

На правах рукописи

МАХАЗЕН ДМИТРИЙ СЕРГЕЕВИЧ

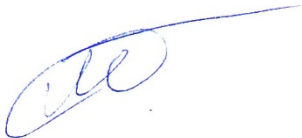
**Регуляция генов семейства *JAZ* посредством РНК-интерференции как инструмент активации вторичного метаболизма в клеточных культурах растений**

1.5.6 – Биотехнология (биологические науки)

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук



Владивосток 2022

Работа выполнена в лаборатории биоинженерии ФГБУН «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» ДВО РАН

**Научный руководитель:**

кандидат биологических наук,  
**Веремейчик Галина Николаевна**

**Официальные оппоненты:**

**Ермакова Светлана Павловна**, доктор химических наук, доцент, ФГБУН «Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова» ДВО РАН, заведующая лабораторией химии ферментов

**Мазейка Андрей Николаевич**, кандидат биологических наук, ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», доцент кафедры биохимии и биотехнологии

**Ведущая организация:**

ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва

Защита состоится «26» апреля 2022 года в «10» часов на заседании диссертационного совета 99.0.064.02 на базе ФГБУН «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» ДВО РАН по адресу: 690022, г. Владивосток, пр-т 100-летия Владивостока, 159.

Факс: (423)2310-193. E-mail: info@biosoil.ru

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке ДВО РАН и на сайте ФГБУН «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» ДВО РАН: <http://www.biosoil.ru/>.

Отзывы на автореферат в двух экземплярах с заверенными подписями просим направлять по адресу: 690022, г. Владивосток, проспект 100-летия Владивостока, 159 ученому секретарю диссертационного совета.

Автореферат разослан «\_\_» марта 2022 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



Тюнин А. П.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Фундаментальные исследования биологических функций растительной клетки находят широкое практическое применение в различных сферах использования растительных ресурсов, одной из которых является биотехнология и биоинженерия. Среди различных направлений биотехнологии растений, получение ценных метаболитов на основе клеточных культур-продуцентов становится все более актуальным и перспективным в связи с ухудшением экологической обстановки и общемировой тенденцией к максимальному сохранению природных ресурсов и биоразнообразия (Eibl *et al.*, 2018; Agya *et al.*, 2020). Основной проблемой в данном направлении является низкая продуктивность клеточных культур многих видов растений. Для решения этой проблемы активно используются методы биотехнологии и генетической инженерии. Поиск современных, универсальных и эффективных инструментов генетической инженерии растительной клетки является актуальной задачей в области биотехнологии и физиологии растений. Современные требования к таким инструментам подразумевают высокий активаторный эффект на биосинтез физиологически активных веществ без ущерба для ростовых характеристик (Krsteva *et al.*, 2020).

Вторичные метаболиты растений являются важной частью защитной системы растительной клетки как от биотического, так и от абиотического стрессовых воздействий. Благодаря ярко выраженным биологическим эффектам, фитоалексины нашли широкое применение в фармакологии, пищевой и косметической промышленности. Регуляция биосинтеза большинства фармакологически-значимых фитоалексенов осуществляется главным образом сигнальной системой жасмоновой кислоты (ЖК). Ключевыми регуляторными элементами ЖК-сигнальной системы являются не так давно открытые супрессионные транскрипционные факторы (ТФ) семейства JAZ (Jasmonate ZIM-domain proteins). Исследование эффекта инактивации супрессоров семейства JAZ на биосинтез фитоалексенов является актуальным направлением биотехнологии растительной клетки, а исследование сопутствующих молекулярных механизмов представляет высокий научный интерес.

Объектами работы являются два различных растения. Первое – модельное растение *Arabidopsis thaliana* L., в котором хорошо изучен механизм ЖК-опосредованной регуляции биосинтеза вторичных. В дополнение и для подтверждения был использован *Vitis vinifera* L., что позволяет исследовать биосинтез ценного соединения – *транс*-резвератрола (Berman *et al.*, 2017) в рамках ЖК-опосредованной регуляции. Таким образом, использование двух различных систем, реализующих различные биосинтетические пути, позволяет показать эффективность, универсальность и молекулярный механизм исследуемого биоинженерного подхода активации вторичного метаболизма за счет ингибирования экспрессии генов супрессоров семейства JAZ. Реализация идеи была проведена методом основанном на механизме РНК-интерференции.

**Степень разработанности темы.** Механизмы действия ЖК различны в зависимости от факторов стресса окружающей среды из-за разнообразия сигналов растительных гормонов и взаимодействия между различными сигналами. Многочисленные гены и транскрипционные факторы участвуют в основном пути передачи сигналов ЖК в качестве активаторов или репрессоров, опосредуя ответы

на сигналы стресса окружающей среды. Модуль JAZ-МУС играет центральную роль в пути передачи сигналов ЖК посредством интеграции регуляторных ТФ и связанных генов. Сигнальная система ЖК действует синергетически и антагонистично с другими сигнальными системами растений, чтобы противостоять стрессу окружающей среды. Этот процесс часто сопровождается регуляцией гормонов роста и развития растений. В последние годы данные, полученные на основе омиксных технологий, предоставили возможность полного понимания таких сложных сетей взаимодействия генов и белков. Однако, всё еще не ясна индивидуальная роль *JAZ* генов, малоизучено разнообразие *JAZ* генов в различных растениях, а также сам механизм взаимодействия гормональной регуляции.

**Цель и задачи исследования.** Цель представленной работы – оценить эффект ингибирования экспрессии генов *JAZ* на вторичный метаболизм и продуктивность клеточных культур винограда и арабидопсиса, а также исследовать сопутствующие молекулярные механизмы.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Получить трансгенные клеточные культуры арабидопсиса и винограда, экспрессия гена *JAZ* в которых ингибирована посредством механизма РНК-интерференции.

2. Изучить эффект ингибирования экспрессии генов *JAZ* на продукцию азот-, серосодержащих соединений в культуре арабидопсиса и *транс*-резвератрола в культуре винограда. Оценить экспрессию генов ферментов биосинтеза и регуляторных ТФ.

3. Оценить активаторный эффект экзогенной ЖК, как имитации биотического стрессового стимула, на биосинтез и продуктивность фитоалексинов в нормальных и *JAZ*-ингибированных клеточных линиях.

4. Оценить активаторный эффект абиотических стрессовых стимулов (низкие температуры и засоление) на биосинтез и продуктивность фитоалексинов в нормальных и *JAZ*-ингибированных клеточных линиях.

5. Оценить экспрессию маркерных генов основных сигнальных систем растительной клетки (АБК, ЖК и АФК), для выявления их взаимодействия и участия в конститутивной активации ЖК-сигнальной системы, опосредованной ингибированием экспрессии гена *JAZ*.

**Научная новизна и практическая значимость.** Впервые показано, что индивидуальное ингибирование экспрессии гена *JAZ1* и его гомолога значительно активирует биосинтез вторичных метаболитов в клеточных культурах растений без существенного ущерба ростовым характеристикам, что обеспечивает высокую продуктивность клеточных линий. Полученные в работе результаты могут быть использованы в области биотехнологического производства фармакологически значимых соединений на основе клеточных культур растений. Кроме того, возможно использование результатов диссертационной работы для проведения теоретических и практических занятий в университете на биологических факультетах.

**Методология и методы исследования.** В качестве теоретической основы для создания общей концепции были взяты данные исследований различных групп ученых. В работе были использованы современные информационные ресурсы такие как базы данных GenBank, TAIR, GENOSCOPE, Uniprot, BioGRID, комплексы

качественного современного анализа данных RefFinder, P-SAMS, MEGA, U-GENE, создания генетических конструкций *in silico* и биоинформатического анализа. В работе использовались современные стандартизированные методы молекулярной биологии с использованием отечественных и зарубежных протоколов и реактивов. Такие базовые методы включают в себя: ПЦР, ПЦР-РВ, клонирование, рестрикция, электрофорез нуклеиновых кислот и другие. Для анализа содержания вторичных метаболитов был использован метод ВЭЖХ-МС, который предполагает высокую точность получения данных о качественном и количественном составе искомым соединений. Статистическая обработка данных велась общепринятыми методами *t*-теста, ANOVA, пост-хок анализа.

#### **Основные положения, выносимые на защиту.**

1. Ингибирование экспрессии генов *AtJAZ1* и *VvJAZ9* посредством РНК-интерференции в клеточных культурах *A. thaliana* и *V. vinifera*, приводит к активации биосинтеза камалексина и *транс*-резвератрола, соответственно.

2. Ингибирование экспрессии генов *AtJAZ1* и его гомолога *VvJAZ9* в клеточных культурах арабидопсиса и винограда, соответственно, имитирует действие сигнальной системы ЖК, что обеспечивает активацию биосинтеза фитоалексинов без значительного ингибирования роста, характерного для природного ЖК-опосредованного ответа.

