

DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen624418>

Научный обзор



# Трансгенез микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii*: актуальные подходы

П.А. Виролайнен, Е.М. Чекунова

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

## АННОТАЦИЯ

Микроводоросли — богатый источник биологически активных веществ природного происхождения, которые находят применение в фармацевтическом, сельскохозяйственном, пищевом и промышленном производстве. Генетическая инженерия микроводорослей открывает большие возможности для создания штаммов-продуцентов различных пищевых добавок, коммерческих ферментов, а также белков терапевтического назначения — антител, гормонов и вакцин. Одноклеточная зеленая водоросль *Chlamydomonas reinhardtii* P.A. Dang. — модельный объект генетики фотосинтеза — оказалась удобной для разработки новых подходов в генетической инженерии микроводорослей. Преимущества *C. reinhardtii* состоят в возможности трансформации всех трех ее геномов (ядерного, митохондриального и хлоропластного), низкой стоимости и простоте культивирования, безопасности для человека и наличии системы посттрансляционной модификации белков, что делает этот организм потенциально интересной платформой для применения в биотехнологии. За последние несколько лет были достигнуты значительные успехи в трансгенезе *C. reinhardtii*, в том числе с применением новых методик редактирования генома. В этом обзоре мы представляем данные о современных достижениях в области модификации генома одноклеточной зеленой водоросли *C. reinhardtii*: принципы дизайна трансгенных конструкций, методики трансформации ядерного и хлоропластного геномов, используемые селективные маркеры и подходы к редактированию геномов с помощью системы CRISPR/Cas9.

**Ключевые слова:** микроводоросли; *C. reinhardtii*; хлоропласт; трансформация; генетическая инженерия; дизайн трансгенов; ГМО; CRISPR/Cas.

## Как цитировать

Виролайнен П.А., Чекунова Е.М. Трансгенез микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii*: актуальные подходы // Экологическая генетика. 2024. Т. 22. № 1. С. 47–62. DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen624418>

DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen624418>

Review

# Transgenesis in microalga *Chlamydomonas reinhardtii*: current approaches

Pavel A. Virolainen, Elena M. Chekunova

Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

## ABSTRACT

Microalgae are a rich source of biologically active substances of natural origin, which have potential for use in pharmaceutical, agricultural, food and industrial production. Genetic engineering of microalgae opens up great prospects for creating improved strains that produce various food additives, commercial enzymes, as well as proteins for therapeutic purposes — antibodies, hormones and vaccines. *Chlamydomonas reinhardtii* P.A. Dang. is a unicellular green alga, a reference organism for studying the genetics of photosynthesis and developing new genetic engineering approaches in microalgae. The advantages of *C. reinhardtii* include the ability to transform all three of its genomes (nuclear, mitochondrial and chloroplast), low cost and ease of cultivation, safety for humans and the presence of a system for post-translational modification of proteins, which makes this organism a potential platform for use in biotechnology. Over the past few years, significant advances have been made in transgenesis of *C. reinhardtii*, including the use of new techniques based on the CRISPR/Cas9 genome editing technology. In this review, we summarize the available information on current approaches to transgenesis of the unicellular green alga *C. reinhardtii*: 1) general principles of transgenic constructs design for transformation of the nuclear and chloroplast genome, 2) popular selection markers used, 3) methods of cell transformation, 4) methods of genome editing using the CRISPR/Cas9 system.

**Keywords:** microalgae; *C. reinhardtii*; chloroplast; transformation; genetic engineering; transgene design; GMO; CRISPR/Cas.

## To cite this article

Virolainen PA, Chekunova EM. Transgenesis in microalga *Chlamydomonas reinhardtii*: current approaches. *Ecological genetics*. 2024;22(1):47–62. DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen624418>

Received: 26.12.2023

Accepted: 15.02.2024

Published online: 18.02.2024

## ВВЕДЕНИЕ

Зукариотические микроводоросли — чрезвычайно разнообразная сборная группа фотосинтезирующих одноклеточных организмов, приспособленных к широкому спектру экологических ниш [1]. Они являются первичными продуцентами, на которых приходится около 50 % общего объема фиксации углерода во всем мире [2]. Благодаря высокой метаболической пластичности, микроводоросли содержат широкий спектр полезных веществ, таких как природные антиоксиданты, витамины, липиды, белки, пигменты, углеводы и вторичные метаболиты фармацевтического, сельскохозяйственного, пищевого и промышленного применения. Микроводоросли являются богатым источником фармакологически активных метаболитов, обладающих противоопухолевыми, антибактериальными, противогрибковыми и противовирусными свойствами. Помимо наработки эндогенных соединений при применении методов биоинженерии микроводоросли потенциально могут быть использованы в качестве недорогой платформы для биосинтеза различных промышленных ферментов и терапевтических белков — антител, гормонов и вакцин [3]. Генетическая инженерия открывает большие перспективы для создания высокопродуктивных штаммов микроводорослей; будучи одноклеточными организмами, многие виды микроводорослей большую часть своего вегетативного цикла остаются гаплоидными, что сокращает время получения и селекции трансформантов. Использование микроводорослей в качестве «клеточных фабрик» — многообещающий подход к производству коммерчески ценных соединений [4]. Некоторым видам микроводорослей (например, *Chlorella vulgaris* Beijerinck и *Chlamydomonas reinhardtii* P.A. Dang.) присвоен статус GRAS (англ. Generally Recognized as Safe — «В целом признано безопасным») — они безопасны при употреблении в пищу [5].

Тем не менее микроводоросли до сих пор остаются относительно сложными объектами для генетических манипуляций [6]. Основные проблемы связаны с необходимостью видоспецифичного подхода: трансформация клеток может быть осложнена особенностями строения мембран и клеточной стенки у представителей конкретного таксона, а разработанная трансгенная конструкция может не экспрессироваться из-за мощной системы сайленсинга генов. Эти трудности объясняют низкую эффективность трансформации микроводорослей и скудный список успешно редактируемых видов [6, 7].

*C. reinhardtii* (хламидомонада) — одна из наиболее изученных зукариотических зеленых водорослей, популярный модельный объект для изучения генетики фотосинтеза, биологии хлоропласта, структуры и функций сенсорных фоторецепторов и фотоповедения. Хламидомонада также является модельным организмом для разработки новых подходов генетической инженерии ДНК микроводорослей. Сочетание быстрого роста и простоты

культивирования со способностью к фотосинтезу, хорошо изученный жизненный цикл, полностью секвенированные три генома (ядерный, хлоропластный и митохондриальный) [8, 9], возможность трансформации каждого из них [10], а также безопасность для человека делают хламидомонаду ценным объектом и для биотехнологии. Большое разнообразие штаммов *C. reinhardtii* поддерживается в различных биоресурсных коллекциях по всему миру. Единственная в России генетическая коллекция сохраняется на кафедре генетики и биотехнологии Санкт-Петербургского государственного университета в Петергофе.

В качестве платформы для биосинтеза рекомбинантных белков с терапевтическими свойствами в настоящее время успешно используют хлоропласт хламидомонады (табл. 1), — например, в нем возможен синтез аллергена пыльцы березы Bet v 1 для терапии аллергии и спайкового белка SARS-CoV-2 для создания вакцины. Методики трансформации пластома *C. reinhardtii* достаточно хорошо разработаны и позволяют получать стабильно высокую экспрессию трансгена [11].

До недавнего времени введение трансгенов в ядерный геном хламидомонады и их экспрессия были сопряжены с определенными трудностями из-за эффективной системы сайленсинга. За последние несколько лет были достигнуты значительные успехи в этой области, в том числе с применением новых методик на основе CRISPR/Cas9 [41, 42].

В этой статье представлен обзор актуальных методик трансгенеза у одноклеточной зеленой водоросли *C. reinhardtii*. Рассмотрены общие принципы дизайна трансгенных конструкций для трансформации ядерного и хлоропластного геномов, используемые селективные маркеры для отбора трансформантов, методики введения трансгена (трансформации) и редактирования генома с помощью системы CRISPR/Cas9.

## ПРИНЦИПЫ ДИЗАЙНА ТРАНСГЕННЫХ КОНСТРУКЦИЙ

Трансгенная конструкция представляет собой кассету ДНК, содержащую все необходимые регуляторные элементы для правильной экспрессии в организме-мишени. Все конструкции обычно содержат промоторную последовательность, ген интереса (трансген), селективный маркер и терминаторную последовательность. В зависимости от необходимости трансгенная конструкция может нести дополнительные элементы, позволяющие обеспечить направленную вставку в геном или ее контролируемое удаление из генома.

Интеграция чужеродного гена возможна как в ядерный, так и в хлоропластный геном *C. reinhardtii*, основные характеристики каждого из них представлены в табл. 2. В обоих случаях для эффективного получения трансформантов требуются адекватный дизайн трансгенной конструкции, в том числе оптимизация нуклеотидных

**Таблица 1.** Белки терапевтического назначения, синтезированные в хлоропласте *C. reinhardtii***Table 1.** Therapeutic proteins synthesized in the chloroplast of *C. reinhardtii*

Назначение	Белок	Ссылка
Разработка вакцин	Белок VP1 вируса ящура (FMD)	[12]
	Белок E2 вируса классической чумы свиней (CSFV)	[13]
	Белок p57 патогена рыб <i>Renibacterium salmoninarum</i>	[14]
	Белок VP28 вируса синдрома белых пятен (WSD) креветок	[15]
	Фибронектин-связывающий домен D2 <i>Staphylococcus aureus</i>	[16]
	Антигены agrV и varA патогена рыб <i>Aeromonas salmonicida</i>	[17]
	Антигены Pfs25, Pfs28, Pfs48/45, CelTOS <i>Plasmodium falciparum</i>	[18–21]
	Белок E 7 вируса папилломы человека 16 (HPV 16)	[22, 23]
	Антиген MPT64 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	[24]
	Гемагглютинин вируса птичьего гриппа (AIV) H5	[25]
	Белок p201 AroB100	[26]
Спайковый белок SARS-CoV-2	[27]	
Терапия заболеваний	Фактор роста эндотелия сосудов	[28]
	Интерлейкин 4	[29]
	TRAIL (TNFSF10)	[30]
	Моноклональные антитела человека	[28, 31–33]
	Глутаматдекарбоксилаза человека (hGAD65)	[34]
	Амфотерин (HMGB1)	[28]
	Иммунотоксины	[35]
	Соматотропин человека	[36]
Терапия аллергий	Эндолизины Cpl-1 и Pal бактериофага <i>Streptococcus pneumoniae</i>	[37]
	Интерлейкин 29	[38]
Терапия аллергий	Аллерген арахиса Ara h 1	[39]
	Аллерген пыльцы березы Bet v 1	[40]

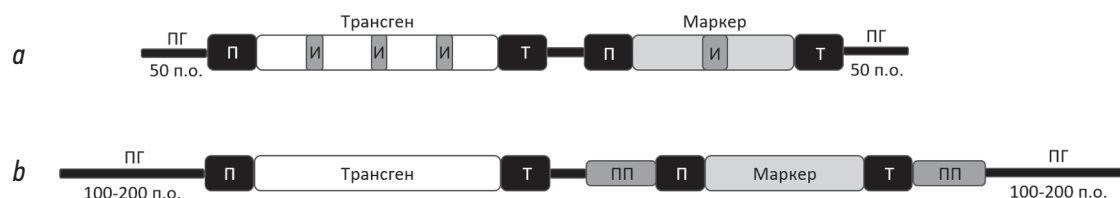
**Таблица 2.** Основные характеристики ядерного и хлоропластного геномов *C. reinhardtii***Table 2.** Main characteristics of the nuclear and chloroplast genomes of *C. reinhardtii*

Характеристика	Геном	
	ядерный	хлоропластный
Размер, пар оснований	~110 × 10 <sup>6</sup>	~205 × 10 <sup>3</sup>
GC-состав, %	~64	~36
Количество генов	~17585	99
Количество хромосом	17	1
Количество копий в одной клетке	1	Один хлоропласт на клетку, ~80 копий генома на хлоропласт
Способ интеграции трансгена	Случайная инсерция, гомологичная рекомбинация (при генетическом редактировании)	Гомологичная рекомбинация

последовательностей по кодонному составу; подбор методов введения трансгена и селекции трансформантов, методы удаления маркерных последовательностей.

