

УДК 57.084.1

На правах рукописи



ШВЕДОВА Анастасия Николаевна

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

Специальность: 1.5.6 – биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2025

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

Научный руководитель:

Хватков Павел Алексеевич

кандидат биологических наук, заведующий лабораторией биоинженерии растений, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад — Национальный научный центр РАН»

Официальные оппоненты:

Савченко Татьяна Викторовна

доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории фотосинтетического окисления воды, Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук — обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

Додуева Ирина Евгеньевна

кандидат биологических наук, доцент кафедры генетики и биотехнологии, биологический факультет, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

Ведущая организация:

Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»
(ФИЦ Биотехнологии РАН)

Защита состоится 11 декабря 2025 г. в 11-00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.016.01 (Д 006.027.01), на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» по адресу 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 42, тел. +7(499)976-65-44.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке института и на официальном сайте ФГБНУ ВНИИСБ <http://www.vniisb.ru/ru/council/>

Автореферат разослан _____ 2025 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

М.В. Дудников

Актуальность темы. Спрос на вакцинацию увеличился за последние несколько лет из-за увеличения заболеваемости не только вирусными, но и бактериальными инфекционными заболеваниями. Наиболее эффективными 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. Рекомбинантные белки в основном используются для терапии и включают: антитела, вакцины, ферменты, цитокины и факторы роста. Кроме того, острая необходимость в производстве рекомбинантных белков включает высокий спрос на промышленные ферменты и реагенты, используемые в исследованиях, включая антитела, используемые для идентификации и очистки белков (Rani D., 2024).

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, 2018; Heenatigala et al. 2020). Системы производства биопрепаратов на растительной основе к настоящему моменту достигли уровня коммерческого применения благодаря возможности производить сложные гликозилированные молекулы со сравнительно низкими производственными затратами, высокой масштабируемостью и гибкостью производства. Организация масштабного производства фармацевтических белковых препаратов требует создания высокоэффективных организмов-продуцентов. 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* (Савельева Н.В.2015; Dubey K.K., 2018; Schillberg S., 2021). Перспективной растительной платформой могут стать растения семейства *Lemnaceae*. Представители этого семейства имеют небольшой размер, который позволяет культивировать их в закрытых системах – биореакторах. Также ряски имеют высокое содержание белка в тканях (большинство видов содержат 15-45% белка в расчете на сухое вещество), благодаря чему их используют в пищу люди как высокобелковый продукт и широко применяют для кормления сельскохозяйственных животных (Appenroth K.J. 2017, Vog M. 2019). Такой ряд особенностей рясковых позволяет считать их перспективными продуцентами рекомбинантных белков.

В настоящем исследовании были использованы два важных терапевтических белка (ГКСФ и гирудин), которые сегодня производятся преимущественно в дрожжевых системах. ГКСФ (гранулоцитарный колониестимулирующий фактор человека) является полипептидным цитокином, стимулирующим продукцию нейтрофилов, применяется в онкологической практике и при трансплантации костного мозга. Нарработка данного белка в растительных системах приводится в литературе преимущественно в модельных объектах (табак и другие). 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. Так Parmenter с соавторами (1995) разработали экспрессионную систему на основе растений рапса (*Brassica napus*), где гирудин экспрессировался в слиянии с олеозином, накопление гирудина достигало 0,3% от общего белка семян. Слитый белок гирудин-олеозин транспортировался в масляные тельца, где и происходило его накопление. Выделение масла с рекомбинантным белком осуществлялось с помощью флотации и центрифугирования. Аналогичные результаты были получены при использовании эфиопской горчицы *Brassica carinata* и сафлора *Carthamus tinctorius* (Chaudhary 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.

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 апротинин. 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 впервые в мире была продемонстрирована стабильная трансформация вольфии (вид *W. arrhiza*). В исследованиях были получены 4 трансгенные линии, устойчивые к антибиотику гигромицину и содержащие ген *uidA (gus)* (Khvatkov P. 2015). Однако, эффективность трансформации была не высока ($\approx 0,2\%$). 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».

Цели 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 дисульфатогирудина-1.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Произвести оптимизацию транзистной 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* как претендента на высокоэффективную растительную экспрессионную систему для наработки рекомбинантных белков.
- Впервые в мире получены трансгенные растения вольфии бескорневой содержащие и экспрессирующие гены терапевтических белков (гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека и дисульфатогирудина-1).

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. Разработка эффективной системы трансформации вольфии бескорневой. Подобрано оптимальное соотношение концентраций регуляторов роста, оптимизированы условия инокуляции (концентрация и тип агробактериального штамма, время кокультивации), 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.

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); Сборник тезисов международной научной конференции «Биология и биотехнология растений», Алматы, 2014; Plant genetics, genomics, bioinformatics and biotechnology. The 3rd International Conference, PlantGen, Novosibirsk, 2015; Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием,

ИРНТУ 85 (Иркутск, 2015); XV Молодежная научная конференция посвященная памяти академика РАСХН Г.С. Муромцева "Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии" (Москва, 2015 г); 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).

По материалам диссертации опубликовано 12 работ, из которых: 3 статьи в журналах, входящих в перечень научных изданий, рекомендованных ВАК РФ, 9 тезисов докладов международных и российских конференций.

Личный вклад автора. Личное участие автора состоит в непосредственном планировании и выполнении экспериментов, анализе полученных данных и их оформлении для публикаций. Подавляющая часть экспериментальной работы выполнена соискателем самостоятельно. Теоретический анализ полученных результатов А. Н. Шведова проводила совместно с научным руководителем диссертационной работы.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 12 работ, из которых: 3 статьи в журналах, входящих в перечень научных изданий, рекомендованных ВАК РФ, 9 тезисов докладов международных и российских конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания объекта и методов исследований, результатов исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка используемой литературы. Работа изложена на 116 страницах машинописного текста, содержит 5 таблиц и 22 рисунка. Библиографический список включает 186 источников, из них 174 на иностранном языке.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Растительный материал. Для проведения исследований использовали стерильные целые одиночные растения *Wolffia arrhiza*, культивируемые на агаризованной среде Шенка-Хильдебрандта (SH) (0,7% агара; Panreac, Испания) при 21°C, 65 $\mu\text{моль/м}^2\cdot\text{сек}$ интенсивности освещенности и 16-ти часовом фотопериоде (рис.1а). В экспериментах по агробактериальной трансформации были использованы кластерные структуры вольфии, полученные в ходе 4-месячной прекультивации растений на агаризованной среде SH, содержащей 1% маннитола, 1% сорбитола, 2% глюкозы в качестве источников углерода, а также 5,0 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-D) и 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина (BA) (рис.1б).

