такая ситуация характерна для агробактериальной трансформации, но, не смотря на поликопийность инсерций, даже в случае с геном гирудина, наиболее высокий уровень среди всех образцов показал вариант, где присутствуют 6 интеграций в геном растения, линия Wh15. На примере с геном hG-CSF линии с наибольшим количеством инсерций (5 и 7 в вариантах WG-04 и WG-32), оказались самые продуктивные, а выход целевого продукта с 1 кг сырой массы продуцента был на уровне свыше 30 мг/кг сырой массы. Таким образом, в случае растений вида *Wolffia arrhiza* мультикопийность вставок не является недостатком как растения-продуцента, а наоборот позволяет добиться более высокого выхода рекомбинантного продукта.

В целом, анализ литературных источников и полученных экспериментальных данных позволяет сделать вывод о том, что вольфия бескорневая может стать перспективным продуцентом в области растительного биофарминга. Также, благодаря более детальной проработке существующего протокола генетической трансформации вольфии бескорневой и повышению его эффективности удалось впервые в мире получить растения, содержащие ценные терапевтические белки - гирудин и гранулоцитарный колониестимулирующий фактор человека.

Выводы

1. Использование гистохимического анализа транзientной экспрессии гена *uidA* в качестве критерия оценки эффективности агробактериальной трансформации позволило добиться 19% эффективности транзientной трансформации эксплантов вольфии бескорневой в результате инокуляции бактериальной суспензией штамма EHA105 с оптической плотностью 0.4 (OD₆₀₀) через 72 ч кокультивации эксплантов с агробактерией.
2. Присутствие на первом пассаже после агробактериальной трансформации в селективной среде 2,5 мг/л 2,4-D совместно с 1,5 мг/л ВА позволило получить стабильные трансгенные линии вольфии с эффективностью трансформации 0,54%.
3. Применение усовершенствованного протокола агробактериальной трансформации позволило получить трансгенные линии вольфии экспрессирующие рекомбинантные терапевтические белки (дисульфатогирудин-1, экспрессирующийся в линиях в диапазоне 534,55-775,45 нг/г сырой массы продуцента, и гранулоцитарный колониестимулирующий фактор человека, экспрессирующийся в линиях в диапазоне от 0,36 до 35,5 мкг/г сырой массы продуцента).
4. Применение технологии культивирования вольфии в биореакторе позволило определить оптимальную плотность популяции для трансфера и экстракции рекомбинантного ГКСФ из культивационной среды.
5. Подтверждена перспективность использования *Wolffia arrhiza* в качестве экспрессионной платформы для наработки терапевтических белков.

Библиографический список

1. Войнов Н.А., Волова Т.Г., Зобова Н.В. Современные проблемы и методы биотехнологии // Электрон.учеб. пособие. – Красноярск: ИПК СФУ, 2009. – 418 с.
2. Доспехов, Б.А. Методика полевого опыта / Б.А. Доспехов – М. : Колос, 1979. – 415 с.
3. Козырева, О.Г. Генетика и регенерация в культуре *in vitro* злаков / Козырева О.Г., Дунаева С.Е. // Генетика. – 1994. – № 10. – С. 1432-1440.
4. Костромина М. А., Биотехнологический способ получения рекомбинантных аналогов гирудина-1 из *Hirudo medicinalis* 2012 г. М. А. Костромина, Р. С. Есипов, А. И. Мирошников // Биоорганическая химия. – 2012, Т.38. – № 2. – С.166–176
5. Мартынов С.П. Пакет программ статистического и биометрико-генетического анализа в растениеводстве и селекции / С.П. Мартынов - Тверь, 1999.
6. Розов С.М. Основные стратегии гликоинженерии растительных систем экспрессии для получения гуманизированных рекомбинантных фармацевтических белков / С.М. Розов, Н.В. Пермякова, Е.В. Дейнеко // Биохимия. – 2018. – Т.83. – №3. – С.328-348
7. Рокицкий, П.Ф. Биологическая статистика / П.Ф. Рокицкий. – Минск: «Вышэйша школа», 1973. – с. 80-107, 187-269.
8. Савельева, Н.В. Трансгенные растения-продуценты веществ медицинского и ветеринарного назначения / Н.В. Савельева, М.С. Бурлаковский, В.В. Емельянов, Л.А. Лутова // Экологическая генетика. – 2015. –Т.2 – №13. – С.77-99. <https://doi.org/10.17816/ecogen13277-99>
9. Скрыпник К. А., Человеческий гранулоцитарный колониестимулирующий фактор в клинической практике. / К. А. Скрыпник, В.С. Косоруков // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – №4. – Т.10– 2011. – С.3-6

10. Хватков, П.А. Изучение условий глубинного культивирования вольфии бескорневой (*Wolffia arrhiza* (L.) Horkel ex Wimm) в модифицированном биореакторе. / П.А. Хватков, М.А. Чернобровкина, В.В. Синев, С.В. Долгов // Биотехнология. – 2013. – №6. – С.51–56.
11. Чернобровкина, М.А. Влияние параметров биолиственной трансформации ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L.) на уровень транзиторной экспрессии репортерного гена gfp / М.А. Чернобровкина, Е.А. Сидоров, И.А. Баранов, П.Н. Харченко, С.В. Долгов // Известия РАН. Серия биологическая. – 2007. – №6. – С. 669-775.
12. Шведова, А.Н. Оптимизация факторов, влияющих на эффективность агробактериальной трансформации *Wolffia arrhiza* / А.Н. Шведова, П.А. Хватков, С.В. Долгов // Биотехнология. – 2022. – Т.38. – №6. – С.40–46.
<https://doi.org/10.56304/S0234275822060126>
13. Altpeter, F. Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities / F. Altpeter, N. Baisakh, R. Beachy, R. Bock, T. Capell, P. Christou, H. Daniell, K. Datta, S. Datta, P.J. Dix, C. Fauquet, N. Huang, A. Kohli, H. Mooibroek, L. Nicholson, T.T. Nguyen, G. Nugent, K. Raemakers, A. Romano, D.A. Somers, E. Stoger, N. Taylor, R. Visser // Molecular Breeding. – 2005. – Vol. 15. – P. 305–327.
14. Akita, M. Induction and development of potato tubers in a jar fermentor / M. Akita, S. Takayama // Plant Cell Tissue Organ Culture. – 1994. – Vol. 36. – P. 177–182.
15. Appenroth, K. J. Telling duckweed apart: Genotyping technologies for Lemnaceae / K. J. Appenroth, N. Borisjuk and E. Lam. // Chin. J. Appl. Environ. Biol. – 2013. – V.19. – P.1-10
16. Appenroth K.J. Nutritional value of duckweeds (Lemnaceae) as human food /K.J. Appenroth, K.S. Sree, V. Böhm, S. Hammann, W. Vetter, M. Leiterer, G. Jahreis //