Трансгенные конструкции для трансформации ядерного и хлоропластного геномов *C. reinhardtii* значительно различаются между собой (рис. 1).

Трансформация ядерного генома *C. reinhardtii* до недавнего времени была сопряжена с определенными трудностями, связанными с эффективной системой сайленсинга вводимых экзогенов [41]. Кроме того, до появления методики CRISPR/Cas трансгенная конструкция могла быть интегрирована в ядерный геном только путем



**Рис. 1.** Общий план строения трансгенных конструкций для трансформации ядерного и хлоропластного генома *C. reinhardtii*: *a* — конструкция для трансформации ядерного генома; *b* — конструкция для трансформации хлоропластного генома. ПГ — плечи гомологии; П — промотор/5'-нетранслируемая область; И — интрон; Т — терминатор/3'-нетранслируемая область; ПП — прямые повторы. Дополнительные пояснения к рисунку приведены в тексте

**Fig. 2.** Overall structure of transgenic constructs for transformation of the nuclear and chloroplast genome of *C. reinhardtii*: *a* — construct for transformation of the nuclear genome; *b* — construct for transformation of the chloroplast genome. ПГ — homology arms; П — promoter/5'-untranslated region; И — intron; Т — terminator/3'-untranslated region; ПП — direct repeats. Additional explanations are given in the text

случайной инсерции, что делало хлоропласт хламидомонады, где встраивание происходит только по гомологии, более привлекательной платформой. Тем не менее было разработано несколько правил дизайна трансгенов для их успешной экспрессии в ядерной ДНК *C. reinhardtii*. Во-первых, необходимо использование эндогенных промотора (нативного или химерного), терминатора, 5'- и 3'-нетранслируемых областей — наиболее часто используют таковые от генов, кодирующих малую субъединицу рибулозобисфосфаткарбоксилазы (*rbcS2*), белок теплового шока *hsp70A* и субъединицу II реакционного центра фотосистемы I (*psaD*) [43]. Во-вторых, следует учитывать кодонный состав трансгена и трансформируемого генома [44]. В-третьих, регулярное прерывание трансгена интронами [тройкратное повторение интрона 1 *rbcS2* (145 п. о.) в последовательности трансгена и однократное использование интрона 2 *rbcS2* (329 п. о.) в последовательности маркера] способствует высокому уровню экспрессии [45, 46]. Этот эффект достигается за счет процесса, получившего название интрон-опосредованное усиление (Intron-Mediated Enhancement — IME). Предполагаемый механизм заключается во взаимодействии РНК-полимеразы II со сплайсосомой: в случае, если это взаимодействие не происходит, то РНК-полимераза прерывает транскрипцию, а незрелый транскрипт деградирует. Это явление может лежать в основе способности отличать транскрипты по принципу свой-чужой. Гены *C. reinhardtii* чрезвычайно богаты интронами в сравнении с другими организмами: 92 % генов содержат интроны со средним размером 373 п. о., средний размер экзонов при этом составляет 190 п. о. [41].

Направленная вставка трансгена в ядерный геном хламидомонады возможна только путем гомологичной рекомбинации по плечам гомологии (50 п. о.) через репарацию двухцепочечного разрыва, индуцируемого системой CRISPR/Cas [47]. Редактирование генома *C. reinhardtii* методом CRISPR/Cas9 подробно рассмотрено ниже.

Трансформация пластома *C. reinhardtii* до сих пор остается более удобной и выгодной по следующим причинам: 1) сводится к минимуму потенциальная токсичность продукта для клетки; 2) возможна целевая интеграция

трансгена путем гомологичной рекомбинации без использования системы CRISPR/Cas; 3) высокая плоидность пластома и высокий уровень экспрессии генов хлоропластов; 4) отсутствие системы сайленсинга генов. Одним из недостатков этого подхода является отсутствие возможности гликозилирования синтезированных в хлоропласте белков [11].

Трансгенная конструкция для пластидной трансформации состоит из трансгена и селективного маркера, фланкированных двумя плечами гомологии размером 100–200 п. о., гомологичными выбранному сайту встраивания в хлоропластную ДНК хозяина. Для экспрессии трансгена и маркера в хлоропласте *C. reinhardtii* чаще всего используют регуляторные последовательности ядерного гена *rbcS2*, хлоропластных генов *psaD*, *psaA* и *psaB* (апопротеины фотосистемы I), *rbcL* (большая субъединица рибулозобисфосфаткарбоксилазы) и *psbA* (коровый белок D1 фотосистемы II) [11]. При дизайне трансгенной конструкции для трансформации хлоропласта хламидомонады также необходимо учитывать GC-состав трансгена и хлоропластной ДНК.

Маркерный ген может быть удален из трансформированного генома с помощью Cre/loxP рекомбиназной системы [48]. Для пластома доступен вариант с определенным дизайном трансгенной конструкции: маркерный ген должен быть фланкирован с обеих сторон прямыми повторами, что при условии удаления фактора отбора при дальнейшем размножении трансформанта может привести к внутренней гомологичной рекомбинации по повторам с удалением селективного маркера из генома хлоропласта [49].

## СЕЛЕКТИВНЫЕ МАРКЕРЫ

Селекционные маркеры применяются при трансгенезе для создания условий отбора трансформированных клеток. Наиболее широко используемые при трансформации *C. reinhardtii* маркерные последовательности представлены в табл. 3.

Первыми маркерами селекции у *C. reinhardtii* служили ее собственные гены, восстанавливающие метаболические



**Таблица 3.** Наиболее широко используемые при трансформации ядерной и хлоропластной ДНК *C. reinhardtii* селекционные маркеры  
**Table 3.** The most widely used selection markers for the transformation of nuclear and chloroplast DNA of *C. reinhardtii*

Мишень	Ген	Продукт	Селекция	Ссылка
Ядерная ДНК	<i>ARG7</i>	Аргининосукцинатлиаза	Среда без аргинина	[50]
	<i>NIT1</i>	Нитратредуктаза	Среда без нитрата	[51]
	<i>CRY1-1</i>	Мутантный рибосомный белок S14/grp59	Среда с эметином, криптоплеврином	[52]
	<i>aph7''</i>	Аминогликозид-фосфотрансфераза	Среда с гигромицином В	[43]
	<i>aphVIII</i>	Аминогликозид-фосфотрансфераза	Среда с паромомицином, неомицином, канамицином	[53]
	<i>ble</i>	Блеомицин-связывающий белок	Среда с флеомицином	[44, 54]
Ядерная и хлоропластная ДНК	<i>aadA</i>	Аминогликозид-аденилилтрансфераза	Среда со спектиномицином, стрептомицином	[55, 56]
Хлоропластная ДНК	<i>aphA6</i>	Аминогликозид-фосфотрансфераза	Среда с канамицином, амикацином	[57]

пути у штаммов, мутантных по генам *ARG7* и *NIT1*. Трансформированные нормальными копиями этих генов ауксотрофные мутанты отбирают как прототрофы. Такой «безмаркерный» (англ. «marker-free») подход, основанный на компенсации мутации копией гена дикого типа, остается популярным и достаточно широко используется при трансформации ядерной ДНК и пластома у соответствующих мутантов [58, 59].

Ген *ARG7* кодирует фермент аргининосукцинатлиазу и восстанавливает метаболический путь биосинтеза аргинина при успешной трансформации аргининзависимого мутантного штамма *C. reinhardtii*, что позволяет трансформантам расти на минимальной среде без добавления аргинина.

Ген *NIT1* кодирует нитратредуктазу — фермент, позволяющий при успешной трансформации мутантного штамма *C. reinhardtii* использовать нитрат как единственный источник азота в среде.

В 1994 г. был выделен и изучен мутантный штамм *C. reinhardtii*, устойчивый к ингибиторам трансляции эметину и криптоплеврину [52]. Установлено, что эта устойчивость обусловлена миссенс-мутацией (*CRY1-1*) в гене *CRY1*. Последовательность мутантного гена *CRY1-1* под управлением эндогенного промотора *rbcS2* может быть использована для трансформации штаммов дикого типа *C. reinhardtii*.

Применение экзогенов в качестве маркеров устойчивости для селекции позволило упростить отбор трансформантов и снять ограничение на необходимость использования мутантов *C. reinhardtii* как акцепторов трансгенов. В настоящее время наиболее эффективными и широко применяемыми экзогенными маркерами являются различные гены резистентности к антибиотикам.

Ген *aph7''* *Streptomyces hygroscopicus* кодирует фосфотрансферазу, которая деактивирует антибиотик гигромицин В. Для трансформации хламидомонады используется химерная конструкция, включающая помимо последовательности гена *aph7''* *S. hygroscopicus* промотор

гена  $\beta 2$ -тубулина и первый интрон с 3'-нетранслируемой областью *rbcS2* *C. reinhardtii* [43].

Ген *aphVIII* *Streptomyces rimosus* кодирует фосфотрансферазу, которая деактивирует антибиотики паромомицин, неомицин и канамицин. Наиболее высокая эффективность трансформации была продемонстрирована при использовании химерной конструкции следующего состава: последовательности 5'-нетранслируемой области гена белка теплового шока *hsp70A* *C. reinhardtii*, первого интрона гена *rbcS2* *C. reinhardtii*, гена *aphVIII* *S. rimosus*, 3'-нетранслируемой области гена *rbcS2* *C. reinhardtii* [53].

Ген *ble* *Streptoalloteichus hindustanus* кодирует фермент, связывающий антибиотик флеомицин. Химерная конструкция с этим геном, включающая последовательности первого интрона и 5'- и 3'-нетранслируемых областей гена *rbcS2* *C. reinhardtii*, показала стабильно высокую эффективность трансформации и экспрессии [44, 54].

Ген *aadA* *Escherichia coli* кодирует фермент, придающий устойчивость к антибиотикам спектиномицину и стрептомицину. Для трансформации пластома *C. reinhardtii* используют конструкцию с последовательностями промотора хлоропластного гена *atpA* и 3'-нетранслируемой области *rbcL* *C. reinhardtii* [55]. Для трансформации ядерной ДНК ген *aadA* *E. coli* объединяют с 5'- и 3'-нетранслируемыми областями гена *rbcS2* *C. reinhardtii* [56].

