

УДК 576.3/7.086.83:58

Вариабельность по экспрессии *GFP*-гена в моноклональных клеточных линиях *Arabidopsis thaliana*

© 2019 Т.В. МАРЕНКОВА^{1,*}, Ю.В. СИДОРЧУК¹, А.В. НОСОВ^{1,2}, А.А. ФОМЕНКОВ^{1,2}, В.В. КУЗНЕЦОВ¹, С.Р. МУРСАЛИМОВ¹, А.А. ЗАГОРСКАЯ¹, Е.А. УВАРОВА¹, П.А. БЕЛАВИН¹, Е.В. ДЕЙНЕКО¹

¹ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск 63090

²ФГБНУ «Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук», Москва 127276

*e-mail: marenkova@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 23.10.2018 г.

После доработки 23.11.2018 г.

Принята к публикации 15.01.2019 г.

Создана серия трансгенных моноклональных клеточных линий *Arabidopsis thaliana*, полученных в результате отбора при агробактериальной трансформации отдельных клеток (клеточных агрегатов) со случайными событиями интеграции *GFP*-гена. Выход рекомбинантного GFP-белка в созданных клеточных линиях составил от 0,06 до 2,37 % от общего растворимого белка. Выделено три линии с максимально высоким, около 2% от общего растворимого белка, накоплением целевого GFP-белка. Определены районы встраивания инсерций Т-ДНК в растительный геном для 12 моноклональных клеточных линий. Вариабельность по накоплению рекомбинантного GFP-белка среди исследуемых 21 клеточной линии может послужить в качестве референсных значений при геномном редактировании *A. thaliana* с применением технологии CRISPR/Cas9, направленном на повышение синтеза рекомбинантных белков в растительных системах экспрессии. Линии с максимально высоким уровнем накопления рекомбинантного белка в дальнейшем представляют интерес для выявления и детальной характеристики сайтов интеграции трансгена. Такие сайты могут быть использованы в качестве мишеней для целевой интеграции генов при создании линий-биопродуцентов рекомбинантных белков.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, суспензионная клеточная культура, агробактериальная трансформация, экспрессия гена, Green fluorescent protein

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-1-58-67

Суспензионные культуры клеток высших растений – это уникальная природная лаборатория, которая позволяет на клеточном уровне не только исследовать различные аспекты физиологии и биохимии растений, но и с использованием технологий генной инженерии получать различные рекомбинантные белки. Перспективность культур растительных клеток в качестве экспрессионной платформы стала очевидной после появления на рынке α -талиглуцеразы (taliglucerase alfa), син-

тезированной клетками моркови в биореакторах Pfizer (США). К настоящему времени для наработки рекомбинантных белков используются клеточные линии табака ВУ-2 [1], моркови [2] и др. Несмотря на успешное использование суспензионных клеточных культур растений для фундаментальных исследований и коммерческого получения фармацевтических белков, все еще важной проблемой остается невысокий выход рекомбинантных белков.

Список сокращений: ОРБ – общий растворимый белок; ОТ-ПЦР - полимеразная цепная реакция с использованием обратной транскрипции; GFP – Green Fluorescent Protein; SH – среда Шенка-Хильдебрандта.

Повышение выхода целевого белка в культуре клеток высших растений, как правило, решается отбором клеточных линий с наиболее «благоприятными» событиями интеграции трансгена в реципиентный геном, поскольку классические методы интеграции чужеродной ДНК приводят к встраиванию целевого гена в случайные районы генома-реципиента. Области генома растений существенно различаются по своей транскрипционной активности от высокоактивных (эухроматин) до практически «молчащих» (гетерохроматин). В связи с этим в трансгенных линиях наблюдается значительная вариабельность по уровню и стабильности экспрессии трансгенов. Многочисленные данные по вариабельности экспрессии чужеродных генов у трансгенных растений [3, 4] и растительных клеток *in vitro* [5, 6] указывают на то, что случайное попадание трансгена в транскрипционно активный участок генома может обеспечить его высокую и стабильную экспрессию. Это могут быть районы расположения генов «домашнего хозяйства», например ядрышкового организатора, гистоновых генов и др. Именно эти области становятся привлекательными в биотехнологии для использования технологий геномного редактирования CRISPR/Cas9 и получения высокопродуктивных биопродуктов.

При использовании подходов направленной интеграции целевых генов в район расположения какого-либо из генов «домашнего хозяйства» важно экспериментально оценить вклад именно этого района в уровень экспрессии и выход рекомбинантного белка по сравнению со случайными событиями интеграции трансгена.

В связи с этим целью данного исследования является оценка вариабельности по накоплению рекомбинантного белка GFP в клеточных линиях *Arabidopsis thaliana* со случайными событиями интеграции *GFP*-гена, кодирующего зеленый флуоресцентный белок. Выявленный диапазон значений по выходу рекомбинантного белка в клеточных линиях *A. thaliana* в дальнейшем может служить в качестве референсных данных при выполнении работ по направленной интеграции гена в районы расположения генов «домашнего хозяйства».

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Генетическая трансформация культуры клеток *A. thaliana* и получение моноклональных клеточных линий

Генетически модифицированные клеточные линии были получены методом агробактериальной трансформации на основе суспензионной культуры

A. thaliana (L.) Heynh. (экотип Columbia, инбредная линия Col-0), полученной Носовым А.В. и Фоменковым А.А., штамм суспензионной культуры клеток *A. thaliana* депонирован во Всероссийской коллекции культур клеток высших растений (ВКККР, <http://www.ippras.ru/cfc/alccmp/>) под № 85 и названием NFC-0. Культуру клеток поддерживали *in vitro* на среде Шенка-Хильдебрандта (SH) [7] с добавлением фитогормонов (1 мг/л 2,4-Д и 0,1 мг/л кинетин). Т-область плазмиды pCAMBIA_GFP, использованная для трансформации суспензионной культуры, включала кассету экспрессии: промотор 35S РНК CaMV, целевой ген *GFP* (кодирует белок EGFP, Enhanced Green Fluorescent Protein), терминатор гена нопалинсинтазы Ti-плазмиды *Agrobacterium tumefaciens* (tNOS1) и маркерный ген *hptII* (кодирует гигромицинофосфотрансферазу II, обеспечивающую устойчивость к гигромицину) под управлением промотора 35S РНК CaMV.