- Food Chem. – 2017. – V.217. – P. 266–273. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.116>
17. Arakawa T. Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine / T. Arakawa, D. Chong, W. Langridge // Nat. Biotechnol. – 1998. – V.16. – P.292–297. <https://doi.org/10.1038/nbt0398-292>
 18. Bagdy D. Hirudin / D. Bagdy, E. Barabas, L. Graf, T.E. Petersen, S. // Magnusson // Methods Enzymol. – 1976. V.45. – P.669–678.
 19. Bakker A.B. First administration to humans of a monoclonal antibody cocktail against rabies virus: safety, tolerability, and neutralizing activity / A.B. Bakker, C. Python, C.J. Kissling et al. // Vaccine. – 2008. – V.26. – I.47. – P.5922-5927 <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.08.050>
 20. Bagyan I.L. 5'-Regulatory region of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA gene 6b directs organ-specific, wound-inducible and auxin-inducible expression in transgenic tobacco / I.L. Bagyan, E.V. Revenkova, G.E. Pozmogova, A.S. Kraev, K.G. Skryabin // Plant Mol. Biol. – 1995. – V.29. – P.1299–1304. <https://doi.org/10.1007/BF00020470>
 21. Barta A. Expression of a nopaline synthase — human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue / A. Barta, K. Sommergruber, D. Thompson *et al.* // The Plant Mol Biol. – 1986. – V.6. – P.347–357 <https://doi.org/10.1007/BF00034942>
 22. Bertran K. (2015) Impact of vaccination on infection with Vietnam H5N1 high pathogenicity avian influenza virus in hens and the eggs they lay / K. Bertran, K. Moresco, D.E. Swayne // Vaccine. – V.33. – P.1324–1330
 23. Bhanthumnavin A.K.J. Resurgence of duckweed research and applications: Report from the 3rd International duckweed conference / A.K.J. Bhanthumnavin, K. S. Sree, T. Fakhoorian and E. Lam // Plant Mol. Biol. – 2015. – V.89. – P.647-654.

24. Boehm R. A transient transformation system for duckweed (*Wolffia columbiana*) using *Agrobacterium*-mediated gene transfer / R. Boehm, C. Kruse, D. Voeste, S. Barth, H. Schnabl // J Appl Bot. – 2001. – V.75. – P.107–111.
25. Bog M. Duckweed (Lemnaceae): Its Molecular Taxonomy / M. Bog, K-J. Appenroth, K.S. Sree // Front. Sustain. Food Syst. – 2019. – V.3. – P.117.
<https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00117>
26. Bregitzer P. Enhancement of plant regeneration from embryogenic callus of commercial barley cultivars / P. Bregitzer, L.S. Dahleen, R.D. Campbell // Plant Cell Reports. – 1998. – Vol. 17. – P. 941-945.
27. Breitbach C.J. Intravenous delivery of a multi-mechanistic cancer-targeted oncolytic poxvirus in humans / C. Breitbach, J. Burke, D. Jonker, et al. // Nature. - 2011. – V.477. – P.99-102 <https://doi.org/10.1038/nature10358>
28. Buriev Z.T. Tomato-made edible COVID-19 vaccine TOMAVAC induces neutralizing IgGs in the blood sera of mice and humans / Z.T. Buriev, S.E. Shermatov, D.E. Usmanov, M.K. Mirzakhmedov, K.A. Ubaydullaeva, V.S. Kamburova, B.K. Rakhmanov, M.S. Ayubov, A.N. Abdullaev, J.B. Eshmurzaev, B.O. Mamajonov, A.A. Tulanov, A.A. Ismailova, T.A. Petrova, R.J. Rozumbetov, T.U. Aripova, M.I. Muminov, K.Y. Ermatova, D.A. Dalimova, S.U. Turdikulova, A. Abdukarimov, I.Y. Abdurakhmonov // Front Nutr. – 2024. – V.10
<https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1275307>
29. Capell T. Potential Applications of Plant Biotechnology against SARS-CoV-2 / T. Capell, R.M. Twyman, V. Armario-Najera, J.K. Ma, S. Schillberg, P. Christou // Trends Plant Sci. – 2020. – V.25(7). – P.635-643.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.04.009>
30. Chang J.Y. Stability of hirudin, a thrombin-specific inhibitor / J.Y. Chang // The structure of alkaline-inactivated hirudin. J. Biol. Chem. – 1991. – V.266(17). – P.10839–10843.

31. Chang, Y. High frequency plant regeneration from immature embryos of an elite barley cultivar (*Hordeum vulgare* L. cv. Morex) / Y. Chang, J. von Zitzewitz, P.M. Hayes, T.H.H. Chen // *Plant Cell Reports*. – 2003. – Vol. 21. – P. 733-738.
32. Chaudhary S. Transgenic *Brassica carinata* as a vehicle for the production of recombinant proteins in seeds / S. Chaudhary, D.L. Parmenter, M.M. Moloney // *Plant Cell Rep.* – 1998. – V.17(3). – P.195–200.
33. Chen H.Y. Expression, purification and characterization of the recombinant hirudin variant III in the *Bacillus subtilis* / H.Y. Chen, X.H. Qi, X. Geng, O.G. Xu, J. Wang, Z.R. Wu // *Adv. Mater Res.* – 2012. – V.343–344. – P.753–763.
<https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.343-344.753>
34. Cheng J.J. Growing duckweed to recover nutrients from wastewaters and for production of fuel ethanol and animal feed / J.J. Cheng and A. M. Stomp // *Clean*. 2009. – V.37. – P.17-26. <https://doi.org/10.1002/clen.200800210>
35. Chikwamba R. K. Localization of a bacterial protein in starch granules of transgenic maize kernels / R. K. Chikwamba, M. P. Scott, L. B. Mejía, H. S. Mason, K. Wang, // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2003. – V.100. – I.19. – P.11127-11132.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1836901100>
36. Clore G.M. The conformations of hirudin in solution: a study using nuclear magnetic resonance, distance geometry and restrained molecular dynamics / G.M. Clore, D.K. Sukumaran, M. Nilges, J. Zarbock, A.M. Gronenborn // *EMBO J.* – 1987. – V. 6. – I.2 – P.529–537. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb04785.x>
37. Concha C. Disease prevention: An opportunity to expand edible plant-based vaccines / C. Concha, R. Cañas, J. Macuer, M.J Torres, A.A. Herrada, F. Jamett, C. Ibáñez // *Vaccine*. – 2017. – V.5. – I.2. – P.14–23.
<https://doi.org/10.3390/vaccines5020014>
38. Cronquist A. The evolution and classification of flowering plants, 2nd edition / A. Cronquist // Bronx: New York Botanic Gardens. – 1988.