3. Ингибирование экспрессии гена *AtJAZ1* в клетках арабидопсиса усиливает активаторные действия абнотических стрессов (соль, холод) на биосинтез камалексина, а также обеспечивает устойчивость клеточной культуры к холодовому стрессу, что способствует увеличению продуктивности камалексина за счет слабого ингибирующего действия низких температур на рост трансгенной культуры по сравнению с контрольной.

4. Ингибирование экспрессии гена *AtJAZ1* изменяет конститутивную и индуцибельную экспрессию ключевых генов ответа на стрессовые воздействия: *ICE1*, *MYC2*, *ZAT12*, группы генов *DREB*, *HSF*, *ABF*, что обеспечивает увеличение продуктивности трансгенной культуры при воздействии холода за счёт активации вторичного метаболизма и снижения отрицательного воздействия холода на рост культуры через взаимодействие сигнальных путей АБК, ЖК и АФК.

5. Ингибирование экспрессии генов *JAZ* является перспективным универсальным биотехнологическим инструментом для активации биосинтеза фенилпропаноидных производных и азот-, серосодержащих соединений, обладающих фармакологическими свойствами, с целью получения рентабельных альтернативных источников на основе высокопродуктивных клеточных культур растений.

**Степень достоверности результатов.** Все работы выполнялись минимум в трех повторностях, полученные данные обрабатывались статистически методами *t*-статистики, что позволяет выявить статистическую значимость каждого сравнения образцов, и для каждого вида данных дана информация о том являются ли они статистически значимыми. Так же работа подкреплена иллюстрациями и фотографиями, которые являются подтверждением этапов работы.

**Апробация работы.** Результаты работы представлены на следующих конференциях: XVI Всероссийская молодёжная школа-конференция памяти В.Е.

Васьковского (Владивосток, 2017 год), Международная научно-практическая конференция «Вопросы современных научных исследований» (Омск, 2019 год).

**Публикации.** Материалы диссертации изложены в 5 публикациях, из них 2 в журналах из списка ВАК (2 публикации из списка WoS/Scopus). Одна публикация из списка РИНЦ, и 2 тезисов конференций.

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из введения, 4 глав, выводов и списка литературы. Работа изложена на 142 страницах, иллюстрирована 24 рисунками и содержит 3 таблицы. Список литературы насчитывает 232 наименований.

**Благодарности.** Автор искренне благодарит научного руководителя к.б.н. Веремейчик Галину Николаевну и чл.-корр., д.б.н. Булгакова Виктора Павловича за всестороннюю помощь и поддержку на всех этапах работы. Также автор выражает глубочайшую признательность сотрудникам лабораториям биоинженерии, клеточной биологии и биологии развития, бионанотехнологий и биомедицины, ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН за поддержку. Неоценимый вклад в обучение, работу и анализ данных внес к.б.н. Шкрыль Юрий Николаевич. Данная работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ (18-34-00500), РНФ (20-16-00016).

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы рассмотрены современные данные о гормональной регуляции растений, дана характеристика растений арабидопсиса и винограда, а также характеристика вторичных метаболитов и регуляторных элементов контролирующих пути биосинтеза вторичных метаболитов.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Биоинформатический анализ.** Биоинформатический анализ 23 аминокислотных последовательностей JAZ арабидопсиса и JAZ винограда был проведен в программном комплексе MEGA 11 (Tamura *et al.*, 2021). Анализ филогении был проведен с использованием метода «ближайших соседей» (Saitou and Nei, 1987). Дерево сгенерировано в масштабе с длинами ветвей в тех же единицах, что и эволюционные расстояния (рассчитаны на основе метода поправки Пуассона), используемые для вывода филогенетического дерева. Для анализа взаимодействий белка AtJAZ1 был использован агрегатор баз данных взаимодействий белков программный комплекс BioGRID (Oughtred *et al.*, 2021, <https://thebiogrid.org/>, v4.4). Минимальный уровень доказательности - 1.

**Создание генетических конструкций.** Для таргетирования гена *AtJAZ1 A. thaliana* (AT1G19180, TAIR) последовательность зрелой имиПНК (5'-UCGGCUGACGUGAGUUGCCUU-3') и последовательность зрелой имиПНК (5'-UGGGACUGGGGAGCUUCCCAA-3') для таргетирования гена *V. vinifera VvJAZ9* (XM\_002277121, GenBank) были разработаны *in silico* с использованием программы P-SAMS (Fahlgren *et al.*, 2016). Создание имиПНК на основе вектора pRS300 осуществляли методом сайт-специфического мутагенеза (Schwab *et al.*, 2006). Пары праймеров были разработаны с использованием программы WMD3 (<http://wmd3.weigelworld.org>). Полученные последовательности имиПНК

переносили в вектор pSAT6. Кассету, содержащую 35S промотор-имиРНК-35S терминатор, переносили с использованием фермента *PI-PspI* (NEB, England) в бинарный вектор pPZP-RCS2. Полученные бинарные вектора переносили в клетки штамма ЕНА105 *Agrobacterium tumefaciens* (Hood *et al.*, 1993) с помощью электропорации (GenePulser, BioRad, США). Полученные рекомбинантные штаммы *A. tumefaciens* использовали для генетической трансформации арабидопсиса и винограда.

**Получение и культивирование клеточных линий.** Нетрансформированная каллусная культура *A. thaliana* Col-0, обозначенная в данной работе как AtWT, была получена ранее (Bulgakov *et al.*, 2012). Культуру AtWT трансформировали, как описано ранее (Bulgakov *et al.*, 2012), с использованием рекомбинантного штамма *A. tumefaciens* ЕНА105. Саженьцы *V. vinifera* (сорт Каберне-Совиньон, питомник Фанагория, <https://www.en.fanagoria.ru/>) выращивали в теплице. Контрольная культура VvWT была получена из листьев растения. Трансгенные культуры VvEV (трансформированная вектором pPZP, содержащим только ген *nptII*) и *jaz9* (трансформированная вектором pPZP, содержащим конструкцию с последовательностью имиРНК) были так же получены из листьев методом агробактериальной трансформации. Трансгенные культуры селективировали в течение трех месяцев на среде с добавлением канамицина в концентрации 50 мг/л. Все клеточные линии культивировались на агаризованной среде MS с добавлением 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина и 2 мг/л 1-нафталиноуксусной кислоты для винограда и 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина и 0,5 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты для арабидопсиса, в темноте, при 24°C, с 28-дневными интервалами.

**Определение трансгенности полученных клеточных культур.** Чтобы доказать успешность трансформации, ДНК клеточной культуры экстрагировали, как описано ранее (Veremeichik *et al.*, 2019); наличие Т-ДНК было проверено с помощью ПЦР с парами праймеров, специфичными для гена *nptII* (nptD/nptR) и кассеты экспрессии имиРНК (35S PROM/35S TERM). Для проведения ПЦР использовали набор ScreenMix (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя.

**Экстракция РНК и синтез кДНК.** Выделение тотальной РНК было выполнено методом преципитации LiCl (Shkryl *et al.*, 2016). Полученную РНК инкубировали с 1 ед. ДНКазы I (Jena Bioscience, Германия), в соответствии с руководством производителя. ДНКазу удаляли с помощью BlueSorb (Силекс М, Россия). Проверку целостности РНК проводили гель-электрофорезом в 1% агарозе и с помощью спектрофотометра BioSpec Nano (Шимадзу, Япония). Для получения кДНК использовали набор MMLV RT («Евроген», Россия) согласно протоколу производителя. Реакцию проводили в термоциклере C1000 (BioRad, США).

**Количественный анализ экспрессии генов методом ПЦР-РВ.** Для проведения количественной ПЦР с детекцией в реальном времени (ПЦР-РВ) использовали CFX96 (BioRad, США) и 2,5x SYBR Green PCR Master Mix (Евроген, Россия) в соответствии с протоколом производителя, использованные праймеры и их последовательности приведены в таблице 2 текста диссертации. Для каждого анализа экспрессии гена использовали три биологических и три технических повтора. Условия ПЦР были следующими: денатурация 98°C, 30 с, отжиг 60°C, 30 с, синтез 72°C, 30 с; 40 циклов. Программное обеспечение BioRad CFX Manager (версия 3.1; Bio-Rad Laboratories Inc., США) использовалось для анализа данных

экспрессии ПЦР-РВ и для проведения анализа кривой плавления. Для определения оптимальных референсных генов (Czechowski *et al.*, 2005) для ПЦР-РВ применяли подход (Xie *et al.* 2012), основанный на использовании алгоритмов geNorm, Normfinder, BestKeeper, Delta-Ct (<https://www.heartcure.com.au/reffinder/>). Согласно полученным результатам, рейтинг RefFinder предполагает использование двух референсных генов - *AtSAND* (AT2G28390) и *AtPP2A* (AT1G13320) для арабидопсиса. Тепловые карты экспрессии были созданы с помощью <http://www.heatmapper.ca/tools>.

