

УДК 576.54

ФОРМИРОВАНИЕ АГРЕГАТОВ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ: РОЛЬ КОМПОНЕНТОВ КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК

© 2022 г. Е. И. Григорьева^{1, 2, *}, Ю. В. Сидорчук¹, Е. В. Дейнеко¹

¹Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

*e-mail: grigoreva.eln@mail.ru

Поступила в редакцию 28.04.2022 г.

После доработки 28.06.2022 г.

Принята к публикации 28.06.2022 г.

Использование культур клеток высших растений для наработки рекомбинантных белков, в том числе медицинского назначения, представляется перспективной альтернативой существующим платформам на основе клеток млекопитающих или бактерий. Несомненные преимущества растительных клеток: полное отсутствие риска контаминации вирусами и прионами животного происхождения; достаточно высокая скорость роста клеток; относительно низкая стоимость компонентов питательных сред; возможность обеспечения производства рекомбинантных белков в строго контролируемых условиях биореакторов в соответствии с нормами Надлежащей производственной практики – GMP (Good Manufacturing Practice). Несмотря на то, что растительные клетки уже используются в промышленных масштабах для наработки биофармацевтиков, в этом направлении остается еще много нерешенных проблем. Наиболее важными из них являются все еще низкий уровень выхода рекомбинантного белка, а также способность растительных клеток к образованию агрегатов при культивировании *in vitro*. Образование клеточных агрегатов, различающихся по величине, представляет серьезную проблему при культивировании суспензионных культур, в особенности в больших объемах промышленных биореакторов. В основе образования агрегатов в суспензионных клеточных культурах лежит природная способность клеток растений к адгезии – после завершения деления клетки остаются связанными между собой посредством формирования общих срединных пластинок. В предлагаемом обзоре описаны особенности структуры растительной клетки, биохимические механизмы, лежащие в основе адгезии, а также их генетическая основа. Рассмотрены перспективы применения современных методов геномного редактирования для изменения функционирования генов, принимающих участие в обеспечении межклеточной адгезии растительных клеток.

Ключевые слова: суспензионные культуры клеток растений, клеточные агрегаты, межклеточная адгезия, *Arabidopsis thaliana*, гены семейства *GAUT*

DOI: 10.31857/S0042132422060035

ВВЕДЕНИЕ

Суспензионные клеточные культуры – перспективная платформа для наработки рекомбинантных белков фармацевтического назначения (Загорская, Дейнеко, 2017). В отличие от целых растений, они характеризуются более быстрым накоплением биомассы и способностью секретировать биологически активные белки в межклеточное пространство, что значительно упрощает работу с ними (Firek et al., 1993). Кроме того, при культивировании в биореакторах всегда строго контролируются стерильные условия, что снижает риск контаминации клеточных культур растений (Kolewe et al., 2008). Суспензии клеток растений в качестве платформы для наработки рекомбинантных белков имеют ряд преимуществ относительно платформ

на основе бактериальных культур и клеток животных. Поддержание культур клеток растений характеризуется простотой и более низкой стоимостью, по сравнению с клетками животных. В культурах клеток растений происходит корректный фолдинг рекомбинантных белков и их посттрансляционные модификации, что представляется чрезвычайно важным при сопоставлении с бактериальными системами экспрессии.

Несмотря на привлекательность клеточных культур высших растений в качестве альтернативных систем экспрессии для наработки рекомбинантных белков, а также использование этой платформы для наработки некоторых биофармацевтиков в промышленных масштабах (Загорская, Дейнеко, 2017), в этом направлении все еще оста-

ются нерешенные проблемы. Наиболее важные из них: недостаточно высокий выход рекомбинантного белка, а также способность клеток растений к образованию агрегатов. Следует подчеркнуть, что обе эти проблемы представляются, на наш взгляд, взаимосвязанными, и решение одной из них (уменьшение размеров клеточных агрегатов) может привести к возрастанию синтетических способностей клеточной культуры.

В процессе деления клетки растений, культивируемые *in vitro* в жидких питательных средах, не переходят в культуральную среду в виде одиночных клеток, а проявляют тенденцию к сохранению связей между собой, образуя группы клеток разного размера. Таким образом, клеточные агрегаты — это группы клеток, которые остаются связанными между собой после их деления в суспензионной культуре. В структуре агрегатов, которые могут содержать в себе до нескольких сотен клеток, часто наблюдается гетерогенность, так как разные клетки в составе агрегата имеют разный доступ к компонентам питательной среды (Zhao et al., 2003). Клетки в центре агрегата не получают достаточного количества питательных веществ и кислорода из среды, а клетки, находящиеся на поверхности агрегата, часто повреждаются при перемешивании в процессе культивирования, за счет чего отмирают раньше, чем оставшаяся масса агрегата. Все это приводит к различию метаболизма клеток в разных частях агрегата (Patil, Roberts, 2013). Преодоление именно этого явления и лежит в основе усилий по повышению синтетического потенциала клеточных культур за счет снижения их способности к образованию крупных клеточных агрегатов.

В ряде экспериментов установлено, что снижение агрегированности суспензий приводит к повышению выхода вторичных метаболитов. Так, например, клеточные культуры *Taxus* с мелкими агрегатами накапливали в 2–20 раз больше паклитаксела, чем культуры с более крупными агрегатами (Kolewe et al., 2011; Patil et al., 2013). Для клеточных культур *Tagetes patula*, используемых для получения тиофена (Hulst et al., 1989), отмечается, что уменьшение размеров агрегатов в определенном диапазоне также приводило к повышению выхода целевого метаболита. Однако на примере клеточной культуры *Saussurea medusa* показано, что снижение агрегированности не всегда приводит к увеличению выхода вторичных метаболитов — изменение размера агрегатов значимо не влияет на выход яцеозидина и гиспидулина (Zhao et al., 2003). Эти данные свидетельствуют о том, что, вероятно, для каждой культуры характерен свой диапазон размера агрегатов, оптимальный для продукции вторичных метаболитов.

На образование агрегатов в суспензионной культуре могут влиять различные факторы. В их числе

состав питательной среды. На агрегацию клеток влияет наличие регуляторов роста в среде. Высокие уровни 2,4-дихлорфенолуксусной кислоты обычно приводят к мелкодисперсным культурам с лучшим разделением клеток, низкие уровни — увеличивают агрегацию клеток (Liau, Boll, 1971; George et al., 2008). Использование в среде α -нафтилуксусной кислоты в качестве ауксина приводит к значительному увеличению размера агрегатов (Смоленская и др., 2007). Более высокие уровни цитокининов часто вызывают большую агрегацию (Kinnersley, Dougall, 1980). Кроме того, pH среды, частота пересева и скорость перемешивания также могут повлиять на распределение размеров агрегатов (Henshaw et al., 1966; Steiner, Dougall, 1995; Kieran et al., 2000).

Помимо оптимизации состава среды и условий культивирования, существуют и другие возможности целенаправленного снижения агрегированности суспензионных культур. Среди них есть как химические и ферментативные, так и механические способы. К химическим способам относятся: обработка ферментами, деградирующими клеточную стенку (Naill, Roberts, 2004); добавление гормонов (Diwan, Malpathak, 2010), колхицина (Hayashi, Yoshida, 1988), метаболических ингибиторов, например L- α -аминоокси- β -фенилпропаноидной кислоты (Edahiro, Seki, 2006); снижение концентрации Ca^{2+} (Takayama et al., 1977). Среди физических способов: фильтрация суспензий через фильтры с порами разного диаметра (Henshaw et al., 1966); подача импульсов сжатого воздуха (Kurz, 1971); селективное извлечение агрегатов крупного размера или иммобилизация клеток (Prenosil, Hegglin, 1990).

Широкое разнообразие методов снижения агрегированности обусловлено тем, что каждый из них имеет существенные недостатки. Химические и ферментативные методы могут влиять на экспрессию генов, что может привести к изменению метаболических свойств клеточной культуры. В отдельных случаях высокие концентрации некоторых агентов могут негативно сказаться на ростовых характеристиках культур. Механические методы требуют постоянного повторения, поскольку эффект каждого из них является временным (Patil, Roberts, 2013). По этой причине ни один из вышеперечисленных методов не универсален.