39. Daniell H. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants / H. Daniell, S. J. Streatfield, K. Wycoff, // Trends. Plant. Sci. – 2001. – V.6. – I.5 – P.219-226.
[https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(01\)01922-7](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)01922-7)
40. Davis J.I. A phylogenetic structure for the monocotyledons, as inferred from chloroplast DNA restriction site variation, and a comparison of measures of clade support / J.I. Davis // Syst. Bot. 1995. – V.20. – P.503-527.
41. Dellaporta, S.L. A Plant DNA Miniprep: Version II / S.L. Dellaporta, J. Wood, J.B. Hicks // Plant Mol. Biol. Rep. – 1983. – Vol. 1. – P. 19-21.
<https://doi.org/10.1007/BF02712670>
42. Dodt J. Expression, secretion and processing of hirudin in E. coli using the alkaline phosphatase signal sequence / J. Dodt, T. Schmitz, T. Schafer, C. Bergmann // FEBS Lett. – 1986. – M.202. – P.373–377.
43. Dolgov S., Pathogen-derived methods for improving resistance of transgenic plums (*Prunus domestica* L.) for Plum pox virus infection / S. Dolgov, R. Mikhaylov, T. Serova, O. Shulga, and A. Firsov, // Julius Kühn Arch. – 2010. – V.427. – P.133–140.
44. Dolgova A. S. Arabidopsis termination elements increase transgene expression in tobacco plants / A. S. Dolgova, S. V. Dolgov, N. N. Nazipova, O. G. Maksimenko, and P. G. Georgiev // Plant Cell Tissue Organ Cult. – 2015. – V.120. – P.1107–1116.
doi: [10.1007/s11240-014-0667-1](https://doi.org/10.1007/s11240-014-0667-1)
45. Dubey K.K. Vaccine and antibody production in plants: developments and computational tools / K.K. Dubey, G. A. Luke, C. Knox, P. Kumar, B.I. Pletschke, P.K. Singh, P. Shukla // Brief. Funct. Genomics – 2018. V.17(5). – P.295–307.
<https://doi.org/10.1093/bfpg/ely020>

46. Edelman M., Perl A., Flaishman M., Blumenthal A. Transgenic lemnaeae. Australian Patent Publication AU759570C, 1998. International Classification A01G 7/00; A01H 1/00; C12N 5/00; C12N 15/00.
47. Fedosov S. N. Human intrinsic factor expressed in the plant *Arabidopsis thaliana* / S. N. Fedosov, N. B. Laursen, E. Nexø, S.K. Moestrup, T.E. Petersen, Eø Jensen, L. Berglund // *European Journal of Biochemistry* – 2003. – V.270 – I.16. – P.3362-7 <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03716.x>
48. Fenton J.W. 2nd Thrombin inhibition by hirudin: how hirudin inhibits thrombin / J.W. 2nd Fenton, G.B. Villanueva, F.A. Ofori, J.M. Maraganore // *Haemostasis*. – 1991. – V.1. – P.27-31. <https://doi.org/10.1159/000216259>
49. Filippov, M. The effect of auxins, time exposure to auxin and genotypes on somatic embryogenesis from mature embryos of wheat / M. Filippov, D. Miroshnichenko, D. Vernikovskaya, S. Dolgov // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2006. – Vol. 84. – P. 192-201.
50. Firsov, A. High-yield expression of M2e peptide of avian influenza virus H5N1 in transgenic duckweed plants / A. Firsov, I. Tarasenko, T. Mitiouchkina, N. Ismailova, L. Shaloiko, A. Vainstein, S. Dolgov // *Mol. Biotechnology*. – 2015. – Vol. 57. – P. 653-661. <https://doi.org/10.1007/s12033-015-9855-4>
51. Firsov A. Expression and Immunogenicity of M2e Peptide of Avian Influenza Virus H5N1 Fused to Ricin Toxin B Chain Produced in Duckweed Plants / A. Firsov, I. Tarasenko, T. Mitiouchkina, L. Shaloiko, O. Kozlov, L. Vinokurov, E. Rasskazova, A. Murashev, A. Vainstein and S. Dolgov // *Front. Chem.* – 2018. – V.6. – P.22. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00022>
52. Franceschi V. R. Calcium oxalate in plants: Formation and Function / V. R. Franceschi, P.A. Nakata // *Annual Review of Plant Biology*. – 2005. – V.56. – I.1. – P.41–71. doi:[10.1146/annurev.arplant.56.032604.144106](https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144106)