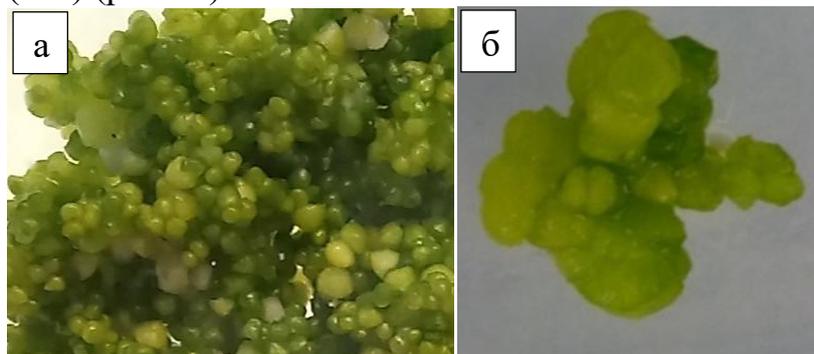


Рисунок 1. Растительный материал для проведения исследований, где а – растения вольфии бескорневой, б – кластерные

структуры вольфии бескорневой.

Оптимизация условий транзientной трансформации. Для проведения экспериментов по оптимизации генетической трансформации вольфии использовали три супервирулентных штамма *Agrobacterium tumefaciens*: ЕНА105 (Hood E.E., 2009), СВЕ21 (Bagyan I.L., 1995) и Ag10 (Lazo G.R., 1991) содержащие конструкцию pVec035, в состав которой входит интронсодержащий ген β -глюкоронидазы *Escherichia coli* (*uidA*) (рис.2)

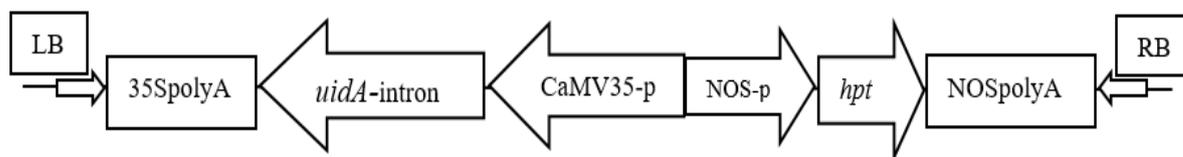


Рисунок 2. Схематическое представление области Т-ДНК вектора pVec035. CaMV35-p – промотор 35S субъединицы вируса мозаики цветной капусты; *uidA-intron* – интронсодержащий ген β -глюкоронидазы (*gus*); NOSpolyA – терминатор нопалинсинтазы с сигналом полиаденилирования; *hpt* – белок-кодирующая последовательность гена гигромицинофосфотрансферазы; NOS-p – промотор нопалинсинтазы; 35SpolyA – терминатор 35S вируса мозаики цветной капусты с сигналом полиаденилирования; LB, RB – соответственно левая и правая фланкирующие последовательности Т-ДНК.

Для трансформации использовали ночную культуру каждого штамма агробактерии, выращенную в шейкере-инкубаторе (при 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 (Hyg) для штамма СВЕ21 или 50 мг/л рифампицина (Rif) для штаммов ЕНА105 и Ag10. Для инокуляции эксплантов (кластеров) использовали 5 агробактериальных суспензий, разведенных 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), каждого штамма. 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 (при 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 повторах для каждого варианта эксперимента) в течение последующих 6 суток кокультивации (24, 48, 72, 96, 120, 148 ч). Всего в экспериментах по оптимизации протокола агробактериальной трансформации было задействовано порядка 3 750 эксплантов.

Гистохимический анализ активности гена *uidA* проводили согласно методу Jefferson et al. (1987). Растения подвергали вакуумной инфльтрации с использованием 0,1%-ного 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% Тритона 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 °С. Далее растения отмывали в 80%-ном растворе этанола.

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

Оптимизация концентраций регуляторов роста для стабильной агробактериальной трансформации. Эксперимент по оптимизации агробактериальной трансформации проводился с использованием штамма EHA105+pVec035 с оптической плотностью 0,4 (OD₆₀₀). 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 (Tm) и переносили на среды для культивирования эксплантов (с содержанием 2,4-D совместно с BA), селекции (5 мг/л Нуг) и элиминации агробактерии (100 мг/л Tm). В экспериментах было задействовано 25 вариантов комбинаций регуляторов роста 2,4-D и BA (2,4-D в концентрациях 0,5–2,5 мг/л с шагом 0,5 мг/л совместно с BA в концентрациях 0,5–2,5 мг/л с шагом 0,5 мг/л) в трех повторах. Для каждого из 25 вариантов было задействовано по 1600 эксплантов. Спустя 14 дней экспланты переносили на безгормональную среду SH для индукции регенерации с добавлением 100 мг/л тиментина (Tm) для элиминации агробактерии и 5 мг/л Нуг для селекции трансгенной ткани.

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, чтобы 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.

Векторные конструкции с целевыми генами белков гирудина и ГКСФ.

Для трансформации вольфии применяли обезоруженный супервирулентный штамм *Agrobacterium tumefaciens* ЕНА105 с интродукцией векторных конструкций pCamHIR и pCamGCSF (рис.3), содержащих в себе целевые гены, кодирующие дисульфатогирудин-1 и ГКСФ.

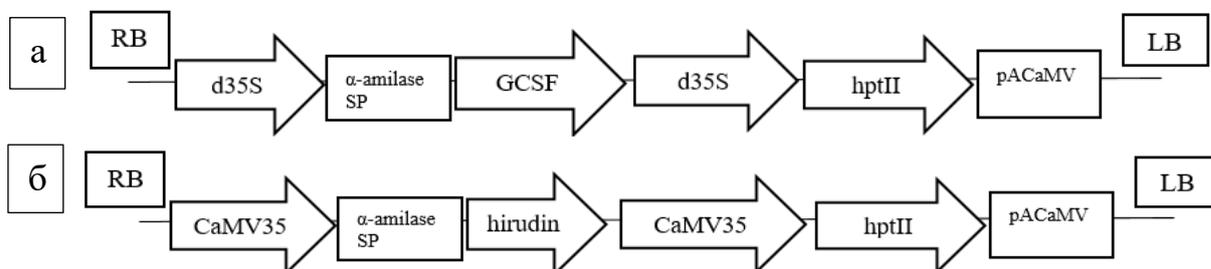


Рисунок 3. Карты бинарных векторов pCamGCSF(а) и pCamHIR (б), где LB, RB – левая и правая фланкирующие последовательности Т-ДНК; *GCSF* – нуклеотидная последовательность гена гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (hG-CSF); *hirudin* - нуклеотидная последовательность гена дисульфатогирудина-1; CaMV35S- промотор 35S субединицы вируса мозаики цветной капусты; d35S- двойной промотор 35S субединицы вируса мозаики цветной капусты; α -amilaseSP- сигнальный пептид альфа-амилазы риса; *hptII*- белок-кодирующая последовательность гена гигромицинофосфотрансферазы; pACaMV- сигнал полиаденилирования.