Агробактериальную трансформацию проводили по ранее описанной методике [8]. Генетически модифицированные клеточные линии *A. thaliana* культивировали на среде SH с антибиотиками (гигромицин 5 мг/л и меропенем 25 мг/л).

Моноклональные клеточные линии получали методом плейтинга исходных клеточных суспензий. На чашки Петри со средой SH с антибиотиками высевали разведенные культуральной средой клеточные суспензии (на 4-й день культивирования) и наращивали микрокалусы из отдельных клеток/клеточных агрегатов. Для каждой из 21 исходных клеточных линий было отобрано по 10 моноклональных калусов, и один наиболее перспективный по результатам цитологического анализа калус вводился в суспензионную культуру для дальнейших исследований.

Цитологический анализ клеток трансгенной суспензионной культуры *A. thaliana*

Первичный цитологический анализ исходных трансформированных линий проводили, разделением их на две группы и оценивая соотношения флуоресцирующих (GFP^+) и несветящихся (GFP^-) клеток/клеточных агрегатов. В первую группу были отнесены суспензии, в которых все клетки/клеточные агрегаты проявляли интенсивную GFP-флуоресценцию, во вторую группу – клеточные культуры, у которых среди GFP^+ клеток/агрегатов с высокой и средней интенсивностью флуоресценции, встречались GFP^- клетки/агрегаты. Моноклональные клеточные линии оценивались по соотношению GFP^+ и GFP^- клеток/агрегатов, по интенсивности флуоресценции и морфологии

агрегатов. Для того чтобы отличить живые клетки/агрегаты от погибших, анализируемые клеточные культуры подкрашивали трипановым синим. В работе применяли методы световой и флуоресцентной микроскопии с использованием микроскопа Axioskop 2 plus (Zeiss, Германия) с цифровой камерой Axio-Cam ERc 5S (Zeiss, Германия) и блоком фильтров 10 (Ex BP 450–490, Em BP 515–565) для GFP (Zeiss). Изображения обрабатывали в программе AxioVision 4.8.

Характеристика роста и анализ протопластов, полученных из клеток трансгенных клеточных линий

Ростовые характеристики оценивали на примере исходных клеточных линий №1 и №6, культивируемых на среде SH с добавлением антибиотиков гигромицина (5 мг/л) и меропенема (25 мг/л). В течение первых трех пассажей в среду добавляли оба антибиотика, а с 4-го по 6-й пассажи только меропенем. Начиная с 6-го пассажа, клетки культивировали без антибиотиков. Пассирование проводили через каждые 10 дней, инокулировали 1 мл клеточной культуры в 25 мл свежей SH-среды. Индексы роста (*I*) клеточных культур на 10-й день культивирования рассчитывали по разнице между конечной и начальной сухой массой, отнесенной к начальной сухой массе клеток. Все эксперименты выполнены в 3-кратной повторности. Число клеток оценивали по числу протопластов. Протопласты получали по ранее описанной методике [9]. Клеточные ядра окрашивали DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол, «Sigma-Aldrich»). В работе использовали проточный цитометр Gallios (Beckman Coulter, США), регистрацию флуоресценции GFP проводили в канале FL1 (лех 488 нм, лем 505–545 нм), DAPI – в канале FL9 (лех 405 нм, лем 430–470 нм). Данные анализировали в программе FlowJo 7.6.2. Также использовали микроскоп Axio Imager Z2 (Zeiss, Германия) с цифровой камерой Axio-Cam MR и блоками фильтров: 44 (Ex BP 475/40; Em BP 530/50) для GFP; 02 (Ex G365; Em LP420) для DAPI. Изображения обрабатывали в программе AxioVision 4.8.

Определение числа копий *GFP*-гена методом мультиплексной ПЦР в реальном времени

Число копий *GFP*-гена в генетически модифицированных клеточных линиях *A. thaliana* оценивали на основе мультиплексной ПЦР в реальном времени. Праймеры и TaqMan-зонды на разные участки встраиваемой конструкции, а также на референсный ген *A. thaliana* *PARP2* приведены

в табл. S1 (дополнительный материал). Реакцию проводили на амплификаторе Bio-Rad CFX96 (США) по программе: 95 °С, 5 мин; 40 циклов – [95 °С, 10 с; 60 °С, 20 с]. Результаты обсчитывали в программе CFX Manager 3.1 (Bio-Rad) по методике $\Delta\Delta C_t$ [10] против однокопийного трансгенного растения, охарактеризованного ранее методом блот-гибридизации по Саузерну [11].