53. Franzke A. The role of G-CSF in adaptive immunity / A. Franzke // Cytokine & Growth Factor Reviews. – 2006. V.17. – I.4. 235–244 Mini review
<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2006.05.002>
54. French J. C. Chloroplast DNA phylogeny of the Ariflorae. in Monocotyledons: systematics and evolution / J. C. French, M. G. Chung and Y. K. Hur, P.J. Rudall, P.J. Cribb, D.F. Cutler, and C.J. Humphries //Royal Botanic Gardens. 1995. – V.1. – P.255-275
55. Friedrich A.S. Untersuchungen zu Kultivierung, Transformation und Fermentation von *Wolffia spec.* – Inaugural – Dissertation, 2005. – 177 <https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:hbz:5N-06052>
56. Gasdaska, J.R. Advantages of therapeutic protein production in the aquatic plant *Lemna* / J.R. Gasdaska, D. Spenser, L. Dickey // Bioprocess. – 2003. – Vol. 2. – P. 49-56. <https://doi.org/10.12665/J22.Gasdaska>
57. Greinacher A. Lepirudin: a bivalent direct thrombin inhibitor for anticoagulation therapy / A. Greinacher. // Expert Review of Cardiovascular Therapy – 2004. – V.2. – P.339–357. <https://doi.org/10.1586/14779072.2.3.339>
58. Greinacher A. Contaminated heparin / A. Greinacher, T.E. Warkentin // N. Engl. J. Med. – 2008. – V. 359 – I.12. – P.1291-1293. doi:[10.1056/NEJMc081387](https://doi.org/10.1056/NEJMc081387)
59. Hanlon C.A Experimental utility of rabies virus-neutralizing human monoclonal antibodies in post-exposure prophylaxis / C.A. Hanlon, C.A. DeMattos, C.C. DeMattos, et al. // Vaccine. – 2001. – V.19 – P.3834–42
[https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(01\)00135-9](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(01)00135-9)
60. Harvey R.P. Cloning and expression of a cDNA coding for the anticoagulant hirudin from the bloodsucking leech, *Hirudo medicinalis* / R.P. Harvey, E. Degryse, L. Stefani, F. Schamber, J.P. Cazenave, M. Courtney, P. Tolstoshev, J.P. Lecocq // Proc Natl. Acad. Sci. USA. – 1986. – V.83(4). – P.1084–1088.

61. Heenatigala P.P.M. Expression of LamB Vaccine Antigen in *Wolffia globosa* (Duck Weed) Against Fish Vibriosis / P.P.M. Heenatigala, Z. Sun, J. Yang, X. Zhao, H. Hou // Front. Immunol. – 2020. – V.11. – P.1857.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01857>
62. Hiatt A. Production of antibodies in transgenic plants / A. Hiatt, R. Cafferkey, K. Bowdish // Nature. – 1989. – V.342. – P.76–78 <https://doi.org/10.1038/342076a0>
63. Hoekema, A. Delivery of T-DNA from the *Agrobacterium tumefaciens* chromosome into plant cells / A. Hoekema, P.W. Roelvink, P.J.J. Hooykaas, R.A. Schilperoort // EMBO. – 1984. – Vol. 3. – P. 2485-2490.
64. Hong S.Y. Production of biologically active hG-CSF by transgenic plant cell suspension culture / S.Y. Hong, T.H. Kwon, J.H. Lee, Y.S. Jang, M.S. Yang // Enzyme and Microbial Technology. – 2002. – V.30. I.6. – P. 763-767
[https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00055-8](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00055-8)
65. Hong S.Y. Production of bioactive human granulocyte-colony stimulating factor in transgenic rice cell suspension cultures / S.Y. Hong, T.H. Kwon, Y.S. Jang, S.H. Kim, M.S. Yang // Protein Expression and Purification. – 2006. – V.47. – I.1. – P.68-73 <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.09.028>
66. Hood E.E. New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants / E.E. Hood, S.B. Gelvin, L.S Melchers, A. Hoekema // Transgen. Res. – 1993. – V.2. – P.208–218. <https://doi.org/10.1007/BF01977351>
67. Hu Z. Expression, purification and characterization of recombinant targeting bifunctional hirudin in *Pichia pastoris* / Z. Hu, N. Zhang, F. Gu, Y. Li, X. Deng, G. Chen // Afr J Biotech. – 2009. – V.8. – I.20. – P.5571–5577
68. Hutchinson J. The families of flowering plants, arranged according to a new system based on their probable phylogeny / J. Hutchinson Oxford University Press. – 1973. – V.2. – I.3.

69. Ilan, A. In vitro propagation in liquid culture and acclimatization of *Brodiaea* / Ilan A., Ziv M., Halevy A.A. // *Scientia Hort.* 1995. V. 63. P. 101–112.
70. Iqbal O. Successful Use of Recombinant Hirudin and Its Monitoring by Ecarin Clotting Time in Patients with Heparin-Induced Thrombocytopenia Undergoing Off-Pump Coronary Artery Revascularization / O. Iqbal, M. Tobu, S. Aziz, M. Gerdisch, M. Da Valle, M. Demir, D.A. Hoppensteadt, S. Ahmad, J.M. Walenga, J. Fareed // *J. Card. Surg.* – 2005. – V.20. – P.42–51. <https://doi.org/10.1111/j.0886-0440.2005.200316.x>
71. Jefferson R.A. β -glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker / R.A. Jefferson, S.M. Burgess, D. Hirsh // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1986. – Vol. 83. – P. 8447-8451.
72. Klcova, L. Cultivar and environmental conditions affect the morphogenic ability of barley (*Hordeum vulgare* L.) scutellum derived calli / L. Klcova, M. Havrlentova, J. Farago // *Biologia. Bratislava.* – 2004. – Vol. 59(4). – P. 501-504.
73. Khvatkov P. Transformation of *Wolffia arrhiza* (L.) Horkel ex Wimm / M. Chernobrovkina, A. Okuneva, A. Pushin, S. Dolgov // *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* – 2015. – V.123 – P.299–307. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0834-z>
74. Khvatkov P., Callus induction and regeneration in *Wolffia arrhiza* (L.) Horkel ex Wimm. / M. Chernobrovkina, A. Okuneva, A. Shvedova, I. Chaban, S. Dolgov // *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* – 2015. – V.120. – P.263–273. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0603-4>
75. Kozlov O.N. Agrobacterium-mediated transformation of *Lemna minor* L. with hirudin and β -glucuronidase genes / O.N. Kozlov, T.Y. Mitiouchkina, I.V. Tarasenko, L.A. Shaloiko, A.P. Firsov, S.V. Dolgov // *Appl. Biochem. Microbiol.* – 2019. – V.55(8). – P.805–815.