В основе образования агрегатов лежит характерное для растений явление межклеточной адгезии, поддерживающей связь между дочерними клетками после их разделения. Адгезия обеспечивается полисахаридами клеточной стенки, из которых наибольший вклад в поддержание межклеточных контактов вносят пектины (Daher, Braybrook, 2015). Синтез пектинов и их модификация — многостадийный процесс, вовлекающий большое количество ферментов, для части кото-

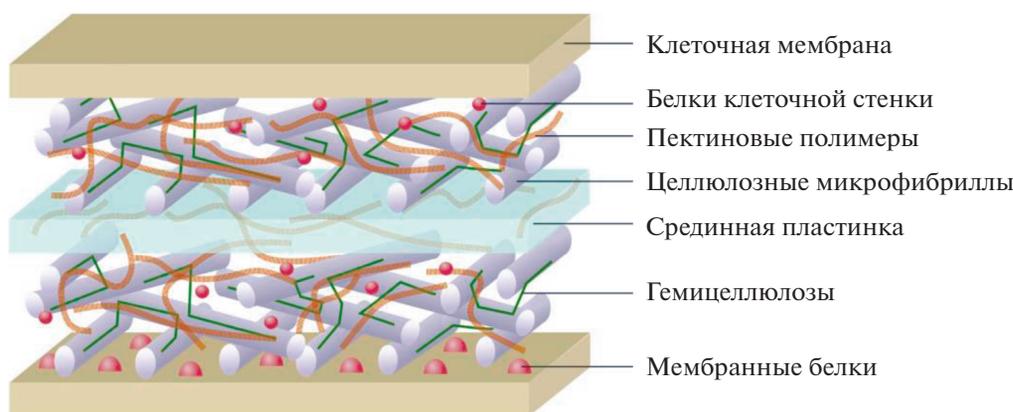


Рис. 1. Схема строения первичной клеточной стенки.

рых до сих пор все еще не установлена четкая биохимическая функция. Данный обзор нацелен на анализ имеющихся современных данных об особенностях структуры клеточной стенки растений, о роли механизмов, лежащих в основе адгезии клеток, и генов, контролирующих реализацию этих механизмов. Имеющиеся в настоящее время методы и подходы геномного редактирования позволяют рассчитывать на получение нокаутов некоторых ключевых генов, контролирующих важные биохимические реакции, связанные с процессами адгезионных взаимодействий клеток. Выключение некоторых звеньев, обеспечивающих адгезионные взаимодействия между клетками, дает основание надеяться на их ослабление и, как результат этого, на снижение размеров клеточных агрегатов в суспензионных культурах клеток растений.

СТРУКТУРА КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ РАСТЕНИЙ

Межклеточная адгезия имеет существенное значение для формирования и поддержания структуры растения в целом, обеспечивая множество процессов, происходящих на протяжении всей жизни растения. Адгезионные связи между клетками реализуются за счет полимеров клеточных стенок посредством их модификаций и взаимодействий друг с другом.

Клеточные стенки – сложные и динамичные структуры (Горшкова, 2007). Они разнообразны по своему строению и функциям, их химический состав и структура могут изменяться в зависимости от типа клеток, стадии развития и вида растений (McCann, Knox, 2010). Выделяют три группы клеточных стенок. Первичные клеточные стенки, имеющиеся у всех клеток растений, образуются в процессе активного роста клеток и состоят по большей части из полисахаридов. Вторичные клеточные стенки, которые встречаются в дифференци-

рованных клетках, содержат преимущественно полисахариды и лигнин. Кроме того, у некоторых видов растений можно встретить желатинозный слой, который состоит почти полностью из полисахаридов (Anderson, Kieber, 2020).

Первичная клеточная стенка имеется у всех растений и состоит из большого количества компонентов (рис. 1). У двудольных, в частности и у *Arabidopsis thaliana*, она состоит из сети целлюлозных микрофибрилл, которые переплетаются и соединяются при помощи разветвленных полисахаридов – пектинов и гемицеллюлоз (Lampugnani et al., 2018). Помимо полисахаридов, клеточная стенка содержит структурные белки и ферменты (Roberts, Gonzalez-Carranza, 2007).

Полисахариды, входящие в состав клеточных стенок, разнообразны по строению и варьируют от линейных полимеров до сложных, разветвленных молекул (Anderson, Kieber, 2020). Целлюлоза – основной структурный компонент всех клеточных стенок, она обеспечивает прочность клеток и определяет их форму. Цепи β -1,4-глюканов соединяются водородными связями и формируют целлюлозные микрофибриллы (Anderson, Kieber, 2020). Каллоза – полимер, состоящий из глюкозных звеньев, соединенных β -1,3-связями, синтезируется только на определенных стадиях развития в некоторых клеточных структурах, например в срединной пластинке и плазмодесмах. Молекулы каллозы часто разрушаются вскоре после синтеза, что делает ее одним из самых динамичных компонентов клеточной стенки (Ellinger, Voigt, 2014). Синтез целлюлозы и каллозы осуществляется непосредственно на цитоплазматической мембране клетки (Haigler, 2018; Zhang et al., 2021).

Следующий важный компонент клеточной стенки растений – гемицеллюлозы. Основная функция гемицеллюлоз в первичной клеточной стенке – это сшивание соседних микрофибрилл целлюлозы с образованием трехмерной структуры, способной противостоять тургорному давлению.

нию клетки (Roberts, Gonzalez-Carranza, 2007). Гемицеллюлозы представлены ксилоглюканами, ксиланами, маннанами и глюканами со смешанными связями (Scheller, Ulvskov, 2010). Самый часто встречаемый в первичных клеточных стенках полисахарид из группы гемицеллюлоз — ксилоглюкан. Остатки глюкозы в скелете ксилоглюканов соединены β -1,4-связями, а боковые цепи, содержащие остатки ксилозы, галактозы и фукозы, соединены разными видами связей. Ксиланы имеют скелет, состоящий из β -1,4-связанных ксилозильных остатков с боковыми цепями, содержащими в основном арабинозу и глюкуроновую кислоту (Anderson, Kieber, 2020). Маннаны имеют скелет из остатков маннозы, связанных также β -1,4-связями. Глюкоманнаны содержат в остове как глюкозу, так и маннозу. В активно растущих тканях однодольных растений порядка Commelinales часто встречаются глюканы, которые в своем скелете содержат β -1,4- и β -1,3-связи (Scheller, Ulvskov, 2010).

Большую долю среди полисахаридов первичной клеточной стенки составляют пектины, в среднем — одну треть от всех полисахаридов, входящих в структуру клеточных стенок. Они входят в состав матричной части клеточной стенки и принимают участие в формировании сайтов адгезии клеток (Roberts, Gonzalez-Carranza, 2007). Отличительная черта пектинов — остов, содержащий галактуроновую кислоту. Пектины представлены тремя классами: гомогалактуронаны, рамногалактуронаны I и рамногалактуронаны II (Daher, Braybrook, 2015). Гомогалактуронаны — наиболее распространенный класс пектинов, их скелет состоит из остатков галактуроновой кислоты, соединенных α -1,4-связями. Иногда они могут иметь ответвления из ксилозных и апиозных цепей (Mohnen, 2008). Гомогалактуронаны могут быть метилэтерифицированы по C6 карбоксильной группе остатка галактуроновой кислоты или ацетилированы по позициям O2 и O3 (Mohnen, 2008). Остов рамногалактуронанов I состоит из чередующихся остатков галактуроновой кислоты и рамнозы, и к нему присоединены боковые цепи из арабинана, галактана и арабиногалактана. Рамногалактуронаны II — это высококонсервативный и сложный класс пектинов, полимеры этого класса имеют основной скелет, как у гомогалактуронанов, дополненный боковыми цепями, содержащими до 13 различных сахаров и более 20 различных гликозильных связей (Anderson, Kieber, 2020).

Помимо полисахаридов, клеточные стенки в своем составе имеют белковые компоненты. Сложные паттерны гликозилирования этих белков и большие семейства генов затрудняют их функциональную характеристику (Borassi et al., 2016). Структурные белки клеточной стенки включают экстенсины, которые представляют собой гликопротеины, богатые гидроксипролином, белки, богатые пролином, и арабиногалактановые белки.

Помимо структурных белков, в клеточной стенке имеются и белки, несущие ферментативные функции. Кроме полимерных компонентов, клеточные стенки содержат ионы, малые метаболиты и воду в двух формах — свободную и связанную (Anderson, Kieber, 2020).

Клеточная стенка — это не простая сумма компонентов. Взаимодействия между отдельными составляющими и возможность регулирования этих взаимодействий являются определяющими как для механических, так и для других характеристик клеточных стенок (Gu, Rasmussen, 2022). Поэтому для определения механических характеристик клеточных стенок решающее значение имеют взаимодействия между полимерами (Anderson, Kieber, 2020). Так, например, ксилоглюканы и ксиланы связываются с целлюлозными микрофибриллами водородными связями, образуя сеть (McCann, Knox, 2010). Ксилоглюканы могут быть ковалентно связаны с пектиновыми полимерами (Popper, Fry, 2008). Боковые цепи арабинана и галактана, связанные с пектиновым полимером RG-I (рамногалактуронан I), могут прикрепляться к микрофибриллам целлюлозы аналогично гемицеллюлозам (Zykwinska et al., 2007). Взаимодействия пектинов друг с другом и с другими полимерами — важный фактор для формирования межклеточной адгезии (Daher, Braybrook, 2015).

МЕХАНИЗМЫ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЕ АДГЕЗИЮ КЛЕТОК РАСТЕНИЙ

Контакты между клетками растений устанавливаются во время их деления — между двумя дочерними клетками образуется клеточная пластинка, которая в дальнейшем будет связывать две соседние клетки. Основной полимер срединной пластинки — каллоза. Однако важным процессом, необходимым для ее формирования, также является слияние везикул, содержащих гомогалактуронан (Drakakaki, 2015). Благодаря срединной пластинке клетки остаются связанными друг с другом, из-за чего дальнейший рост и развитие соседних клеток становятся согласованными процессами (Jarvis et al., 2003).