Методика стабильной агробактериальной трансформации с конструкциями с целевыми генами. Эксперименты проводили методом кокультивации эксплантов (кластеров) с суспензией агробактерии. Ночную культуру агробактерии (ЕНА105 + pCamHIR или pCamGCSF), кокультивацию, отмывку, а также селекцию растительных тканей проводили аналогично как в эксперименте по оптимизации концентраций регуляторов роста. Экспланты культивировали на среде SH с добавлением 2,5 мг/л 2,4-D и 1,5 мг/л ВА. Спустя 14 дней, экспланты переносили на безгормональную среду SH для индукции регенерации с добавлением 100 мг/л тиментина (Tm) для элиминации агробактерии и 5 мг/л Нуг для селекции трансгенной ткани.

Молекулярно-генетический анализ трансгенных образцов вольфии. Наличие последовательности гетерологичных генов в тотальной ДНК образцов вольфии проводили с помощью ПЦР-анализа. При проведении ПЦР использовали следующие пары праймеров: для гена *uidA* gusA1: 5'-TCGTAATTATGCGGGCAACGTC-3' и gusA2: 5'-CGAATCCTTTGCCACGCAAG-3'; для гена *hptII* *hptf*: 5'-ACATTGTTGGAGCCGAAATC-3' и *hptr*: 5'-GACATTGGGGAGTTTAGCGA-3'; для гена *Hirudin* HirXF: 5'-AGCTCTAGAATGGCCAAGAGGATTGC-3' и HirSR: 5'-TTCGAGCTCTCATTTGGAGGTA CTCTTCAGG-3'; для гена *hG-CSF* Gfr1for: 5'-GTCCTCTAGAATGGCGAAGAGGATCGCC-3' и Gfr2rev: 5'-ATGAGCTCTCACGGTTGGGCGAGATG-3'; для гена *virC* virC1: 5' -GCASTATCTACCTACCGCTACGTCATC-3' и virC2: 5' -

GTTGTCGATCGGGACTGTAAATGTG-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-0,5мМ, конечная концентрация праймеров – 0,4 пикМ/мкл, 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).

Саузерн-блот анализ для выявления последовательности целевых генов *hG-CSF* и *Hirudin* проводили с использованием геномной ДНК (≈ 50 мкг) трансформированных и нетрансформированных растений вольфии. ДНК расщепляли в течение 16 часов при 37 °С при помощи эндонуклеаз рестрикции: HindIII (100 единиц) для растений, трансформированных pCamGCSF, эндонуклеазой XbaI (100 ед.) для растений, трансформированных pCamHIR. Далее производили электрофорез в агарозном геле (0,8%). Продукты рестрикции были иммобилизованы на мембране Hybond + (Amersham, США) в соответствии с инструкциями производителя. ДНК-зонды был синтезированы на матрице плазмид методом ПЦР с парой праймеров G1for и G1rev (итоговый зонд на ген *hG-CSF* 600 п.н.) или HirXF и HirSR (итоговый зонд на ген *hirudin* 294 п.н.). Зонды метили щелочной фосфатазой с помощью набора AlkPhos Direct Labeling Kit (Amersham Bioscience, США). Сигналы на мембране детектировали с помощью реагента CDP Star в соответствии с инструкциями производителя (Amersham, Bioscience). Сигналы с мембраны детектировали на рентгеновских пленках (ХВЕ blue чувствительный, Retina) в пленочной кассете при комнатной температуре в течение 24 часов. Рентгеновские снимки сканировали на приборе Epson Perfection V750 PRO.

Количественную оценку накопления гирудина и ГКСФ проводили методом ИФА (ELISA). 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 ГКСФ (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). Для гирудина в качестве первичных антител использовали мышинные моноклональные антитела 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 к ГКСФ (Abcam, Великобритания), которые разводили в соотношении 1:1000, а в качестве вторичных - конъюгированные с щелочной фосфатазой кроличьи антитела IgG, (Pierce, США) в разведении 1:2000. Гибридизацию с первичными антителами в обоих случаях проводили в течение 16 ч при температуре +4 °С. Далее отмывали и добавляли вторичные антитела. Гибридизацию проводили 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, а количество экспрессируемых растениями гирудина и ГКСФ оценивали на основе эталонных стандартов.

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).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Оптимизация условий транзientной трансформации

Для оптимизации агробактериальной трансформации вольфии было необходимо подобрать наиболее эффективный агробактериальный штамм, концентрацию инокулюма, а также время кокультивации эксплантов с агробактериальной суспензией. В эксперименте было использовано 3 агробактериальных штамма (ЕНА105, СВЕ21, Agl0) в концентрациях OD_{600} от 0,2 до 1,0. Все штаммы содержали конструкцию с геном *uidA* (*gus*). Результаты оказались следующие:

- После инокуляции эксплантов суспензией агробактериального штамма ЕНА105 с оптической плотностью 0,4 (OD_{600}) через 72 ч кокультивации эффективность транзientной экспрессии была максимальной и составляла 19% (рис. 4а).
- 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. 4б).
- При трансформации агробактериальным штаммом Agl0 только на 5 сутки кокультивации можно было отметить участки гистохимического окрашивания эксплантов, максимальная эффективность составила 3% при использовании инокулюма в концентрации 1,0 (OD_{600}) (рис.4в).