**Химический анализ вторичных метаболитов клеточных культур.** Все химические вещества, используемые для ВЭЖХ анализов, были аналитической чистоты. Образцы каллусной ткани сушили до постоянного веса в условиях вакуума (Concentrator plus, Eppendorf, Германия) при комнатной температуре в темноте. Материал двукратно экстрагировали в 70% (v/v) метаноле (2 мл на 100 мг сухой массы). Смесь гомогенизировали, обрабатывали ультразвуком в течение 20 минут и инкубировали 24 часа при комнатной температуре в темноте. Полученные экстракты центрифугировали в течение 10 минут при 15000 об/мин. Супернатант очищали с помощью нейлоновой мембраны 0,45 мкм (Millipore, США) и использовали для анализа. ВЭЖХ с МС и УФ-детектированием проводили с использованием аналитической системы 1260 Infinity (Agilent Technologies, США) с УФ детектором на диодной матрице и масс-спектрометром Bruker HCT ultra PTM Discovery System (Bruker Daltonik GmbH, Германия). Для разделения компонентов экстрактов использовали обращено-фазовую хроматографию на колонке Zorbax C18 (150 × 2,1 мм, 3,5 мкм, Agilent, США) при температуре 40°C. Детальное описание условий приведено в главе 2.5 материалы и методы текста диссертации. Определение содержания искомым компонентов проводили методом абсолютной градуировки с использованием стандартных образцов камалексина, глюкобрассицина, *транс*-резвератрола (Sigma-Aldrich, США) для построения калибровочных графиков.

**Статистика.** Все значения выражены как среднее значение ± стандартная ошибка с использованием программы Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США). Различия  $P < 0,05$  считалось значимым. Две независимые категории сравнивались с использованием *t*-критерия Стьюдента, сравнения между несколькими группами проводились с помощью ANOVA с последующим протоколом множественного сравнения. Для межгруппового сравнения использовали апостериорный критерий защищенного наименее значимого различия (PLSD) Фишера.

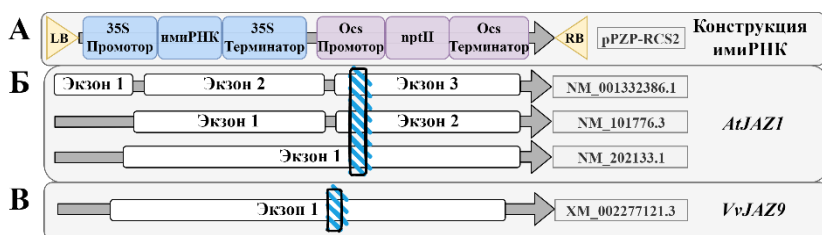
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Биоинформатический анализ гена *AtJAZ1* арабидопсиса и гена *VvJAZ9* винограда.** Был проведен филогенетический анализ аминокислотных последовательностей JAZ в двух исследуемых растениях, винограде и арабидопсисе, для поиска среди известных генов JAZ винограда ближайшего гомолога гена *JAZ1* арабидопсиса, полученные из баз данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>). Список генов дан в таблице 1 текста диссертации. Функции 12 генов *AtJAZ* арабидопсиса исследованы, среди них *AtJAZ1* является наиболее изученным в плане регуляции специализированного метаболизма растений. Было показано, что одной из целей JAZ-зависимой репрессии является биосинтез фитоалексинов (Song *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2018). Среди 11 генов *JAZ V*.

*vinifera VvJAZ9* и *VvJAZ4* – ближайшие гомологи *AtJAZ1* с гомологией 47% и 43%, соответственно. Поскольку, *VvJAZ9* является более близким гомологом *AtJAZ1*, данный ген был выбран для дальнейшей работы.

Анализ межбелковых взаимодействий выполнен в программном комплексе BioGRID (Oughtred *et al.*, 2021, <https://thebiogrid.org/>, v4.4). Было выявлено 48 белков, взаимодействующих в рамках первого порядка с белком *AtJAZ1*, внутри сети было найдено 119 взаимодействий. Взаимодействие с ключевым белком холодной акклимации ICE1 (Chinnusamy, 2003) является одним из наиболее интересных. Ранее было показано наличие физического взаимодействия между *AtJAZ1* и ICE1, и *AtJAZ1*-опосредованное снижение экспрессии генов, регулируемых ICE1 (Hu *et al.*, 2013). Таким образом, можно предположить, что ингибирование экспрессии гена *AtJAZ1* может повлиять на устойчивость к холоду. Также можно отметить и другие взаимодействия: EIN3, CO, NINJA, GAI, GL3, факторы группы MYB, которые связывают ЖК сигналинг с другими гормональными системами.

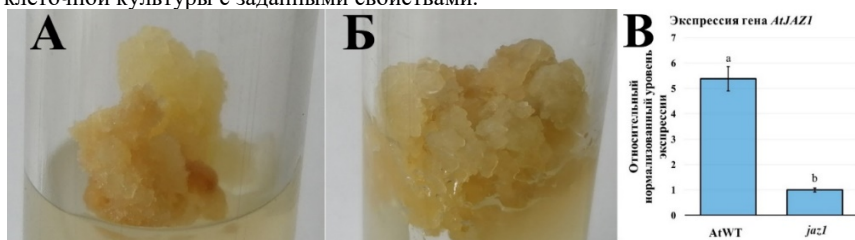
**Получение генетических конструкций и трансгенных культур клеток арабидопсиса и винограда.** Кассетный вектор, содержащий последовательность имиРНК (5'-UCGGCUGACGUGAGUUGCCU-3'), нацеленную на все 3 сплайсварианта гена *AtJAZ1*, был создан *in silico* в программе P-SAM. Генетическую конструкцию 35S-Промотор-имиРНК*AtJAZ1*-35S-Терминатор, полученную *in vitro* в соответствии с главой 2.2.1 материалы и методы диссертации, переносили в бинарный вектор pPZP-RCS2 (Рисунок 1). Бинарный вектор переносили в штамм *A. tumefaciens* ЕНА105 методом электропорации.



**Рисунок 1** – Генетическая конструкция и сайты таргетирования имиРНК, **А** – общая структура генетической конструкции, содержащей последовательность имиРНК, **Б** – структура мРНК гена *AtJAZ1* и его сплайс варианты, **В** – структура мРНК гена *VvJAZ9*. Синей штриховкой отмечены сайты мРНК, на которые нацелены имиРНК. Рядом с каждым геном указан идентификационный номер GenBank.

Контрольная клеточная культура арабидопсиса, обозначенная как *AtWT* (от англ. Wild Type), была получена ранее (Bulgakov *et al.*, 2012). Клеточную линию *AtWT* трансформировали посредством агробактериальной трансформации, с использованием полученного рекомбинантного штамма. После селекции на среде с добавлением канамицина (50 мг/л) в течение трех месяцев была получена стабильно растущая клеточная линия, обозначенная как *jaz1*. Обе культуры клеток имели сходную морфологию, цвет, консистенцию (Рисунок 2). Методом ПЦР-РВ было показано, что экспрессия гена *AtJAZ1* ниже более чем в пять раз в трансгенной линии

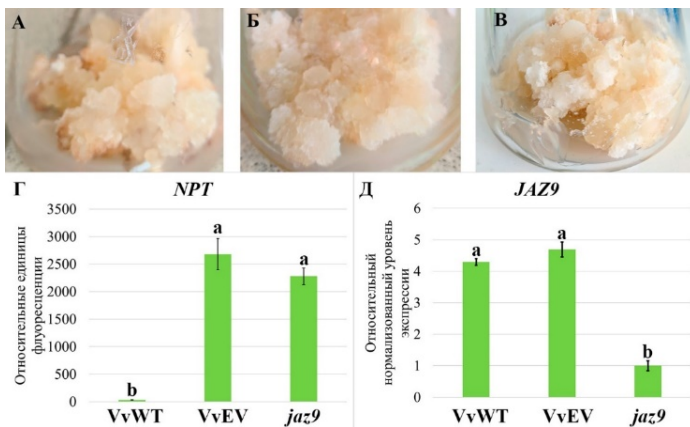
по сравнению с контрольной культурой, что говорит об успешном получении клеточной культуры с заданными свойствами.



**Рисунок 2** – Внешний вид клеточных культур. **А** – нетрансгенная клеточная культура AtWT. **Б** – трансгенная культура (*jaz1*), трансформированная полученной конструкцией. **В** – результат анализа экспрессии гена *AtJAZ1* методом ПЦР-РВ. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего (SEM). Различные буквы над планками погрешностей указывают на статистически значимые различия средних значений ( $P < 0,05$ , *t*-тест).