Долгое время считалось, что срединная пластинка является основным местом соединения клеток, однако на данный момент времени исследователи считают, что больший вклад в адгезию клеток растений вносят области, формирующиеся в месте соединения трех клеток — двух дочерних и прилегающей к ним третьей клетки (Roberts, Gonzalez-Carranza, 2007). Тургорное давление, придающее тканям прочность, — основная сила, способствующая разделению клеток. Наибольшее напряжение за счет тургорного давления создается именно в углах клеток (Jarvis et al., 2003). В этой области формируется межклеточное пространство,

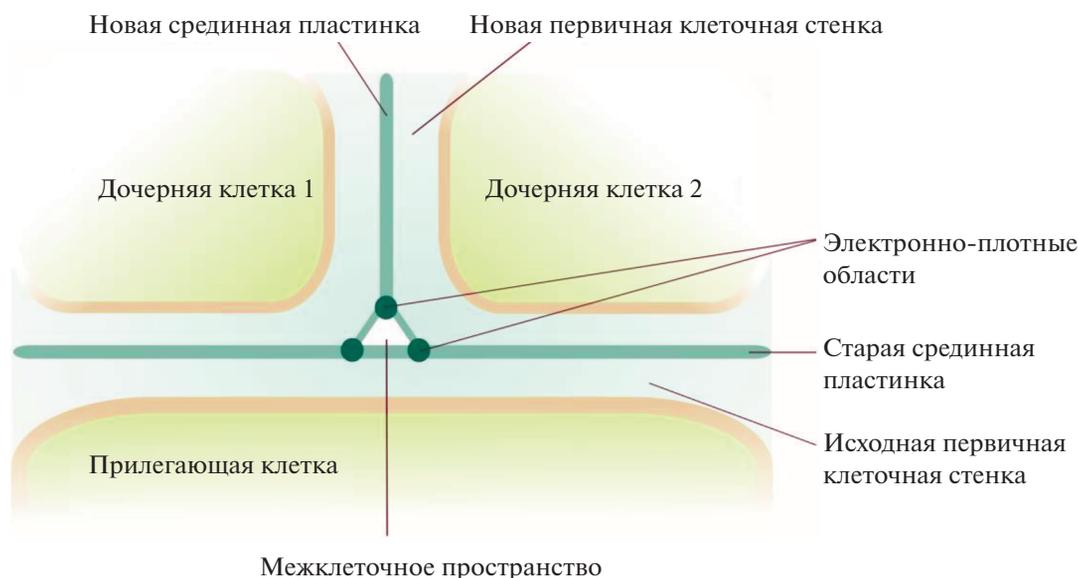


Рис. 2. Схема соединения трех клеток и формирования межклеточного пространства между ними.

которое до определенной степени расширяется вдоль срединных пластинок, а по углам этого пространства наблюдаются электронно-плотные области (рис. 2) (Roberts, Gonzalez-Carranza, 2007). Структура стенки в этих областях имеет свои особенности — они характеризуются отличиями в строении пектинов и наборе белков (McCann, Knox, 2010).

Основные полимеры клеточной стенки, обеспечивающие адгезию, — гомогалактуронаны. Именно эта фракция пектинов наиболее широко представлена в срединной пластинке и углах клеток (Parker et al., 2001). Содержание других пектиновых фракций — рамногалактуронана I и рамногалактуронана II — выявляется на низком уровне (Jarvis et al., 2003). В зонах адгезии клеток наблюдается повышенное содержание Ca^{2+} (Nuxham et al., 1999). Пектин, доставляемый к клеточной стенке во время ее формирования, сильно этерифицирован метильными группами. Ферменты пектинметилэстеразы (pectinmethylesterases, PME) удаляют метильные группы с гомогалактуронана и делают его более доступным для взаимодействия с ионами кальция, благодаря которым формируются ионные сшивки. Сила таких ионных поперечных мостиков значительно увеличивается, когда несколько ионизированных остатков галактуроната соседствуют друг с другом на каждой из двух гомогалактуронановых цепей (Micheli, 2001). Эти ионные сшивки влияют на механические свойства гомогалактуронана — делают его менее гибким, что позволяет формировать прочные структуры, удерживающие клетки связанными друг с другом (Peaucelle et al., 2011). Активность PME находится в балансе с активностью ингибиторов пектинметилэстераз (pectinmethylesterase inhibi-

tors, PME1), что позволяет поддерживать баланс между прочностью и гибкостью при формировании адгезивных сайтов (Dahe, Braybrook, 2015). Характер метилирования гомогалактуронана отличается в углах клеток и межклеточниках (Manfield et al., 2005), что говорит о разной роли этих областей в поддержании межклеточной адгезии.

Адгезия клеток растений — комплексное явление, поэтому, помимо самих пектинов и их модификаций, на адгезию влияют еще и взаимодействия гомогалактуронана с другими компонентами клеточной стенки. Важным является фактор прикрепления срединной пластинки к первичной клеточной стенке. Некоторые молекулы пектина ковалентно связываются с ксилоглоканами, формируя пектин-ксилоглокановые комплексы. Эти комплексы соединяются с первичной стенкой на каждой стороне срединной пластинки за счет того, что ксилоглокановый компонент может легко связываться с целлюлозными микрофибриллами (Cumming et al., 2005).

Помимо полисахаридов, в формировании адгезивных сайтов принимают участие и специфические для срединной пластинки белки (Jarvis et al., 2003). Они могут образовывать нековалентные связи с пектинами или друг с другом. Например, арабиногалактановые белки (arabinogalactan-proteins, AGPs) связываются с пектинами посредством кальциевых сшивок (Baldwin, McCann, Roberts, 1993). AGPs — это белки, полипептидная цепь которых несет на себе большое количество полисахаридных заместителей, содержащих арабинозу и галактозу (Roberts, Gonzalez-Carranza, 2007). AGPs присутствуют вблизи клеточной стенки и через якорь гликозилфосфатидилинозитола

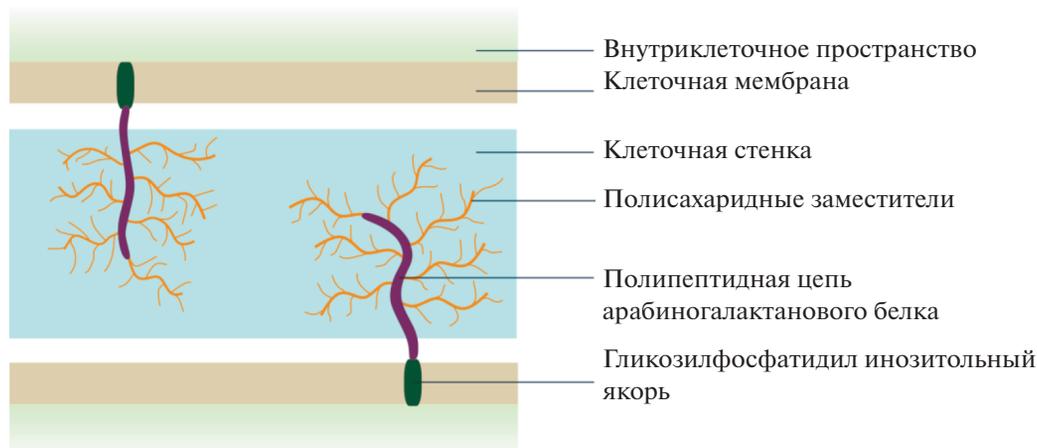


Рис. 3. Схема расположения арабиногалактановых белков в мембране и клеточной стенке растительной клетки.

(*glycosylphosphatidylinositol*, GPI) прикреплены к плазматической мембране (Lin et al., 2022). AGPs, связываясь с одной стороны с мембраной клетки, а с другой – с полисахаридами матрикса клеточной стенки, являются важным фактором в прикреплении клеточной стенки к мембране и в межклеточной адгезии (рис. 3) (Tan et al., 2013).

В силу своей сложности природа межклеточной адгезии до сих пор остается не до конца изученной, однако на сегодня известно, что в обеспечении адгезии принимает участие большое количество компонентов клеточной стенки, взаимодействующих друг с другом. Имеющиеся данные позволяют утверждать, что пектины, а именно гомогалактуронан, играют большую роль в формировании сайтов адгезии, поэтому далее будут рассмотрены особенности синтеза именно этого типа полимеров клеточной стенки.

ФЕРМЕНТЫ СИНТЕЗА И МОДИФИКАЦИИ ГОМОГАЛАКТУРОНАНА

Поскольку пектины играют важную роль в адгезии клеток, модификации их синтеза можно рассматривать как перспективный инструмент для регуляции адгезии. В биосинтезе пектинов участвует большое количество ферментов, среди которых гликозил- и метилтрансферазы (Mohnen, 2008).

