

Ауксин-зависимая регуляция гомеостаза АФК в *rolA*-трансгенных клеточных культурах *Rubia cordifolia* L.

Т.О. Соломатина*, Г.Н. Веремейчик, Т.Ю. Горпенченко, В.П. Григорчук

Федеральный научный центр биоразнообразия наземных экосистем Восточной Азии Дальневосточного отделения Российской академии наук, ФГБУН ФНЦ биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия

* solomatina@mail.ru

Гены *rol*, изучаемые с XIX века, хорошо известны как биоинженерный инструмент для активации вторичного метаболизма растений. Согласно последним публикациям, ген *rolA* имеет две важные особенности. Во-первых, изменение продукции вторичных метаболитов у длительно культивируемых *rolA*-трансгенных клеточных культур *Rubia cordifolia* L. было замечено в 2014 году и описано в 2018 году. Во-вторых, сильное ауксин-зависимое антагонистическое воздействие на гомеостаз активных форм кислорода (АФК) связано с экспрессией генов *rolA* и *rolB*.

Цель: Изучение ауксин-зависимой регуляции гомеостаза АФК в *rolA* (агропинового типа) – трансгенных клеточных культурах *R. cordifolia* L. Что включает в себя поиск причины изменения вторичного метаболизма в длительно культивируемой трансгенной клеточной линии и изучение влияния индивидуальной экспрессии гена *rolA* на гомеостаз АФК.

Материалы и методы: Методами классической биотехнологии растений были получены и выращены нормальные и трансгенные клеточные культуры *R. cordifolia* L. Были применены современные стандартизованные методы молекулярной биологии: ПЦР, ПЦР-РВ, клонирование, рестрикция, электрофорез нуклеиновых кислот и другие. Пероксидазную активность нативных белков анализировали спектрофотометрически. Для анализа содержания вторичных метаболитов использовали метод ВЭЖХ-МС, который предполагает высокую точность данных о качественном и количественном составе искоемых соединений. Визуализация АФК в клетках была проведена методом конфокальной микроскопии, анализ жизнеспособности – методом электронной микроскопии. Статистическую обработку данных проводили общепринятыми методами t-теста, ANOVA и post hoc анализа.

Результаты: Мы проанализировали SNPs в 5'UTR и кодирующей области гена *rolA*. Две мутации в онкогене *rolA* экспрессируются, но ни одна из этих мутаций не затрагивает известные функционально значимые аминокислоты белка RolA.

В промоторе гена *rolA* обнаружен консервативный мотив АСТТТА для ауксин-опосредованных факторов транскрипции. На двух отдельных культурах клеток была продемонстрирована сильная зависимость экспрессии гена *rolA* от экзогенных ауксинов.

Более того, экспрессия генов, участвующих в метаболизме АФК, снижалась в ответ на опосредованное ауксинами увеличение экспрессии гена *rolA*.

Таким образом, можно предположить, что длительная культивация клеточной линии может приводить к изменению ее гормонального состояния с течением времени, что может модулировать действие белка *rolA*. Можно также предположить, что антагонистическое взаимодействие между *rolA* и *rolB* предотвращает сильную *rolB*-индуцированную чувствительность к ауксину и окислительные всплески, чтобы сбалансировать состояние клеток. Недавнее исследование продемонстрировало потенциальное ауксин-зависимое противоречие между *rolA* и *rolB*, а также потенциальные мишени и физиологические последствия, такие как метаболизм АФК.

Выводы: Длительное культивирование клеточной линии может привести к изменению ее гормонального состояния с течением времени, что может модулировать действие белка RolA. Кроме того, ауксин-зависимая экспрессия гена *rolA* приводила к снижению метаболизма ROS.

Промотор гена *rolA* может регулироваться ауксином благодаря наличию мотива АССТТТА для ауксин-зависимого белка Dof. Ауксин-зависимая индукция экспрессии гена *rolA* сопровождается снижением экспрессии генов, кодирующих ферменты системы метаболизма АФК. Можно с уверенностью предположить, что антагонистическое взаимодействие между *rolA* и *rolB* предотвращает сильную *rolB*-индуцированную чувствительность к ауксину и окислительные всплески.

Финансирование: Работа выполнена в рамках государственного задания ИАПУ ДВО РАН (тема FWFW-2024-0004) и в рамках государственного задания ФНЦ биоразнообразия наземной среды Восточной Азии ДВО РАН (тема № 0207-2024-0022).