76. Kruse, C. Transient transformation of *Wolffia columbiana* by particle bombardment / C. Kruse, R. Boehm, D. Veste, S. Barth, H. Schnabl // *Aquat. Bot.* – 2002. – V.72. – P.175–181. [https://doi.org/10.1016/S0304-3770\(01\)00219-4](https://doi.org/10.1016/S0304-3770(01)00219-4)
77. Kuehdorf K. Influence of salinity and high temperature on turion formation in the duckweed *Spirodela polyrhiza* / K. Kuehdorf, K.J. Appenroth // *Aquat. Bot.* – 2012. – V.97. – P.69–72
78. Kurup V.M. Edible Vaccines: Promises and Challenges / V.M. Kurup, J. Thomas // *Mol. Biotechnol.* – 2020. – V.62. – P.79–90. <https://doi.org/10.1007/s12033-019-00222-1>
79. Lacroix B. and Citovsky V. *Agrobacterium* / B. Lacroix and V. Citovsky // *Brenner's Encyclopedia of Genetics. Reference Module in Life Sciences.* – 2013. – P.52–54. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822563-9.00066-4>
80. Lam E. Duckweed in bloom: The 2nd International Conference on Duckweed Research and Applications Heralds the Return of A Plant Model for Plant Biology. / E. Lam, K. J. Appenroth, T. Michael, K. Mori and T. Fakhoorian // *Plant Mol. Biol.* – 2014. – V.84. – P.737-742
81. Landolt E. The family of Lemnaceae — a monographic study / E. Landolt // *Veroff Geobot Inst ETH, Stiftung Rubel, Zurich.* – 1986. – V.1. – P.417–435
82. Landolt E. The family of Lemnaceae - Monographic study, Vols. 1 and 2 - (Vols. 2 and 4 of Biosystematic investigations in the family of duckweeds (Lemnaceae)) / E. Landolt, R. Kandeler // *Plant Growth Regul* 7. – 1988. – P.309–310. <https://doi.org/10.1007/BF00037640>
83. Lazo G.R. A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium* / G.R. Lazo, P.A. Stain, R.A. Ludwig // *Nat. Biotechnol.* – 1991. – V.9. – P.963-967. <https://doi.org/10.1038/nbt1091-963>
84. LeBlanc Z. Plant-Based Vaccines: The Way Ahead / Z. LeBlanc, P. Waterhouse, J. Bally // *Viruses.* – 2020. – V.13. – P.1-5. <https://doi.org/10.3390/v13010005>

85. Lemaux, P.G., Cho M.-J., Zhang S., Bregitzer P. Transgenic cereals: *Hordeum vulgare* (barley) / P.G. Lemaux, M.-J. Cho, S. Zhang, P. Bregitzer // In: Vasil I.K. (ed). Molecular improvement of cereal crop. Kluwer Academic. London. – 1999. – P. 255-316.
86. Les D.H. Phylogeny and systematics of Lemnaceae, the duckweed family / D.H. Les, D.J. Crawford, E. Landolt, D. John, J.D. Gabel, K.T. Rebecca // Systematic Botany. – 2002. V.27. – I.2. – P.221–240
87. Lienard D. Suspension-culture BY-2 tobacco cells produce and mature immunologically active house dust mite allergens / D. Lienard, O. Tran Ding, E. van Oort, L. Van Overtvelt, C. Bonneau, E. Wambre, M. Bardor, P. Cosette, A. Didier-Laurent, FD. de Borne, R. Delon, R. van Ree, P. Moingeon, L. Faye, V. Gomord // Plant Biotechnol. J. – 2007. – V.5. – P.93-108. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2006.00221.x>
88. Li J. Callus induction and regeneration in *Spirodela* and *Lemna* / J. Li, M. Jain, R. Vunsh, J. Vishnevetsky, U. Hanania, M. Flaishman, A. Perl, M. Edelman // Plant Cell Rep. – 2004. – V. 22. – P. 457–464.
89. Lou X. M. Expression of the human hepatitis B virus large surface antigen gene in transgenic tomato plants / X. M. Lou, Q.H. Yao, Z. Zhang, R.H. Peng, A.S. Xiong, H.K. Wang // Clinical and Vaccine Immunology. – 2007. – V.14 – I.4. – P.464–469. <https://doi.org/10.1128/CVI.00321-06>
90. Martinez C.A. Research advances in plant-made flavivirus antigens / C.A. Martinez, A.M. Guilietti, R. Talou // Biotechnology Advances. – 2012. – V.30 – I.6. – P.493-505 <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.03.004>
91. Magnusson, I. Anatomical observation on somatic embryogenesis from scutellar tissues of immature zygotic embryos of *Triticum aestivum* / I. Magnusson, C.H. Bornmann // Physiologia Plantarum. – 1985. – Vol. 63. – P. 137-145.

92. Mason H.S. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants./ H. S. Mason, D. M. Lam, C. J. Arntzen // Proceedings of the National Academy of Sciences USA. – 1992. – V.89 – P.11745–11749.
<https://doi.org/10.1073/pnas.89.24.1174>
93. Mason H. S. Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice / H. S. Mason, J. M. Ball, J. J. Shi, X. Jiang, M. K. Estes, C. J. Arntzen // Proceedings of the National Academy of Sciences USA. – 1996. – V.93. – P.5335–5340.
<https://doi.org/10.1073/pnas.93.11.5333>
94. Mengwasser K.E. Hirudin binding reveals key determinants of thrombin allostery // K.E. Mengwasser, L.A. Bush, P. Shih, A.M. Cantwell, E. Di Cera // J. Biol. Chem. 2005. – V.280. – I.29 – P.26997–27003
<https://doi.org/10.1074/jbc.M502678200>
95. Mett V. A plant-produced influenza subunit vaccine protects ferrets against virus challenge / V. Mett, K. Musiychuk, B. Hong, A. Horsey, N. Ugulava, Y. Shoji, D.L.R. Patricia, G.A. Palmer, S. Rabindran, S.J. Streatfield, A. Boyers, M. Russell, A. Mann, R. Lambkin, J.S. Oxford, G.C. Schild, V. Yusibov // Influenza and Other Respiratory Viruses Journal. – 2008. – Vol. 2(1). – P. 33-40.
<https://doi.org/10.1111/j.1750-2659.2008.00037.x>
96. Montagu Van M. & Zambryski P. Agrobacterium and Ti Plasmids / M. Van Montagu, P. Zambryski // Reference Module in Life Sciences. – 2017.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.06024-6>
97. Moravec T. Production of *Escherichia coli* heat labile toxin (LT) B subunit in soybean seed and analysis of its immunogenicity as an oral vaccine / T. Moravec, M. A. Schmidt, E. M. Herman, T. Woodford-Thomas // Vaccine. – 2007. – V.25. – I.9. – P.1647-1657.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.11.010>