Гликозилтрансферазы

Полимеризация пектинов происходит за счет присоединения к цепи полисахарида сахаров, представленных в активированной форме нуклеозиддифосфатных остатков с формированием гликозидных связей. Большая часть таких остатков синтезируется в цитозоле, а сама сборка полисахаридных цепей осуществляется во внутреннем пространстве аппарата Гольджи (Lampugnani et al., 2018). В клеточную стенку пектины доставляются

посредством экзоцитоза везикул, при участии актиновых и миозиновых компонентов цитоскелета (Mohnen, 2008).

Гликозилтрансферазы (*glycosyltransferases*, GTs) – группа ферментов, катализирующих перенос фрагментов простых сахаров от активированных донорных молекул к специфическим акцепторным молекулам с образованием гликозидных связей (Zabotina et al., 2021). В настоящий момент известно более 100 семейств GTs. Гомология внутри семейств GTs и между ними низкая, так как большинство GTs ответственно за формирование специфических связей. GTs подразделяют на два типа. Тип I включает в себя ферменты, катализирующие непрерывное добавление гликозильных остатков и обеспечивающие тем самым эффективную полимеризацию. Обычно это интегральные мембранные белки, которые синтезируют гомополисахариды. GTs типа II катализируют только один перенос, после которого комплекс фермент–продукт диссоциирует. GTs типа II обычно имеют общую топологию и состоят из короткого N-концевого цитоплазматического домена, трансмембранного домена и большого каталитического домена, обращенного к просвету Гольджи (Lampugnani et al., 2018).

GTs, принимающие участие в синтезе пектинов, – часть семейства GT8. Внутри семейства GT8 выделяют четыре группы ферментов: гликогенин гликозилтрансферазы; инозитол 1- α -галактозилтрансферазы; галактуронозилтрансферазы; UDP-Gal:гликозид α -1,3-галактозилтрансферазы (Yin et al., 2011). Третья группа включает в себя GTs, принадлежащие к генному семейству *GAUT1*-подобных генов, – они участвуют в полимеризации полисахаридов клеточной стенки растений (Amos, Mohnen, 2019). Семейство *GAUT1*-подобных генов включает в себя 25 генов *A. thaliana*, среди которых 15 генов *GAUT* с идентично-

Таблица 1. Характеристика генов клады GAUT из семейства GT8

Ген	Функция белка	Место экспрессии	Источник
<i>GAUT1</i>	α -1,4-галактуранозилтрансфераза, катализирует присоединение галактурановой кислоты от UDP-GalA к невосстанавливаемому концу полимеризующегося гомогалактуронана	Все клетки	Sterling et al., 2001
<i>GAUT2</i>	Результат неполной дупликации гена <i>GAUT1</i> ; характерен исключительно для <i>A. thaliana</i>	Не экспрессируется	Caffall et al., 2009
<i>GAUT4</i>	Участвует в синтезе гомогалактуронана	Все клетки	Biswal et al., 2018
<i>GAUT5</i> <i>GAUT6</i>	Связываются в комплекс с <i>GAUT1</i> для закоривания	Пыльники и пыльцевые трубки	Lund et al., 2020
<i>GAUT7</i>	Ассоциируется с <i>GAUT1</i> в комплекс <i>GAUT1:GAUT7</i> , функционирует для закрепления <i>GAUT1</i> на мембране Гольджи	Все клетки	Amos et al., 2018
<i>GAUT8</i>	Принимает участие в синтезе гомогалактуронана и ксилана клеточной стенки	Сосудистые ткани стебля	Bouton et al., 2002; Orfila et al., 2005
<i>GAUT9</i>	Предположительно, участвует в синтезе гомогалактуронана и ксилана	Все клетки	Caffall et al., 2009
<i>GAUT10</i>	Предположительно, участвуют в синтезе гомогалактуронана		
<i>GAUT11</i>	Предположительно, участвуют в синтезе гомогалактуронана		
<i>GAUT12</i>	Участвует в синтезе глюкуроноксилана и гомогалактуронана, принимает участие в синтезе вторичных клеточных стенок	Сосудистые ткани	Persson et al., 2007; Caffall et al., 2009
<i>GAUT13</i> <i>GAUT14</i>	Участвуют в синтезе гомогалактуронана, ксилана	Пыльца и пыльцевые трубки	Lund et al., 2020

Примечание: данных о функциональной активности продуктов генов *GAUT3*, *GAUT15* найдено не было.

стью 37–68% (56–84% сходства) с *GAUT1* (Sterling et al., 2006) и 10 *GAUT1*-подобных генов (*GATLs*) с процентом идентичности 39–44% (43–53% сходства) с *GAUT1* (Mohnen, 2008). Сравнительный анализ (табл. 1) генов *GAUT A. thaliana*, *Populus trichocarpa* и *Oryza sativa* позволил классифицировать их на семь клад: клада A-1 (*GAUT 1–3*); A-2 (*GAUT4*); A-3 (*GAUT 5* и *6*); A-4 (*GAUT7*); B-1 (*GAUT 8* и *9*); B-2 (*GAUT 10* и *11*); C (*GAUT 12–15*) (Caffall et al., 2009).

Ген *GAUT1* кодирует белок гомогалактуронан α -1,4-галактуранозилтрансферазу I (HG: α 1,4GalAT), являющийся ферментом биосинтеза пектинов с биохимически подтвержденной активностью (Sterling et al., 2001). Фермент *GAUT1* катализирует присоединение галактурановой кислоты от UDP-GalA к невосстанавливаемому концу полимеризующегося гомогалактуронана (Atmodjo et al., 2011). Сразу после синтеза белок *GAUT1* имеет трансмембранный и каталитический домены, но в процессе посттрансляционных модификаций происходит разрезание между Met167 и Arg168, в результате чего белок утрачивает свой трансмембранный домен. Для того чтобы оставаться связанным с мембраной аппарата Гольджи, белок *GAUT1* формирует комплекс с другой галактуранозилтранс-

феразой – *GAUT7* (Atmodjo et al., 2013). Оба фермента принадлежат к GTII и имеют характерную для этого типа структуру. Последовательности генов, кодирующих белки *GAUT1* и *GAUT7* идентичны на 36%, но несмотря на это белок *GAUT7* не имеет каталитической галактуранозилтрансферазной активности. Он ассоциируется с *GAUT1* в комплексе *GAUT1:GAUT7*, который поддерживается как ковалентными, так и нековалентными взаимодействиями. *GAUT1* является каталитической субъединицей комплекса, а *GAUT7* функционирует, по крайней мере частично, для закрепления *GAUT1* на мембране Гольджи (Amos et al., 2018). Этот комплекс действует на этапе элонгации, но пока остается неизвестным, каким образом происходит инициация синтеза гомогалактуронана и принимает ли в ней участие комплекс *GAUT1:GAUT7*.

GAUT1 и *GAUT7* – наиболее активно экспрессирующиеся гены семейства *GAUT* у *A. thaliana*. Следующий по уровню экспрессии – ген *GAUT4* (Biswal et al., 2018). Белок *GAUT4* имеет очень сходную с *GAUT1* аминокислотную последовательность (83% сходства), что позволяет предполагать сходство функций этих двух ферментов (Caffall et al., 2009). Подавление экспрессии гена

GAUT4 привело к снижению содержания гомо-галактуронана в клетках проса (Biswal et al., 2018).

Продукты генов *GAUT5* и *GAUT6* так же, как и белок *GAUT7*, могут связываться с *GAUT1*. Но, в отличие от *GAUT7*, эти гены активно экспрессируются в основном в пыльниках и пыльцевых трубках, где также принимают участие в синтезе гомо-галактуронана (Lund et al., 2020).

Ген *GAUT2*, вероятно, является результатом неполной дубликации гена *GAUT1*, он характерен исключительно для *A. thaliana*. Это подтверждается отсутствием активного транскрипта, который являлся бы продуктом этого гена. Изменение экспрессии гена *GAUT2* не повлияло на фенотип растений (Caffall et al., 2009).

Другой ген, значимый для биосинтеза пектина и принадлежащий к группе *GAUT*, это *GAUT8/QUA1*, продукт которого имеет 77%-ное сходство по аминокислотной последовательности с *GAUT1*. Этот ген высоко экспрессируется в сосудистых тканях стебля растения (Orfila et al., 2005). У гетерозиготных мутантов *A. thaliana qua1-1* наблюдается сниженная адгезия эпидермальных клеток листьев и клеток верхушки корня (Durand et al., 2009), что приводит к карликовости растений, а гомозиготные мутанты имеют летальный фенотип (Caffall et al., 2009). В клеточных стенках мутантов на 25% снижено количество GalA. В мембранных препаратах стеблей мутантов *qua1-1* снижена активность как α -1,4-GalAT, так и β -1,4-XylT (Orfila et al., 2005). Это позволяет предполагать, что фермент *GAUT8* принимает участие в синтезе не только гомо-галактуронана, но и ксилана клеточной стенки.

Мутанты по генам *GAUT9*, *GAUT10* и *GAUT11* также характеризовались сниженным содержанием GalA в проростках, а *GAUT9* – еще и повышенным содержанием ксилана. Следует подчеркнуть, что явных нарушений адгезии или изменения роста у мутантов по этим генам не наблюдалось (Caffall et al., 2009).