Определение областей растительной ДНК, прилежащих к Т-ДНК-инсерциям методом инвертированной ПЦР

Последовательности растительной ДНК, в которые встраивались Т-ДНК-инсерции, определяли методом инвертированной ПЦР [12]. Геномную ДНК трансгенных линий выделяли с помощью СТАБ-осаждающего буфера [13] и 300 нг подвергали гидролизу одной из эндонуклеаз *TaqI* или *MspI*, или *HindIII*. Первый раунд ПЦР-реакции проводили с праймерами 1Lup/1Llow для левой границы Т-ДНК и 1Rup/1Rlow для правой границы (табл. S2, дополнительный материал). 1/10 объема полученной после 1-го раунда амплификационной смеси использовали для проведения 2-го раунда ПЦР-реакции с вложенными праймерами 2Lup/2Llow для левой границы и 2Rup/2Rlow для правой границы (табл. S2, дополнительный материал). Реакцию проводили по программе: 1 цикл – [3 мин при 94 °С; 1 мин при 50 °С; 3 мин при 72 °С,] и 34 цикла – [1 мин при 94 °С; 1 мин при 58 °С; 3 мин при 72 °С]. Анализ продуктов амплификации проводили в 1%-ном агарозном геле, фрагменты разной длины вырезали, выделяли из геля и использовали в качестве матриц для реамплификации со вложенными праймерами. Программа реамплификации включала: 1 цикл – [3 мин при 95 °С; 1 мин при 58 °С; 2 мин при 72 °С] и 34 цикла – [1 мин при 94 °С; 1 мин при 62 °С; 2 мин при 72 °С] – 72 °С, 5 мин. ПЦР-продукты реамплификации выделяли из агарозного геля, очищали и использовали для реакции секвенирования («Евроген», Россия). Результаты секвенирования ПЦР-фрагментов обрабатывали в программе BLAST [14].

Анализ экспрессии *GFP*-гена и накопления белка GFP

Тотальную РНК выделяли из биомассы клеточных линий с помощью реагента ExtractRNA (Евроген), РНК обрабатывали DNase I (Thermo Scientific) и 4 мкг РНК брали для получения кДНК, используя комплект реактивов Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit.

Анализ экспрессии *GFP*-гена проводили при помощи ПЦР в реальном времени на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad) с праймерами и зондами *GFP_f*, *GFP_r*, *GFP_p* (табл. S1, дополнительный материал). Программа амплификации включала: 3 мин при 95 °С, затем 40 циклов с детекцией на стадии отжига: [10 с при 95 °С; 20 с при 61 °С]. Обработка данных проводилась с помощью программы Bio-Rad CFX Manager 3.1.

Накопление *GFP*-белка в клеточных линиях оценивали в 300 мг биомассы каждого образца суспензионных культур клеток на 7-й день культивирования. Клетки растирали в жидком азоте, добавляли 500 мкл экстракционного буфера (1×PBS: 10 mM фосфат натрия, 2,7 mM хлорид калия, 137 mM хлорид натрия, 1,76 mM фосфат калия, pH 7,4). Интенсивность флуоресценции экстрактов определяли на спектрофотометре VICTOR Multilabel Plate Reader 1420 (Perkin Elmer Inc., USA), при длине волны 485/535нм. Для калибровки использовали стандартный раствор *GFP* (rTurboGFP, Evrogen, 1 мг/мл). Для нормирования образцов по накоплению *GFP* белка определяли количество общего белка в экстрактах по методу М. Бредфорд на спектрофотометре SmartSpec™ Plus Spectrophotometer (Bio-Rad).

Измерения проводили в 3–5 биологических повторностях. Для выявления различий между группами применяли непараметрический дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса (программный пакет Statistica 5.5). Критическое значение уровня значимости принималось равным 5%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение трансгенных клеточных линий *A. thaliana*

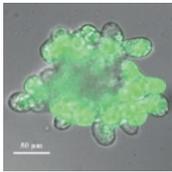
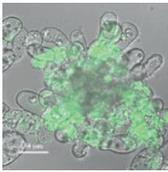
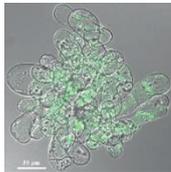
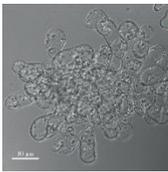
Методом агробактериальной трансформации суспензионной культуры *A. thaliana* была получена 21 исходная клеточная линия, представленная независимыми событиями интеграции *GFP*-гена в случайные районы генома. Результаты первичного цитологического анализа продемонстрировали высокую гетерогенность (химерность) большинства исходно полученных трансгенных клеточных линий как по интенсивности флуоресценции, так и по соотношению *GFP*⁺ и *GFP*⁻ клеток/агрегатов. Все клеточные линии были разделены на две группы (табл. 1). Первую группу составили 4 клеточные линии (19%) с высокой интенсивностью флуоресценции во всех клетках и клеточных агрегатах. Во вторую группу были отнесены оставшиеся клеточные линии, у которых интенсивность флуоресценции была слабее, и доля *GFP*⁻ клеток/клеточных агрегатов составляла от 5% до 95%.

Для снижения гетерогенности и получения гомогенной культуры клеток, как правило, используют два подхода – метод флуоресцентно-активированного клеточного сортирования (FACS) и плейтинг. Применение клеточного сортирования сопряжено с рядом трудностей, связанных с необходимостью использования протопластов, сложностями обеспечения стерильных условий, с невысокой выживаемостью протопластов и др. [15]. Метод плейтинга

Таблица 1

Распределение клеточных линий *A. thaliana* по интенсивности флуоресценции и соотношению *GFP*⁺ и *GFP*⁻ клеточных агрегатов

Distribution of cell lines *A. thaliana* according to fluorescence intensity and the ratio of *GFP*⁺ to *GFP*⁻ cell aggregates

Характеристика	Группа 1	Группа 2		
				
Интенсивность флуоресценции	Высокая	Средняя и низкая		
Соотношение <i>GFP</i> ⁺ и <i>GFP</i> ⁻ , %	100:0	5:95 до 95:5		
Исходные клеточные линии	1, 2, 10, 14	3–9, 11–13, 15, 16–21		
Клеточные линии после плейтинга	1 ₍₃₎ , 2 ₍₂₎ , 3 ₍₁₎ , 10 ₍₂₎ , 12 ₍₃₎ , 15 ₍₁₎	4 ₍₁₎ , 5 ₍₂₎ , 6 ₍₂₎ , 7 ₍₁₎ , 8 ₍₃₎ , 9 ₍₄₎ , 11 ₍₁₎ , 13 ₍₂₎ , 14 ₍₃₎ , 16 ₍₁₎ , 17 ₍₂₎ , 18 ₍₁₎ , 19 ₍₁₎ , 20 ₍₁₎ , 21 ₍₁₎		

Примечание: нижний индекс в скобках – число копий гена *GFP* на диплоидный геном.