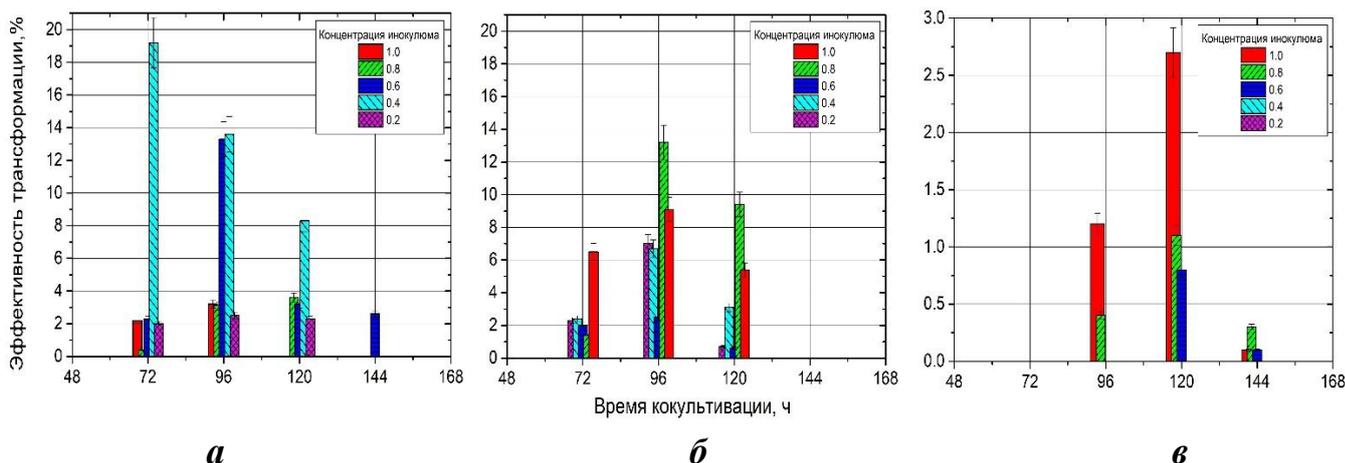


Рисунок 4. Эффективность транзientной экспрессии гена *uidA* в тканях эксплантов вольфии в зависимости от штамма агробактерии: ЕНА 105 (а), СВЕ 21 (б), Ag10 (в). Концентрации инокулюма указаны в оптических единицах при длине волны 600 нм (OD_{600}).

Основываясь на полученных результатах для дальнейших экспериментов было решено использовать штамм ЕНА 105 в концентрации инокулюма (OD_{600}) 0,4, а предпочтительное время кокультивирования эксплантов с агробактерией - 72 часа.

2. Оптимизация концентраций регуляторов роста для стабильной агробактериальной трансформации

Ранее в нашей лаборатории удавалось получать трансгенные популяции вольфии с интеграцией в геном различных векторных конструкций (Khvatkov P., 2015), но эффективность трансформации не превышала 0,2%. Было известно, 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 (Khvatkov P., 2015). Исходя из полученных данных, было необходимо детально изучить влияние регуляторов роста на эффективность трансформации вольфии.

Анализ данных эффективности трансформации вольфии показал, что, распределение величин, отличалось от нормального (таблица 1). 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 до 2,5 мг/л 2,4-D 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 1

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

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 (рис.5). 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. В результате проведенного исследования эффективность трансформации *Wolffia arrhiza* относительно исходного протокола (Khvatkov P., 2015) удалось повысить с 0,2% до 0,4-0,5%.

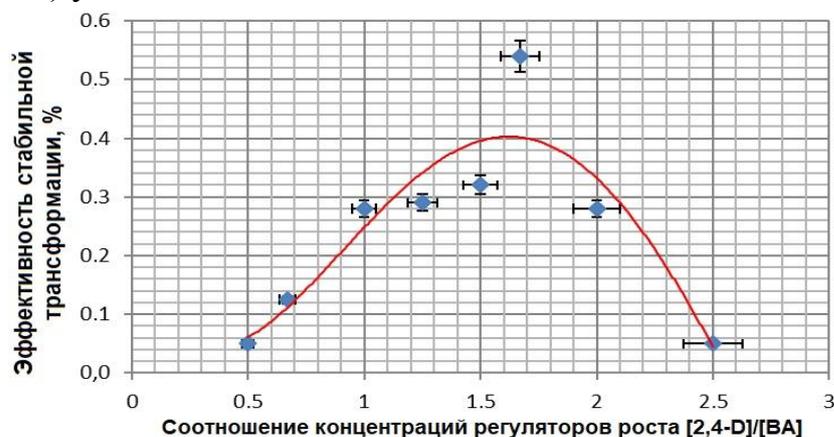


Рисунок 5. Влияние соотношения концентраций регуляторов роста ([2,4-D]/[ВА]) на эффективность стабильной трансформации *Wolffia arrhiza*.

3. Стабильная агробактериальная трансформация вольфии конструкциями с целевыми генами

Экспериментально показано, что для получения трансгенных растений вольфии бескорневой эффективна 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 и антибиотиками для селекции тканей и элиминации агробактерии. Далее экспланты переносили на среду SH с добавлением Нуг в концентрации 5 мг/л и Тм в концентрации 100 мг/л, без добавления регуляторов роста. После 6 недель культивирования на среде SH без регуляторов роста на поверхности кластеров появлялись зеленые меристематические области (рис.6а), а из них через 8-10 недель развивались изумрудно-зеленые глобулярные структуры (рис.6б), из которых затем развивались целые растения (рис.6 в,г).