IRX8 – продукт гена *GAUT12* – характеризуется 61%-ным аминокислотным сходством с *GAUT1*. Мутанты *gaut12/irx8* имеют нарушения в ксилеме и более тонкую вторичную клеточную стенку (Persson et al., 2007). Такой фенотип проявляется за счет пониженного содержания глюкуроноксилана и гомо-галактуронана (Caffall et al., 2009). Кроме того, наличие хотя бы одной не мутантной аллели *GAUT12/IRX8*, как и в случае с *GAUT8/QUA1*, необходимо для выживаемости растений, поскольку гомозиготные мутации оказались летальными (Caffall et al., 2009). Наиболее высокий уровень экспрессии гена *GAUT12* наблюдается в сосудистых тканях, в богатых глюкуроноксиланом областях, что позволяет предполагать, что этот ген участвует в синтезе вторичных клеточных стенок у двудольных растений (Persson et al., 2007).

Ферменты, кодируемые генами *GAUT13* и *GAUT14*, принимают активное участие в синтезе гомо-галактуронана в пыльце и пыльцевых трубках. Экспрессия этих генов в пыльцевых трубках оказалась в 6–9 раз больше, чем экспрессия *GAUT1* (Lund et al., 2020). Мутанты *gaut13* и *gaut14* характеризуются повышенным содержанием GalA и пониженным содержанием Xyl и Rha в клеточных стенках. Выявленная коэкспрессия этих генов с *GAUT12* свидетельствует об их участии в синтезе ксилана (Caffall et al., 2009).

Несмотря на то, что для большинства генов семейства *GAUT* была показана их важность в процессе синтеза компонентов клеточной стенки, все имеющиеся на данный момент результаты основаны на изучении мутантов по определенным генам, и точная биохимическая роль для большинства продуктов генов этого семейства до сих пор не подтверждена.

Метилтрансферазы

Важную роль для поддержания структуры клеточной стенки играет метилэтерификация гомо-галактуронана. Галактуроновая кислота в составе гомо-галактуронана большинства клеточных стенок этерифицирована по карбоксильной группе C6 (Derbyshire et al., 2007). Реакцию этерификации катализирует фермент гомо-галактуронан-метилтрансфераза (homogalacturonan methyltransferase, HG-MT). HG-MT связана с мембраной и имеет каталитический домен, расположенный в просвете аппарата Гольджи. В качестве донора метильной группы при этерификации выступает S-аденозилметионин (S-adenosylmethionine, SAM) (Ridley et al., 2001). Предполагается, что растения могут содержать несколько HG-MT, которые отличаются сродством к гомо-галактуронану с разной степенью метилирования (Mohnen, 2008). HG-MT коэкспрессируется с *GAUT1* и *GAUT7*, это указывает на то, что процессы синтеза и этерификации пектина связаны друг с другом (Caffall, Mohnen, 2009). Однако было показано, что синтез все же предшествует этерификации (Atmodjo et al., 2013).

Описано несколько генов, кодирующих предположительные HG-MT, среди которых гены *QUA2* и *QUA3*, принадлежащие семейству *QUA2*. Семейство *QUA2* включает в себя 29 генов *A. thaliana*, для каждого из которых характерен предполагаемый SAM-зависимый MT-домен. Ряд экспериментов показал, что эти гены могут действительно кодировать HG-MT. Мутантные растения *A. thaliana qua2-1* характеризуются карликовым фенотипом, сниженным на 50% содержанием гомо-галактуронана и дефектами в клеточной адгезии (Mouille et al., 2007). В клетках, которые были подвергнуты нокдауну гена *QUA3* посредством РНК-интерференции, пектин был менее этерифицирован, по сравнению с диким типом. Кроме

того, были отмечены изменения в составе и сборке полисахаридов клеточной стенки. Однако нокадаун *QUA3*, в отличие от *QUA2*, никак не повлиял на адгезию клеток (Miao et al., 2011). Помимо генов семейства *QUA2*, предположительную роль в этерификации пектинов может играть белок *CGR3* (cotton Golgi-related 3). При анализе данного белка из *A. thaliana* было показано, что он имеет общие с S-аденозилметионинметилтрансферазами консервативные остатки. *CGR3* локализован в аппарате Гольджи, и ген, его кодирующий, коэкспрессируется с генами биосинтеза пектина. Клеточные стенки мутантов с нокаутом гена *CGR3* имеют сниженный уровень этерификации гомогалактуронана (Held et al., 2011).

Несмотря на все эксперименты с изменением экспрессии генов *QUA2*, *QUA3* и *CGR3*, функциональная активность их белковых продуктов в качестве НГ-МТ биохимически не была подтверждена.

Пектинметилэстеразы и полигалактуроназы

Адгезия клеток растений необходима для поддержания целостности организма, но процесс разделения клеток также важен для протекания некоторых процессов в жизни растения. Разделение клеток после деления происходит за счет двух процессов: деметилирования гомогалактуронана и гидролиза полимерных цепочек. Для осуществления этих процессов в клетках растений существуют ферменты — PMEс и полигалактуроназы (polygalacturonase, PGs) соответственно (Daher, Braybrook, 2015).

PMEс имеют активность, обратную метилтрансферазам, — они деметилируют полигалактуронаны клеточных стенок. Семейство генов *PME* включает в себя 68 *PME*-связанных генов у *A. thaliana* (Micheli, 2001). Активность PMEс необходима для последующей работы полигалактуроназ, которые гидролизуют деэтерифицированный гомогалактуронан. Полигалактуроназы представлены крупным семейством генов, которые являются положительными регуляторами созревания плодов, опадения листьев, роста и расхождения клеток (Xiao et al., 2014).

Различные мутанты *A. thaliana* и других видов растений как по генам пектинметилэстераз, так и по генам полигалактуроназ показали, что оба эти фермента необходимы для разделения клеток в различных частях растений (Bird et al., 1988; Atkinson et al., 2002; Rhee et al., 2003; Francis et al., 2006; Ogawa et al., 2009). Эти эксперименты подтверждают, что PG-опосредованная PME-зависимая деградация пектина — ключевое событие в разделении клеток в онтогенезе растения.

ИССЛЕДОВАНИЯ, НАПРАВЛЕННЫЕ НА ПОИСК СПОСОБОВ СНИЖЕНИЯ АДГЕЗИОННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ МЕЖДУ КЛЕТКАМИ

Межклеточная адгезия, лежащая в основе образования клеточных агрегатов при культивировании клеток растений в жидких питательных средах, — характерная черта любого растения как многоклеточного организма. Формирование агрегатов в культуре клеток растений представляется нежелательным с точки зрения коммерческого использования культур клеток растений в качестве экспрессионных платформ для наработки рекомбинантных белков в биореакторах, а также для получения фармацевтически ценных вторичных метаболитов. Именно этот факт послужил толчком к развитию исследований, направленных на поиск способов снижения адгезионных характеристик клеток растений *in vitro*. Более того, нарушение адгезионных взаимодействий между клетками может послужить одним из способов увеличения метаболических возможностей клеточных культур растений за счет формирования более мелких клеточных агрегатов с большей доступностью компонентов питательной среды составляющим их клеткам.

Первые попытки снижения агрегированности клеточных культур и уменьшения размеров клеточных агрегатов были направлены на разрушение уже сформировавшихся клеточных стенок, что приводило к ослаблению адгезионных взаимодействий между клетками. Для этих целей использовались различные подходы, направленные на разрушение клеточных стенок с применением химических и механических способов (Patil, Roberts, 2013). Успешность применения некоторых из них была связана не только с уменьшением агрегированности отдельных видов клеточных культур, но и приводила к возрастанию их продуктивности в отношении целевых метаболитов.

С накоплением знаний о генетической природе межклеточной адгезии клеток растений, а также с развитием и совершенствованием молекулярных методов, появились способы влияния на адгезивные свойства путем нарушения синтеза конкретных компонентов клеточных стенок. На примере серии Т-ДНК-мутаций *A. thaliana* была продемонстрирована успешность выключения (нокаутов) экспрессии некоторых генов, ответственных за синтез компонентов клеточных стенок. Снижение экспрессии этих генов за счет применения методов РНК-интерференции (нокадауны) также было связано с изменением состава клеточных стенок и ослаблением адгезионных взаимодействий между клетками. Так, например, Т-ДНК-индуцированные мутанты *A. thaliana* с инсерцией в район гена *GAUT4* характеризовались пониженным содержанием гомогалактуронана в клеточных стенках (Caffall et al., 2009). По-