98. Müller C. More than just one: multiplicity of Hirudins and Hirudin-like Factors in the Medicinal Leech *Hirudo medicinalis*. / C. Müller, K. Mescke, S. Liebig, H. Mahfoud, S. Lemke, J.P. Hildebrandt // Mol. Genet. Genomics. – 2016. – V.291(1). – P.227–240.
99. Narayanan K. Recombinant hirudin--initial observations in reconstructive microsurgery / K. Narayanan, J.M. Walenga, M.D. Liang, J. Fareed // Haemostasis. – 1991. – V.21. – P.168–171. <https://doi.org/10.1159/000216280>
100. Oldach, K.H. Efficient in vitro plant regeneration from immature zygotic embryos of pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] and *Sorghum bicolor* (L.) Moench. / K.H. Oldach, A. Morgenstern, S. Rother, M. Girgi, M. O’Kennedy, H. Lorz // Plant Cell Reports. – 2001. – Vol. 20. – P. 416-421.
101. Oszvald M. Expression of a synthetic neutralizing epitope of porcine epidemic diarrhea virus fused with synthetic b subunit of *Escherichia coli* heat labile enterotoxin in rice endosperm / M. Oszvald, T.J. Kang, S. Tomoskozi, C. Tamas, L. Tamas, T.G. Kim, M.S. Yang // Molecular Biotechnology. 2007. – V.35. – P.215–223. <https://doi.org/10.1007/BF02686007>
102. Parmenter D.L. Production of biologically active hirudin in plant seeds using oleosin partitioning / D.L. Parmenter, J.G. Boothe, G.J. van Rooijen, E.C. Yeung, M.M. Moloney // Plant Mol. Biol. – 1995. – V.29(6). – P.1167–1180. <https://doi.org/10.1007/BF00020460>
103. Pham, T.L.T. Improvement of transformation procedure into duckweed (WOLFFIA SP.) via *Agrobacterium tumefaciens* / T.L.T. Pham, H.A. Nguyen, T.H. Pham, T.H. Nguyen, H.H. Le // Tạp chí Công nghệ Sinh học (in Vietnam) – 2010. – Vol 8(1). – P. 53-60.
104. Rader R.A. Biopharmaceutical manufacturing: historical and future trends in titers, yields, and efficiency in commercial-scale bioprocessing / R.A. Rader, E.S. Langer

- // J. BioProcess, – 2015. – V.13(4). – P.47–54.
<http://dx.doi.org/10.12665/J134.Langer>
105. Radzio R. Efficient synthesis of the blood-coagulation inhibitor hirudin in the filamentous fungus *Acremonium chrysogenum* / R. Radzio, U. Kuck // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 1997. – V.48. – I.1. – P.58–65.
 106. Richter L. J. Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization / L. J. Richter, Y. Thanavala, C. J. Arntzen and H. S. Mason // *Nat. Biotechnol.* 2000. – V.18. – P.1167–1171. doi: 10.1038/81153
 107. Rival S. Spirodela (duckweed) as an alternative production system for pharmaceuticals: a case study aprotinin / S. Rival, J.P. Wisniewski, A. Langlais, H. Kaplan, G. Freyssinet, G. Vancanneyt, R. Vunsh, A. Perl, M. Edelman // *Transgenic Research.* – 2008. – Vol.17 – P. 503–513.
<https://doi.org/10.1007/s11248-007-9123-x>
 108. Roche J. Metabolic changes and associated cytokinin signals in response to nitrate assimilation in roots and shoots of *Lolium perenne* / J. Roche, J. Love, Q. Guo, J. Song, M. Cao, K. Fraser, J. Huege, C. Jones, O. Novák, M.H. Turnbull, P.E. Jameson // *Physiol. Plant.* – 2016. – V.156. – P.497–511
 109. Rosales-Mendoza S. What Does Plant-Based Vaccine Technology Offer to the Fight against COVID-19? / S. Rosales-Mendoza, V.A. Márquez-Escobar, O. González-Ortega, R. Nieto-Gómez, J.I. Arévalo-Villalobos // *Vaccines.* – 2020. – V.8. – P.183. <https://doi.org/10.3390/vaccines8020183>
 110. Rosenfeld S.A. Production and purification of recombinant hirudin expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* / S.A. Rosenfeld, D. Nadeau, J. Tirado, G.F. Hollis, R.M. Knabb, S. Jia // *Protein Expr Purif.* – 1996. – V.8. – I.4. – P.476–482. <https://doi.org/10.1006/prep.1996.0127>

111. Rothwell G.W. Molecular phylogenetic relationships among Lemnaceae and Araceae using the chloroplast trnL-trnF intergenic spacer / G.W. Rothwell, M.R. van Atta, H.E. Ballard, R.A. Stockey // *Mol. Phyl. Evol.* – 2004. – V.30. – P.378-385.
112. Sambrook J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed.) / J. Sambrook, E. R. Fritsch & T. Maniatis // Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. – 1989.
113. Santi L. An efficient plant viral expression system generating orally immunogenic Norwalk virus-like particles / L. Santi, L. Batchelor, Z. Huang, B. Hjelm, J. Kilbourne, C. J. Arntzen, Q. Chen, H. S. Mason // *Vaccine.* – 2008. – V.26. – I.15. – P.1846-1854. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.01.053>
114. Sciutto E. New approaches to improve a peptide vaccine against porcine *Taenia solium* cysticercosis / E. Sciutto, G. Frago, K. Manoutcharian, G. Gevorkian, G. RosasSalgado, M. Hernández-Gonzalez, L. Herrera-Estrella, J. Cabrera-Ponce, F. López-Casillas, C. González-Bonilla, A. Santiago-Machuca, F. Ruíz-Pérez, J. Sánchez, F. Goldbaum, A. Aluja, C. Larralde, // *Arch. Med. Res.* – 2002. – V.33 – I.4. – P.371-378.
[https://doi.org/10.1016/S0188-4409\(02\)00376-4](https://doi.org/10.1016/S0188-4409(02)00376-4)
115. Schillberg S. Critical analysis of the commercial potential of plants for the production of recombinant proteins / S. Schillberg, N. Raven, S. Spiegel, S. Rasche, M. Buntru // *Front. Plant Sci.* – 2019. – V.10. – P.720.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00720>
116. Schillberg S. Plant molecular farming for the production of valuable proteins - Critical evaluation of achievements and future challenges / S. Schillberg, R. Finern // *J Plant Physiol.* – 2021. – V.258-259 <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2020.153359>
117. Schenk, R.U. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures / R.U. Schenk, A.C. Hildebrandt // *Can J Bot.* – 1972. – Vol. 50. – P. 199–204.