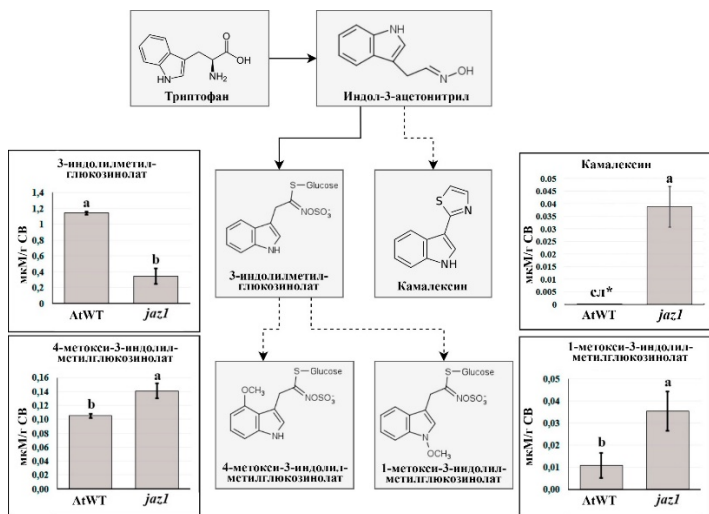
Генетическая конструкция, содержащая искусственную микро-РНК (5'-UGGGACUGGGGAGCUUCCCAA-3'), нацеленную на ген *VvJAZ9*, была аналогичным образом (Рисунок 1). Полученный вектор был перенесен в штамм ЕНА105 *A. tumefaciens*. Также вектор pPZP-RCS2 (содержащий только ген *nptII*) был перенесен в отдельный штамм ЕНА105 для получения культуры клеток винограда экспрессирующих только ген *nptII* для оценки эффекта трансформации. Саженьцы винограда (сорт Каберне-Совиньон) выращивали в контролируемых условиях в течение 6 месяцев. Листья стерилизовали, разрезали на экспланты 5 мм и помещали на гормон-содержащую среду MS. Первичный каллус рекультивировали и селектировали до получения контрольной клеточной линии, VvWT. Для получения трансгенной линии, экспланты кокультивировали с рекомбинантными штаммами *A. tumefaciens* ЕНА105 и селектировали в присутствии канамицина (50 мг/л) в течение 3-х месяцев. Была получена клеточная линия, обозначенная *jaz9*. Также была получена линия VvEV (от англ. EmpU Vector, пустой вектор), экспрессирующая только ген *nptII*. Клеточные линии винограда имели схожий внешний вид (Рисунок 3 А-В). Методом ПЦР-РВ было показано, что экспрессия гена *VvJAZ9* в 4,5 раза ниже в культуре *jaz9* по сравнению с культурой VvWT и трансгенной культурой VvEV (Рисунок 3Д). Успешная трансформация была подтверждена определением уровня экспрессии гена *nptII* методом ПЦР-РВ (Рисунок 3Г).

имиРНК-опосредованное ингибирование экспрессии гена *AtJAZ1* в культуре арабидопсиса и его гомолога *VvJAZ9* в культуре винограда обеспечило 4-5-ти кратное снижение экспрессии целевых генов. Таким образом, мы получили две независимые сравнимые системы на основе клеточных культур растений, реализующих различные метаболические пути, для дальнейшего анализа эффекта ингибирования генов семейства *JAZ* на биосинтез вторичных метаболитов.



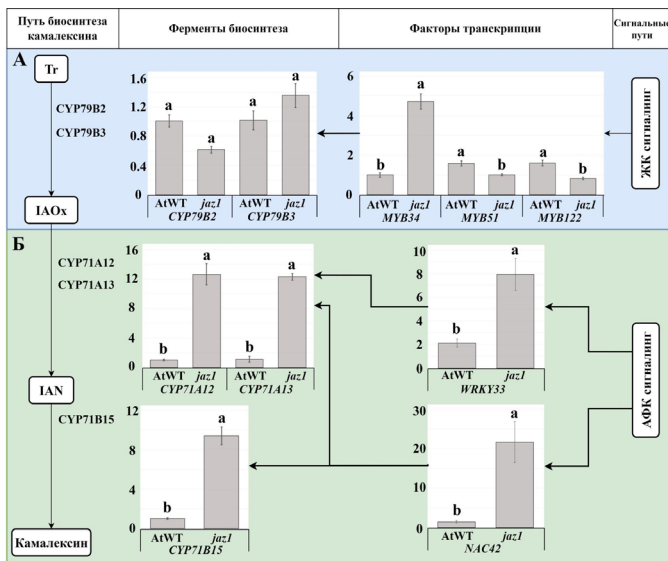
**Рисунок 3** – Контрольная и трансгенные клеточные линии винограда. **А, Б, В** – внешний вид клеточных культур: нетрансгенной линии VvWT и трансгенных, VvEV (трансформированной пустым вектором) и *jaz9* (*VvJAZ9*-ингибированной культуры), соответственно. Результаты анализа ПЦР-РВ: **Г** – относительный уровень экспрессии гена *nptII*, **Д** – сравнение экспрессии гена *VvJAZ9*. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Различные буквы над планками погрешностей указывают на статистически значимые различия средних значений ( $P < 0,05$ , LSD Фишера).

**Биосинтез азот-, серосодержащих вторичных метаболитов в клеточных культурах арабидопсиса.** Далее был проанализирован состав вторичных метаболитов в контрольной и трансгенной клеточных культурах арабидопсиса. Концентрация предшественника более активных метоксиформ глюкозинолатов, индол-3-илметилглюкозинолата, была снижена в 3,3 раза в трансгенной культуре по сравнению с контролем. Концентрация метоксиформ, 1-метоксииндол-3-илметилглюкозинолата и 4-метоксииндол-3-илметилглюкозинолата, напротив, увеличилась в трансгенной культуре в 2,8 и 1,2 раза по сравнению с контрольной культурой, соответственно (Рисунок 4). Основной фитоалексин арабидопсиса, камалексин, в контрольной культуре отсутствовал; в трансгенной культуре его концентрация составила 0,045 мкМ/мг сухого веса (Рисунок 4). Индекс роста трансгенной и контрольной культур статистически значимо не отличался, и составил для контрольной культуры  $5,9 \pm 0,53$ , для трансгенной  $5,79 \pm 0,42$ , значения даны как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Продуктивность камалексина для контрольной культуры невозможно определить, так как его содержание ниже уровня детекции прибора; для трансгенной культуры продуктивность составила  $27,65 \pm 2,32$  мкг/л среды, значения также даны как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего.



**Рисунок 4** – Влияние ингибирования экспрессии гена *AtJAZ1* на ЖК-регулируемый биосинтез производных триптофана. Показаны путь биосинтеза индольных глюкозинолатов и камалексина и их концентрации (мкМ/г СВ, сухой вес) в культурах *AtWT* (контрольная) и *jaz1* (трансгенная) в контрольных условиях. Сплошные линии представляют одну реакцию, пунктирная линия – несколько реакций. сл\* – следовые количества. Различные буквы над планками погрешностей указывают на статистически значимые различия средних значений ( $P < 0,05$ ,  $t$ -тест).

Основные факторы транскрипции, регулирующие путь камалексина, различались по экспрессии между контрольной и трансгенной культурами. Экспрессия гена *MYB34* была в 4,7 раза выше в трансгенной культуре; однако экспрессия генов *MYB51* и *MYB122* в контрольной культуре была достоверно выше, но не более, чем в 2 раза (Рисунок 5А). Данные *MYB* регулируют экспрессию генов ферментов верхнего порядка *CYP79B2/B3* (Frerigmann *et al.*, 2015). Уровни экспрессии этих ферментов существенно не изменились в клетках *jaz1* (Рисунок 5А). Экспрессия нижележащих ферментов *CYP71A12*, *CYP71A13* и *CYP71B15* резко увеличивалась в клетках *jaz1* по сравнению с *AtWT* (в 12, 12 и 8 раз соответственно) (Рисунок 5Б). Транскрипционные факторы *WRKY33* и *NAC42* вносят значительный вклад в регуляцию экспрессии генов ферментов биосинтеза двух конечных реакций. Будучи основным регулятором ответа на биотрофные патогены, *WRKY33* связан с передачей сигналов как салициловой кислоты, так и жасмоновой кислоты, и было показано, что он является негативным регулятором белков *JAZ*. (Saga *et al.*, 2012, Birkenbihl *et al.*, 2012). Экспрессия гена *WRKY33*, который регулирует экспрессию генов *CYP71A12* и *CYP71A13*, увеличилась в 8 раз. Экспрессия *NAC42*, который регулирует экспрессию генов *CYP71A12*, *CYP71A13* и *CYP71B15*, была увеличена более чем в 20 раз в клетках *jaz1* по сравнению с *AtWT* (Рисунок 5Б).