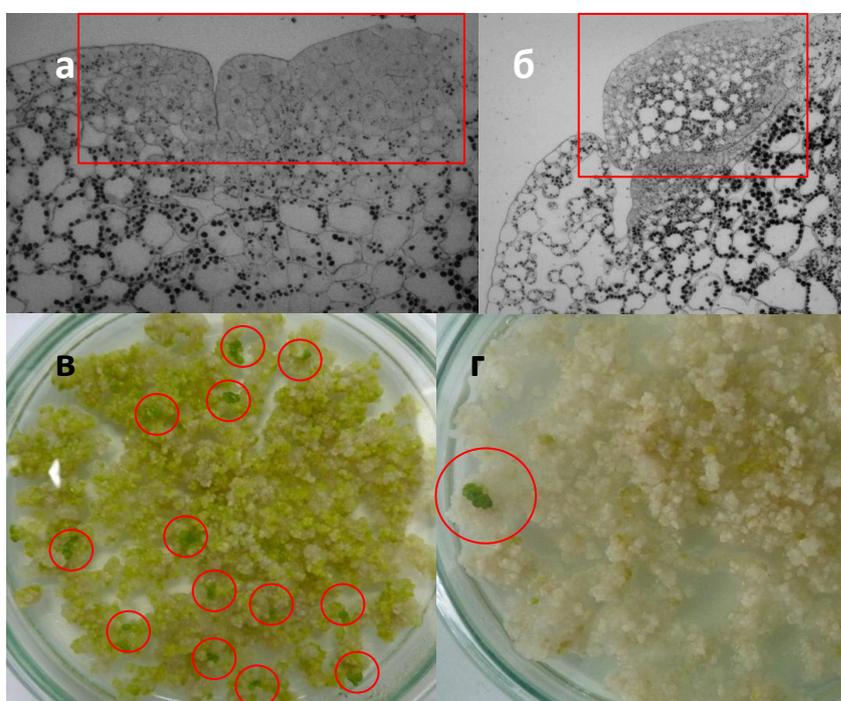


Рисунок 6. Развитие трансгенных регенерантов вольфии, где а – зеленая меристематическая область (выделено красным прямоугольником) на поверхности кластера, образовавшаяся после 6 недель воздействия селективной среды, б –глобулярные структуры (выделено красным прямоугольником) на поверхности кластера, возникшие после 8-10 недель воздействия селективных сред, в, г - массовое (в) или одиночное (г) образование целых растений (выделено красными кругами) в присутствии Нуг в концентрации 5 мг/л в питательной среде.

Для создания продуцента гирудина на основе вольфии использовали агробактериальный штамм ЕНА105 содержащий плазмиду pSamHIR. Было задействовано 8550 эксплантов. Эффективность трансформации составила 0,48% на 100 эксплантов. Всего была получена 41 независимая Нуг-устойчивая

трансгенная популяция вольфии. Далее все линии были дополнительно проанализированы с помощью ПЦР, двадцать из них были проанализированы с помощью ИФА, десять - с помощью Саузерн-блоттинга и три линии (с наибольшей экспрессией гирудина) - с помощью Вестерн-блоттинга. В результате ПЦР-анализа трансгенных линий вольфии было выявлено, что 40 гигромицин-устойчивых линий содержали полноразмерную вставку тДНК, а 1 линия только последовательность устойчивости к гигромицину (рис.7).

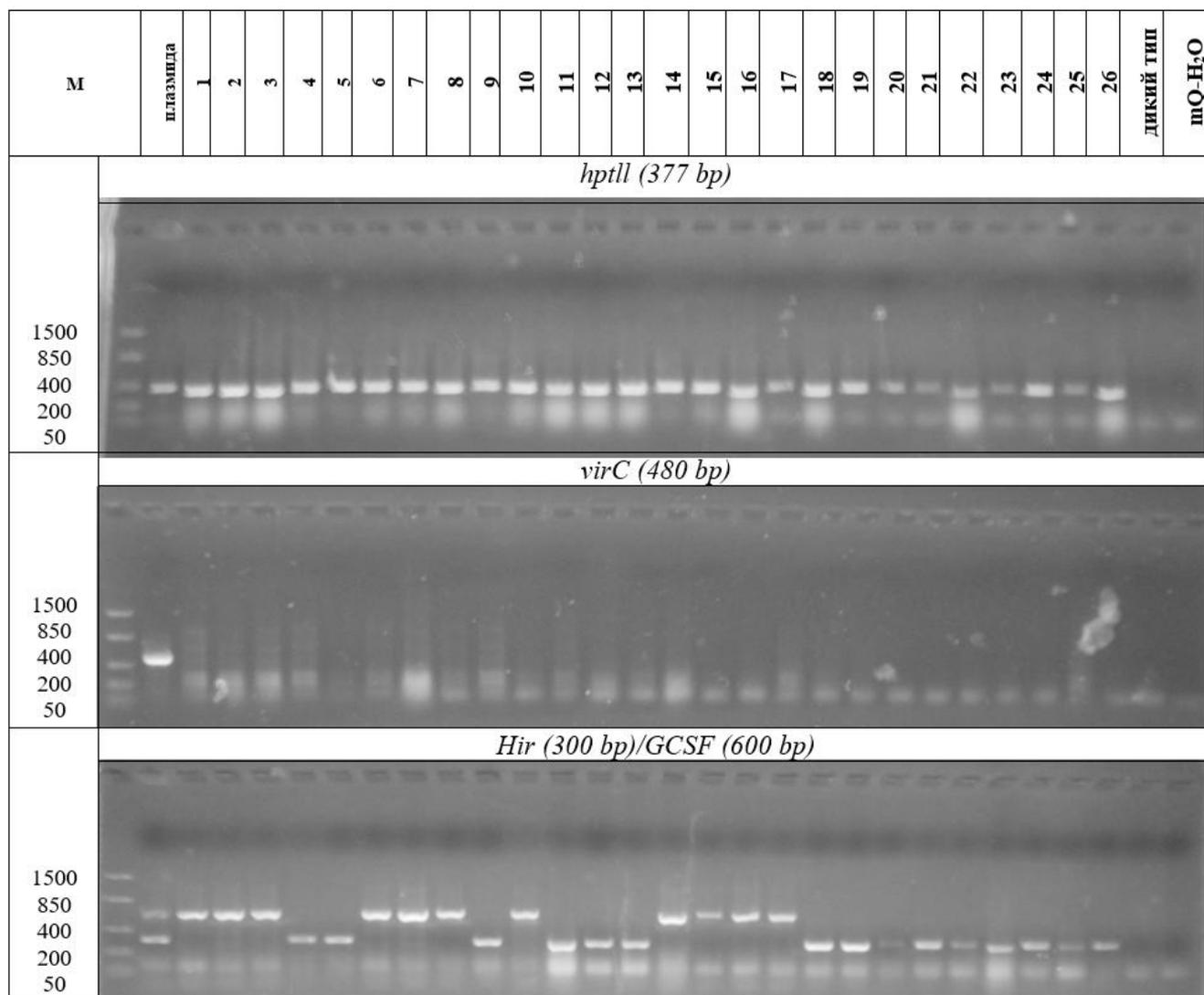


Рисунок 7. Электрофореграмма продуктов ПЦР, где М - маркер молекулярных масс, дикий тип – не трансгенное растение, mQ H₂O – отрицательный контроль для проверки чистоты реактивов, а 1-26 – анализируемые образцы.

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.8). 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 не трансгенного контроля. Наибольшие уровни накопления гирудина наблюдались в линии Wh-15 ($775,5 \pm 111,9$ нг / г FW), в линиях Wh-09 и Wh-19 накопление гирудина было ниже - $766,4 \pm 98,9$ и $534,5 \pm 109,6$ нг/г FW соответственно. Различия в накоплении гирудина в линиях Wh-09, Wh-15 и Wh-19 статистически не существенны.