Ген *aphA6* *Acinetobacter baumannii* кодирует фосфотрансферазу, которая деактивирует антибиотики канамицин и амикацин. Наибольшая экспрессия в хлоропласте хламидомонады при сохранении компактности наблюдалась при использовании химерной конструкции с последовательностью 5'-нетранслируемой области гена *psbA* *C. reinhardtii*, гена *aphA6* *A. baumannii* и 3'-нетранслируемой области *rbcL* *C. reinhardtii* [57].

В качестве маркерного гена также могут быть использованы флуоресцентные белки, такие как mCherry [60], mVenus [45] и др. Скрининг таких трансформантов проводят с помощью конфокального микроскопа.

## МОДУЛЬНАЯ СИСТЕМА КЛОНИРОВАНИЯ *CHLAMYDOMONAS*

Быстрая и предсказуемая модификация генома *C. reinhardtii* может быть обеспечена использованием стандартизированных инструментов и методик. С этой целью был разработан набор инструментов для модульного клонирования на основе технологии Golden Gate — *Chlamydomonas Modular Cloning kit* [61]. Система использует рестриктазы BsaI и BpiI и состоит из трех наборов векторов для клонирования (уровни 0, 1 и 2). Векторы уровня 0 содержат отдельные элементы: промоторы, 5'- и 3'-нетранслируемые области, кодирующие последовательности, терминаторы, селекционные маркеры и интроны. Эти модули затем направлены собираются в одну полную транскрипционную единицу внутри вектора уровня 1 в ходе реакции рестрикции/лигирования. На втором этапе несколько транскрипционных единиц из векторов уровня 1 могут быть объединены в составе вектора уровня 2, что позволяет создавать мультигенные кластеры, кодирующие ферменты новых метаболических путей [42].

Готовый стандартизированный набор инструментов позволяет быстро (за 4–5 нед.) создавать модифицированные клетки как для фундаментальных исследований, так и для биотехнологии.

## МЕТОДЫ ТРАНСФОРМАЦИИ *C. REINHARDTII*

Трансформация представляет собой процесс интеграции функционального фрагмента ДНК — трансгенной конструкции — в клетки-мишени. В настоящее время широко используются три метода доставки трансгенов в клетки хламидомонады: стеклянные шарики, электропорация и биобаллистика [10].

Стеклянные шарики являются наиболее доступным, простым и эффективным методом трансформации ядерного [62] и плазмидного [63] генома. Трансген, клетки *C. reinhardtii*, лишенные клеточной стенки (с использованием автолизина или безоболочечный штамм), и стеклянные шарики перемешиваются на вортексе. Стеклянные шарики при встряхивании разрывают мембрану, позволяя осуществлять перенос экзогенной ДНК во внутреннюю среду клетки. С их помощью также возможно доставлять в клетки рибонуклеопротеиновые (РНП) комплексы, формируемые нуклеазой Cas и гидовой РНК (gRNA).

Впервые продемонстрированный на хламидомонаде в 1991 г. [64] метод электропорации заключается в обработке клеток импульсами высокого напряжения на электропораторе: в мембране формируются поры диаметром 20–40 нм, через которые чужеродная ДНК попадает в клетку. Метод позволяет добиться большого выхода трансформантов, но требует тонкой настройки

и подбора условий, зависящих от используемого прибора и конкретного штамма *C. reinhardtii* [65]. Электропорацию осуществляют генерацией импульсов двух типов — экспоненциального и квадратного. Более контролируемым и приводящим к генерации большего числа трансформантов типом волн являются квадратные [66]. Кроме того, при генерации импульсов квадратного типа штаммы *C. reinhardtii* с клеточной стенкой (англ. cw — cell-walled) можно электропорировать без ее удаления автолизинном [67], в то время как экспоненциальные импульсы пригодны только для трансформации клеток, лишенных клеточной стенки [65]. Проведенные эксперименты по электропорации cw-клеток *C. reinhardtii* экспоненциальными волнами на электропораторе «ВТХ ЕСМ 600» без обработки автолизинном привели к получению 3 % частоты трансформации, а с обработкой автолизинном — к 87 %, подтвердив и дополнив ранее полученные данные [47]. При оптимизации таких параметров, как концентрация трансгена, тип волн и напряжение, частота трансформации методом электропорации может быть выше, чем при использовании метода стеклянных шариков [68]. Общую эффективность трансформации значительно увеличивает использование новейших моделей электропораторов, например NEPA21. Этот прибор последовательно генерирует три типа квадратных импульсов: «poring pulse» — с высоким напряжением и короткой длиной импульса, создающий поры в мембране клетки; серия «transfer pulse» — с низким напряжением и продолжительной длиной импульса; «transfer pulse» — с измененной полярностью для эффективной доставки молекул ДНК в клетки [67]. Электропорация — стандартный метод трансформации *C. reinhardtii*, особенно при доставке в клетки РНП-комплексов Cas/gRNA.

Метод биобаллистики заключается в бомбардировке клеток-реципиентов частицами тяжелых металлов (главным образом золота или серебра), покрытыми трансгенной ДНК, в вакуумной камере. Этим методом возможна трансформация ДНК как клеточного ядра, так и органоидов — митохондрий и пластид. В настоящее время эта методика используется главным образом для трансформации хлоропластов хламидомонады.

Были разработаны и протестированы и другие методы трансформации хламидомонады, но они не получили широкого распространения, к таковым относится агробактериальная трансформация [10]. Этот подход гораздо более сложен и при этом не имеет существенных преимуществ перед электропорацией [69].

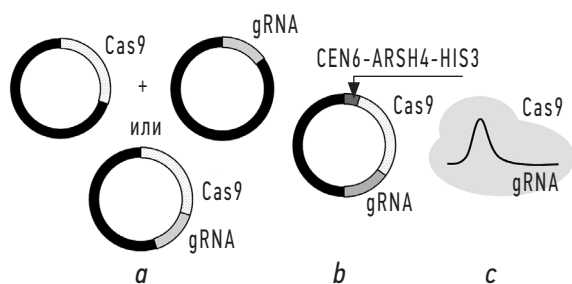
Недавно была разработана новая система доставки в клетки *C. reinhardtii* РНП-комплексов Cas9/gRNA с помощью проникающего в клетку пептида (англ. cell-penetrating peptide — CPP) pVEC (аминокислотная последовательность: LLILRRRIRKQAHANHSK). Она может использоваться в качестве альтернативного электропорации метода трансформации по параметрам доступности и эффективности [70].

## РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА *C. REINHARDTII* МЕТОДОМ CRISPR/CAS9

CRISPR/Cas9 — система из белка Cas9, обладающего нуклеазной активностью, и некодирующей гидовой РНК, комплементарно взаимодействующей с ДНК в целевом сайте. Общая схема функционирования системы редактирования генома CRISPR/Cas9 следующая: собранный комплекс Cas9/gRNA при обнаружении в молекуле ДНК комплементарной спейсеру gRNA последовательности (протоспейсера) и прилегающего к нему специфического мотива (PAM) связывается с ней по принципу комплементарного взаимодействия gRNA-ДНК, а эндонуклеаза Cas9 вносит двухцепочечный разрыв на 3–4 нуклеотида выше по течению от PAM. В образовавшийся *in vivo* разрыв может быть направленно встроена трансгенная конструкция, несущая плечи гомологии к сайту рестрикции (гомологичная рекомбинация) [71].

Новейшие методы трансформации хламидомонады основаны на использовании технологии CRISPR/Cas9. Компоненты системы могут быть доставлены следующими способами: 1) введение в клетку плазмидных векторов, несущих последовательности, кодирующие белок Cas9 и gRNA; 2) введение в клетку собранного *in vitro* РНП-комплекса Cas9/gRNA (рис. 2). Использование РНП-комплекса имеет существенные преимущества, так как позволяет избежать случайного инсерционного мутагенеза при использовании плазмидного вектора, уменьшает вероятность нецелевого редактирования и, как следствие, демонстрирует более высокую эффективность.

В интегративной стратегии используется одна или две плазмиды, кодирующая/ие гены Cas9 и gRNA. После внедрения в клетку плазида линейризуется клеточными рестриктазами и интегрируется в случайное место в геноме *C. reinhardtii*. При экспрессии внесенных в геном трансгенов собирается комплекс Cas9/gRNA, который производит двухцепочечный разрыв в целевом сайте [72]. Первая попытка продуцировать эндонуклеазу Cas9 и gRNA



**Рис. 2.** Стратегии доставки компонентов системы CRISPR/Cas9 в клетки *C. reinhardtii*: *a* — интегративная система; *b* — эпизомная система; *c* — рибонуклеопротеиновая система. Дополнительные пояснения к рисунку приведены в тексте

**Fig. 2.** Strategies for delivering components of the CRISPR/Cas9 system into *C. reinhardtii* cells: *a* — integrative system; *b* — episomal system; *c* — ribonucleoprotein system. Additional explanations are given in the text

с одной и той же плазмиды в клетках *C. reinhardtii* привела к получению единственной колонии трансформанта по гену *FKB12* из взятых  $>10^9$  клеток [73]. При совместной трансформации клеток двумя независимыми плазмидами удалось получить нокаутные линии по гену *APT* с эффективностью 3–30 % [74].

Также был разработан метод, позволяющий избежать интеграции последовательностей генов Cas9 и gRNA в геном. Показано, что плазмиды, содержащие дрожжевую центромерную последовательность, участок инициации репликации и дрожжевой селективный маркер (CEN6-ARSH4-HIS3) автономно реплицируются в клетках и не встраиваются в геном диатомей *Thalassiosira pseudonana* Cleve и *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin [75, 76]. В 2019 г. эксперименты с этой методикой были продолжены и получены стабильные трансформанты зеленых микроводорослей *Acutodesmus obliquus* (Turpin) Hegewald & Hanagata и *Neochloris oleoabundans* S. Chantanachat & H. C. Bold, однако со временем эпизомная плазида все же встроилась в ядерный геном [77]. В другом исследовании [78] с использованием эпизомного вектора был успешно нокаутирован ген нитратредуктазы у микроводоросли *Nannochloropsis oceanica* Suda & Miyashita. Эпизомная плазида элиминировалась из клеток трансформантов примерно через 30 циклов клеточных делений, что позволило получить нетрансгенную линию. Использование эпизомного кольцевого вектора еще не апробировалось для трансформации *C. reinhardtii*. Тем не менее разработка такой плазмиды проста, а возможность конструирования нетрансгенных линий без маркеров делает этот метод сопоставимым по своей применимости с РНП-системой [72].

Поскольку у *C. reinhardtii* экспрессия чужеродных генов часто неэффективна, особенно если они кодируют крупные белки, такие как Cas9 [60, 73], чаще всего применяется метод предварительной сборки *in vitro* РНП-комплекса Cas9/gRNA, который непосредственно используют для трансформации. РНП-комплекс быстро разрушается в клетке, что ограничивает активность эндонуклеазы, сводя к минимуму риски нецелевых эффектов по сравнению с конститутивной экспрессией Cas9 [79].