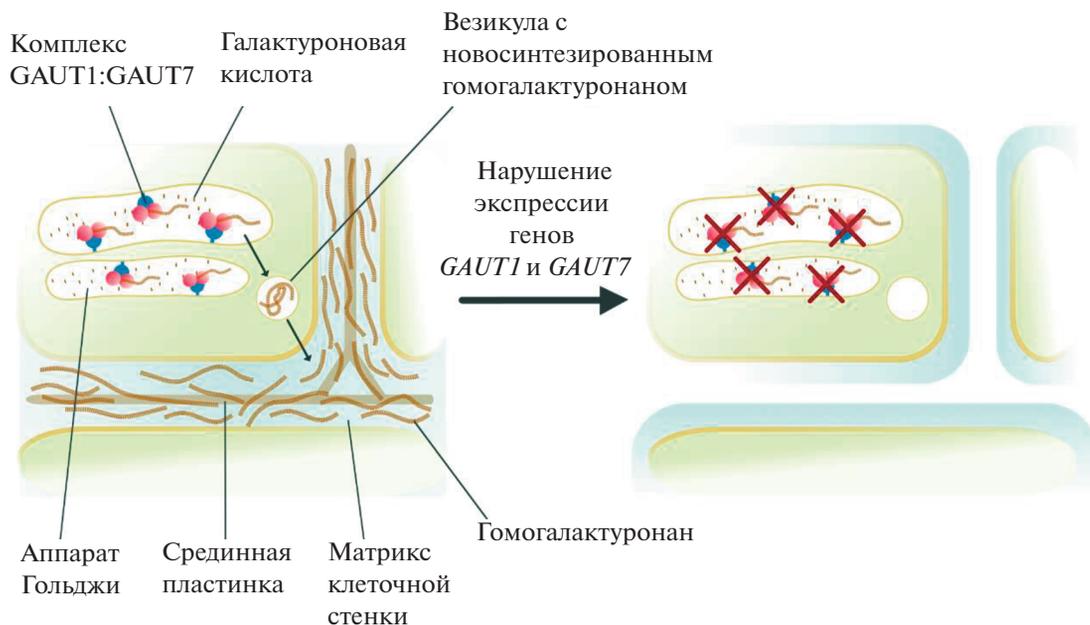


Рис. 4. Гипотетическая схема влияния нарушения экспрессии генов *GAUT1* и *GAUT7* на межклеточные взаимодействия.

давление экспрессии этого же гена методом РНК-интерференции приводило не только к снижению как количества гомогалактуронана, так и содержания рамногалактуронана II, а также к нарушению поперечных кальциевых сшивок между пектиновыми полимерами (Li et al., 2019). Среди Т-ДНК-мутантов по генам *GAUT9*, *GAUT10*, *GAUT11*, *GAUT13*, *GAUT14* наблюдались изменения в количественном содержании галактуроновою кислоты, что может свидетельствовать о нарушениях синтеза пектиновых полимеров (Caffall et al., 2009). Нарушение экспрессии гена *GAUT12* путем РНК-интерференции также приводило к снижению содержания пектиновых полимеров в клеточных стенках (Biswal et al., 2015). Для Т-ДНК-мутантов по гену *GAUT8/QUA1*, помимо изменений в составе клеточных стенок, было показано нарушение межклеточной адгезии и снижение агрегированности в суспензионной культуре клеток *A. thaliana* (Bouton et al., 2002; Orfila et al., 2005).

Помимо генов семейства *GAUT*, нарушение экспрессии которых приводило к изменению строения клеточной стенки, выявлены гены других семейств, нарушение экспрессии которых также приводило к ослаблению адгезионных характеристик клеток растений. Так, нокдаун методом РНК-интерференции гена *QUA3*, принадлежащего семейству генов *QUA* и кодирующего гомогалактуронат метилтрансферазу, был связан с изменениями в составе клеточных стенок *A. thaliana* (Miao et al., 2011). Т-ДНК-мутация по гену *QUA2* привела к снижению количества гомогалактуронана в клеточной стенке и к нарушениям межклеточной

точной адгезии (Mouille et al., 2007). Таким образом, вышеприведенные примеры успешного применения методов инсерционного мутагенеза и РНК-интерференции убедительно демонстрируют, что пути биосинтеза различных компонентов клеток растений, обеспечивающих их адгезионные характеристики, могут быть модифицированы.

Необходимо подчеркнуть, что среди генов семейства *GAUT* наибольший интерес, с точки зрения влияния на межклеточную адгезию и снижение агрегированности, представляют гены *GAUT1* и *GAUT7*, поскольку именно они играют ведущую роль в полимеризации гомогалактуронана (Atmodjo et al., 2011). Можно предполагать, что нарушение структуры этих генов и подавление их экспрессии приведут к снижению синтеза пектинов и нарушению структуры клеточной стенки, что в результате будет связано с ослаблением межклеточной адгезии. Однако пока нет работ, демонстрирующих то, как нарушение экспрессии этих генов влияет на состав клеточных стенок и на взаимодействие клеток растений в суспензионных культурах. На рис. 4 представлена гипотетическая схема возможных последствий выключения генов *GAUT1* и *GAUT7*.

Гены *GAUT1* и *GAUT7* кодируют белки, которые вместе образуют комплекс полимеризации пектинов, расположенный на внутренней стороне мембраны аппарата Гольджи. *GAUT7* служит мембранным якорем для *GAUT1*, который в свою очередь отвечает за присоединение галактуроновою кислоты к полимерной цепи гомогалактуро-

нана. Синтезированные полимеры посредством везикулярного транспорта доставляются к клеточной стенке, где входят в состав срединных пластинок и образуют сайты адгезии клеток растений. Предполагается, что при нарушении структуры генов *GAUT1* и *GAUT7* белковый комплекс *GAUT1:GAUT7* не будет формироваться, вследствие чего нарушится процесс полимеризации гомогалактуронана. Отсутствие в клеточной стенке главного компонента, ответственного за адгезию клеток, может привести к полному их разделению и снижению количества клеток, входящих в состав агрегатов при культивировании суспензий. Уже известны геномные последовательности генов *GAUT1* и *GAUT7* для *A. thaliana* и последовательности их ортологов у других видов растений (Yin et al., 2011), что позволяет применять методы генетического редактирования с использованием направляемых нуклеаз, например Cas9, для получения линий с изменениями в заданных участках интересующих генов.

Создание серии мутаций с нокаутами по генам *GAUT1* и *GAUT7* представляется чрезвычайно перспективным в биотехнологии как с точки зрения практического применения данного подхода для снижения агрегированности клеточных культур растений, так и для решения фундаментальной проблемы, направленной на выявление генов, участвующих в формировании адгезионных характеристик клеток растений. Хорошо разработанные к настоящему времени простые и надежные методы детекции флуоресцентных белков (зеленого флуоресцентного белка и его аналогов) позволят исследователям использовать гены этих белков в качестве целевых для оценки изменения метаболических характеристик клеточной культуры, полученной на основе мутаций по генам, вовлеченным в синтез компонентов клеточной стенки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За счет простоты культивирования, а также наличия механизмов эукариотического фолдинга и посттрансляционных модификаций белков, растительные клеточные культуры являются перспективной платформой для наработки рекомбинантных белков в производственных масштабах. Однако тот факт, что выход белка в растительных клетках существенно ниже, чем в других системах экспрессии, затрудняет их использование. Поскольку низкий выход продукта может быть следствием неоднородности метаболических способностей клеток в разных частях агрегатов, образуемых растительными клетками в суспензиях, то одним из подходов к увеличению накопления целевого продукта может стать снижение размера таких агрегатов.

В основе образования агрегатов лежит характерное для большинства растительных клеток яв-

ление межклеточной адгезии — за счет компонентов клеточных стенок клетки не расходятся полностью после завершения цикла деления. Адгезионные взаимодействия — это комплексное явление, на которое оказывает влияние большое количество различных факторов. Однако показано, что наибольший вклад в адгезию вносят пектины клеточных стенок — благодаря их взаимодействию друг с другом и с другими компонентами клеточных стенок клетки остаются связанными. В синтезе и модификации пектиновых полимеров принимает участие большое количество ферментов, многие из которых кодируются генами, принадлежащими семейству *GAUT*. Показано, что нарушение экспрессии некоторых генов этого семейства приводит к изменению количественного содержания пектинов клеточных стенок, а часть таких мутаций — причина нарушения межклеточной адгезии.

Нарушение экспрессии генов, участвующих в синтезе пектинов, может способствовать изучению влияния различных этапов синтеза пектинов на адгезию, а также выявлению взаимосвязи агрегированности культуры и количества нарабатываемого рекомбинантного белка. Показано, что снижение размера агрегатов влияет на продуктивность культур в отношении вторичных метаболитов, поэтому такая же связь может быть обнаружена и в отношении рекомбинантных белков. Наиболее интересными в данном контексте являются гены, участвующие в формировании главного комплекса полимеризации гомогалактуронана — *GAUT1* и *GAUT7*, поскольку их вклад в адгезию представляется наибольшим.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования, грант № FWNR-2022-0022.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Горшкова Т.А. Растительная клеточная стенка как динамичная система. М.: Наука, 2007. 428 с.
- Загорская А.А., Дейнеко Е.В. Суспензионные культуры клеток растений как платформа для получения рекомбинантных белков // Физиол. раст. 2017. Т. 64. С. 403–417.