Note: Copy numbers of *GFP* gene in the corresponding lines are parenthesized.

или разведения клеточных культур – наиболее простой и эффективный подход для снижения гетерогенности исходных клеточных линий, полученных после агробактериальной трансформации. Однако попытки получения моноклональных клеточных линий с генами *IL-4* и *hGM-CSF*, кодирующими интерлейкин-4 и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор человека, с использованием подхода разведения суспензии в кондиционированной среде, оказались безуспешными [6]. Для разделения исходной гетерогенной трансформированной клеточной суспензии табака на отдельные клеточные линии [6, 16] использовали оригинальный подход, сочетающий совместное культивирование трансгенной и нетрансгенной суспензий с разведением клеток при высеве на чашку Петри в соотношении 1:1000.

В данной работе плейтинг в сочетании с цитологическим анализом (рис. 1) позволил выделить дополнительные клеточные линии с улучшенными характеристиками GFP-флуоресценции и отсутствием GFP⁻ клеток/клеточных агрегатов (см. табл. 1). В результате доля клеточных линий первой группы возросла с 19% до 33,3%, что сви-

детельствовало о том, что даже один раунд плейтинга улучшил характеристики клеточных линий по GFP-флуоресценции и снизил их гетерогенность. Отбор клонов с высоким уровнем экспрессии рекомбинантного белка успешно был использован исследователями для восстановления продуктивности трансгенной суспензии, в которой произошло снижение количества наработки рекомбинантных белков после длительного культивирования [6].

Пролиферативная активность клеточных линий

Пролиферативная активность культур клеток была оценена на двух случайно выбранных трансгенных линиях (№1 и №6) после шести пассажей с антибиотиками и на 18-й пассаж без антибиотиков. Характеристики роста в контрольной нетрансгенной культуре клеток *A. thaliana* (субкультивируется *in vitro* 12 лет) и в трансгенных линиях были сходными (индексы роста по числу клеток – 35–39; по сухой биомассе – 59–62).

Данные флуоресцентной микроскопии протопластов *A. thaliana* двух исследуемых клеточных

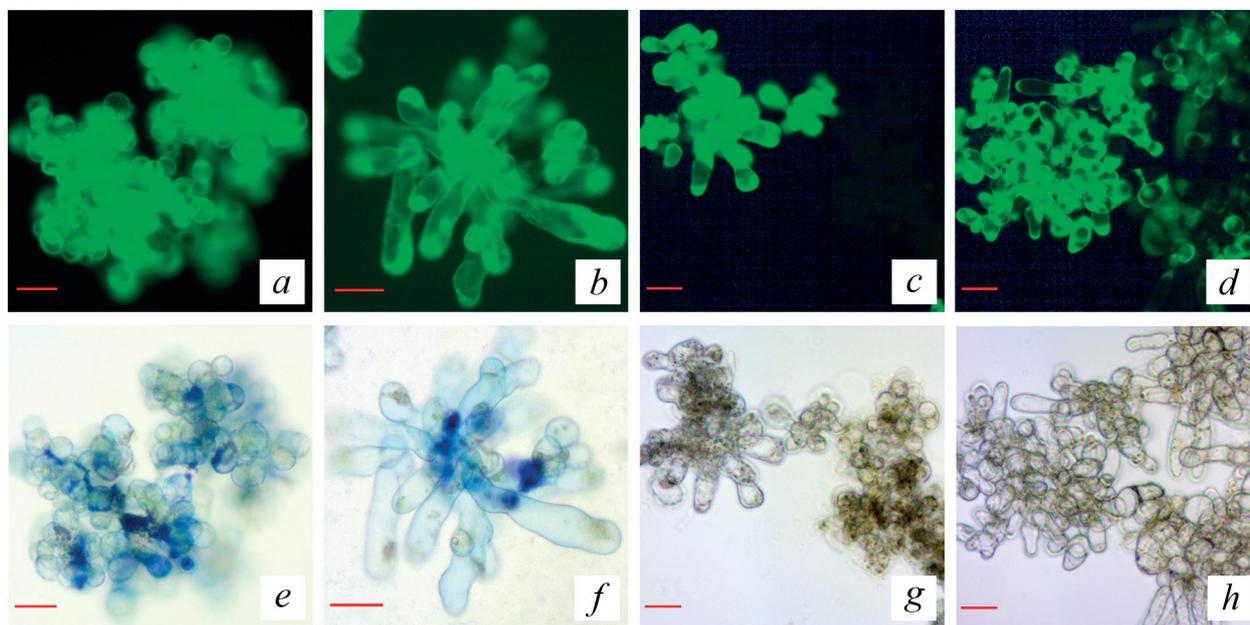


Рис. 1. Цитологический анализ состава клеточных агрегатов в трансформированных суспензионных клеточных культурах после проведения плейтинга. *a, e* – агрегаты, состоящие из мелких, округлых клеток; *b, f* – агрегаты, состоящие из удлиненных линейно растущих клеток; *c, g* – GFP⁺ и GFP⁻ клеточные агрегаты; *d, h* – клеточные агрегаты различной морфологии и интенсивности флуоресценции. *a–d* – флуоресцентная микроскопия; *e–h* – световая микроскопия; *e, f* – клетки подкрашены трипановым синим. Масштабная линейка – 50 мкм.