Методика CRISPR/Cas9 может быть использована для целевого выключения (нокаута) и вставки (нокина) генов у хламидомонады. Компоненты системы доставляются в клетку совместно с донорной ДНК — чаще всего одним из селекционных маркеров, который может встроиться в место двухцепочечного разрыва. Для повышения степени контролируемости производимой манипуляции с геномом и предопределенности результата требуется задействование механизмов гомологичной рекомбинации — добавление в последовательность донорной ДНК плеч гомологии, фланкирующих сайт рестрикции нуклеазы Cas9. Это позволило повысить выход трансформантов до 85 % [47, 60].

В 2017 г. был существенно доработан общий протокол трансформации *C. reinhardtii*. Согласно наблюдениям,



тепловая обработка клеток перед трансформацией является критически важным параметром для получения наибольшего числа трансформантов. Предполагается, что в клетках происходят некие физиологические изменения, благоприятные для активности комплекса Cas9/gRNA и/или для процессов, связанных с репарацией ДНК. Были определены также оптимальные параметры для пост-трансформационного восстановления клеток [60].

В 2020 г. был разработан высокоэффективный метод целевого инсерционного мутагенеза, названный TIM (англ. Targeted insertional mutagenesis). Авторы провели серию парных экспериментов и выявили параметры, имеющие решающее значение для высокой эффективности трансгенеза хламидомонады на основе РНП-стратегии CRISPR/Cas. Оптимизация протокола трансформации ядерного генома позволила в отдельных экспериментах достичь эффективности мутагенеза от 40 до 95 %, даже при мультиплексном редактировании [47].

В 2023 г. был разработан протокол для рутинного создания мутантных линий хламидомонады без остаточных маркеров селекции [80]. В этом же году с использованием

РНП-комплекса CRISPR/Cas впервые были получены стабильные в течение 100 дней культивирования трансформанты, экспрессирующие оптимизированный трансген бактериальной фитазы, встроенный во второй экзон ядерного гена *NIT1*. Примечательно, что клетки, трансформированные традиционными способами (без использования РНП-комплекса или метода CRISPR/Cas), потеряли ген фитазы через два поколения (около 20 дней культивирования) [81].

За время активных исследований было предпринято множество попыток оптимизации условий трансформации хламидомонады и повышения эффективности редактирования генов. Оценивались условия выращивания и методы подготовки клеток, необходимая плотность отбираемой для трансформации культуры, концентрация РНП-комплекса Cas9/gRNA, методика удаления клеточной стенки, подбор и оптимизация методов трансформации под разные штаммы хламидомонады и оборудование, а также методики восстановления и отбора трансформантов. В настоящее время используют общий протокол трансформации ядерного генома микроводоросли *C. reinhardtii* РНП-комплексом CRISPR/Cas по следующей схеме:

#### 1. Выращивание и подготовка клеток

Клетки выращивают на твердой среде TAP (1,5 % агар, аргинин, дрожжевой автолизат) при температуре 20–25 °С в цикле свет (200–300  $\mu\text{E}/\text{m}^2 \times \text{c}$ ) — 14 ч, темнота — 10 ч с пересевом каждые три дня.

Клетки собирают на третий день после посева (в фазе экспоненциального роста) и ресуспендируют в стерильной воде, далее осаждают центрифугированием (5000 об/мин, 5 мин).

Клетки штаммов с клеточной стенкой ресуспендируют в автолизине до достижения плотности  $1 \times 10^8$  кл/мл и инкубируют при комнатной температуре в течение 30 мин

Клетки штаммов без клеточной стенки ресуспендируют в жидкой среде TAP + 40 мМ сахарозы до достижения плотности  $1 \times 10^8$  кл/мл

#### 2. Тепловая обработка

Клетки инкубируют при температуре 40 °С с перемешиванием (150 об/мин) в течение 30 мин.

Клетки осаждают центрифугированием (5000 об/мин, 5 мин), промывают в жидкой среде TAP + 40 мМ сахарозы, осаждают центрифугированием (5000 об/мин, 5 мин) и затем ресуспендируют в жидкой среде TAP + 40 мМ сахарозы до достижения плотности  $1 \times 10^8$  кл/мл

#### 3. Трансформация

##### Стеклянные шарики

В пробирку со стерильными стеклянными шариками диаметром 0,45 мм (500–600 мкг) добавляют 300 мкл ресуспендированных клеток ( $3 \times 10^7$  кл/мл), 5 мкл РНП-комплекса Cas9/gRNA (3 мкМ Cas9:gRNA) и 1 мкг трансгенной конструкции.

Условия встряхивания на вортексе: максимальная скорость, первый раунд 15 с, перерыв 10 с, второй раунд 10 с.

Каждую реакционную смесь ресуспендируют в 600 мкл свежей жидкой среды TAP + аргинин в отдельной пробирке

##### Электропорация

(электропоратор «BioRad GenePulser Xcell»)

К 40 мкл ресуспендированных клеток ( $4 \times 10^6$  кл/мл) добавляют 4 мкл РНП-комплекса Cas9/gRNA (3 мкМ Cas9:gRNA) и 1 мкг трансгенной конструкции.

Условия электропорации: кювета 2 мм, квадратные волны, 300 V, 6 импульсов, длина импульса 4 мс, интервал между импульсами 100 мс.

Кювету со смесью коротко охлаждают во льду до и после электропорации.

#### 4. Восстановление и отбор

Клетки восстанавливаются при температуре 20–25 °С и тусклом свете в течение 24 ч.

Культуральную смесь встряхивают на вортексе и переносят на чашки Петри с твердой селективной средой TAP (1,5 % агар, 10 мкг/мл антибиотика).

Клетки выращивают при температуре 20–25 °С в цикле свет (200–300  $\mu\text{E}/\text{m}^2 \times \text{c}$ ) — 14 ч, темнота — 10 ч до формирования колоний трансформантов (1–2 нед.)

Разработка передовых методов редактирования генов сыграло важную роль в становлении *C. reinhardtii* как модельного организма для изучения микроводорослей. Достижения последних лет, среди которых установление правил дизайна трансгенов, создание модульной системы клонирования (*Chlamydomonas Modular Cloning kit*) и адаптация системы CRISPR/Cas9 для направленного редактирования генома, существенно повысили эффективность экспрессии внедряемых в клетки хламидомонады трансгенов и общий потенциал генной инженерии микроводорослей. Это открывает перспективы создания новых штаммов-продуцентов биологически активных веществ, ценных как для фундаментальных исследований, так и для практического использования, и позволит пополнить ресурсы единственной в России Петергофской генетической коллекции штаммов *C. reinhardtii*.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одноклеточная зеленая водоросль *C. reinhardtii* — популярный модельный организм в молекулярной биологии и генетике. Степень изученности генетических систем хламидомонады является стандартом для других микроводорослей. Доступность, простота культивирования и возможность манипулирования всеми тремя геномами (ядерным, хлоропластным и митохондриальным) позволили исследователям внести значительный вклад в изучение и разработку новых подходов генетической инженерии ДНК у микроводорослей.

Система редактирования генома CRISPR/Cas9 открыла новую страницу в генной инженерии *C. reinhardtii* — стала возможна направленная вставка трансгена в ядерный геном. За последние годы было накоплено достаточно сведений о параметрах, которые оказывают влияние на этот процесс, достигнуты значительные успехи в разработке высокоэффективных протоколов трансформации клеток и наработке ценных ферментов и белков. Представленный в 2018 г. *Chlamydomonas Modular Cloning kit* призван унифицировать процесс дизайна трансгенных конструкций. Стандартизированные генетические элементы могут быть легко заменены и собраны в полноценные единицы экспрессии, которые далее позволяют создавать мультигенные конструкции более высокого порядка. Это открывает возможность внедрения в клетки новых метаболических путей [42, 61].

Микроводоросли в целом — интересный объект для внедрения и адаптации новых подходов к манипулированию геномами. Они содержат широкий спектр полезных веществ: антиоксиданты, липиды, белки, углеводы и вторичные метаболиты. Например, зеленая водоросль *C. vulgaris* (хлорелла) может быть использована как продуцент 18 аминокислот, 20 витаминов и множества минералов [82]. Микроводоросли являются исключительно богатым источником фармакологически активных метаболитов, обладающих противоопухолевыми, антибактериальными,

противогрибковыми и противовирусными свойствами, а также пригодными организмами для очистки сточных вод и производства биотоплива.

В настоящее время для биосинтеза ценных соединений как правило используют гетеротрофные платформы: бактерии, дрожжи, культуры клеток. Тем не менее развитие биоэкономики и потребность в устойчивых альтернативах продуктам нефтехимии стимулируют интерес к поиску и использованию новых организмов-продуцентов, в том числе фотосинтезирующих микроводорослей. Достижения в области биосинтеза рекомбинантных белков в хлоропластах *C. reinhardtii*, а также постоянно совершенствующиеся техники трансформации подчеркнули потенциал этой водоросли как основы для коммерческого использования [36]. Существует ряд специфических свойств, которые делают микроводоросли идеальными кандидатами для производства различных пищевых добавок, коммерческих ферментов, а также белков терапевтического назначения: 1) культивирование микроводорослей доступно, наращивание биомассы занимает немного времени, легко контролируется и масштабируется; 2) трансгенные микроводоросли можно получить быстро, за 4–5 нед.; 3) возможность трансформации пластома и ядерного генома позволяет производить несколько трансгенных белков (или целый белковый комплекс) в одном организме. Несмотря на то что бактериальные и дрожжевые системы более экономичны, они имеют ряд недостатков. Их использование не всегда позволяет получать функциональные белки из-за возможных проблем в процессах посттрансляционных модификаций и фолдинга белков. Использование другой альтернативной платформы — наземных растений — позволяет обеспечить огромную экономию за счет потенциального масштаба культивирования, однако долгое получение трансгенных линий (4–6 лет), возможность потока генов через пыльцу в окружающую среду и запрет на открытое выращивание трансгенных растений делают эту платформу менее экономически выгодной [4, 31, 83].

Есть все основания полагать, что микроводоросли в перспективе могут стать альтернативной платформой для наработки хозяйственно ценных соединений в промышленной и медицинской биотехнологии. Как наиболее изученная в генетическом отношении одноклеточная водоросль хламидомонада имеет потенциал стать главной платформой развития биотехнологии микроводорослей [84].

## ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

**Вклад авторов.** Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией. Личный вклад каждого автора: П.А. Виролайнен — поиск и анализ литературы, написание текста; Е.М. Чекунова — концепция, внесение окончательной правки.

**Источник финансирования.** Работа выполнена при поддержке гранта СПбГУ (ID Pure 115624290).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

## ADDITIONAL INFORMATION

**Authors' contribution.** All authors have made a significant contribution to the development of the concept and preparation

of the article, as well as read and approved the final version before its publication. Personal contribution of the authors: P.A. Virolainen — search and analysis of literature, writing the main part of the text; E.M. Chekunova — development of the concept, making final edits.

**Funding source.** The authors acknowledge Saint Petersburg State University for a research grant (project ID Pure 115624290).