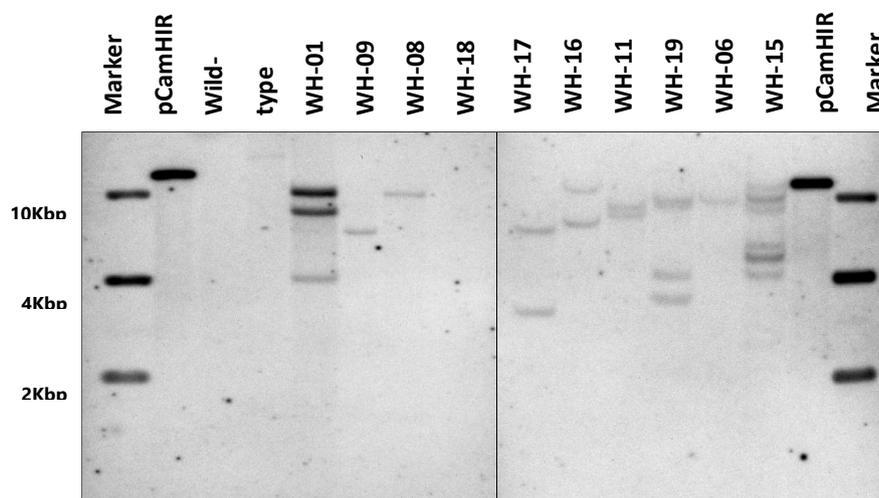


Рисунок 8. Саузерн-блот анализ линий вольфии с интеграцией гена *Hirudin*

Линии с максимальной экспрессией гирудина были выбраны для Вестерн-блот анализа. В результате анализа гирудин был достоверно детектирован только у одной трансгенной линии (Wh-15) из 3 исследованных. 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 вольфии. В контрольном образце белка из растений дикого типа (не трансгенных) не наблюдали иммунореактивной полосы соответствующей гирудину.

Максимальное накопление гирудина в линии Wh-15 составило $775,5$ нг/г сырого веса, что значительно выше, чем в большинстве экспериментов по экспрессии пептидов в растительных экспрессионных системах, но ниже, чем в большинстве экспериментов по экспрессии пептидов в рясковых экспрессионных системах. Предположительно определяющим фактором для относительно низкого уровня накопления гирудина явилась его нестабильность в тканях растений ряски, в частности, деградация за счет протеолитических ферментов растения-продуцента. 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. Полученные результаты будут в дальнейшем использованы в исследованиях по совершенствованию генетических конструкций для экспрессии рекомбинантных пептидов.

Для создания продуцента ГКСФ на основе *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. Были получены 34 независимых линии вольфии, которые развивались в присутствии в среде гигромицина. По данным ПЦР-анализа контаминации агробактериальными генами *vir* группы в проанализированных образцах не было (рис.7). Все 34 полученные гигромицин-устойчивые линии вольфии содержали селективный ген *hptII* и целевую последовательность *hG-CSF*. По данным ИФА ГКСФ детектировался 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 растения. Самые высокие уровни накопления ГКСФ наблюдали в линиях WG-04 и WG-32 (33,9 и 35,5 мкг на кг зеленой массы). Саузерн-блот анализ был проведен для исследования 11 трансгенных линий. Были отобраны линии с различным уровнем экспрессии - нулевым, средним, высоким и низким (рис.9).

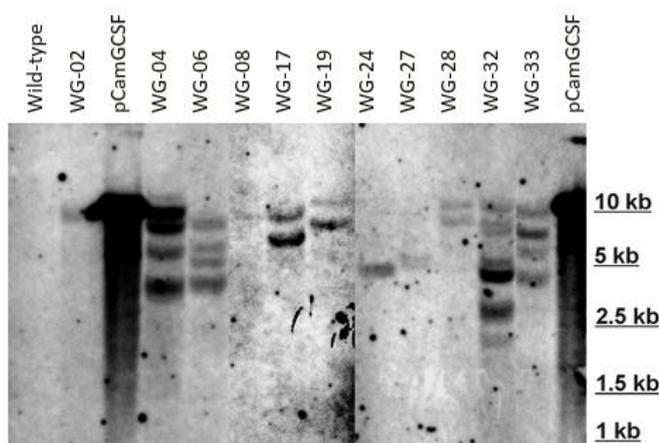


Рисунок 9. Результаты саузерн-блот анализа для 11 трансгенных линий вольфии с интеграцией гена *hG-CSF*

Полученные результаты подтвердили интеграцию гена *hG-CSF* в геномную ДНК *Wolffia*. В исследуемых образцах были обнаружены от 1-го до 7 локусов интеграции в геном вольфии (один локус интеграции в образцах WG-02, WG-08, WG-24, и WG-27, два – в образцах WG-17, WG-19, WG-28, четыре - в WG-06 и WG-33, пять – в WG-04, 7 локусов в WG-32). ДНК нетрансформированных растений не удалось гибридизовать с зондом. Вестерн-блот с использованием антител к ГКСФ выявил наличие полосы 20 кДа, соответствующей рекомбинантному ГКСФ в 33 из 34 исследованных трансгенных линиях вольфии (рис.10). В контроле не наблюдалось иммунореактивных полос. А максимальное накопление ГКСФ наблюдали в линиях WG-04 и WG-32, в остальных линиях накопление целевого белка было существенно ниже. Довольно много исследователей придерживаются мнения, что мультикопийность трансгенных инсерций приводит к снижению уровня экспрессии привнесенных генов. Несмотря на поликопийность инсерций гена *hG-CSF* 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. В результате исследования были впервые получены трансгенные растения вольфии, 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.