- Смоленская И.Н., Решетняк О.В., Смирнова Ю.Н. и др. Противоположное влияние синтетических ауксинов – 2,4-дихлорфеноксиуксусной и 1-нафтилуксусной кислот на рост культуры клеток женьшеня настоящего и синтез гинзенозидов // Физиол. раст. 2007. Т. 54. № 2. С. 243–252.
- Amos R.A., Mohnen D. Critical review of plant cell wall matrix polysaccharide glycosyltransferase activities verified by heterologous protein expression // Front. Plant Sci. 2019. Т. 10. P. 915.
- Amos R.A., Pattathil S., Yang J. et al. A two-phase model for the non-processive biosynthesis of homogalacturonan polysaccharides by the GAUT1:GAUT7 complex // J. Biol. Chem. 2018. V. 293. № 49. P. 19047–19063.
- Anderson C.T., Kieber J.J. Dynamic construction, perception, and remodeling of plant cell walls // Annu. Rev. Plant Biol. 2020. V. 71. P. 39–69.
- Atkinson R.G., Schröder R., Hallett I.C. et al. Overexpression of polygalacturonase in transgenic apple trees leads to a range of novel phenotypes involving changes in cell adhesion // Plant Physiol. 2002. V. 129. № 1. P. 122–133.
- Atmodjo M.A., Sakuragi Y., Zhu X. et al. Galacturonosyltransferase (GAUT)1 and GAUT7 are the core of a plant cell wall pectin biosynthetic homogalacturonan:galacturonosyltransferase complex // PNAS USA. 2011. V. 108. № 50. P. 20225–20230.
- Atmodjo M.A., Hao Z., Mohnen D. Evolving views of pectin biosynthesis // Annu. Rev. Plant Biol. 2013. V. 64. P. 747–779.
- Baldwin T.C., McCann M.C., Roberts K. A novel hydroxyproline-deficient arabinogalactan protein secreted by suspension-cultured cells of *Daucus carota* (purification and partial characterization) // Plant Physiol. 1993. T. 103. № 1. C. 115–123.
- Bird C.R., Smith C.J.S., Ray J.A. et al. The tomato polygalacturonase gene and ripening-specific expression in transgenic plants // Plant Mol. Biol. 1988. V. 11. P. 651–662.
- Biswal A.K., Hao Z., Pattathil S. et al. Downregulation of GAUT12 in *Populus deltoides* by RNA silencing results in reduced recalcitrance, increased growth and reduced xylan and pectin in a woody biofuel feedstock // Biotechnol. Biofuels. 2015. V. 8. № 1. P. 41.
- Biswal A.K., Atmodjo M.A., Li M. et al. Sugar release and growth of biofuel crops are improved by downregulation of pectin biosynthesis // Nat. Biotechnol. 2018. V. 36. № 3. P. 249–257.
- Borassi C., Sede A.R., Mecchia M.A. et al. An update on cell surface proteins containing extensin-motifs // J. Exp. Bot. 2016. V. 67. № 2. P. 477–487.
- Bouton S., Leboeuf E., Mouille G. et al. QUASIMODO1 encodes a putative membrane-bound glycosyltransferase required for normal pectin synthesis and cell adhesion in *Arabidopsis* // Plant Cell. 2002. V. 14. № 10. P. 2577–2590.
- Caffall K.H., Mohnen D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides // Carbohydr. Res. 2009. V. 344. № 14. P. 1879–1900.
- Caffall K.H., Pattathil S., Phillips S.E. et al. *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutants implicate GAUT genes in the biosynthesis of pectin and xylan in cell walls and seed testa // Mol. Plant. 2009. V. 2. № 5. P. 1000–1014.
- Cumming C.M., Rizkallah H.D., McKendrick K.A. et al. Biosynthesis and cell-wall deposition of a pectin–xyloglucan complex in pea // Planta. 2005. V. 222. № 3. P. 546–555.
- Daher F.B., Braybrook S.A. How to let go: pectin and plant cell adhesion // Front. Plant Sci. 2015. V. 6. P. 523.
- Derbyshire P., McCann M.C., Roberts K. Restricted cell elongation in *Arabidopsis* hypocotyls is associated with a reduced average pectin esterification level // BMC Plant Biol. 2007. V. 7. № 1. P. 31.
- Diwan R., Malpathak N. Histochemical localization in *Ruta graveolens* cell cultures: elucidating the relationship between cellular differentiation and furanocoumarin production // Vitro. Cell. Dev. Biol. Plant. 2010. V. 46. № 1. P. 108–116.
- Drakakaki G. Polysaccharide deposition during cytokinesis: challenges and future perspectives // Plant Sci. 2015. V. 236. P. 177–184.
- Durand C., Vitré-Gibouin M., Follet-Gueye M.L. et al. The organization pattern of root border-like cells of *Arabidopsis* is dependent on cell wall homogalacturonan // Plant Physiol. 2009. V. 150. № 3. P. 1411–1421.
- Edahiro J., Seki M. Phenylpropanoid metabolite supports cell aggregate formation in strawberry cell suspension culture // J. Biosci. Bioeng. 2006. V. 102. № 1. P. 8–13.
- Ellinger D., Voigt C.A. Callose biosynthesis in *Arabidopsis* with a focus on pathogen response: what we have learned within the last decade // Ann. Bot. 2014. V. 114. № 6. P. 1349–1358.
- Firek S., Draper J., Owen M.R.L. et al. Secretion of a functional single-chain Fv protein in transgenic tobacco plants and cell suspension cultures // Plant Mol. Biol. 1993. V. 23. P. 861–870.
- Francis K.E., Lam S.Y., Copenhaver G.P. Separation of *Arabidopsis* pollen tetrads is regulated by quartet1, a pectin methyltransferase gene // Plant Physiol. 2006. V. 142. № 3. P. 1004–1013.
- George E.F., Hall M.A., Klerk G.J. Plant propagation by tissue culture // Plant propagation by tissue culture / Eds C.E. Green, D.A. Somers, W.P. Hackett, D.D. Biesboer. Dordrecht: Springer, 2008. P. 283–333.
- Gu Y., Rasmussen C.G. Cell biology of primary cell wall synthesis in plants // Plant Cell. 2022. T. 34. № 1. C. 103–128.
- Haigler C.H. Two types of cellulose synthesis complex knit the plant cell wall together // PNAS USA. 2018. T. 115. № 27. C. 6882–6884.
- Hayashi T., Yoshida K. Cell expansion and single-cell separation induced by colchicine in suspension-cultured soybean cells // PNAS USA. 1988. V. 85. № 8. P. 2618–2622.
- Held M.A., Be E., Zemelis S. et al. CGR3: a Golgi-localized protein influencing homogalacturonan methylesterification // Mol. Plant. 2011. V. 4. № 5. P. 832–844.
- Henshaw G.G., Jha K.K., Mehta A.R. et al. Studies on the growth in culture of plant cells. I. Growth patterns in batch propagated suspension cultures // J. Exp. Bot. 1966. V. 17. № 2. P. 362–377.
- Hulst A.C., Meyer M.M.T., Breteler H., Tramper J. Effect of aggregate size in cell cultures of *Tagetes patula* on thiophene production and cell growth // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1989. V. 30. P. 18–25.