118. Serova I.A. A 3,387 bp 5'-flanking sequence of the goat alpha-S1-casein gene provides correct tissue-specific expression of human granulocyte colony-stimulating factor (hG-CSF) in the mammary gland of transgenic mice. / I.A. Serova, G.A. Dvoryanchikov, L.E. Andreeva, et al. // Transgenic Res. – 2012. – V.21. – P.485–498 <https://doi.org/10.1007/s11248-011-9547-1>
119. Sijmons, P.C. Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants / P.C. Sijmons, B.M. Dekker, B. Schrammeijer, T.C. Verwoerd, P.J. van den Elzen, A. Hoekema // Biotechnology. – 1990. – V.8 – I.3. – P.217–221. <https://doi.org/10.1038/nbt0390-217>
120. Sharifi T. M. Expression of human granulocyte-colony stimulating factor (hG-CSF) gene in tobacco (*Nicotiana tabacum*) / T. M. Sharifi, M. Solouki, M. Tohidfar, M. Sadeghizadeh // Austr. J. Crop Sci. V.6. – P.135–140.
121. Sharma, A. K., and Sharma, M. K. /Plants as bioreactors: recent developments and emerging opportunities // Biotechnol. Adv. – 2009. –V.27. – P.811–832.
doi: [10.1016/j.biotechadv.2009.06.004](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.06.004)
122. Sohrab S. S. Edible Vaccine: Current Status and Future Perspectives / S. S. Sohrab, A. Husen, M. Suhail, E. I. Azhar // Current Drug Metabolism. – 2017. – V.18. – I.9. – P.831 – 841 [10.2174/1389200218666170711121810](https://doi.org/10.2174/1389200218666170711121810)
123. Sree K.S. Taxonomy of duckweeds (Lemnaceae), potential new crop plants. Emirates Journal of Food and Agriculture / K.S. Sree Bog M., Appenroth K.J. – 2016. – V.28 – I.5. – P.291-302 <https://doi.org/10.9755/ejfa.2016-01-038>
<http://www.ejfa.me/>
124. Srinivas L. Transient and stable expression of hepatitis B surface antigen in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) / L. Srinivas, G.B. Sunil Kumar, T.R. Ganapathi, C. J. Revathi, V. A. Bapat // Plant Biotechnology Reports. – 2008. – V.2. – P.1–6. <https://doi.org/10.1007/s11816-008-0041-z>

125. Stiff, C.M. Stable transformation of barley callus using biolistic particle bombardment and the phosphinothricin acetyltransferase (bar) gene / C.M. Stiff, A. Kilian, H. Zhou, D. Kudrna, A. Kleinhofs // Plant, Cell, Tissue and Organ Culture. – 1995. – Vol. 40. – P. 243-248.
126. Stone S.R. Kinetics of the inhibition of thrombin by hirudin / S.R. Stone, J. Hofsteenge // Biochemistry. 1986. – V.25. – I.16. – P.4622–4628.
doi:[10.1021/bi00105a005](https://doi.org/10.1021/bi00105a005)
127. Stockey R.A. The fossil *Limnobiophyllum scutatum*: resolving the phylogeny of Lemnaceae / R.A. Stockey, G.L. Homan, G.W. Rothwell // Am. J. Bot. – 1997. – V. 84. – P.355—368
128. Patent US20050060776A1, IC1 C12P21/02, C12N15/09, C12N9/00, C12N5/10, C12P21/08, C12N15/82, C07K14/56. Expression of biologically active polypeptides in duckweed / A.-M. Stomp, D. Lynn, J. Gasdaska; original assignee Biolex Inc. – № US10/873,846; priority date 31.07.00; publication date 17.03.05.
129. Patent US6040498A, IC1 A01H4/00, C12N15/84, C12N15/82, A01H13/00. Genetically engineered duckweed / A.-M. Stomp, N. Rajbhandary; original assignee North Caroline State University. – № US09/132,536; priority date 11.08.98; publication date 21.03.00.
130. Patent US7176024B2, IC1 C1M1/100, C12N5/00. Bioreactor for growing biological materials supported on a liquid surface / R.E. Branson, K. Everett, B. Hester, T.B. Vickers; original assignee Biolex Inc. – № US10/845,914; priority date 30.05.03; publication date 13.02.07.
131. Sun Y. (2007) Expression and characterization of *Acidothermus cellulolyticus* E1 endoglucanase in transgenic duckweed *Lemna minor* 8627 / Y. Sun, J.J. Cheng, M.E. Himmel, C.D. Skory, W.S. Adney, S.R. Thomas, B. Tisserat, Y. Nishimura, Y.T. Yamamoto // Biores Technol. – V. 98. – P.2866–2872

