

Изменение агрегативности клеток в суспензионной культуре *Arabidopsis thaliana* при нокауте генов семейства GAUT

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

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

*frankevich@bionet.nsc.ru

Цель: Клетки растений, в частности суспензионные клеточные культуры, представляют собой перспективную платформу для биосинтеза биофармацевтических белков. Однако одной из ключевых проблем этого метода является высокая агрегативность, ограничивающая их продуктивность. Существуют примеры показывающие, что снижение агрегативности растительных суспензионных клеточных культур приводит к увеличению выхода вторичных метаболитов. Поэтому поиск новых подходов к уменьшению агрегативности суспензий остается актуальной задачей. Основная причина агрегативности может быть связана с межклеточной адгезией, характерной для растений. Важную роль в данном процессе играют гены семейства GAUT, кодирующие пектины клеточных стенок, в частности гомолактуронан. В настоящее время известно 15 генов семейства GAUT, однако только часть из них участвуют в биосинтезе и полимеризации гомолактуронана. В данном исследовании нами были изучены гены *GAUT1*, *GAUT7* и *GAUT8* и влияние нокаута этих генов на агрегативность клеток в суспензионной культуре.

Материалы и методы: Для получения мутаций в генах *GAUT1* и *GAUT7* разработаны две мультиплексные генетические конструкции на основе системы CRISPR/Cas9, несущие по две направляющих РНК для получения крупных делеций в целевых генах. Далее была проведена агробактериальная трансформация и отобраны растения с нокаутами по генам *GAUT1* и *GAUT7*. Культура линии Quasimodo1, несущая природную мутацию по гену *GAUT8* была предоставлена доктором Стефаном Вергером, сотрудником департамента генетики леса и физиологии растений Шведского университета аграрных культур. Из мутантных растений были получены каллусные и суспензионные культуры, у которых оценивались уровень накопления биомассы, агрегативность, количество пектинов, уровень накопления белка GFP, а также был проведен микроскопический анализ.

Результаты: Результаты сравнительного анализа показали, что прирост биомассы у линий *GAUT1* и *GAUT7* не отличался от контрольного образца, в то время как линия *GAUT8* демонстрировала более высокий прирост биомассы. Агрегативность у линий *GAUT1* и *GAUT7* была увеличена на 21 и 18% соответственно, тогда как у линии *GAUT8* агрегативность была снижена на 46%. Анализ пектинового состава выявил различия в содержании пектинов у линий *GAUT1* и *GAUT7* по сравнению с контролем, тогда как уровень пектинов у *GAUT8* оставался на том же уровне. Микроскопический анализ показал морфологические различия между всеми мутантными линиями по сравнению с контролем. агрегаты клеток *GAUT1* и *GAUT7* были крупнее и темнее, что может свидетельствовать о некротических изменениях и накоплении неполимеризованного пектина. Клеточная линия *GAUT8* напротив характеризуется более мелкими и округлыми клетками в агрегатах. В результате, количество рекомбинантного белка у линий *GAUT1* и *GAUT7* было снижено до 5,7 и 5,6% соответственно по сравнению с 16% контрольной линии.

Выводы: Полученные данные свидетельствуют о том, что редактирование генов семейства GAUT оказывает значительное влияние на агрегативность суспензионных клеточных культур и уровень экспрессии рекомбинантного белка. Гены *GAUT1* и *GAUT7* не являются перспективными мишенями для уменьшения агрегативности, поскольку их инактивация приводит к негативным последствиям. В то же время мутация в гене *GAUT8* способствует снижению агрегативности клеток и повышению уровня экспрессии белка, что делает этот ген перспективным кандидатом для дальнейших исследований. В будущем планируется детальное изучение других генов семейства GAUT с целью выявления оптимальных мишеней для регуляции агрегативности суспензионных культур *Arabidopsis thaliana*.

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