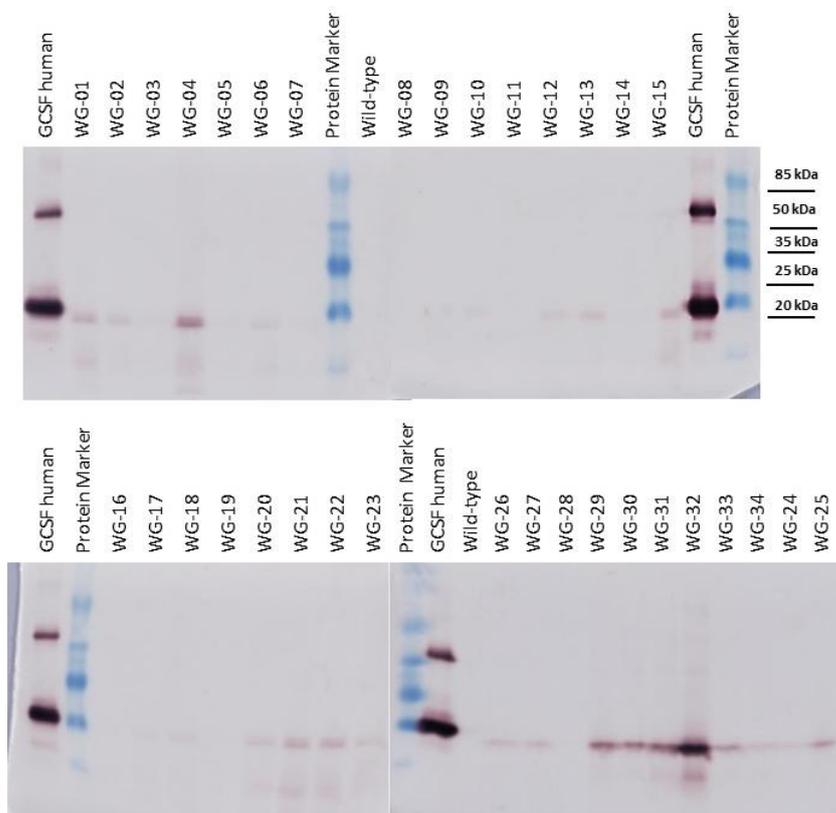


Рисунок 10. Вестерн-блот экспрессии ГКСФ в трансгенных линиях вольфии. Protein Marker - маркер молекулярного размера TS 26612 Protein MW Marker; GCSF human - рекомбинантный ГКСФ (200 нг; AbCam, Великобритания).

Поскольку вольфию потенциально можно использовать как платформу для экспрессии и трансфера растениями белка в среду, было произведено изучение культуральной среды в биореакторе. Эксперимент проводили с использованием биореактора с гидродинамическим перемешиванием Biostat PBR 2S (Sartorius, Germany). Для изучения накопления целевого белка ГКСФ в культуральной среде была выбрана линия WG-32. Исследование производили методом ИФА. В результате было отмечено, что рост содержания ГКСФ в среде начинается, когда прирост растительной биомассы достигает половины от максимально возможного значения (рис.11). Что, по-видимому, является наиболее благоприятным условием для наработки белка в среду. 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. Так как в случае выделения белка из среды можно говорить о менее трудоемком процессе 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. Растения вольфии, содержащие рекомбинантные белки, могут быть перспективными в животноводстве, поскольку возможно применение пассивной вакцинации домашних птиц и животных съедобными вакцинами.

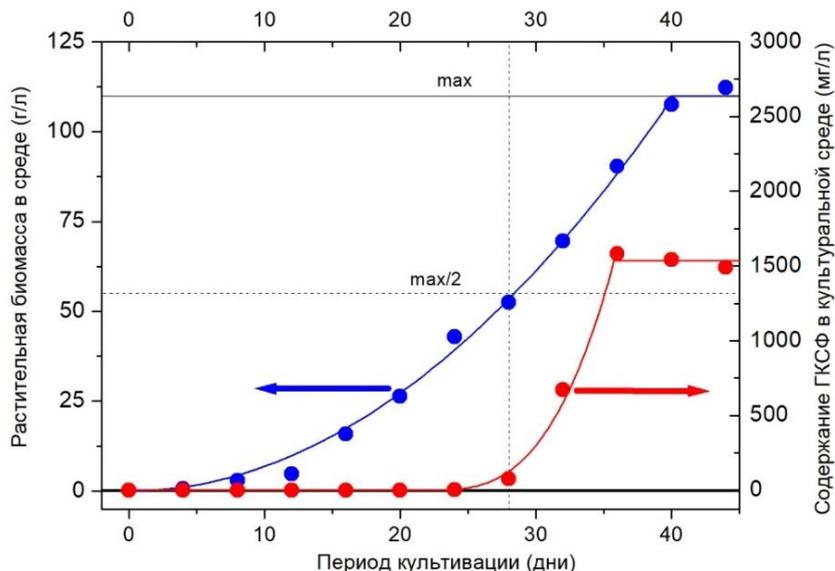


Рисунок 11. Динамика прироста биомассы (синяя кривая) *Wolffia arrhiza* (линия WG-32) и динамика накопления ГКСФ (красная кривая) в культуральной среде.

Таким образом, на примере экспрессии ГКСФ можно говорить о высоком потенциале вольфии бескорневой как продуцента рекомбинантных белков.

4. Заключение

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 и составляла 19%. На основе этих результатов, а также ранее разработанного протокола была произведена оптимизация стабильной трансформации вольфии. Было показано, что для успешной трансформации вольфии бескорневой 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. В результате исследований эффективность трансформации *Wolffia arrhiza* относительно исходного протокола 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 человека и 40 линий, содержащих последовательность гена гирудина. Наибольший уровень накопления гирудина наблюдался в линии Wh-15 и составил 766,4нг/г, что является довольно низким уровнем. Предполагается, что это обусловлено нестабильностью данного белка в тканях вольфии, в особенности деградацией за счет протеолитических ферментов в растениях. Для оптимизации продукции гирудина в тканях растений требуется модификация данного белка для защиты от протеолитического фона самого растения, или механизмы, позволяющие как можно быстрее выводить данный белок из клетки в среду без его разрушения.

Трансгенные линии вольфии содержащие последовательность гена *hG-CSF* имеют довольно высокий уровень накопления целевого белка. Накопление ГКСФ 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). Дальнейшие исследования по накоплению целевого белка в среде, на примере ГКСФ показали, что порядка четверти всего нарабатываемого в вольфии ГКСФ успешно транспортируется в среду культивирования, что свидетельствует о 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 целевых генов в геном вольфии (1-6 для *Hirudin* и 1-7 для *hG-CSF*). Такая ситуация характерна для агробактериальной трансформации, в случае с геном гирудина, наиболее высокий уровень среди всех образцов показал вариант, где присутствуют 6 интеграций в геном растения (линия Wh-15). На примере с геном *hG-CSF* линии с наибольшим количеством инсерций (5 и 7 в линиях 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 растения-продуцента, а наоборот позволила добиться более высокого выхода рекомбинантного продукта.