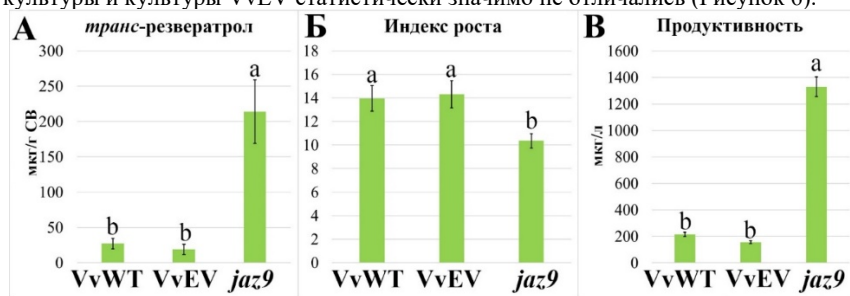
**Рисунок 5** – Анализ экспрессии генов ключевых ферментов биосинтеза камалексина и соответствующих факторов транскрипции. По оси Y всех гистограмм указано нормализованное кратное изменение относительной экспрессии в культурах AtWT (контрольная) и *jaz1* (трансгенная). **А** – восходящий путь, Тр – триптофан, IAOx – индол-3-ацетальдоксим, MYB34 / 51/122 – основные регулирующие ТФ ферментов первой ступени, CYP79B2 и CYP79B3; **Б** – нисходящий путь, IAN – индол-3-ацетонитрил; NAC42 и WRKY33 – ТФ, контролирующие последние стадии биосинтеза, катализируемые ферментами CYP71A12, CYP71A13 и CYP71B15. Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего. Различные буквы над планками погрешностей указывают на статистически значимые различия средних значений ( $P < 0,05$ , *t*-тест).

Анализ содержания фенилпропаноидных производных (флавоноидов и антоцианов) в клеточных культурах арабидопсиса показал их полное отсутствие (данные не приведены). Ранее было показано (Bulgakov *et al.*, 2016), что отсутствие фенольных соединений в клеточных культурах арабидопсиса связано с блокировкой экспрессии основного ТФ, регулирующего фенилпропаноидный путь, MYB11 (Pandey *et al.*, 2015). Кроме того, было показано, что агробактериальная трансформация пустым вектором не оказывает влияния на биосинтез камалексина и индольных глюкозинолатов (Bulgakov *et al.*, 2016). Таким образом, можно предположить, что ингибирование экспрессии гена *AtJAZ1* не способно повлиять на заблокированный в клеточных культурах фенилпропаноидный биосинтетический путь, и в данном аспекте необходимы исследования на растении.

При ингибировании экспрессии гена *AtJAZ1* мы не обнаружили значительного эффекта на рост клеточной культуры. Можно предположить, что *AtJAZ1* не принимает непосредственного участия в регуляции роста, что имеет немаловажное

значение в биоинженерии растений. Ранее было показано, что ингибирование различных групп генов *JAZ* в множественных мутантах арабидопсиса, в большинстве случаев приводило к ингибированию роста (Major *et al.*, 2017; Guo *et al.*, 2018; Major *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2021), индивидуальная роль в данном процессе *AtJAZ1* не была определена. Ингибирование экспрессии гена *AtJAZ1* повлияло на содержания камалексина и глюкозинолатов путем активации экспрессии транскрипционных факторов, регулирующих данный путь. Изменилась экспрессия не только генов группы *MYB*, но и *WRKY33* и *NAC42*, которые регулируются АФК-зависимой сигнальной системой. Полученные данные указывают на вовлеченность группы *JAZ* в процессы взаимодействия ЖК-зависимой и ЖК-независимых сигнальных систем.

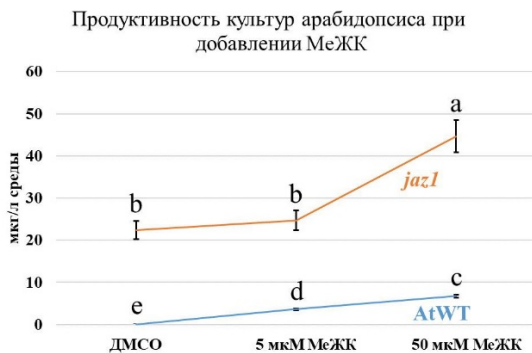
**Биосинтез *транс*-резвератрола в контрольной и трансгенных клеточных культурах винограда.** В течение последних десятилетий был достигнут значительный прогресс в изучении передачи сигналов жасмоновой кислоты на таких модельных растениях, как арабидопсис (Ghorbel *et al.*, 2021). Однако данная тема для многих других видов растений, включая виноград, остается слабо изученной. Мы исследовали содержание *транс*-резвератрола в полученных контрольной и трансгенных культурах (*jaz9*, VvEV) винограда методом ВЭЖХ. Ингибирование экспрессии гена *VvJAZ9* привело к увеличению содержания *транс*-резвератрола в трансгенной культуре *jaz9* (2,13 мг/г сухого веса) почти в 10 раз по сравнению с контрольной культурой (0,2 мг/г сухого веса). В трансгенной векторной культуре VvEV содержание *транс*-резвератрола статистически значимо не отличалось от нетрансгенной культуры клеток. Мы показали, что ингибирование экспрессии гена *VvJAZ9* приводит к снижению индекса роста на 26%. Несмотря на подавление роста, продуктивность линии трансгенных клеток была почти в 7 раз выше, чем у контрольной культуры. Продуктивность и индекс роста контрольной клеточной культуры и культуры VvEV статистически значимо не отличались (Рисунок 6).



**Рисунок 6** – Рост и содержание *транс*-резвератрола в контрольной VvWT и в трансгенных VvEV (трансформированная вектором pPZP) и *jaz9* (*VvJAZ9*-ингибированная) культурах. Сравнение содержания (мкг/г сухого веса) *транс*-резвератрола (А), индекса роста (Б) и продуктивности *транс*-резвератрола (В) в контрольной и трансгенных клеточных культурах. Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего. Различные буквы над планками погрешностей указывают на статистически значимые различия средних значений ( $P < 0,05$ , LSD Фишера).

Анализ эффекта ингибирования экспрессии гена *VvJAZ9* на биосинтетические показатели в культуре клеток винограда показал, что 5-ти кратное снижение экспрессии гена *VvJAZ9* приводит к активации биосинтеза *транс*-резвератрола в 10 раз. Однако, мы наблюдали негативный эффект на ростовые характеристики трансгенной культуры. На основе полученных данных, можно заключить, что *AtJAZ1* и его гомолог *VvJAZ9* играют важную роль в регуляции вторичного метаболизма. При этом ингибирование роста трансгенной культуры винограда было не критичное, учитывая отсутствие негативного влияния на рост в трансгенной культуре арабидопсиса, можно сделать заключение об отсутствии критического негативного влияния ингибирования экспрессии исследуемых генов *JAZ* на ростовые показатели культур при значительной активации вторичного метаболизма. Однако, чтобы делать выводы о роли данной группы *JAZ* в регуляции роста на уровне общей физиологии растений, необходимы дополнительные исследования.

**Влияние метилжасмоната на культуры арабидопсиса.** Были изучены ростовые характеристики и содержание камалексина в контрольной и трансгенной культурах арабидопсиса. В среду был добавлен метилжасмонат в концентрациях 5 мкМ и 50 мкМ. МеЖК в используемых концентрациях не оказал значительного влияния на рост клеточных культур, при этом мы наблюдали дозозависимое повышение содержания камалексина как в контрольной, так и в трансгенной клеточных линиях (Рисунок 7). Однако, уровень активации биосинтеза камалексина в контрольной культуре при высокой дозе МеЖК был почти в 4 раза ниже, чем в трансгенной культуре в контрольных условиях. Добавление 5 мкМ МеЖК не оказало значительного влияния на содержание камалексина в культуре *jaz1*, однако 50 мкМ МеЖК увеличивали продукцию камалексина в *jaz1* до 45 мкг/л.

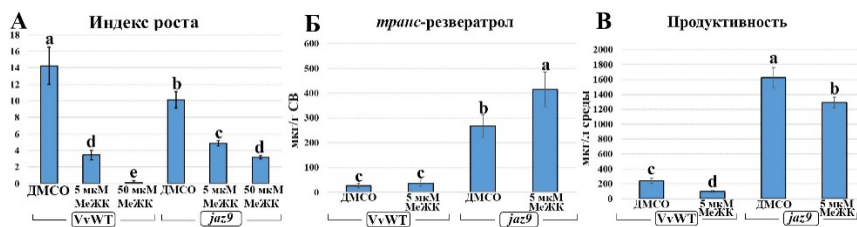


**Рисунок 7** – Влияние метилжасмоната (5 и 50 мкМ) на продукцию камалексина (мкг/л среды) в контрольной *AtWT* (синяя линия) и трансгенной *jaz1* (оранжевая линия) клеточных культурах. Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего. Различные буквы над планками погрешностей указывают на статистически значимые различия средних значений ( $P < 0.05$ , LSD Фишера).