Fig. 1. Cytological analysis of the composition of cell aggregates in transformed cell cultures after plating. (*a, e*), aggregates of small round-shaped cells; (*b, f*), aggregates of elongated linearly growing cells; (*c, g*), GFP⁺ and GFP⁻ cell aggregates; (*d, h*), cell aggregates of different morphologies and fluorescence intensities; (*a–d*), fluorescence microscopy; (*e–h*), light microscopy; (*e, f*) cells are additionally stained with trypan blue. Scale bar, 50 μm.

линий показали (рис. 2*a*), что на протяжении всех шести пассажей с антибиотиками практически 100% клеточных популяций демонстрировали свечение репортерного белка GFP. После 24 пассажей (18 последних – без антибиотиков) проточная цитометрия протопластов линии №6 выявила 99% клеток с GFP белком (рис. 2*c*, 2*d*). Необходимо отметить, что результаты проточной цитометрии в некоторых случаях могут быть занижены в связи с освобождением ядер при отмывке и фиксации протопластов (рис. 2*b*, 2*d*; отмечено звездочкой).

Уровень экспрессии гена *GFP* и накопление репортерного белка в клеточных линиях

На рис. 3*a* показаны относительные значения уровня экспрессии гена *GFP* в исследуемых клеточных линиях *A. thaliana*. Максимальный уровень экспрессии в клеточной линии №15 был при-

нят за 100%. Различия между группами по данному признаку были статистически достоверны ($H(1, N=21) = 5,82424$; $p=0,0158$).

На рис. 3*b* представлены данные по накоплению GFP белка в моноклональных клеточных линиях. Среди клеточных линий по группам наблюдалась вариабельность по данному параметру, от минимального значения 0,06% общего растворимого белка (ОРБ) для линии №18 и максимального уровня 2,37% ОРБ для линии №12. Статистически значимые различия ($H(1, N=21)=12,2807$; $p=0,0005$) также выявлены между первой и второй группами. Выделено три линии с максимально высоким, около 2% от общего растворимого белка, накоплением целевого белка GFP (№2, №12 и №15). Минимальный уровень экспрессии *GFP*-гена, наблюдаемый в клеточных линиях №13, №17 и №18 коррелировал с очень низким количеством белка GFP в этих линиях. Таким

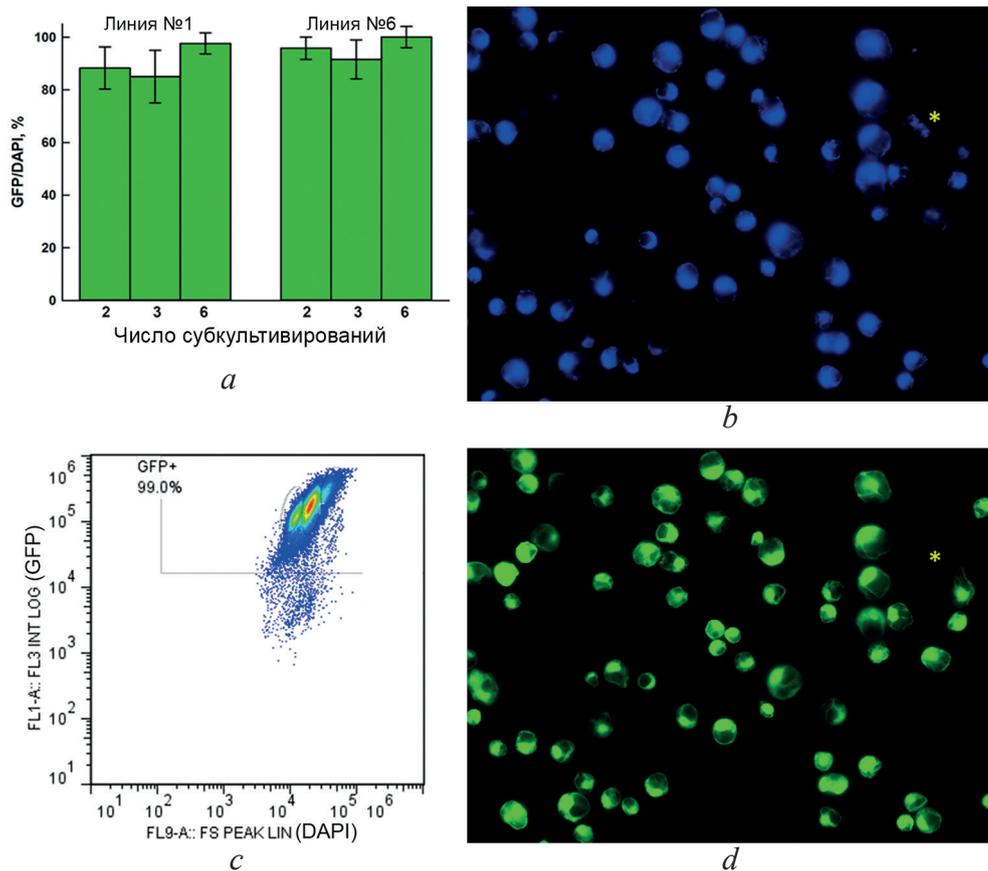


Рис. 2. Флуоресцентная микроскопия и проточная цитометрия протопластов клеток трансгенных линий *A. thaliana*. *a* – соотношение GFP⁺ протопластов к числу протопластов с ядрами, окрашенными DAPI, показана стандартная ошибка среднего; *b* – ядра протопластов, окрашенные DAPI; *c* – двухпараметрический график результатов проточной цитометрии протопластов выделенных из клеток линии № 6 после 24 субкультивирований. *d* – GFP⁺ протопласты. Звездочкой (на *b* и *d*) отмечено ядро без цитоплазмы, следовательно, нет сигнала GFP

Fig. 2. Fluorescence microscopy and flow cytometry of the protoplasts of *A. thaliana* transgenic cell lines. (*a*), the ratio of GFP⁺ protoplasts to the protoplasts with DAPI-stained nuclei with standard error; (*b*), DAPI-stained protoplast nuclei; (*c*), bivariate plot of the flow cytometry of transgenic line no. 6 protoplasts after 24 passages; (*d*), GFP⁺ protoplasts. Asterisk denotes the nucleus without cytoplasm and GFP signal in *b* and *d*