132. Sysuev B.B., Recombinant microorganisms and cell culture in the technology of protein preparations / B.B. Sysuev, J.S. Pokrovskaya // Dev. Registr. Drugs. – 2015. – V.4. – P.96–109.
133. Tabar M. S. Expression of human granulocyte-colony stimulating factor ('hG-CSF') gene in tobacco ('Nicotiana tabacum'). / M. S. Tabar, M. Solouki, M. Tohidfar, M. Sadeghizadeh // Australian Journal of Crop Science. – 2012. – V.6(1) – P.135-140.
134. Tabar M. S. Human granulocyte colony-stimulating factor (hG-CSF) expression in plastids of *Lactuca sativa* / M. S. Tabar, A.A. Habashi, H. Rajabi Memari // Iran Biomed Journal. – 2013. – V.17(3). – P.158-64. doi: [10.6091/ibj.1180.2013](https://doi.org/10.6091/ibj.1180.2013)
135. Tacket C. Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato. / C. Tacket, H. Mason, G. Losonsky *et al.* // *Nat Med.* – 1998. – V.4. – P.607–609. <https://doi.org/10.1038/nm0598-607>
136. Tacket, C. Garden-variety vaccines: antigens derived from transgenic plants / C. O. Tacket // *Expert. Rev. Vaccines.* – 2004. – V.3(5) – P.529-531. <https://doi.org/10.1586/14760584.3.5.529>
137. Takayama, S. Mass propagation of plants through shake and bioreactor culture techniques / S. Takayama // In: Y. P. S. Bajaj (ed.). *Biotechnology in agriculture and forestry: Hightech and micropropagation.* - Springer-Verlag, Berlin. – 1991. – Vol. 17. – P. 1–46.
138. Takahashi, S. Micropropagation of virus free bulblets of *Lilium longiflorum* by tank culture / S. Takahashi, K. Matsubara, H. Yamagata, T. Morimoto // *Acta Hort.* – 1992. – Vol. 319. – P. 83–88.
139. Tippery N.P. Evaluation of phylogenetic relationships in Lemnaceae using nuclear ribosomal data / N. P. Tippery, D. H. Les and D. J. Crawford // *Plant Biol.* – 2015. – V.17. – I.1. – P.50-58.

140. Thorne R. T. Classification and geography of the flowering plants. Botanical Review. 1992. – V.58. – P.225-348.
141. Vacchelli E. Trial Watch: Immunostimulatory cytokines / E. Vacchelli, A. Eggermont, W.H. Fridman, J. Galon, L. Zitvogel, G. Kroemer, L. Galluzzi // Oncoimmunology. 2013. – V.2 – I.7. <https://doi.org/10.4161/onci.24850>
142. Vunsh, R. High expression of transgene protein in Spirodela / R. Vunsh, J. Li, U. Hanania, M. Edelman, M. Flaishman, A. Perl, J.P. Wisniewski, G. Freyssinet // Plant Cell Rep. – 2007. Vol. – 26. – P. 1511-1519. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0361-4>
143. Walmsley, A.M. Plants for delivery of edible vaccines / A.M. Walmsley, C.J. Arntzen // Curr Opin Biotechnol. – 2000. – Vol.11. – P.126–129. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00070-7](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00070-7)
144. Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks. / G. Walsh // Nat Biotechnol. – 2018. – V.36. – I.12. – P.1136–1145. <https://doi.org/10.1038/nbt.4305>
145. Wayne A.P. and Thorne, R.F. (1984) The genus Wolffia (Lemnaceae) in California." Madroño 31(3), 171-79.
146. Wolff P. Les lentilles d'eau de l'Alsace. – Bull. Assoc / P. Wolff //Amis Jard.bot. Col de Saveme, 1992. – P.25–33.
147. Yamamoto, Y.T. Genetic transformation of duckweed *Lemna gibba* and *Lemna minor* / Y.T. Yamamoto, N. Rajbhandari, X.H. Lin, B.A. Bergmann, Y. Nishimura, A.M. Stomp // In Vitro Cellular and Developmental Biology. Plant. – 2001. – Vol. 37(3). – P. 349-353. <https://doi.org/10.1007/s11627-001-0062-6>
148. Yen C.H. Expression of recombinant Hirudin in transgenic mice milk driven by the goat beta-casein promoter / C.H. Yen, C.K. Yang, I.C. Chen, Y.S. Lin, C.S. Lin, S. Chu, C.F. Tu // Biotechnol J. – 2008. – V.3. – I.8. – P.1067–1077.

149. Yusibov, V. Peptide-based candidate vaccine against respiratory syncytial virus / V. Yusibov, V. Mett, V. Mett, C. Davidson, K. Musiychuk, S. Gilliam, A. Farese, T.M. Vittie, D. Mann // *Vaccine*. – 2005. – Vol. 23. – P. 2261-2265.
150. Yusibov V., Recent progress in the development of plant-derived vaccines / V. Yusibov, S. Rabindran // *Expert Reviews of Vaccines*. – 2008. – V.7. – P.1173-1183
151. Vacchelli, E., Eggermont, A., Fridman, W. H., Galon, J., Zitvogel, L., Kroemer, G., et al. (2013). Trial Watch: immunostimulatory cytokines. *Oncoimmunology* 2:e24850.
152. Zhao H. Duckweed rising at Chengdu: Summary of the 1st International Conference on Duckweed Application and Research / H. Zhao, K. J. Appenroth, L. Landesman, A. A. Salmean and E. Lam // *Plant Mol. Biol.* – 2012. – V.78. – P.627-632
153. Zhang X. Tomato is a highly effective vehicle for expression and oral immunization with Norwalk virus capsid protein / X. Zhang, N. A. Buehner, A. M. Hutson, M. K. Estes, H. S. Mason // *Plant. Biotechnol. J.* – 2006. – V.4. – I.4. – P.419-432. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2006.00191.x>
154. Ziegler P. Relative in vitro growth rates of duckweeds (Lemnaceae) – the most rapidly growing higher plants / P. Ziegler, K. Adelman, S. Zimmer, C. Schmidt, Appenroth K-J. // *Plant Biology*. – 2015. – V.17. – I.1. – P.33–41
155. Zimran, A. Pivotal trial with plant cell-expressed recombinant glucocerebrosidase, taliglucerase alfa, a novel enzyme replacement therapy for Gaucher disease / E. Brill-Almon, R. Chertkoff, M. Petakov, F. Blanco-Favela, E.T. Muñoz, S.E. Solorio-Meza, D. Amato, G. Duran, F. Giona et al. // *Blood* – 2011. – V.118, P.5767–5773. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-366955>
156. Ziv, M. Bioreactor technology for plant micropropagation / M. Ziv // *Horticultural Reviews*. – 1999. – Vol. 24. – P. 1–30.

157. Ziv, M. Simple bioreactors for mass propagation of plants / M. Ziv // Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation. – 2005. – P. 79-93.
158. [Plant-based Biologics Market Size 2026 | Revised in a New Report \(researchdive.com\)](#)
159. <http://www.kazusa.or.jp/codon>