**Влияние метилжасмоната на культуры винограда.** Было показано, что рост клеточных культур в присутствии МеЖК значительно изменился по сравнению с

контрольными условиями. Добавление МеЖК в концентрации 5 мкМ снизило рост контрольной культуры на 75%, трансгенной культуры на 53%. При увеличении концентрации МеЖК до 50 мкМ, рост контрольной культуры был полностью ингибирован. В случае трансгенной культуры, добавление 50 мкМ МеЖК ингибировало рост на 75% (Рисунок 8). Содержание *транс*-резвератрола анализировали в культурах, выращенных в присутствии 5 мкМ МеЖК ввиду нежизнеспособности контрольной культуры в присутствии 50 мкМ МеЖК. В контрольной культуре его содержание незначительно возросло. В трансгенной культуре (*jaz9*) его содержание возрастало до 410 мкг/г сухой массы, что выше, чем в контрольных условиях на 37% (Рисунок 8Б). Однако продуктивность культур снизилась, в виду ингибирования роста (Рисунок 8В).

Ранее было показано, что ингибирование группы *JAZ* генов *jaz1/jaz2/jaz5/jaz6* приводило к статистически значимому большей длине корня растения арабидопсиса при добавлении 5 мкМ метилжасмоната по сравнению с длиной корней контрольных растений. Ингибирование же других групп генов *JAZ* (с исключением *AtJAZ1* из группы) либо вызывало меньшие по длине по сравнению с контролем корни, либо неотличимые по длине (Liu *et al.*, 2021). Мы ингибировали экспрессию в клеточных культурах винограда самого близкого по гомологии гена, что говорит о возможной роли именно гомолога гена *AtJAZ1 – VvJAZ9* в данном эффекте. Однако, нельзя не отметить достоверные различия между эффектами исследуемых генов: ингибирование экспрессии гена *AtJAZ1* не оказало влияния на рост трансгенной культуры арабидопсиса, так же, как и экзогенный МеЖК на рост контрольной культуры; в то же время, ингибирование экспрессии гена *VvJAZ9* оказало незначительный, но достоверный ингибирующий эффект на рост трансгенной культуры винограда, так же, как и экзогенный МеЖК ингибировал рост контрольной культуры. Можно сделать вывод, что ожидаемые эффекты от манипуляций с регуляторными генами ЖК сигнальной системы зависят от объекта исследования – конкретного вида растения или от реализуемого биосинтетического пути.

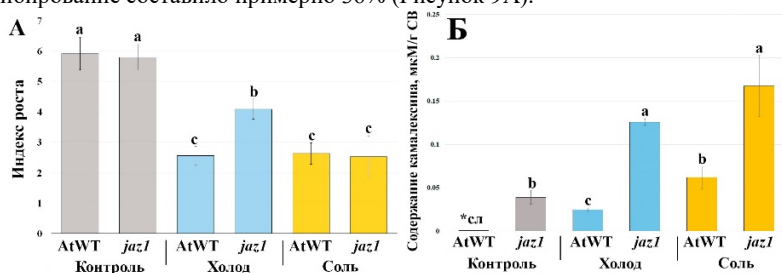


**Рисунок 8** – Сравнение индекса роста (А), содержания *транс*-резвератрола (Б) и продуктивности (В) VvWT (контрольная) и *jaz9* (трансгенной) культур, выращенных в присутствии 5 и 50 мкМ МеЖК. Различные буквы над планками погрешностей указывают на статистически значимые различия средних значений ( $P < 0,05$ , LSD Фишера).

**Влияние стрессовых условий (соль, холод) на рост и содержание камалексина в клеточных линиях арабидопсиса.** Увеличение содержания триптофана при воздействии стрессов в виде холода, соли и добавления абсцизовой

кислоты (Arif *et al.*, 2018) дает основание предполагать, что сигнальный путь абсцизовой кислоты и абиотического стресса могут быть вовлечены в биосинтез камалексина. Ранее было показано, что ЖК положительно регулирует сигнальный путь, связанный с общей устойчивостью к холоду (Hu *et al.*, 2017). Связь между сигнальным путем ЖК и солеустойчивостью была обнаружена в работе с *jaz3* мутантом (Geng *et al.*, 2013; Valenzuela *et al.*, 2016). Следовательно, мы предположили, что подавление экспрессии одного из репрессоров пути ЖК, гена *AtJAZ1*, может повлиять не только на биосинтез камалексина, но и изменить толерантность трансгенных клеток к холоду и/или соли.

В условиях холодового стресса (16°C в течение 14 дней) рост контрольной культуры был ингибирован на 46%, а трансгенной культуры – только на 22%. В условиях солевого стресса (60 мМ NaCl в течение 30 дней) достоверной разницы в индексе роста между контрольной и культурой клеток *jaz1* не обнаружено, ингибирование составило примерно 36% (Рисунок 9А).



**Рисунок 9** – Рост и содержание камалексина в клеточных культурах AtWT (контрольная) и *jaz1* (трансгенная) в стрессовых условиях. Индекс роста (А), концентрацию камалексина, мкМ/г СВ (Б) измеряли для культур AtWT и *jaz1*, выращиваемых в контрольных условиях (серые столбцы), 24°C в течение 3 недель; в условиях холода (синие столбцы), 24°C в течение 1 недели и 16°C в течение 2 недель; 60 мМ NaCl (оранжевые столбцы) в течение 3 недель. Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего. Различные буквы над планками погрешностей указывают на статистически значимые различия средних значений (P < 0,05, LSD Фишера). \*сл – обнаружены только следовые количества.

Мы проанализировали влияние холодового и солевого воздействий на биосинтез камалексина в трансгенной линии *jaz1* по сравнению с контрольной линией AtWT. Воздействие холода и соли индуцировало биосинтез камалексина в культуре AtWT, однако содержание камалексина было не выше, чем в трансгенной линии *jaz1* в контрольных условиях. Содержание камалексина в трансгенной культуре при стрессовых воздействиях было увеличено до 0,15 мкМ по сравнению с контрольными условиями (Рисунок 9Б). Принимая во внимание ингибирование роста, индуцированное холодом, продукция камалексина в контрольной культуре составляла 10 мкг/л, что составляет примерно треть от продуктивности камалексина в культуре *jaz1* (около 30 мкг/л) в контрольных условиях. Подавление роста культуры AtWT солевым стрессом было аналогично подавлению холодовым стрессом. Холодовой стресс увеличивал продукцию камалексина в культуре *jaz1*, и, учитывая устойчивость культуры трансгенных клеток к холодовому стрессу и, как

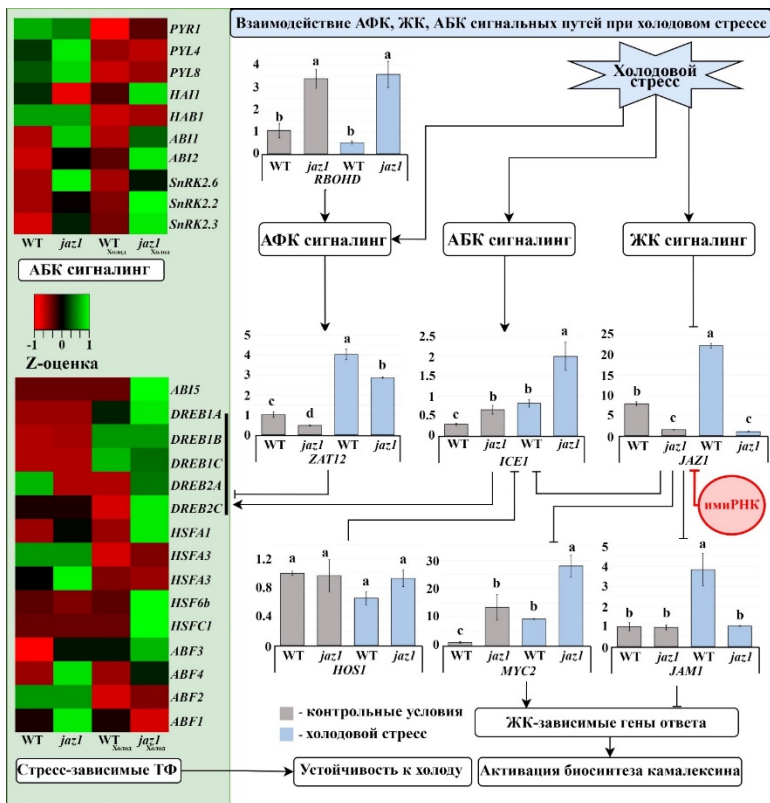
следствию, небольшому ингибированию роста, продукция камалексина увеличилась более чем в два раза (приблизительно 70 мкг/л). Однако ингибирование экспрессии гена *AtJAZ1* не изменило толерантность к солевому стрессу, тем самым при подавлении роста культур, изначально более высокий уровень содержания не отразился на повышении продуктивности, таким образом продукция камалексина в культуре *jaz1* при солевом стрессе увеличивалась до концентраций, наблюдаемых при холодовом стрессе (70 мкг/л).