- Huxham I.M., Jarvis M.C., Shakespeare L. et al. Electron-energy-loss spectroscopic imaging of calcium and nitrogen in the cell walls of apple fruits // *Planta*. 1999. V. 208. № 3. P. 438–443.
- Jarvis M.C., Briggs S.P.H., Knox J.P. Intercellular adhesion and cell separation in plants // *Plant. Cell Environ.* 2003. V. 26. № 7. P. 977–989.
- Kieran P.M., Malone D.M., MacLoughlin P.F. Effects of hydrodynamic and interfacial forces on plant cell suspension systems // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2000. V. 67. P. 139–177.
- Kinnersley A.M., Dougall D.K. Increase in anthocyanin yield from wild-carrot cell cultures by a selection system based on cell-aggregate size // *Planta*. 1980. V. 149. № 2. P. 200–204.
- Kolewe M.E., Gaurav V., Roberts S.C. Pharmaceutically active natural product synthesis and supply via plant cell culture technology // *Mol. Pharm.* 2008. V. 5. № 2. P. 243–256.
- Kolewe M.E., Henson M.A., Roberts S.C. Analysis of aggregate size as a process variable affecting paclitaxel accumulation in *Taxus* suspension cultures // *Biotechnol. Prog.* 2011. V. 27. № 5. P. 1365–1372.
- Kurz W.G.W. A chemostat for growing higher plant cells in single cell suspension cultures // *Exp. Cell Res.* 1971. V. 64. № 2. P. 476–479.
- Lampugnani E.R., Khan G.A., Somssich M., Persson S. Building a plant cell wall at a glance // *J. Cell Sci.* 2018. V. 131. № 2. P. 1–6.
- Li M., Yoo C.G., Pu Y. et al. Downregulation of pectin biosynthesis gene *GAUT4* leads to reduced ferulate and lignin-carbohydrate cross-linking in switchgrass // *Commun. Biol.* 2019. V. 2. № 1. P. 22.
- Lin S., Miao Y., Huang H. et al. Arabinogalactan proteins: focus on the role in cellulose synthesis and deposition during plant cell wall biogenesis // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. № 12. P. 6578.
- Liau D.F., Boll W.G. Growth and patterns of growth and division of cell suspension cultures of bush bean (*Phaseolus vulgaris* cv. Contender) // *Canad. J. Bot.* 1971. V. 49. № 7. P. 1131–1139.
- Lund C.H., Stenbæk A., Atmodjo M.A. et al. Pectin synthesis and pollen tube growth in *Arabidopsis* involves three GAUT1 Golgi-anchoring proteins: GAUT5, GAUT6, and GAUT7 // *Front. Plant Sci.* 2020. V. 11. P. 585774.
- Manfield I.W., Bernal A.J., Moller I. et al. Re-engineering of the PAM1 phage display monoclonal antibody to produce a soluble, versatile anti-homogalacturonan scFv // *Plant Sci.* 2005. V. 169. № 6. P. 1090–1095.
- McCann M.C., Knox J.P. Plant cell wall biology: polysaccharides in architectural and developmental contexts. Ch. 14 // *Plant polysaccharides: biosynthesis and bio-engineering* / Ed. P. Ulvskov. N.Y.: Wiley-Blackwell, 2010. P. 343–366.
- Miao Y., Li H., Shen J. et al. *QUASIMODO3 (QUA3)* is a putative homogalacturonan methyltransferase regulating cell wall biosynthesis in *Arabidopsis* suspension-cultured cells // *J. Exp. Bot.* 2011. V. 62. № 14. P. 5063–5078.
- Micheli F. Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology // *Trends Plant Sci.* 2001. V. 6. № 9. P. 414–419.
- Mohnen D. Pectin structure and biosynthesis // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2008. V. 11. № 3. P. 266–277.
- Mouille G., Ralet M., Cavalier C. et al. Homogalacturonan synthesis in *Arabidopsis thaliana* requires a Golgi-localized protein with a putative methyltransferase domain // *Plant J.* 2007. V. 50. № 4. P. 605–614.
- Naill M.C., Roberts S.C. Preparation of single cells from aggregated *Taxus* suspension cultures for population analysis // *Biotechnol. Bioeng.* 2004. V. 86. № 7. P. 817–826.
- Ogawa M., Kay P., Wilson S., Swain S.M. *Arabidopsis* dehiscence zone polygalacturonase1 (ADPG1), ADPG2, and quartet2 are polygalacturonases required for cell separation during reproductive development in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* 2009. V. 21. № 1. P. 216–233.
- Orfila C., Sørensen S.O., Harholt J. et al. *QUASIMODO1* is expressed in vascular tissue of *Arabidopsis thaliana* inflorescence stems, and affects homogalacturonan and xylan biosynthesis // *Planta*. 2005. V. 222. № 4. P. 613–622.
- Parker C.C., Parker M.L., Smith A.C., Waldron K.W. Pectin distribution at the surface of potato parenchyma cells in relation to cell–cell adhesion // *J. Agric. Food Chem.* 2001. V. 49. № 9. P. 4364–4371.
- Patil R.A., Roberts S.C. Implications of cellular heterogeneity on plant cell culture performance // *Biotechnology for medicinal plants* / Eds S. Chandra, H. Lata, A. Varma. Berlin, Heidelberg: Springer, 2013. P. 207–239.
- Patil R.A., Kolewe M.E., Roberts S.C. Cellular aggregation is a key parameter associated with long term variability in paclitaxel accumulation in *Taxus* suspension cultures // *Plant Cell. Tiss. Organ Cult.* 2013. V. 112. № 3. P. 303–310.
- Peaucelle A., Braybrook S.A., Guillou L.L. et al. Pectin-induced changes in cell wall mechanics underlie organ initiation in *Arabidopsis* // *Curr. Biol.* 2011. V. 21. № 20. P. 1720–1726.
- Persson S., Caffall K.H., Freshour G. et al. The *Arabidopsis* irregular xylem8 mutant is deficient in glucuronoxylan and homogalacturonan, which are essential for secondary cell wall integrity // *Plant Cell.* 2007. V. 19. № 1. P. 237–255.
- Popper Z.A., Fry S.C. Xyloglucan-pectin linkages are formed intra-protoplasmically, contribute to wall-assembly, and remain stable in the cell wall // *Planta*. 2008. V. 227. № 4. P. 781–794.
- Prenosil J.E., Heggin M. Self-immobilized plant cell aggregates in a bioreactor system with low shear stress // *Ann. NY Acad. Sci.* 1990. V. 613. № 1. P. 234–247.
- Rhee S.Y., Osborne E., Poindexter P.D., Somerville C.R. Microspore separation in the *quartet* 3 mutants of *Arabidopsis* is impaired by a defect in a developmentally regulated polygalacturonase required for pollen mother cell wall degradation // *Plant Physiol.* 2003. V. 133. № 3. P. 1170–1180.
- Ridley B.L., O'Neill M.A., Mohnen D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling // *Phytochemistry*. 2001. V. 57. № 6. P. 929–967.
- Roberts J.A., Gonzalez-Carranza Z. Plant cell separation and adhesion. Oxford: Blackwell Publishing Ltd., 2007. 218 p.
- Scheller H.V., Ulvskov P. Hemicelluloses // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2010. V. 61. P. 263–289.

- Steiner H., Dougall D. K. Ammonium uptake in carrot cell structures is influenced by pH-dependent cell aggregation // *Physiol. Plant.* 1995. V. 95. № 3. P. 415–422.
- Sterling J.D., Quigley H.F., Orellana A., Mohnen D. The catalytic site of the pectin biosynthetic enzyme α -1,4-galacturonosyltransferase is located in the lumen of the Golgi // *Plant Physiol.* 2001. V. 127. № 1. P. 360–371.
- Sterling J.D., Atmondjo M.A., Inwood S.E. et al. Functional identification of an *Arabidopsis* pectin biosynthetic homogalacturonan galacturonosyltransferase // *PNAS USA.* 2006. V. 103. № 13. P. 5236–5241.
- Takayama S., Misawa M., Ko K., Misato T. Effect of cultural conditions on the growth of *Agrostemma githago* cells in suspension culture and the concomitant production of an anti-plant virus substance // *Physiol. Plant.* 1977. V. 41. № 4. P. 313–320.
- Tan L., Eberhard S., Pattathil S. et al. An *Arabidopsis* cell wall proteoglycan consists of pectin and arabinoxylan covalently linked to an arabinogalactan protein // *Plant Cell.* 2013. V. 25. № 1. P. 270–287.
- Xiao C., Somerville C., Anderson C.T. Polygalacturonase involved in expansion functions in cell elongation and flower development in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* 2014. V. 26. № 3. P. 1018–1035.
- Yin Y., Mohnen D., Gelineo-Albersheim I., Xu Y. et al. Glycosyltransferases of the GT8 family // *Annu. Plant Rev.* 2011. V. 41. P. 167–212.
- Zabotina O.A., Zang N., Weerts R. Polysaccharide biosynthesis: glycosyltransferases and their complexes // *Front. Plant Sci.* 2021. V. 12. P. 635307.
- Zhang B., Gao Y., Zhang L., Zhou Y. The plant cell wall: biosynthesis, construction, and functions // *J. Integr. Plant Biol.* 2021. V. 63. № 1. P. 251–272.
- Zhao D., Huang Y., Jin Z. et al. Effect of aggregate size in cell cultures of *Saussurea medusa* on cell growth and jaceosidin production // *Plant Cell Rep.* 2003. V. 21. № 11. P. 1129–1133.
- Zykwinska A., Thibault J., Ralet M. Organization of pectic arabinan and galactan side chains in association with cellulose microfibrils in primary cell walls and related models envisaged // *J. Exp. Bot.* 2007. V. 58. № 7. P. 1795–1802.

Aggregates Formation in Higher Plants Cell Culture: The Role of Cell Wall Components

E. I. Grigoreva^{a, b, *}, Y. V. Sidorchuk^a, and E. V. Deineko^a

^aFederal Research Center Institute of Cytology and Genetics,
Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

^bNovosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

*e-mail: grigoreva.eln@mail.ru

The use of higher plants cell cultures for recombinant protein production, including medical ones, seems to be promising alternative to existing platforms based on mammalian or bacterial cells. Doubtless advantage of plant cells is a total absence of animal viruses and prions contamination risks, high growth rate, relatively low cultural medium components cost and the ability to ensure the production of recombinant proteins under strictly controlled conditions of bioreactors in accordance with GMP standards (Good Manufacturing Practice). Despite the fact that plant cells are already commercially used for biopharmaceuticals production, there are still many unsolved problems in this direction. The most important ones are rather low level of recombinant protein yield and cells ability to form aggregates during *in vitro* cultivation. Cell aggregates formation that differs on size is a serious problem during the suspension cultures cultivation, especially in large volumes of commercial bioreactors. The basis of aggregate formation in suspension cell cultures is ability of plant cells to adhere. This review considers the features of the plant cell structure, the biochemical mechanisms underlying adhesion and their genetic basis. Perspectives of modern genetic editing methods for altering functioning of genes that takes part in providing plant cells adhesion are considered.

Keywords: plant cell cultures, cell aggregates, intercellular adhesion, *Arabidopsis thaliana*, GAUT family genes