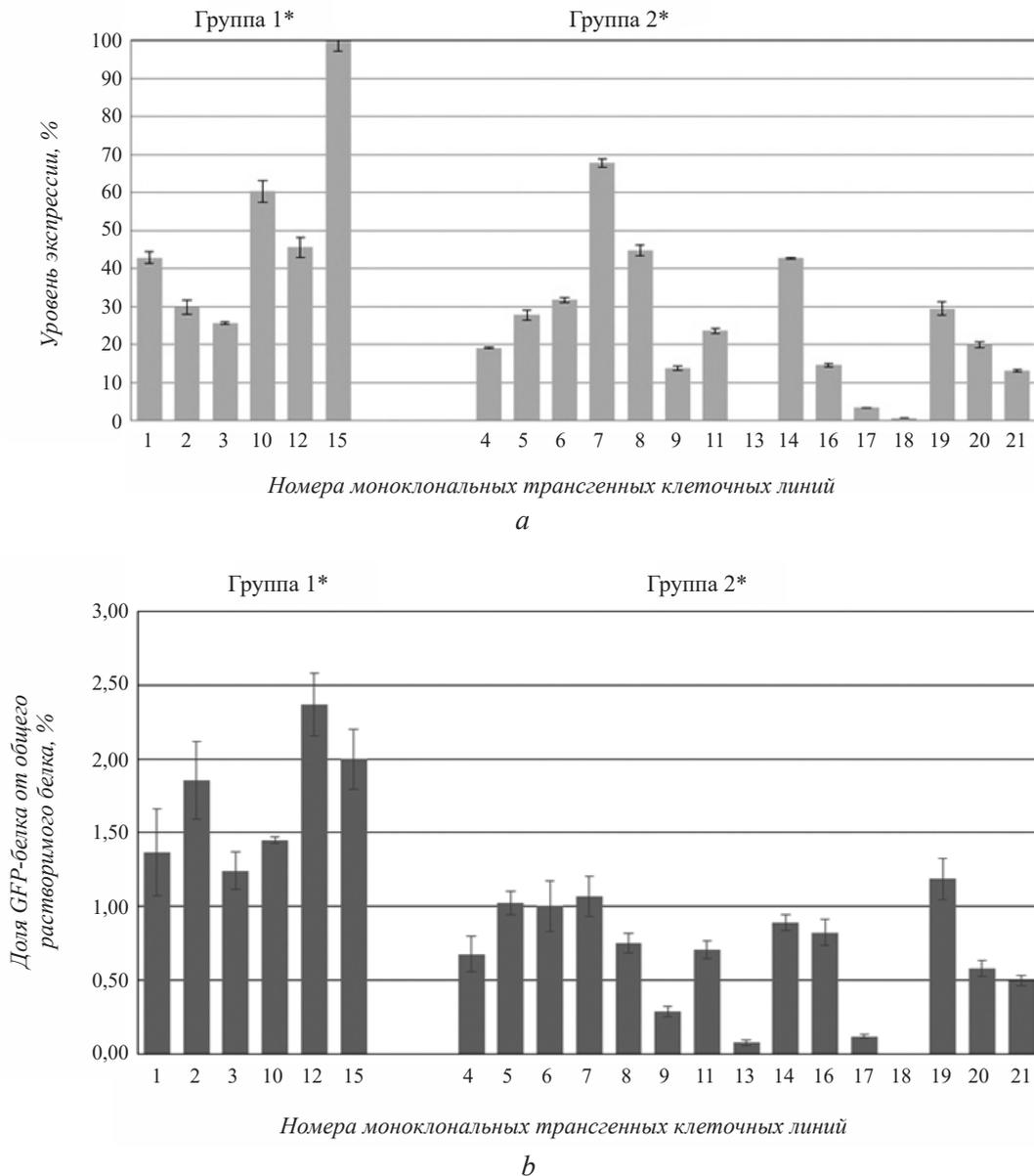


Рис. 3. Уровень экспрессии *GFP*-гена (*a*) и накопление *GFP*-белка (*b*) в трансгенных моноклональных линиях клеток *A. thaliana*, определенные методом количественной ОТ-ПЦР. Данные нормированы по отношению к содержанию ОРБ. Уровень экспрессии линии №15 принят за 100%. Показана стандартная ошибка среднего.

*Достоверные различия между группами ($p < 0,05$)

Fig. 3. Expression level of *GFP* gene (*a*) and *GFP* yield (normalized to the total soluble protein) (*b*) in *A. thaliana* monoclonal transgenic cell lines. Standard error of the mean is shown. Expression level of *GFP* gene assessed by RT-PCR expression of line no. 15 is taken as 100%.

*The differences between groups are statistically significant ($p < 0.05$)

образом, в первой группе наблюдается статистически значимо более высокий уровень экспрессии *GFP*-гена, по сравнению со второй группой, что подтверждается данными цитологического анализа интенсивности сигнала флуоресценции *GFP*-гена в клетках/клеточных агрегатах.

Большая часть (48%) исследуемых моноклональных клеточных линий включали одну ко-

пию целевого гена на геном, 33% линий – две копии и остальная часть (19%) – три и более копий (см. табл. 1), что характерно для случайного характера встраивания гетерологичных генов в растительный геном при агробактериальной трансформации. В табл. 2 приведены данные по районам встраивания инсерций Т-ДНК в растительный геном для 12 моноклональных клеточных линий.