Анализ полученных экспериментальных данных, а также литературных источников позволил 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 получить растения, продуцирующие ценные терапевтические белки - гирудин и гранулоцитарный колониестимулирующий фактор человека.

ВЫВОДЫ

1. Оптимизация условий трансформации эксплантов вольфии бескорневой позволила повысить эффективность трансформации вольфии в 2 раза. Для этого было отобран агробактериальный штамм ЕНА105, время кокультивации составило 72 часа, а плотность агробактериальной суспензии составила 0.4 (OD₆₀₀). 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%.
2. Применение усовершенствованного протокола агробактериальной трансформации позволило получить трансгенные линии вольфии экспрессирующие рекомбинантный терапевтический белок такой как дисульфатогирудин-1, экспрессирующийся в линиях в диапазоне 534,55-775,45 нг/г сырой массы продуцента.
3. Применение усовершенствованного протокола агробактериальной трансформации позволило получить трансгенные линии вольфии экспрессирующие гранулоцитарный колониестимулирующий фактор человека, экспрессирующийся в линиях в диапазоне от 0,36 до 35,5 мг/кг сырой массы продуцента.
4. Применение технологии культивирования вольфии в биореакторе позволило определить оптимальную плотность популяции для трансфера и экстракции рекомбинантного ГКСФ из культивационной среды. Оптимальная плотность популяции наблюдается при культивировании вольфии от 30 до 35 дней, при этом поддержание растительной биомассы в биореакторе должно составлять 85–87,5 г/л.
5. Подтверждена перспективность использования *Wolffia arrhiza* в качестве экспрессионной платформы для наработки терапевтических белков.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. а) **Shvedova, A.N.**, Optimization of Factors Affecting the Efficiency of Agrobacterium-Mediated Transformation of *Wolffia arrhiza* / A.N. Shvedova, P.A. Khvatkov, & S.V. Dolgov, // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2023. – V.59. – № 9. – P.1177–1182. <https://doi.org/10.1134/S0003683823090089>
б) **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>
2. Khvatkov P., *Wolffia arrhiza* as a promising producer of recombinant hirudin / P. Khvatkov, A. Firsov, **A. Shvedova**, O. Kozlov, M. Chernobrovkina, A. Pushin, L. Shaloiko, S. Dolgov // 3 Biotech. – 2021. – V.11. – № 5. – P.209. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02762-3>
3. Khvatkov P., Development of *Wolffia arrhiza* as a producer for recombinant human granulocyte colony-stimulating factor / P.Khvatkov, A.Firsov, **A. Shvedova**,

L.Shaloiko, O.Kozlov, M.Chernobrovkina, A.Pushin, I.Tarasenko, I.Chaban, S. Dolgov // *Frontiers in Chemistry* – 2018. – V.6. – № Jul. – P.304. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00304>

Публикации в других изданиях, тезисы докладов

1. Хватков П.А., Разработка протокола агробактериальной трансформации и получение стабильно экспрессирующих линий вольфии бескорневой (*Wolffia arrhiza*) содержащих гены белков фармацевтического назначения / П.А. Хватков, **А.Н. Шведова**, М.А. Чернобровкина, А.С. Пушин, А.П. Фирсов, Л.А. Шалойко, С.В. Долгов // VII Международная научно-практическая конференция Биотехнология: наука и практика. Севастополь. – 2019 г. – С.582-584.
2. **Шведова А.Н.**, Создание экспрессионной платформы на основе растений *Wolffia arrhiza* для наработки терапевтических белков на примере гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) / А.Н. Шведова, П.А. Хватков, М.А. Чернобровкина, А.С. Пушин, А.П. Фирсов, Л.А. Шалойко, С.В. Долгов // «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии»: 18-я Всероссийская конференция молодых учёных, ФГБНУ ВНИИСБ. – 2018. – С.41-42
3. Khvatkov P., Development of *Wolffia arrhiza* as Producer for Recombinant Human Granulocyte Colony Stimulating Factor // P. Khvatkov, A. Firsov, **A. Shvedova**, L. Shaloiko, A. Pushin, I. Tarasenko, M. Chernobrovkina and S. Dolgov // International Conference on Duckweed Research and Applications 4th. Kerala, 2017. – P.44.
4. Khvatkov P. Callus induction, regeneration and *agrobacterium*-mediated transformation of *Wolffia arrhiza* / P. Khvatkov, **A. Shvedova**, M. Chernobrovkina, A.Pushin, A.Firsov, L.Shaloyko, S.Dolgov // The 3rd International Conference “Plant genetics, genomics, bioinformatics and biotechnology”, PlantGen, Novosibirsk, 2015. – P. 24.
5. Хватков П.А. Разработка протокола агробактериальной трансформации и получение стабильно экспрессирующих линий вольфии бескорневой (*Wolffia arrhiza*) / П.А. Хватков, **А.Н. Шведова**, М.А. Чернобровкина, А.С. Пушин, А.П. Фирсов, Л.А. Шалойко, С.В. Долгов // Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Фундаментальные и прикладные аспекты биотехнологии», ИРНТУ 85, Иркутск, 2015. – С. 270 – 276.
6. **Шведова А.Н.**, Получение линий *Wolffia arrhiza*, Содержащих гены фармакологического назначения / А.Н. Шведова, П.А. Хватков, М.А. Чернобровкина, А.С. Пушин, А.П. Фирсов, Л.А. Шалойко, С.В. Долгов // XV Молодежная научная конференция посвященная памяти академика РАСХН Г.С. Муромцева "Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии" Москва, 2015 г.
7. Хватков П.А. Индукция морфогенеза и агробактериальная трансформация *Wolffia arrhiza* / П.А. Хватков, **А.Н. Шведова**, М.А. Чернобровкина, С.В.

Долгов //Сборник тезисов международной научной конференции «Биология и биотехнология растений», Алматы, 2014. – С. 456.

8. **Шведова А.Н.**, Оптимизация условий морфогенеза и агробактериальной трансформации *Wolffia arrhiza* / А.Н. Шведова, П.А.Хватков // 67 Международная студенческая научно-практическая конференция РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева Москва, 2014.
9. **Шведова А.Н.**, Агробактериальная трансформация *Wolffia arrhiza* /А.Н.Шведова, П.А. Хватков // XIV Молодежная научная конференция посвященная памяти академика РАСХН Г.С. Муромцева "Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии", Москва, 2014.

Автор выражает благодарность научному руководителю за 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 за поддержку при написании статей и диссертации.