**Competing interests.** The authors declare that they have no competing interests.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Blaby-Haas C.E., Merchant S.S. Comparative and functional algal genomics // *Annu Rev Plant Biol.* 2019. Vol. 70. P. 605–638. doi: 10.1146/annurev-arplant-050718-095841
2. Field C.B., Behrenfeld M.J., Randerson J.T., Falkowski P. Primary production of the biosphere: Integrating terrestrial and oceanic components // *Science.* 1998. Vol. 281, N. 5374. P. 237–240. doi: 10.1126/science.281.5374.237
3. Lu Y., Zhang X., Gu X., et al. Engineering microalgae: transition from empirical design to programmable cells // *Crit Rev Biotechnol.* 2021. Vol. 41, N. 8. P. 1233–1256. doi: 10.1080/07388551.2021.1917507
4. Siddiqui A., Wei Z., Boehm M., Ahmad N. Engineering microalgae through chloroplast transformation to produce high-value industrial products // *Biotechnol Appl Biochem.* 2019. Vol. 67, N. 1. P. 30–40. doi: 10.1002/bab.1823
5. www.fda.gov. [Электронный ресурс]. US FDA [дата обращения: 01.11.2023]. Режим доступа: <https://www.fda.gov/>
6. Jeon S., Lim J.-M., Lee H.-G., et al. Current status and perspectives of genome editing technology for microalgae // *Biotechnol Biofuels.* 2017. Vol. 10. ID 267. doi: 10.1186/s13068-017-0957-z
7. Patel V.K., Das A., Kumari R., Kajla S. Recent progress and challenges in CRISPR-Cas9 engineered algae and cyanobacteria // *Algal Res.* 2023. Vol. 71. ID 103068. doi: 10.1016/j.algal.2023.103068
8. Merchant S.S., Prochnik S.E., Vallon O., et al. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions // *Science.* 2007. Vol. 318, N. 5848. P. 245–250. doi: 10.1126/science.1143609
9. Gallaher S.D., Fitz-Gibbon S.T., Strenkert D., et al. High-throughput sequencing of the chloroplast and mitochondrion of *Chlamydomonas reinhardtii* to generate improved *de novo* assemblies, analyze expression patterns and transcript speciation, and evaluate diversity among laboratory strains and wild isolates // *Plant J.* 2018. Vol. 93, N. 3. P. 545–565. doi: 10.1111/tbj.13788
10. Weeks D.P. Genetic transformation of *Chlamydomonas* nuclear, chloroplast, and mitochondrial genomes. В кн.: Goodenough U., editor. *The Chlamydomonas sourcebook.* Academic Press, 2023. P. 325–343. doi: 10.1016/B978-0-12-822457-1.00018-2
11. Esland L., Larrea-Alvarez M., Purton S. Selectable markers and reporter genes for engineering the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii* // *Biology (Basel).* 2018. Vol. 7, N. 4. ID 46. doi: 10.3390/biology7040046
12. Sun M., Qian K., Su N., et al. Foot-and-mouth disease virus VP1 protein fused with cholera toxin B subunit expressed in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast // *Biotechnol Lett.* 2003. Vol. 25, N. 13. P. 1087–1092. doi: 10.1023/a:1024140114505
13. He D.-M., Qian K.-X., Shen G.-F., et al. Recombination and expression of classical swine fever virus (CSFV) structural protein E2 gene in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts // *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2007. Vol. 55, N. 1. P. 26–30. doi: 10.1016/j.colsurfb.2006.10.042
14. Siripornadulsil S., Dabrowski K., Sayre R. Microalgal vaccines. В кн.: León R., Galván A., Fernández E., editors. *Transgenic microalgae as green cell factories.* Advances in experimental medicine and biology. New York: Springer, 2007. Vol. 616. P. 122–128. doi: 10.1007/978-0-387-75532-8\_11
15. Surzycki R., Greenham K., Kitayama K., et al. Factors effecting expression of vaccines in microalgae // *Biologicals.* 2009. Vol. 37, N. 3. P. 133–138. doi: 10.1016/j.biologicals.2009.02.005
16. Dreesen I.A.J., Charpin-El Hamri G., Fussenegger M. Heat-stable oral alga-based vaccine protects mice from *Staphylococcus aureus* infection // *J Biotechnol.* 2010. Vol. 145, N. 3. P. 273–280. doi: 10.1016/j.jbiotec.2009.12.006
17. Michelet L., Lefebvre-Legendre L., Burr S.E., et al. Enhanced chloroplast transgene expression in a nuclear mutant of *Chlamydomonas* // *Plant Biotechnol J.* 2011. Vol. 9, N. 5. P. 565–574. doi: 10.1111/j.1467-7652.2010.00564.x
18. Gregory J.A., Li F., Tomosada L.M., et al. Algae-produced Pfs25 elicits antibodies that inhibit malaria transmission // *PLoS One.* 2012. Vol. 7, N. 5. ID 37179. doi: 10.1371/journal.pone.0037179
19. Gregory J.A., Topol A.B., Doerner D.Z., Mayfield S. Alga-produced cholera toxin-Pfs25 fusion proteins as oral vaccines // *Appl Environ Microbiol.* 2013. Vol. 79, N. 13. P. 3917–3925. doi: 10.1128/AEM.00714-13
20. Jones C.S., Luong T., Hannon M., et al. Heterologous expression of the C-terminal antigenic domain of the malaria vaccine candidate Pfs48/45 in the green algae *Chlamydomonas reinhardtii* // *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013. Vol. 97, N. 5. P. 1987–1995. doi: 10.1007/s00253-012-4071-7
21. Shamriz S., Ofoghi H. Expression of recombinant PfCelTOS antigen in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii* and its potential use in detection of malaria // *Mol Biotechnol.* 2019. Vol. 61, N. 2. P. 102–110. doi: 10.1007/s12033-018-0140-1
22. Demurtas O.C., Massa S., Ferrante P., et al. A *Chlamydomonas*-derived human papillomavirus 16 E7 vaccine induces specific tumor protection // *PLoS One.* 2013. Vol. 8, N. 4. ID 61473. doi: 10.1371/journal.pone.0061473
23. Vlasák J., Boříza J., Ryba Š., Ludvíková V. Alga-based HPV16 E7 vaccine elicits specific immune response in mice // *Asian J Plant Sci Res.* 2013. Vol. 3. P. 141–148.

24. Bertalan I., Munder M.C., Weiß C., et al. A rapid, modular and marker-free chloroplast expression system for the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* // J Biotechnol. 2015. Vol. 195. P. 60–66. doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.12.017
25. Castellanos-Huerta I., Bañuelos-Hernandez B., Tellez G., et al. Recombinant hemagglutinin of avian influenza virus H5 expressed in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii* and evaluation of its immunogenicity in chickens // Avian Dis. 2016. Vol. 60, N. 4. P. 784–791. doi: 10.1637/11427-042816-Reg
26. Beltran-López J.I., Romero-Maldonado A., Monreal-Escalante E., et al. *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts express an orally immunogenic protein targeting the p210 epitope implicated in atherosclerosis immunotherapies // Plant Cell Rep. 2016. Vol. 35, N. 5. P. 1133–1141. doi: 10.1007/s00299-016-1946-6
27. Berndt A.J., Smalley T.N., Ren B., et al. Recombinant production of a functional SARS-CoV-2 spike receptor binding domain in the green algae *Chlamydomonas reinhardtii* // PLoS One. 2021. Vol. 16, N. 11. ID 257089. doi: 10.1371/journal.pone.0257089
28. Rasala B.A., Muto M., Lee P.A., et al. Production of therapeutic proteins in algae, analysis of expression of seven human proteins in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii* // Plant Biotechnol J. 2010. Vol. 8, N. 6. P. 719–733. doi: 10.1111/j.1467-7652.2010.00503.x
29. Zhao Y., Shi X., Zhang Z. High-frequency electroporation and expression of human interleukin 4 gene in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast // Journal of Huazhong Agricultural University. 2006. Vol. 25, N. 2. P. 110–116.
30. Yang Z., Li Y., Chen F., et al. Expression of human soluble TRAIL in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast // Chin Sci Bull. 2006. Vol. 51. P. 1703–1709. doi: 10.1007/s11434-006-2041-0
31. Mayfield S.P., Franklin S.E., Lerner R.A. Expression and assembly of a fully active antibody in algae // PNAS USA. 2003. Vol. 100, N. 2. P. 438–442. doi: 10.1073/pnas.0237108100
32. Tran M., Zhou B., Pettersson P.L., et al. Synthesis and assembly of a full-length human monoclonal antibody in algal chloroplasts // Biotechnol Bioeng. 2009. Vol. 104, N. 4. P. 663–673. doi: 10.1002/bit.22446
33. Barrera D.J., Rosenberg J.N., Chiu J.G., et al. Algal chloroplast produced camelid VH H antitoxins are capable of neutralizing botulinum neurotoxin // Plant Biotechnol J. 2015. Vol. 13, N. 1. P. 117–124. doi: 10.1111/pbi.12244
34. Wang X., Brandsma M., Tremblay R., et al. A novel expression platform for the production of diabetes-associated autoantigen human glutamic acid decarboxylase (hGAD65) // BMC Biotechnol. 2008. Vol. 8. ID 87. doi: 10.1186/1472-6750-8-87
35. Tran M., Van C., Barrera D.J., et al. Production of unique immunotoxin cancer therapeutics in algal chloroplasts // PNAS USA. 2013. Vol. 110, N. 1. P. 15–22. doi: 10.1073/pnas.1214638110
36. Wannathong T., Waterhouse J.C., Young R.E.B., et al. New tools for chloroplast genetic engineering allow the synthesis of human growth hormone in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* // Appl Microbiol Biotechnol. 2016. Vol. 100, N. 12. P. 5467–5477. doi: 10.1007/s00253-016-7354-6
37. Stoffels L., Taunt H.N., Charalambous B., Purton S. Synthesis of bacteriophage lytic proteins against *Streptococcus pneumoniae* in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii* // Plant Biotechnol J. 2017. Vol. 15, N. 9. P. 1130–1140. doi: 10.1111/pbi.12703
38. Akram M., Khan M.A., Ahmed N., et al. Cloning and expression of an anti-cancerous cytokine: human IL-29 gene in *Chlamydomonas reinhardtii* // AMB Expr. 2023. Vol. 13, N. 1. ID 23. doi: 10.1186/s13568-023-01530-1
39. Gregory J.A., Shepley-McTaggart A., Umpierrez M., et al. Immunotherapy using algal-produced Ara h 1 core domain suppresses peanut allergy in mice // Plant Biotechnol J. 2016. Vol. 14, N. 7. P. 1541–1550. doi: 10.1111/pbi.12515
40. Hirschl S., Ralser C., Asam C., et al. Expression and characterization of functional recombinant Bet v 1.0101 in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii* // Int Arch Allergy Immunol. 2017. Vol. 173, N. 1. P. 44–50. doi: 10.1159/000471852
41. Schroda M. Good news for nuclear transgene expression in *Chlamydomonas* // Cells. 2019. Vol. 8, N. 12. ID 1534. doi: 10.3390/cells8121534
42. Schroda M., Remale C. Molecular advancements establishing *Chlamydomonas* as a host for biotechnological exploitation // Front Plant Sci. 2022. Vol. 13. ID 911483. doi: 10.3389/fpls.2022.911483
43. Berthold P., Schmitt R., Mages W. An engineered *Streptomyces hygrosopicus aph7* gene mediates dominant resistance against hygromycin B in *Chlamydomonas reinhardtii* // Protist. 2002. Vol. 153, N. 4. P. 401–412. doi: 10.1078/14344610260450136
44. Lumbrellas V., Stevens D.R., Purton S. Efficient foreign gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* mediated by an endogenous intron: foreign gene expression in *Chlamydomonas* // Plant J. 1998. Vol. 14, N. 4. P. 441–447. doi: 10.1046/j.1365-3113.1998.00145.x
45. Baier T., Wichmann J., Kruse O., Lauersen K.J. Intron-containing algal transgenes mediate efficient recombinant gene expression in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* // Nucleic Acids Res. 2018. Vol. 46, N. 13. P. 6909–6919. doi: 10.1093/nar/gky532
46. Baier T., Jacobebbinghaus N., Einhaus A., et al. Introns mediate post-transcriptional enhancement of nuclear gene expression in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* // PLoS Genet. 2020. Vol. 16, N. 7. ID 1008944. doi: 10.1371/journal.pgen.1008944
47. Picariello T., Hou Y., Kubo T., et al. TIM, a targeted insertional mutagenesis method utilizing CRISPR/Cas9 in *Chlamydomonas reinhardtii* // PLoS One. 2020. Vol. 15, N. 5. ID 232594. doi: 10.1371/journal.pone.0232594
48. Kasai Y., Harayama S. Construction of marker-free transgenic strains of *Chlamydomonas reinhardtii* using a Cre/loxP-mediated recombinase system // PLoS One. 2016. Vol. 11, N. 8. ID 161733. doi: 10.1371/journal.pone.0161733
49. Fischer N., Stampacchia O., Redding K., Rochaix J.-D. Selectable marker recycling in the chloroplast // Mol Gen Genet. 1996. Vol. 251, N. 3. P. 373–380. doi: 10.1007/BF02172529
50. Purton S., Rochaix J.-D. Characterization of the *ARG7* gene of *Chlamydomonas reinhardtii* and its application to nuclear transformation // Eur J Phycol. 1995. Vol. 30, N. 2. P. 141–148. doi: 10.1080/09670269500650901
51. Kindle K.L., Schnell R.A., Fernández E., Lefebvre P.A. Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas* using the *Chlamydomonas* gene for nitrate reductase // J Cell Biol. 1989. Vol. 109, N. 6. P. 2589–2601. doi: 10.1083/jcb.109.6.2589
52. Nelson J.A.E., Savereide P.B., Lefebvre P.A. The *CRY1* gene in *Chlamydomonas reinhardtii*: structure and use as a dominant selectable marker for nuclear transformation // Mol Cell Biol. 1994. Vol. 14, N. 6. P. 4011–4019. doi: 10.1128/mcb.14.6.4011-4019.1994
53. Sizova I., Fuhrmann M., Hegemann P. A *Streptomyces rimosus aphVIII* gene coding for a new type phosphotransferase provides sta-



