

Изучение влияния нокаута генов *GAUT1* и *GAUT7* на агрегативность клеток в суспензионной культуре *Arabidopsis thaliana*

Франкевич Т.А.*, Пермякова Н.В., Сидорчук Ю.В., Дейнеко Е.В.

Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск, Россия

* frankevichta@bionet.nsc.ru

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*; культура клеток; агрегативность; геномное редактирование; галактуронилтрансфераза; GAUT

Цель: Межклеточная адгезия, характерная для растений, может быть основной причиной агрегативности клеток в суспензии. На сегодняшний день существует ряд методов снижения размеров агрегатов в растительных клеточных суспензиях, но ни один из них не считается оптимальным и универсальным, поэтому поиск новых способов снижения агрегативности является актуальной задачей. Известно, что большую роль в поддержании контактов между клетками играют пектины клеточных стенок. За полимеризацию одного из важнейших пектинов клеточной стенки – гомогалактуронана – у *Arabidopsis thaliana* отвечает ферментативный комплекс GAUT1:GAUT7. Получение мутантных линий клеток с нокаутом двух генов, отвечающих за синтез этих ферментов, *GAUT1* и *GAUT7*, позволит исследовать влияние этих ферментов на агрегативность клеток в суспензионной культуре. Используя в качестве исходных растений трансгенные растения-продуценты белка GFP, мы сможем исследовать влияние нокаута этих генов на уровень продукции рекомбинантного белка.

Методы: Для редактирования с использованием системы CRISPR/Cas9 нами были созданы две мультиплексные генетические конструкции на основе плазмиды pDGE347, несущие по две направляющие РНК, для получения делеции в целевых генах. Выполнена агробактериальная трансформация методом «погружения цветков», после чего были отобраны растения, несущие делеции. Из мутантных растений были получены каллусные и суспензионные культуры, с которыми проведен анализ агрегативности и уровня накопления белка GFP.

Результаты: Результаты сравнительного анализа показали, что, несмотря на отсутствие изменений в скорости прироста биомассы, наблюдаются значительные различия между мутантными и контрольной линиями: у линий с нокаутом *GAUT1* и *GAUT7* увеличена агрегативность на 21 и 18 % соответственно. Вследствие этого количество рекомбинантного белка снижено до 5.7 и 5.6 % соответственно по сравнению с 16 % у контрольной линии.

Заключение: Полученные нами результаты показывают, что, несмотря на кажущуюся привлекательность, гены биосинтеза пектина, очевидно, являются плохой мишенью для нокаута, в том случае если цель – снижение агрегативности клеток в культуре. В то же время наша работа демонстрирует, что, безусловно, повлиять на агрегативность клеток в культуре при помощи редактирования возможно.

Финансирование: Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, грант № FWRN-2022-0022.