Для линии №1 было определено местонахождение всех трех копий Т-ДНК, для остальных линий – по одной копии. Встраивание произошло в разные хромосомы генома *A. thaliana* в 5' и 3' не-транскрируемые районы и в кодирующие последовательности генов. В линиях №1, №3 и №21 интеграция одной из копий Т-ДНК произошла в один и тот же геномный локус, кодирующий белок репарации ДНК, RadA-подобный белок, а в линиях №11 и №17 – в район, кодирующий протеинкиназу. Существование подобных «горячих точек» предпочтительного встраивания в определенные

районы растительного генома описаны в работах многих исследователей [17, 18]. Сравнение числа копий *GFP*-гена и данных по уровню накопления GFP-белка не выявило каких-либо статистических закономерностей. Нет достоверных различий при сравнении группы линий с одной копией *GFP*-гена и группы, где представлены линии с двумя и более копиями ($H(1, N=21)=0,9898$; $p=0,3198$). Это подтверждает данные о том, что число копий не является главным фактором, определяющим высокий уровень экспрессии рекомбинантного гена в суспензионных культурах клеток [19].

Таблица 2

Районы встраивания инсерций Т-ДНК в растительный геном в клеточных линиях *A. thaliana*

Characteristics of sequences of plant DNA adjacent to t-DNA insertions in monoclonal transgenic cell lines *A. thaliana*

Номер линии	Хромосома (геномный локус)	Место встраивания	Степень идентичности*, %	Накопление белка GFP в линиях**
1	3 (AT3G25870)	8 пн 5' гипотетический белок 5249 пн 3' NAD(P)-связывающийся белок суперсемейства Россман-фолд	100	1,37±0,59
	2 (AT2G17530)	Протеинкиназа	91	
	5 (AT5G50340)	Белок репарации ДНК RadA-подобный белок	98	
2	1 (AT1G77380)	Аминокислотная пермеаза 3	99	1,86±0,59
3	5 (AT5G50340)	Белок репарации ДНК RadA-подобный белок	100	1,24±0,29
6	5 (AT5G03220)	4195 пн 5': Убиквитин-белковая лигаза E3 95 пн 3': Субъединица медиаторного комплекса Med7	96	1,00±0,34
8	5 (AT5G47220)	Этилен-чувствительный элемент-связывающий белок фактор 2	95	0,75±0,15
10	3 (AT3G28600)	525 пн 5': Р-петля, содержащая белок суперсемейства нуклеозидтрифосфатгидролаз 545 пн 3': Р-петля, содержащая белок суперсемейства нуклеозидтрифосфатгидролаз	96	1,45±0,05
11	2 (AT2G17530)	Протеинкиназа	100	0,70±0,12
16	3 (AT3G63060)	352 пн 5': гипотетический белок 797 пн 3': EID1-подобный белок 3	98	0,82±0,09
17	2 (AT2G17530)	Протеинкиназа	99	0,12±0,01
19	3 (AT3G25870)	Гипотетический белок	97	1,19±0,14
20	1 (AT1G05420)	36 пн 5': белок семейства яйцеклеток 123382 пн 3': гипотетический белок	98	0,58±0,05
21	5 (AT5G50340)	Белок репарации ДНК RadA-подобный белок	98	0,50±0,03

*Степень идентичности секвенированных областей растительной ДНК, прилежащих к Т-ДНК-инсерциям с нуклеотидными последовательностями генома *A. thaliana* (The degree of homology of the sequenced areas of plant DNA adjacent to T-DNA-nucleotide sequences of the genome of *A. thaliana*).

**Данные нормированы по отношению к содержанию ОРБ, приведена стандартная ошибка среднего (The data are normalized with respect to the ORB content, the standard error of the mean is given).

В целом, вариабельность по уровню экспрессии и накоплению рекомбинантного белка, вероятно, отражает особенности случайной интеграции Т-ДНК в разные районы генома реципиентных клеток растений с разным уровнем транскрипционной активности.

Среди растительных систем экспрессии суспензионные культуры клеток *in vitro* представляют собой наиболее перспективную систему экспрессии для «молекулярного фарминга», поскольку сочетают в себе достоинства эукариотического способа синтеза белка, а также простоту и рентабельность, сравнимую с бактериальной системой экспрессии. Культуры клеток высших растений способны синтезировать сложные белки, кодируемые трансгенами, имеют низкую стоимость культивирования, в них отсутствуют человеческие патогены [20]. Однако широкое использование культивируемых *in vitro* клеток растений в качестве биопродукторов рекомбинантных белков сдерживается частично из-за недостаточно высокого уровня их синтеза и накопления, который составляет, как правило, не более 1% от уровня общего растворимого белка [21]. В связи с этим получение моноклональных трансгенных клеточных линий является важным и необходимым этапом, направленным на поиск наиболее «благоприятных» событий интеграции целевого гена в районы с высокой транскрипционной активностью при создании культур клеток-биопродукторов рекомбинантных белков посредством геномного редактирования *A. thaliana* с применением технологии CRISPR/Cas9.

Данная работа выполнена в рамках проекта Российского научного фонда 17-14-01099.

Дополнительный материал

Электронная версия статьи содержит дополнительный материал, доступный безвозмездно на сайте журнала <http://www.biotechnology-journal.ru>