- ble antibiotic resistance to *Chlamydomonas reinhardtii* // Gene. 2001. Vol. 277, N. 1. P. 221–229. doi: 10.1016/s0378-1119(01)00616-3
54. Stevens D.R., Rochaix J.-D., Purton S. The bacterial pleuromycin resistance gene *ble* as a dominant selectable marker in *Chlamydomonas* // Mol Gen Genet. 1996. Vol. 251, N. 1. P. 23–30. doi: 10.1007/BF02174340
55. Goldschmidt-Clermont M. Transgenic expression of aminoglycoside adenine transferase in the chloroplast: A selectable marker of site-directed transformation of *Chlamydomonas* // Nucleic Acids Res. 1991. Vol. 19, N. 15. P. 4083–4089. doi: 10.1093/nar/19.15.4083
56. Cerutti H., Johnson A.M., Gillham N.W., Boynton J.E. A eubacterial gene conferring spectinomycin resistance on *Chlamydomonas reinhardtii*: Integration into the nuclear genome and gene expression // Genetics. 1997. Vol. 145, N. 1. P. 97–110. doi: 10.1093/genetics/145.1.97
57. Bateman J., Purton S. Tools for chloroplast transformation in *Chlamydomonas*: expression vectors and a new dominant selectable marker // Mol Gen Genet. 2000. Vol. 263, N. 3. P. 404–410. doi: 10.1007/s004380051184
58. Larrea-Alvarez M., Young R., Purton S. A simple technology for generating marker-free chloroplast transformants of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. В кн.: Maliga P., editor. Chloroplast Biotechnology. New York: Humana, 2021. P. 293–304. doi: 10.1007/978-1-0716-1472-3\_17
59. Taunt H.N., Jackson H.O., Gunnarsson Í.N., et al. Accelerating chloroplast engineering: a new system for rapid generation of marker-free transplastomic lines of *Chlamydomonas reinhardtii* // Microorganisms. 2023. Vol. 11, N. 8. ID 1967. doi: 10.3390/microorganisms11081967
60. Greiner A., Kelterborn S., Evers H., et al. Targeting of photoreceptor genes in *Chlamydomonas reinhardtii* via zinc-finger nucleases and CRISPR/Cas9 // Plant Cell. 2017. Vol. 29, N. 10. P. 2498–2518. doi: 10.1105/tpc.17.00659
61. Crozet P., Navarro F.J., Willmund F., et al. Birth of a photosynthetic chassis: a MoClo toolkit enabling synthetic biology in the microalga *Chlamydomonas reinhardtii* // ACS Synth Biol. 2018. Vol. 7, N. 9. P. 2074–2086. doi: 10.1021/acssynbio.8b00251
62. Kindle K.L. High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* // PNAS USA. 1990. Vol. 87, N. 3. P. 1228–1232. doi: 10.1073/pnas.87.3.1228
63. Kindle K.L., Richards K.L., Stern D.B. Engineering the chloroplast genome: Techniques and capabilities for chloroplast transformation in *Chlamydomonas reinhardtii* // PNAS USA. 1991. Vol. 88, N. 5. P. 1721–1725. doi: 10.1073/pnas.88.5.1721
64. Brown L.E., Sprecher S.L., Keller L.R. Introduction of exogenous DNA into *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation // Mol Cell Biol. 1991. Vol. 11, N. 4. P. 2328–2332. doi: 10.1128/mcb.11.4.2328-2332.1991
65. Park R.V., Asbury H., Miller S.M. Modification of a *Chlamydomonas reinhardtii* CRISPR/Cas9 transformation protocol for use with widely available electroporation equipment // MethodsX. 2020. Vol. 7. ID 100855. doi: 10.1016/j.mex.2020.100855
66. Wang L., Yang L., Wen X., et al. Rapid and high efficiency transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by square-wave electroporation // Biosci Rep. 2019. Vol. 39, N. 1. ID BSR20181210. doi: 10.1042/BSR20181210
67. Yamano T., Iguchi H., Fukuzawa H. Rapid transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* without cell-wall removal // J Biosci Bioeng. 2013. Vol. 115, N. 6. P. 691–694. doi: 10.1016/j.jbiosc.2012.12.020
68. Shimogawara K., Fujiwara S., Grossman A., Usuda H. High-efficiency transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation // Genetics. 1998. Vol. 148, N. 4. P. 1821–1828. doi: 10.1093/genetics/148.4.1821
69. Mini P., Demurtas O.C., Valentini S., et al. *Agrobacterium*-mediated and electroporation-mediated transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*: A comparative study // BMC Biotechnol. 2018. Vol. 18, N. 1. ID 11. doi: 10.1186/s12896-018-0416-3
70. Kang S., Jeon S., Kim S., et al. Development of a pVEC peptide-based ribonucleoprotein (RNP) delivery system for genome editing using CRISPR/Cas9 in *Chlamydomonas reinhardtii* // Sci Rep. 2020. Vol. 10, N. 1. ID 22158. doi: 10.1038/s41598-020-78968-x
71. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity // Science. 2012. Vol. 337, N. 6096. P. 816–821. doi: 10.1126/science.1225829
72. Ghribi M., Nouemssi S.B., Meddeb-Mouelhi F., Desgagné-Penix I. Genome editing by CRISPR-Cas: a game change in the genetic manipulation of *Chlamydomonas* // Life (Basel). 2020. Vol. 10, N. 11. ID 25. doi: 10.3390/life10110295
73. Jiang W., Brueggeman A.J., Horken K.M., et al. Successful transient expression of Cas9 and single guide RNA genes in *Chlamydomonas reinhardtii* // Eukaryot Cell. 2014. Vol. 13, N. 11. P. 1465–1469. doi: 10.1128/EC.00213-14
74. Guzmán-Zapata D., Sandoval-Vargas J., Macedo-Orsorio K., et al. Efficient editing of the nuclear *APT* reporter gene in *Chlamydomonas reinhardtii* via expression of a CRISPR-Cas9 module // Int J Mol Sci. 2019. Vol. 20, N. 5. ID 1247. doi: 10.3390/ijms20051247
75. Karas B.J., Diner R.E., Lefebvre S.C., et al. Designer diatom episomes delivered by bacterial conjugation // Nat Commun. 2015. Vol. 6. ID 6925. doi: 10.1038/ncomms7925
76. Diner R.E., Bielinski V.A., Dupont C.L., et al. Refinement of the diatom episome maintenance sequence and improvement of conjugation-based DNA delivery methods // Front Bioeng Biotechnol. 2016. Vol. 4. ID 65. doi: 10.3389/fbioe.2016.00065
77. Muñoz C.F., Sturme M.H.J., D'Adamo S., et al. Stable transformation of the green algae *Acutodesmus obliquus* and *Neochloris oleoabundans* based on *E. coli* conjugation // Algal Res. 2019. Vol. 39. ID 101453. doi: 10.1016/j.algal.2019.101453
78. Poliner E., Takeuchi T., Du Z.-Y., et al. Nontransgenic marker-free gene disruption by an episomal CRISPR system in the oleaginous microalga, *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779 // ACS Synth Biol. 2018. Vol. 7, N. 4. P. 962–968. doi: 10.1021/acssynbio.7b00362
79. Baidukova O., Kelterborn S., Sizova I., Hegemann P. Reverse genetics. В кн.: Goodenough U., editor. The *Chlamydomonas* sourcebook. 3<sup>rd</sup> edit. Vol. 1: Introduction to *Chlamydomonas* and its laboratory use. Academic Press, 2023. P. 421–430. doi: 10.1016/B978-0-12-822457-1.00011-X
80. Nievergelt A.P., Diener D.R., Bogdanova A., et al. Efficient precision editing of endogenous *Chlamydomonas reinhardtii* genes with CRISPR-Cas // Cell Rep Methods. 2023. Vol. 3, N. 8. ID 100562. doi: 10.1016/j.crmeth.2023.100562
81. Zadbass Shahabadi H., Akbarzadeh A., Ofoghi H., Kadkhodaei S. Site-specific gene knock-in and bacterial phytase gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* via Cas9 RNP-mediated HDR // Front Plant Sci. 2023. Vol. 14. ID 1150436. doi: 10.3389/fpls.2023.1150436
82. Jayshree A., Jayashree S., Thangaraju N. *Chlorella vulgaris* and *Chlamydomonas reinhardtii*: effective antioxidant, antibacterial and anticancer mediators // Indian J Pharm Sci. 2016. Vol. 78. P. 575–581. doi: 10.4172/pharmaceutical-sciences.1000155



83. Chen K., Wang Y., Zhang R., et al. CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture // *Annu Rev Plant Biol.* 2019. Vol. 70. P. 667–697. doi: 10.1146/annurev-arplant-050718-100049

84. Salomé P.A., Merchant S.S. A series of fortunate events: introducing *Chlamydomonas* as a reference organism // *Plant Cell.* 2019. Vol. 31, N. 8. P. 1682–1707. doi: 10.1105/tpc.18.00952

## REFERENCES

- Blaby-Haas CE, Merchant SS. Comparative and functional algal genomics. *Annu Rev Plant Biol.* 2019;70:605–638. doi: 10.1146/annurev-arplant-050718-095841
- Field CB, Behrenfeld MJ, Randerson JT, Falkowski P. Primary production of the biosphere: Integrating terrestrial and oceanic components. *Science.* 1998;281(5374):237–240. doi: 10.1126/science.281.5374.237
- Lu Y, Zhang X, Gu X, et al. Engineering microalgae: transition from empirical design to programmable cells. *Crit Rev Biotechnol.* 2021;41(8):1233–1256. doi: 10.1080/07388551.2021.1917507
- Siddiqui A, Wei Z, Boehm M, Ahmad N. Engineering microalgae through chloroplast transformation to produce high-value industrial products. *Biotechnol Appl Biochem.* 2019;67(1):30–40. doi: 10.1002/bab.1823
- www.fda.gov. [Internet]. US FDA [cited: 2023 Nov 1]. Available at: <https://www.fda.gov/>
- Jeon S, Lim J-M, Lee H-G, et al. Current status and perspectives of genome editing technology for microalgae. *Biotechnol Biofuels.* 2017;10:267. doi: 10.1186/s13068-017-0957-z
- Patel VK, Das A, Kumari R, Kajla S. Recent progress and challenges in CRISPR-Cas9 engineered algae and cyanobacteria. *Algal Res.* 2023;71:103068. doi: 10.1016/j.algal.2023.103068
- Merchant SS, Prochnik SE, Vallon O, et al. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science.* 2007;318(5848):245–250. doi: 10.1126/science.1143609
- Gallaher SD, Fitz-Gibbon ST, Strenkert D, et al. High-throughput sequencing of the chloroplast and mitochondrion of *Chlamydomonas reinhardtii* to generate improved *de novo* assemblies, analyze expression patterns and transcript speciation, and evaluate diversity among laboratory strains and wild isolates. *Plant J.* 2018;93(3):545–565. doi: 10.1111/tpj.13788
- Weeks DP. Genetic transformation of *Chlamydomonas* nuclear, chloroplast, and mitochondrial genomes. In: Goodenough U, editor. *The Chlamydomonas sourcebook.* Academic Press, 2023. P. 325–343. doi: 10.1016/B978-0-12-822457-1.00018-2
- Esland L, Larrea-Alvarez M, Purton S. Selectable markers and reporter genes for engineering the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biology (Basel).* 2018;7(4):46. doi: 10.3390/biology7040046
- Sun M, Qian K, Su N, et al. Foot-and-mouth disease virus VP1 protein fused with cholera toxin B subunit expressed in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Biotechnol Lett.* 2003; 25(13):1087–1092. doi: 10.1023/a:1024140114505
- He D-M, Qian K-X, Shen G-F, et al. Recombination and expression of classical swine fever virus (CSFV) structural protein E2 gene in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2007;55(1):26–30. doi: 10.1016/j.colsurfb.2006.10.042
- Siripornadulsil S, Dabrowski K, Sayre R. Microalgal vaccines. In: León R, Galván A, Fernández E, editors. *Transgenic microalgae as green cell factories. Advances in experimental medicine and biology.* New York: Springer, 2007. Vol. 616. P. 122–128. doi: 10.1007/978-0-387-75532-8\_11
- Surzycki R, Greenham K, Kitayama K, et al. Factors effecting expression of vaccines in microalgae. *Biologicals.* 2009;37(3):133–138. doi: 10.1016/j.biologicals.2009.02.005
- Dreesen IAJ, Charpin-El Hamri G, Fussenegger M. Heat-stable oral alga-based vaccine protects mice from *Staphylococcus aureus* infection. *J Biotechnol.* 2010;145(3):273–280. doi: 10.1016/j.jbiotec.2009.12.006
- Michelet L, Lefebvre-Legendre L, Burr SE, et al. Enhanced chloroplast transgene expression in a nuclear mutant of *Chlamydomonas*. *Plant Biotechnol J.* 2011;9(5):565–574. doi: 10.1111/j.1467-7652.2010.00564.x
- Gregory JA, Li F, Tomosada LM, et al. Algae-produced Pfs25 elicits antibodies that inhibit malaria transmission. *PLoS One.* 2012;7(5):37179. doi: 10.1371/journal.pone.0037179
- Gregory JA, Topol AB, Doerner DZ, Mayfield S. Alga-produced cholera toxin-Pfs25 fusion proteins as oral vaccines. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79(13):3917–3925. doi: 10.1128/AEM.00714-13
- Jones CS, Luong T, Hannon M, et al. Heterologous expression of the C-terminal antigenic domain of the malaria vaccine candidate Pfs48/45 in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013;97(5):1987–1995. doi: 10.1007/s00253-012-4071-7
- Shamriz S, Ofoghi H. Expression of recombinant PfCelTOS antigen in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii* and its potential use in detection of malaria. *Mol Biotechnol.* 2019;61(2):102–110. doi: 10.1007/s12033-018-0140-1
- Demurtas OC, Massa S, Ferrante P, et al. A *Chlamydomonas*-derived human papillomavirus 16 E7 vaccine induces specific tumor protection. *PLoS One.* 2013;8(4):61473. doi: 10.1371/journal.pone.0061473
- Vlasák J, Bořiza J, Ryba Š, Ludvíková V. Alga-based HPV16 E7 vaccine elicits specific immune response in mice. *Asian J Plant Sci Res.* 2013;3:141–148.
- Bertalan I, Munder MC, Weiß C, et al. A rapid, modular and marker-free chloroplast expression system for the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biotechnol.* 2015;195:60–66. doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.12.017
- Castellanos-Huerta I, Bañuelos-Hernandez B, Tellez G, et al. Recombinant hemagglutinin of avian influenza virus H5 expressed in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii* and evaluation of its immunogenicity in chickens. *Avian Dis.* 2016;60(4):784–791. doi: 10.1637/11427-042816-Reg
- Beltran-López JI, Romero-Maldonado A, Monreal-Escalante E, et al. *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts express an orally immunogenic protein targeting the p210 epitope implicated in atherosclerosis immunotherapies. *Plant Cell Rep.* 2016;35(5):1133–1141. doi: 10.1007/s00299-016-1946-6
- Berndt AJ, Smalley TN, Ren B, et al. Recombinant production of a functional SARS-CoV-2 spike receptor binding domain in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLoS One.* 2021;16(11):257089. doi: 10.1371/journal.pone.0257089
- Rasala BA, Muto M, Lee PA, et al. Production of therapeutic proteins in algae, analysis of expression of seven human proteins in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Biotechnol J.* 2010;8(6):719–733. doi: 10.1111/j.1467-7652.2010.00503.x
- Zhao Y, Shi X, Zhang Z. High-frequency electroporation and expression of human interleukin 4 gene in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Journal of Huazhong Agricultural University.* 2006;25(2):110–116.

30. Yang Z, Li Y, Chen F, et al. Expression of human soluble TRAIL in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Chin Sci Bull.* 2006; 51:1703–1709. doi: 10.1007/s11434-006-2041-0
31. Mayfield SP, Franklin SE, Lerner RA. Expression and assembly of a fully active antibody in algae. *PNAS USA.* 2003;100(2):438–442. doi: 10.1073/pnas.0237108100
32. Tran M, Zhou B, Pettersson PL, et al. Synthesis and assembly of a full-length human monoclonal antibody in algal chloroplasts. *Biotechnol Bioeng.* 2009;104(4):663–673. doi: 10.1002/bit.22446
33. Barrera DJ, Rosenberg JN, Chiu JG, et al. Algal chloroplast produced camelid VH H antitoxins are capable of neutralizing botulinum neurotoxin. *Plant Biotechnol J.* 2015;13(1):117–124. doi: 10.1111/pbi.12244
34. Wang X, Brandsma M, Tremblay R, et al. A novel expression platform for the production of diabetes-associated autoantigen human glutamic acid decarboxylase (hGAD65). *BMC Biotechnol.* 2008;8:87. doi: 10.1186/1472-6750-8-87
35. Tran M, Van C, Barrera DJ, et al. Production of unique immunotoxin cancer therapeutics in algal chloroplasts. *PNAS USA.* 2013;110(1):15–22. doi: 10.1073/pnas.1214638110
36. Wannathong T, Waterhouse JC, Young REB, et al. New tools for chloroplast genetic engineering allow the synthesis of human growth hormone in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016;100(12):5467–5477. doi: 10.1007/s00253-016-7354-6
37. Stoffels L, Taunt HN, Charalambous B, Purton S. Synthesis of bacteriophage lytic proteins against *Streptococcus pneumoniae* in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Biotechnol J.* 2017;15(9):1130–1140. doi: 10.1111/pbi.12703
38. Akram M, Khan MA, Ahmed N, et al. Cloning and expression of an anti-cancerous cytokine: human IL-29 gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *AMB Expr.* 2023;13(1):23. doi: 10.1186/s13568-023-01530-1
39. Gregory JA, Shepley-McTaggart A, Umpierrez M, et al. Immunotherapy using algal-produced Ara h 1 core domain suppresses peanut allergy in mice. *Plant Biotechnol J.* 2016;14(7):1541–1550. doi: 10.1111/pbi.12515
40. Hirschl S, Ralsler C, Asam C, et al. Expression and characterization of functional recombinant Bet v 1.0101 in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Int Arch Allergy Immunol.* 2017;173(1):44–50. doi: 10.1159/000471852
41. Schroda M. Good news for nuclear transgene expression in *Chlamydomonas*. *Cells.* 2019;8(12):1534. doi: 10.3390/cells8121534
42. Schroda M, Remacle C. Molecular advancements establishing *Chlamydomonas* as a host for biotechnological exploitation. *Front Plant Sci.* 2022;13:911483. doi: 10.3389/fpls.2022.911483
43. Berthold P, Schmitt R, Mages W. An engineered *Streptomyces hygrosopicus aph7''* gene mediates dominant resistance against hygromycin B in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Protist.* 2002; 153(4):401–412. doi: 10.1078/14344610260450136
44. Lumberras V, Stevens DR, Purton S. Efficient foreign gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* mediated by an endogenous intron: foreign gene expression in *Chlamydomonas*. *Plant J.* 1998;14(4):441–447. doi: 10.1046/j.1365-313X.1998.00145.x
45. Baier T, Wichmann J, Kruse O, Lauersen KJ. Intron-containing algal transgenes mediate efficient recombinant gene expression in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(13):6909–6919. doi: 10.1093/nar/gky532
46. Baier T, Jacobebbinghaus N, Einhaus A, et al. Introns mediate post-transcriptional enhancement of nuclear gene expression in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLoS Genet.* 2020;16(7):1008944. doi: 10.1371/journal.pgen.1008944
47. Picariello T, Hou Y, Kubo T, et al. TIM, a targeted insertional mutagenesis method utilizing CRISPR/Cas9 in *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLoS One.* 2020;15(5):232594. doi: 10.1371/journal.pone.0232594
48. Kasai Y, Harayama S. Construction of marker-free transgenic strains of *Chlamydomonas reinhardtii* using a Cre/loxP-mediated recombinase system. *PLoS One.* 2016;11(8):161733. doi: 10.1371/journal.pone.0161733
49. Fischer N, Stampacchia O, Redding K, Rochaix J-D. Selectable marker recycling in the chloroplast. *Mol Gen Genet.* 1996; 251(3):373–380. doi: 10.1007/BF02172529
50. Purton S, Rochaix J-D. Characterization of the *ARG7* gene of *Chlamydomonas reinhardtii* and its application to nuclear transformation. *Eur J Phycol.* 1995;30(2):141–148. doi: 10.1080/09670269500650901
51. Kindle KL, Schnell RA, Fernández E, Lefebvre PA. Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas* using the *Chlamydomonas* gene for nitrate reductase. *J Cell Biol.* 1989;109(6):2589–2601. doi: 10.1083/jcb.109.6.2589
52. Nelson JAE, Savereide PB, Lefebvre PA. The *CRY1* gene in *Chlamydomonas reinhardtii*: structure and use as a dominant selectable marker for nuclear transformation. *Mol Cell Biol.* 1994; 14(6):4011–4019. doi: 10.1128/mcb.14.6.4011-4019.1994
53. Sizova I, Fuhrmann M, Hegemann P. A *Streptomyces rimosus aphVIII* gene coding for a new type phosphotransferase provides stable antibiotic resistance to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Gene.* 2001;277(1):221–229. doi: 10.1016/s0378-1119(01)00616-3
54. Stevens DR, Rochaix J-D, Purton S. The bacterial phleomycin resistance gene *ble* as a dominant selectable marker in *Chlamydomonas*. *Mol Gen Genet.* 1996;251(1):23–30. doi: 10.1007/BF02174340
55. Goldschmidt-Clermont M. Transgenic expression of aminoglycoside adenine transferase in the chloroplast: A selectable marker of site-directed transformation of *Chlamydomonas*. *Nucleic Acids Res.* 1991;19(15):4083–4089. doi: 10.1093/nar/19.15.4083
56. Cerutti H, Johnson AM, Gillham NW, Boynton JE. A eubacterial gene conferring spectinomycin resistance on *Chlamydomonas reinhardtii*: Integration into the nuclear genome and gene expression. *Genetics.* 1997;145(1):97–110. doi: 10.1093/genetics/145.1.97
57. Bateman J, Purton S. Tools for chloroplast transformation in *Chlamydomonas*: expression vectors and a new dominant selectable marker. *Mol Gen Genet.* 2000;263(3):404–410. doi: 10.1007/s004380051184
58. Larrea-Alvarez M, Young R, Purton S. A simple technology for generating marker-free chloroplast transformants of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. In: Maliga P, editor. *Chloroplast Biotechnology*. New York: Humana, 2021. P. 293–304. doi: 10.1007/978-1-0716-1472-3\_17
59. Taunt HN, Jackson HO, Gunnarsson ÍN, et al. Accelerating chloroplast engineering: a new system for rapid generation of marker-free transplastomic lines of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Microorganisms.* 2023;11(8):1967. doi: 10.3390/microorganisms11081967
60. Greiner A, Kelterborn S, Evers H, et al. Targeting of photoreceptor genes in *Chlamydomonas reinhardtii* via zinc-finger nucleases and CRISPR/Cas9. *Plant Cell.* 2017;29(10):2498–2518. doi: 10.1105/tpc.17.00659
61. Crozet P, Navarro FJ, Willmund F, et al. Birth of a photosynthetic chassis: a MoClo toolkit enabling synthetic biology in the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *ACS Synth Biol.* 2018;7(9):2074–2086. doi: 10.1021/acssynbio.8b00251

62. Kindle KL. High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *PNAS USA*. 1990;87(3):1228–1232. doi: 10.1073/pnas.87.3.1228
63. Kindle KL, Richards KL, Stern DB. Engineering the chloroplast genome: Techniques and capabilities for chloroplast transformation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *PNAS USA*. 1991;88(5):1721–1725. doi: 10.1073/pnas.88.5.1721
64. Brown LE, Sprecher SL, Keller LR. Introduction of exogenous DNA into *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. *Mol Cell Biol*. 1991;11(4):2328–2332. doi: 10.1128/mcb.11.4.2328-2332.1991
65. Park RV, Asbury H, Miller SM. Modification of a *Chlamydomonas reinhardtii* CRISPR/Cas9 transformation protocol for use with widely available electroporation equipment. *MethodsX*. 2020;7:100855. doi: 10.1016/j.mex.2020.100855
66. Wang L, Yang L, Wen X, et al. Rapid and high efficiency transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by square-wave electroporation. *Biosci Rep*. 2019;39(1):BSR20181210. doi: 10.1042/BSR20181210
67. Yamano T, Iguchi H, Fukuzawa H. Rapid transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* without cell-wall removal. *J Biosci Bioeng*. 2013;115(6):691–694. doi: 10.1016/j.jbiosc.2012.12.020
68. Shimogawara K, Fujiwara S, Grossman A, Usuda H. High-efficiency transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. *Genetics*. 1998;148(4):1821–1828. doi: 10.1093/genetics/148.4.1821
69. Mini P, Demurtas OC, Valentini S, et al. *Agrobacterium*-mediated and electroporation-mediated transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*: A comparative study. *BMC Biotechnol*. 2018;18(1):11. doi: 10.1186/s12896-018-0416-3
70. Kang S, Jeon S, Kim S, et al. Development of a pVEC peptide-based ribonucleoprotein (RNP) delivery system for genome editing using CRISPR/Cas9 in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Sci Rep*. 2020;10(1):22158. doi: 10.1038/s41598-020-78968-x
71. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012;337(6096):816–821. doi: 10.1126/science.1225829
72. Ghribi M, Nouemssi SB, Meddeb-Mouelhi F, Desgagné-Penix I. Genome editing by CRISPR-Cas: a game change in the genetic manipulation of *Chlamydomonas*. *Life (Basel)*. 2020;10(11):25. doi: 10.3390/life10110295
73. Jiang W, Brueggeman AJ, Horken KM, et al. Successful transient expression of Cas9 and single guide RNA genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell*. 2014;13(11):1465–1469. doi: 10.1128/EC.00213-14
74. Guzmán-Zapata D, Sandoval-Vargas J, Macedo-Osorio K, et al. Efficient editing of the nuclear *APT* reporter gene in *Chlamydomonas reinhardtii* via expression of a CRISPR-Cas9 module. *Int J Mol Sci*. 2019;20(5):1247. doi: 10.3390/ijms20051247
75. Karas BJ, Diner RE, Lefebvre SC, et al. Designer diatom episomes delivered by bacterial conjugation. *Nat Commun*. 2015;6:6925. doi: 10.1038/ncomms7925
76. Diner RE, Bielinski VA, Dupont CL, et al. Refinement of the diatom episome maintenance sequence and improvement of conjugation-based DNA delivery methods. *Front Bioeng Biotechnol*. 2016;4:65. doi: 10.3389/fbioe.2016.00065
77. Muñoz CF, Sturme MHJ, D'Adamo S, et al. Stable transformation of the green algae *Acutodesmus obliquus* and *Neochloris oleoabundans* based on *E. coli* conjugation. *Algal Res*. 2019;39:101453. doi: 10.1016/j.algal.2019.101453
78. Poliner E, Takeuchi T, Du Z-Y, et al. Nontransgenic marker-free gene disruption by an episomal CRISPR system in the oleaginous microalga, *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779. *ACS Synth Biol*. 2018;7(4):962–968. doi: 10.1021/acssynbio.7b00362
79. Baidukova O, Ketterborn S, Sizova I, Hegemann P. Reverse genetics. In: Goodenough U, editor. *The Chlamydomonas sourcebook*. 3<sup>rd</sup> edit. Vol. 1: Introduction to *Chlamydomonas* and its laboratory use. Academic Press, 2023. P. 421–430. doi: 10.1016/B978-0-12-822457-1.00011-X
80. Nievergelt AP, Diener DR, Bogdanova A, et al. Efficient precision editing of endogenous *Chlamydomonas reinhardtii* genes with CRISPR-Cas. *Cell Rep Methods*. 2023;3(8):100562. doi: 10.1016/j.crmeth.2023.100562
81. Zadabbas Shahabadi H, Akbarzadeh A, Ofoghi H, Kadkhodaei S. Site-specific gene knock-in and bacterial phytase gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* via Cas9 RNP-mediated HDR. *Front Plant Sci*. 2023;14:1150436. doi: 10.3389/fpls.2023.1150436
82. Jayshree A, Jayashree S, Thangaraju N. *Chlorella vulgaris* and *Chlamydomonas reinhardtii*: effective antioxidant, antibacterial and anticancer mediators. *Indian J Pharm Sci*. 2016;78:575–581. doi: 10.4172/pharmaceutical-sciences.1000155
83. Chen K, Wang Y, Zhang R, et al. CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture. *Annu Rev Plant Biol*. 2019;70:667–697. doi: 10.1146/annurev-arplant-050718-100049
84. Salomé PA, Merchant SS. A series of fortunate events: introducing *Chlamydomonas* as a reference organism. *Plant Cell*. 2019;31(8):1682–1707. doi: 10.1105/tpc.18.00952

## ОБ АВТОРАХ

**Павел Алексеевич Виrolainen**; ORCID: 0000-0001-5918-9395; eLibrary SPIN: 6564-9350; e-mail: st085618@student.spbu.ru

\***Елена Михайловна Чекунова**, д-р. биол. наук; адрес: 199034, Россия, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7–9; ORCID: 0000-0001-8942-4771; eLibrary SPIN: 2788-6386; e-mail: e.chekunova@spbu.ru

## AUTHORS' INFO

**Pavel A. Virolainen**; ORCID: 0000-0001-5918-9395; SPIN: 6564-9350; e-mail: st085618@student.spbu.ru

\***Elena M. Chekunova**, Dr. Sci. (Biology); address: 7–9 Universitetskaya emb., Saint Petersburg, 199034, Russia; ORCID: 0000-0001-8942-4771; eLibrary SPIN: 2788-6386; e-mail: e.chekunova@spbu.ru

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author