Мы показали, что ингибирование экспрессии гена *AtJAZ1* может приводить к изменению устойчивости к холодовому стрессу, и одновременному увеличению содержания камалексина, тем самым значительно изменяя продуктивность культур. Несмотря на то, что обычно активация вторичного метаболизма при добавлении жасмоновой кислоты ведет к смещению баланса между ростом и вторичным метаболизмом в сторону второго, целевое ингибирование экспрессии одного из репрессоров пути жасмоновой кислоты способно увеличить продукцию и устойчивость к холоду клеточных культур, не влияя на ростовые характеристики.

**Молекулярный механизм JAZ-опосредованного взаимодействия ЖК, АБК и АФК сигнальных систем при холодовом стрессе.** Мы показали одновременную активацию биосинтеза камалексина и увеличенную устойчивость к холоду, вызванную ингибированием экспрессии гена *AtJAZ1* арабидопсиса. Более того, ингибирование экспрессии гена *AtJAZ1* удвоило индуцированное холодовым стрессом содержание камалексина. Для того, чтобы прояснить молекулярный механизм, мы изучили экспрессию ключевых генов, регулируемых сигнальными системами ЖК, АБК и сигналов АФК, а также генов, связанных с передачей сигналов холодового стресса в культурах клеток *AtWT* и *jaz1* в контрольных условиях и при воздействии холодового стресса (Рисунок 10).

Низкая температура приводила к увеличению экспрессии *AtJAZ1* в контрольной культуре, тогда как в трансгенной культуре уровень экспрессии *AtJAZ1* не изменялся и оставался на прежнем уровне. Под воздействием холода экспрессия генов факторов транскрипции JAZ1-мишеней *AtMYC2* и *AtJAM1* значительно снижалась и увеличивалась в культуре *AtWT*, соответственно. В культуре *jaz1* уровни экспрессии *MYC2*, главного активатора нижележащих генов-мишеней пути жасмоновой кислоты, были увеличены по сравнению с контрольной культурой как в контрольных, так и в холодных условиях. Экспрессия гена *AtJAM1*, являющегося антагонистом *AtMYC2*, была равна уровням контрольной культуры и не изменялась под воздействием холода в линии *jaz1*, в то время как в линии *AtWT* на холоде экспрессия *AtJAM1* увеличилась в 4 раза. (Рисунок 10).

Анализ экспрессии маркеров передачи сигналов АФК – генов *AtRBOHD* и *AtZAT12*, показал возможные взаимодействия между *AtJAZ1* и передачей сигналов АФК. Мы показали, что экспрессия *AtRBOHD* в клетках культуры *jaz1* стабильно увеличивалась более чем в 3 раза по сравнению с контрольной. Продолжительное воздействие холода не влияло на экспрессию *AtRBOHD* ни в контрольной, ни в трансгенных клеточных линиях (Рисунок 10). Уровень экспрессии негативного регулятора СBF-зависимого пути – *AtZAT12*, увеличивались как в контрольной, так и в трансгенной культурах при холодовом стрессе, но уровень его экспрессии был значительно выше у контрольной культуры по сравнению с культурой *jaz1* (Рисунок 10).



**Рисунок 10** – Анализ экспрессии генов в клеточных культурах AtWT (контрольная) и *jaz1* (трансгенная) в контрольных условиях и при холодом стрессе. Левая панель: тепловые карты, полученные на основе ПЦР-РВ-анализа экспрессии генов АБК сигналинга (рецепторы, фосфатазы, киназы) и основных стресс-зависимых ТФ (группы *DREB*, *HSF*, *ABF*); правая панель: анализ экспрессии генов, связанных с устойчивостью к холодом стрессу и передачей сигналов АБК (*ICE1* и *HOS1*), АФК (*RBOHD* и *ZAT12*) и пути ЖК (*JAZ1*, *MYC2* и *JAM1*). Красный овал (ими-РНК) показывает на схеме мишень РНК-ингибирования, *AtJAZ1*. На вертикальной оси всех гистограмм обозначена нормализованная относительная экспрессия гена. Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего. Различные буквы над планками погрешностей указывают на статистически значимые различия средних значений ( $P < 0,05$ , LSD Фишера).

Оценить роль *AtJAZ1* при холодом стрессе невозможно без анализа другого важнейшего гормона растений – абсцизовой кислоты. Было показано что, экспрессия ключевого фактора транскрипции при холодом стрессе *AtICE1* была выше в культуре *jaz1* по сравнению с AtWT (Рисунок 10). Под действием

пониженных температур уровень экспрессии гена *AtICE1*, и одновременное действие, и холода, и ингибирования *AtJAZ1* вызывало аддитивный эффект. Экспрессия гена *AtHOS1*, репрессора *AtICE1*, была одинаковой в обеих культурах и не изменялась при воздействии холода. Гены такие как, *AtABF1*, *AtABF3* и *AtABF4* (но не *AtABF2* и *AtABI5*), были активированы (Рисунок 10). Однако в контрольных условиях ни один из генов CBF/DREB не был активирован в линиях *jaz1*, ни генов, ответственных за термотолерантность (таких как *AtDREB2A* и *AtDREB2C*), ни генов, ответственных за устойчивость к холоду (*DREB1*). В то же время воздействие холодом, в соответствии с предыдущими результатами (Hu *et al.*, 2013), активировало гены холодоустойчивости *DREB1B*, *DREB1C*, *DREB1A* (Рисунок 10).

Мы также изучили экспрессию генов, кодирующих рецепторы PYR/PYL/RCAR абсцизового сигналинга, протеинфосфатазы 2С (PP2C), такие как *HAI1*, *HAB1*, *ABI1* и *ABI2*. Экспрессия гена рецептора *AtPYL* практически не изменилась в линиях *jaz1*. Экспрессия генов протеинфосфатаз PP2Cs была различной: *AtABI1* и *AtABI2* активировались в клеточных культурах *jaz1*, в то время как *AtHAI1* подавлялась. Экспрессия гена *AtHAB1* не изменилась. Невозможно функционально различить *ABI1/ABI2* и *HAI1* на уровне их молекулярных взаимодействий (Tischer *et al.*, 2017). Однако существует функциональное различие, заключающееся в том, что *AtHAI1* участвует в АБК-независимой передаче сигналов, связанной с устойчивостью к засухе (Bhaskara *et al.*, 2012). При этом было показано увеличение экспрессии генов регуляторов *AtICE1* – киназ группы *SnRK* при воздействии холода в трансгенной культуре. Гены *AtHSFA1*, *AtHSFC1* и *AtHSFA6b* экспрессировались в трансгенной культуре аналогично контрольной культуре; в условиях холодового стресса не наблюдалось значительного изменения в контрольной культуре *AtWT*, тогда как в трансгенной культуре уровень экспрессии значительно повышался. Экспрессия генов *AtHSFA2* и *AtHSFA3* была снижена в холодных условиях в трансгенной культуре, но ее уровень отличался в контрольных условиях; в контрольной культуре уровень экспрессии гена *AtHSFA3* был выше, чем в трансгенной линии, а *AtHSFA2* – выше в трансгенной линии (Рисунок 10).

Ингибирование экспрессии гена *AtJAZ1* не только имитирует патоген-индуцированную ЖК-зависимую активацию вторичного метаболизма, но и позволяет модулировать акклимацию к холоду. ЖК не является непосредственным регулятором устойчивости к холоду, однако играет в данном процессе немаловажную роль, тесно взаимодействуя посредством ТФ, в том числе и репрессоров семейства *JAZ*, с ключевыми при холодовом стрессе сигнальными системами, АФК (взаимосвязанную с кальциевой сигнальной системой) и АБК (Sinha *et al.*, 2015). Молекулярный анализ показал, что индивидуальное ингибирование экспрессии гена *AtJAZ1* положительно влияет на экспрессию генов, ответственных за акклимацию именно к холоду – киназы группы *SnRK*, *DREB1A*, *ABI5* (АБК регуляция), *ICE1* (АФК и АБК регуляция). Исходя из полученных данных, можно сделать заключение, что мишеней для непосредственной или опосредованной репрессии *JAZ* вне ЖК-сигнальной системы значительно больше, чем известно на данный момент. На данном этапе, можно заключить, что ингибирование экспрессии гена *AtJAZ1* (как и его гомологов) не только позволяет получить продуктивную клеточную культуру, но и является перспективным инструментом для модуляции холодовой устойчивости растений.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получение ценных метаболитов растительного происхождения на основе клеточных культур-суперпродуцентов становится все более актуальным и перспективным направлением в области биотехнологии растений, в связи с ухудшением экологической обстановки и общемировой тенденцией к максимальному сохранению природных ресурсов и биоразнообразия (Eibl *et al.*, 2018; Агуа *et al.*, 2020). Низкая продуктивность клеточных культур является основной проблемой в данном направлении. Современные требования к инструментам биоинженерии растений подразумевают высокий активаторный эффект на биосинтез интересующих соединений без ущерба ростовым характеристикам клеточных культур (Krasteva *et al.*, 2020). Практическое применение генно-инженерных подходов для оптимизации продуктивности клеточных культур как ресурсов для пищевой, фармакологической и косметической промышленности ограничено общемировыми требованиями к применяемым подходам (Krasteva *et al.*, 2020). Таким образом поиск генов, кодирующих супрессионные регуляторные белки, является наиболее актуальным и перспективным направлением в области исследований биотехнологии растительных клеточных культур-продуцентов, соответствующим современным тенденциям и требованиям, а также возможностям геномного редактирования.