ЛИТЕРАТУРА

- Xu J.F., Okada S., Tan L., Goodrum K.J., et al. Human growth hormone expressed in tobacco cells as an arabinogalactan-protein fusion glycoprotein has a prolonged serum life. *Transgenic Res.*, 2010, 19, 849–867. doi: 10.1007/s11248-010-9367-8
- Rosales-Mendoza S., Tello-Olea M.A. Carrot cells: a pioneering platform for biopharmaceuticals production. *Mol. Biotechnol.*, 2015, 57(3), 219–232. doi: 10.1007/s12033-014-9837-y
- Day C.D., Lee E., Kobayashi J., Holappa L.D., et al. Transgene integration into the same chromosome location can produce alleles that express at a predictable level, or alleles that are differentially silenced. *Genes Dev.*, 2000, 14(22), 2869–2880.
- Forsbach A., Schubert D., Lechtenberg B., Gils M., et al. A comprehensive characterization of single-copy T-DNA insertions in the *Arabidopsis thaliana* genome. *Plant Mol. Biol.*, 2003, 52(1), 161–176.
- Muller E., Lorz H., Lutticke S. Variability of transgene expression in clonal cell lines of wheat. *Plant Sci.*, 1996, 114(1), 71–82.
- James E., Lee J.M. Loss and recovery of protein productivity in genetically modified plant cell lines. *Plant Cell Rep.*, 2006, 25(7), 723–727. doi: 10.1007/s00299-005-0096-z
- Schenk R.V., Hildebrandt A.C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian J. Botany*, 1972, 50, 199–204. doi: 10.1139/b72-026
- Ogawa Y., Dansako T., Yano K., Sakurai N., et al. Efficient and high-throughput vector construction and *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* suspension-cultured cells for functional genomics. *Plant Cell Physiol.*, 2008, 49(2), 242–250. doi: 10.1093/pcp/pcm181
- Носов А.В., Фоменков А.А., Мамаева А.С., Соловченко А.Е. и др. Дополнительные возможности использования клик-реакции 5-этинил-2'-дезоксиринидина с азидами флюорохромов в изучении клеточного цикла и метаболизма дезоксирибонуклеозидов. *Физиология растений*, 2014, 61(6), 893–904. doi: 10.7868/S0015330314060141
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, 2001, 25(4), 402–408. doi: org/10.1006/meth.2001.1262
- Турчинович А.А., Дейнеко Е.В., Загорская А.А., Филипенко М.Л., и др. Получение трансгенных растений табака - продуцентов интерлейкина-18 человека. *Докл. РАН*, 2004, 395(5), 704–707.
- Thomas C.M., Jones D.A., English J.J., Carroll B.J., et al. Analysis of the chromosomal distribution of transposon-carrying T-DNAs in tomato using the inverse polymerase chain reaction. *Mol. Gen. Genet.*, 1994, 242(5), 573–585.
- Allen G.C., Flores-Vergara M.A., Krasynanski S., Kumar S., et al. A modified protocol for rapid DNA isolation from plant tissues using cetyltrimethylammonium bromide. *Nat. Protoc.*, 2006, 1(5), 2320–2325.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., et al. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 1990, 215(3), 403–410.
- Kirchhoff J., Raven N., Boes A., Roberts J.L., et al. Monoclonal tobacco cell lines with enhanced recombinant protein yields can be generated from heterogeneous cell suspension cultures by flow sorting. *Plant Biotechnol. J.*, 2012, 10(8), 936–944. doi: 10.1111/j.1467-7652.2012.00722.x

16. Nocarova E., Fischer L. Cloning of transgenic tobacco BY-2 cells an efficient method to analyse and reduce high natural heterogeneity of transgene expression. *BMC Plant Biol.*, 2009, (9), 44. doi: 10.1186/1471-2229-9-44
17. Alonso J.M., Stepanova A.N., Leisse T.J., Kim C.J., et al. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 2003, 301(5633), 653–657. doi: 10.1126/science.1086391
18. Jeong D.H., An S., Park S., Kang H.G., et al. Generation of a flanking sequence-tag database for activation-tagging lines in japonica rice. *Plant J.*, 2006, 45(1), 123–132. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02610.x
19. Kaldis A., Ahmad A., Reid A., McGarvey B., et al. High-level production of human interleukin-10 fusions in tobacco cell suspension cultures. *Plant Biotechnol. J.*, 2013, 11(5), 535–545. doi: 10.1111/pbi.12041
20. Buyel J.F. Process development strategies in plant molecular farming. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 2015, 16(11), 966–982.
21. Wilken L.R., Nikolov Z.L. Recovery and purification of plant-made recombinant proteins. *Biotechnol. Adv.*, 2012, 30(2), 419–433. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.07.020

Variation in *GFP* Gene Expression in *Arabidopsis thaliana* Monoclonal Cell Lines

T.V. MARENKOVA^{1,*}, Yu.V. SIDORCHUK¹, A.V. NOSOV^{1,2}, A.A. FOMENKOV^{1,2},
V.V. KUZNETSOV¹, S.R. MURSALIMOV¹, A.A. ZAGORSKAYA¹, E.A. UVAROVA¹,
P.A. BELAVIN¹, and E.V. DEINEKO¹

¹*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, 63090, Novosibirsk Russia*

²*Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, 127276, Moscow Russia*

**e-mail*: marenkova@bionet.nsc.ru

Received October 23, 2018

Revised November 23, 2018

Accepted January 15, 2019

Abstract—A set of transgenic *Arabidopsis thaliana* monoclonal cell lines has been created by selecting individual cells (cell aggregates) with random *GFP* gene integration events after the Agrobacterium-mediated transformation. The yield of the recombinant GFP ranged from 0.07 to 2.37% of the total soluble protein. Three lines with the highest, about 2% of the total soluble protein, accumulation of the target GFP protein were isolated. Areas of T-DNA insertions into the plant genome for 12 monoclonal cell lines were determined. The variation in this characteristic among 21 examined cell lines can serve as a reference for *A. thaliana* CRISPR/Cas9 genome editing aimed at the increase in the yield of recombinant proteins in plant expression systems. The lines with the highest level of the recombinant protein accumulation are of interest for the further identification and detailed characteristics of the sites for the transgene integration. These sites can be used as targets for the gene integration during the creation of lines for the production of recombinant proteins.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, cell suspension culture, Agrobacterium-mediated transformation, gene expression, green fluorescent protein.

Acknowledgements—The work was performed under project no. 17-14-01099 of the Russian Science Foundation.

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-1-58-67