В представленной работе мы впервые показали, что ингибирование экспрессии гена *AtJAZ1* в клеточной культуре *A. thaliana* приводит к активации биосинтеза азот-, серосодержащих соединений, не ингибируя накопление биомассы трансгенной культуры (Makhazen *et al.*, 2021a). Для подтверждения полученного эффекта, была проведена работа по ингибированию экспрессии ближайшего гомолога гена *AtJAZ1* – гена *VvJAZ9* винограда в клеточной культуре *V. vinifera*. Впервые было показано, что данный подход позволяет также увеличить содержание *транс*-резвератрола, который продуцируется в фенилпропаноидном пути биосинтеза, отличным от пути биосинтеза камалексина (Makhazen *et al.*, 2021b). Высокая научная значимость полученного и подтвержденного эффекта заключается в возможности использования научных данных о репрессорных механизмах, перспективных в качестве таргетных генов для геномного редактирования с целью активации биосинтеза ценных растительных соединений. Применение таких биоинженерных подходов позволит получить альтернативные ресурсы для практического применения с учетом современных требований к качеству ресурса.

Помимо подтверждения действия ингибирования экспрессии репрессорных генов семейства *JAZ* на биосинтез камалексина, глюкозинолатов и *транс*-резвератрола, был проведен комплексный анализ молекулярного механизма полученного эффекта. Мы показали, что ингибирование экспрессии генов *JAZ* имитирует действие сигнальной системы ЖК, что обеспечивает активацию биосинтеза фитоалексинов (Makhazen *et al.*, 2021a). Так же, как это происходит в растении в ответ на стрессовое воздействие, главным образом, атаку некротрофных патогенов. Однако, искусственная активация ЖК сигнального пути протекает без значительного ингибирования роста, характерного для природного ЖК-опосредованного ответа. Помимо ЖК-зависимого ответа на некротрофный патогенез, фитоалексины вырабатываются так же в ответ на абиотические стрессовые воздействия. Мы показали, что ингибирование экспрессии гена *AtJAZ1*

в клеточных культурах арабидопсиса усиливает активаторные действия абиотических стрессов (соль, холод) на биосинтез камалексина. Кроме того, было показано, что ингибирование гена *AtJAZ1* обеспечивает толерантность клеточной культуры к холодному стрессу, что способствует увеличению продуктивности камалексина за счет слабого ингибирующего действия низких температур на рост трансгенной культуры по сравнению с контрольной. Обнаруженный эффект является перспективным направлением для исследований генов группы JAZ как мишеней для биоинженерного получения холодоустойчивых растений. Анализ экспрессии маркерных стрессовых генов показал, что ингибирование экспрессии *JAZ* генов изменяет конститутивную и индуцибельную экспрессию ключевых генов ответа на стрессовые воздействия: *ICE1*, *MYC2*, *ZAT12*, группы генов *DREB*, *HSF*, *ABF*, что обеспечивает увеличение продуктивности трансгенной культуры при воздействии холода за счёт активации вторичного метаболизма и снижения отрицательного воздействия холода на рост культуры через взаимодействие сигнальных путей АБК, ЖК и АФК (Makhazen *et al.*, 2021a).

Таким образом, ингибирование экспрессии генов *JAZ* является перспективным универсальным биотехнологическим инструментом для активации биосинтеза фенилпропаноидных производных и азот-, серосодержащих соединений, обладающих фармакологическими свойствами, с целью получения рентабельных альтернативных источников на основе высокопродуктивных клеточных культур растений.

## ВЫВОДЫ

1. Ингибирование экспрессии гена *AtJAZ1* посредством РНК-интерференции в клеточной культуре *A. thaliana* приводит к активации биосинтеза азот-, серосодержащих соединений, не ингибируя накопление биомассы трансгенной культуры. Содержание метоксиглюкозинолатов увеличивается до трех раз по сравнению с контрольной культурой; содержание камалексина достигает 9 мкг/г сухого веса при недетектируемом уровне в контрольной культуре.

2. Ингибирование экспрессии гена *VvJAZ9* (ближайшего гомолога гена *AtJAZ1* арабидопсиса) в клеточной культуре *V. vinifera* приводит увеличению содержания *транс*-резвератрола в десять раз по сравнению с контрольной клеточной культурой; при этом продуктивность трансгенной клеточной культуры в 7 раз выше по сравнению с контрольной клеточной культурой, учитывая снижение индекса роста трансгенной культуры клеток.

3. Ингибирование экспрессии генов *AtJAZ1* и его гомолога *VvJAZ9* в клеточных культурах арабидопсиса и винограда, соответственно, имитирует действие сигнальной системы ЖК, что обеспечивает активацию биосинтеза фитоалексинов. Однако, искусственная активация ЖК сигнального пути протекает без значительного ингибирования роста, характерного для природного жасмонатопосредованного ответа.

4. Ингибирование экспрессии гена *AtJAZ1* в клеточной культуре арабидопсиса усиливает активаторные действия абиотических стрессов (соль, холод) на биосинтез камалексина. В стрессовых условиях в трансгенной культуре увеличивается продуктивность камалексина до 68 мкг/л, что в 3-7 раз больше, чем в контрольной культуре.

5. Ингибирование экспрессии гена *AtJAZ1* обеспечивает устойчивость клеточной культуры к холодовому стрессу, что способствует увеличению продуктивности камалексина за счет слабого ингибирующего действия низких температур на рост трансгенной культуры по сравнению с контрольной. Обнаруженный эффект является перспективным направлением для биоинженерного получения холодоустойчивых растений.

6. Ингибирование экспрессии гена *AtJAZ1* изменяет конститутивную и индуцибельную экспрессию ключевых генов ответа на стрессовые воздействия: *ICE1*, *MYC2*, *ZAT12*, группы генов *DREB*, *HSF*, *ABF*, что обеспечивает увеличение продуктивности трансгенной культуры при воздействии холода за счёт активации вторичного метаболизма и снижения отрицательного воздействия холода на рост культуры через взаимодействие сигнальных путей АБК, ЖК и АФК.

7. Ингибирование экспрессии генов *JAZ* является перспективным универсальным биотехнологическим инструментом для активации биосинтеза фенилпропаноидных производных и азот-, серосодержащих соединений, обладающих фармакологическими свойствами, с целью получения рентабельных альтернативных источников на основе высокопродуктивных клеточных культур растений.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

**Статьи, опубликованные в ведущих рецензируемых научных журналах из списка ВАК РФ:**

1) **Makhazen D. S.** Inhibition of the *JAZ1* gene causes activation of camalexin biosynthesis in Arabidopsis callus cultures / D. S. Makhazen, G. N. Veremeichik, Y. N. Shkryl [et al.] // Journal of Biotechnology. – 2021. – Vol. 342. – P. 102-113.

2) **Makhazen D. S.** RNA inhibition of the *JAZ9* gene increases the production of resveratrol in grape cell cultures / D. S. Makhazen, G. N. Veremeichik, Y. N. Shkryl [et al.] // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2021. – Vol. 147. – № 3. – P. 611-618.

**Статья, опубликованная в прочих изданиях:**

3) **Махазен Д.С.** Новый способ активации вторичного метаболизма в растительных клетках за счет ингибирования экспрессии генов *JAZ* с помощью РНК-интерференции / Д. С. Махазен // Вестник Дальневосточного отделения Российской академии наук. – 2017. – №. 4 (194).

**Работы, опубликованные в материалах всероссийской и международной научных конференциях:**

4) **Махазен Д.С., Шкрыль Ю.Н., Булгаков В.П.** Новый способ активации вторичного метаболизма в растительных клетках за счет ингибирования экспрессии генов *JAZ* с помощью РНК интерференции // XVI Всероссийская молодежная школа-конференция памяти В.Е. Васьяковского г. Владивосток 2017

5) **Махазен Д.С., Дегтяренко А.И., Григорчук В.П., Чернодед Г.К., Шкрыль Ю.Н., Булгаков В.П.** Влияние ингибирования экспрессии гена *AtJAZ1* на биосинтез вторичных метаболитов и стрессоустойчивость трансгенных культур арабидопсиса // Международная научно-практическая конференция «Вопросы современных научных исследований» г. Омск 2019

МАХАЗЕН ДМИТРИЙ СЕРГЕЕВИЧ

**Регуляция генов семейства *JAZ* посредством РНК-интерференции как инструмент активации вторичного метаболизма в клеточных культурах растений**

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук