

Сайленсинг генов AKR2 в растениях *Nicotiana benthamiana*

И.В. Селифонов^{1*}, А.Г. Соловьев^{1, 2}

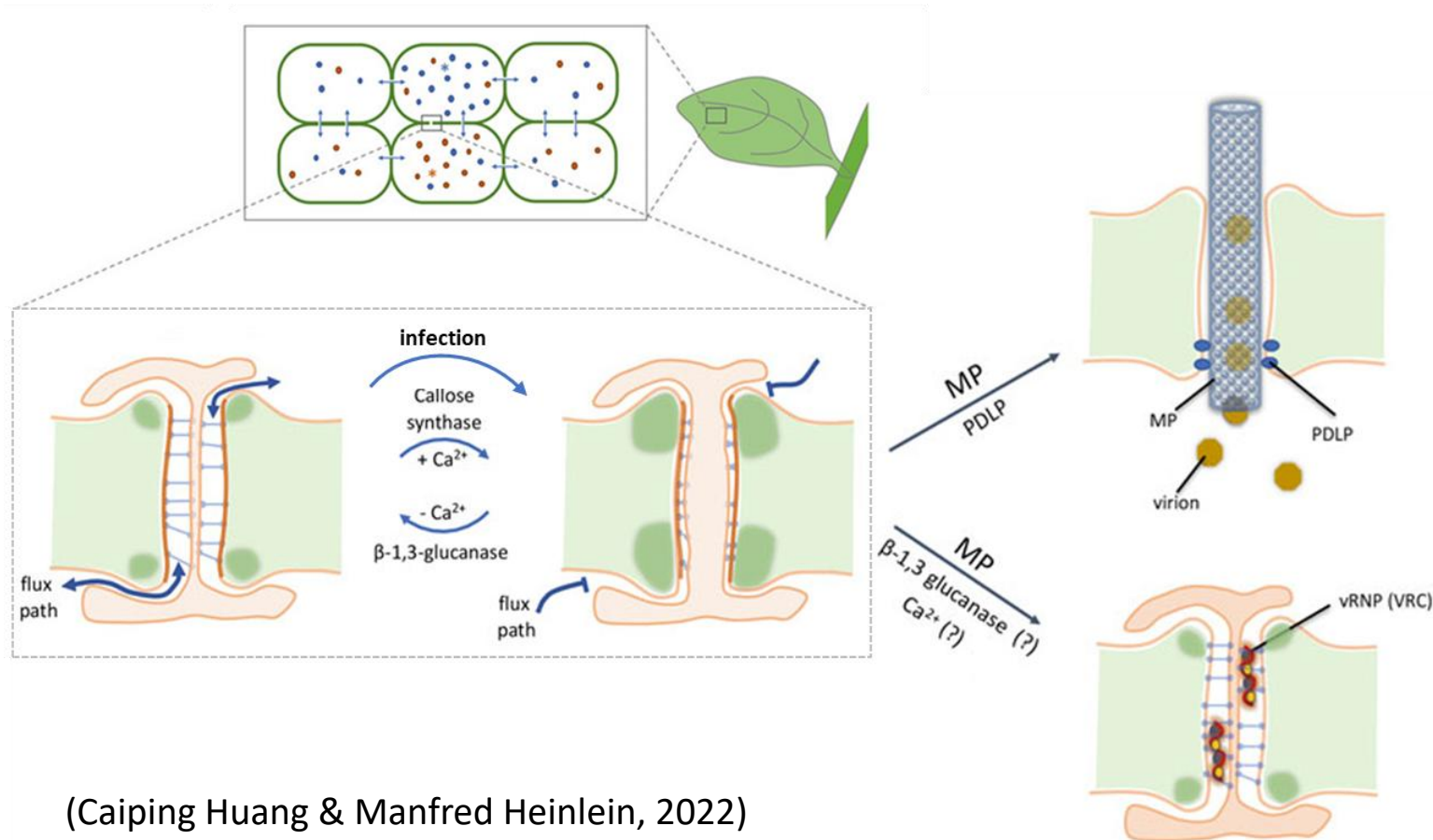
¹ Факультет биоинженерии и биоинформатики, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

* selifonov2002@gmail.com

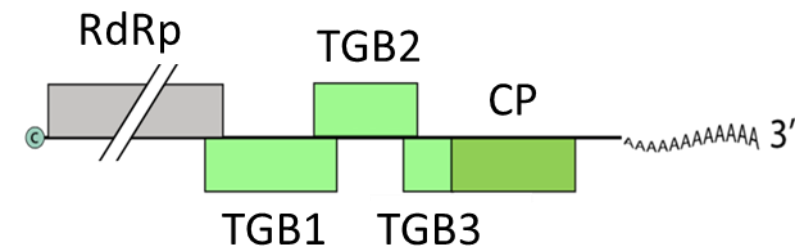
Введение: Транспортные белки

Жизненный цикл вирусов растений включает их межклеточный транспорт через плазмодесмы, который обеспечивается транспортными белками (movement proteins, MP).



(Caiping Huang & Manfred Heinlein, 2022)

Тройной блок генов (ТГВ) – один из хорошо изученных примеров генов MP.

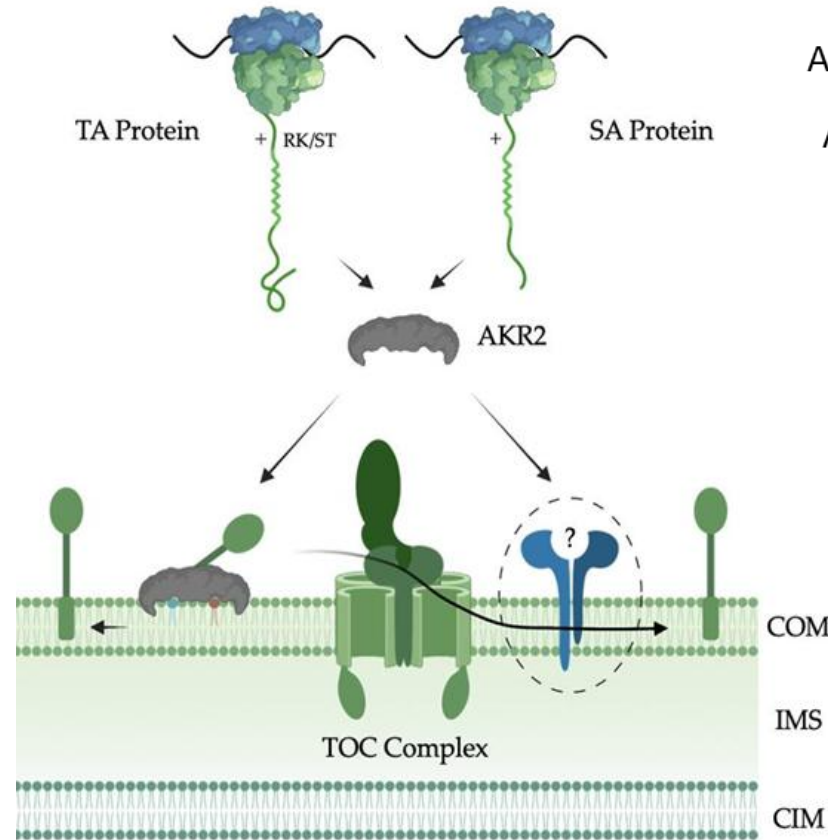


Геномная РНК X-вируса картофеля (PVX) содержит ТГВ.

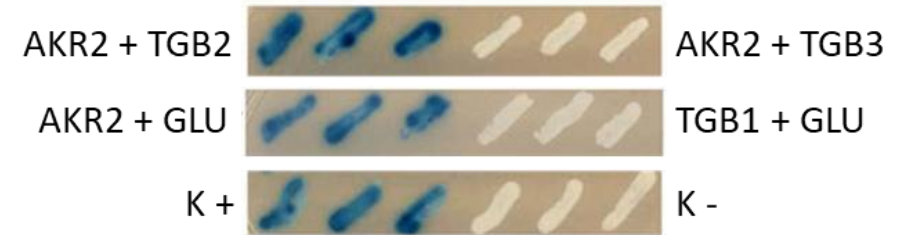
Введение: гены AKR2

Белки AKR2 *Arabidopsis thaliana*:

- Транспорт в хлоропласты мембранных белков
- Устойчивость к бактериальным инфекциям
- Понижение уровня РФК (взаимодействие с аскорбат-пероксидазой)
- Регуляция синтеза белков устойчивости (PR-1, GST6)



Встраивание белков во внешнюю мембрану хлоропласта с участием AKR2 (Fish et al., 2022)

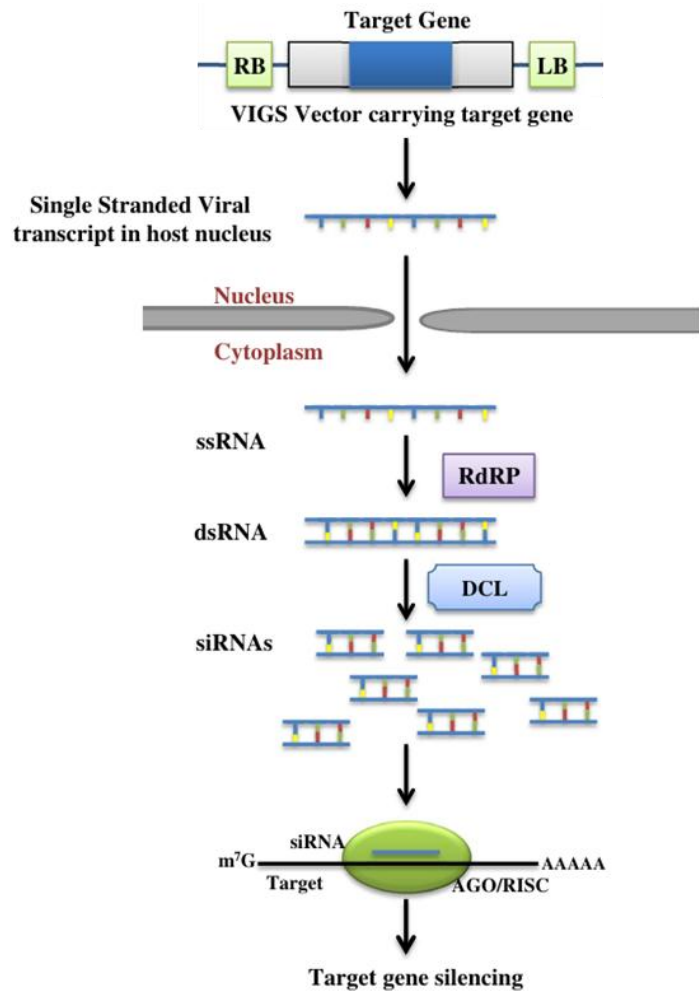


Y2H-скрининг (Fridborg et al., 2003)

Гомологи AKR2 из *Nicotiana tabacum* взаимодействуют с TGB2 и с β -1,3-глюканазой.

Гипотеза: AKR2 используются вирусом для облегчения его межклеточного транспорта за счет гидролиза каллозы и повышения пропускной способности плазмодесм.

Методы: Вирус-индуцированный сайленсинг генов (VIGS)



Принцип действия метода
(Tiwari et al., 2014)

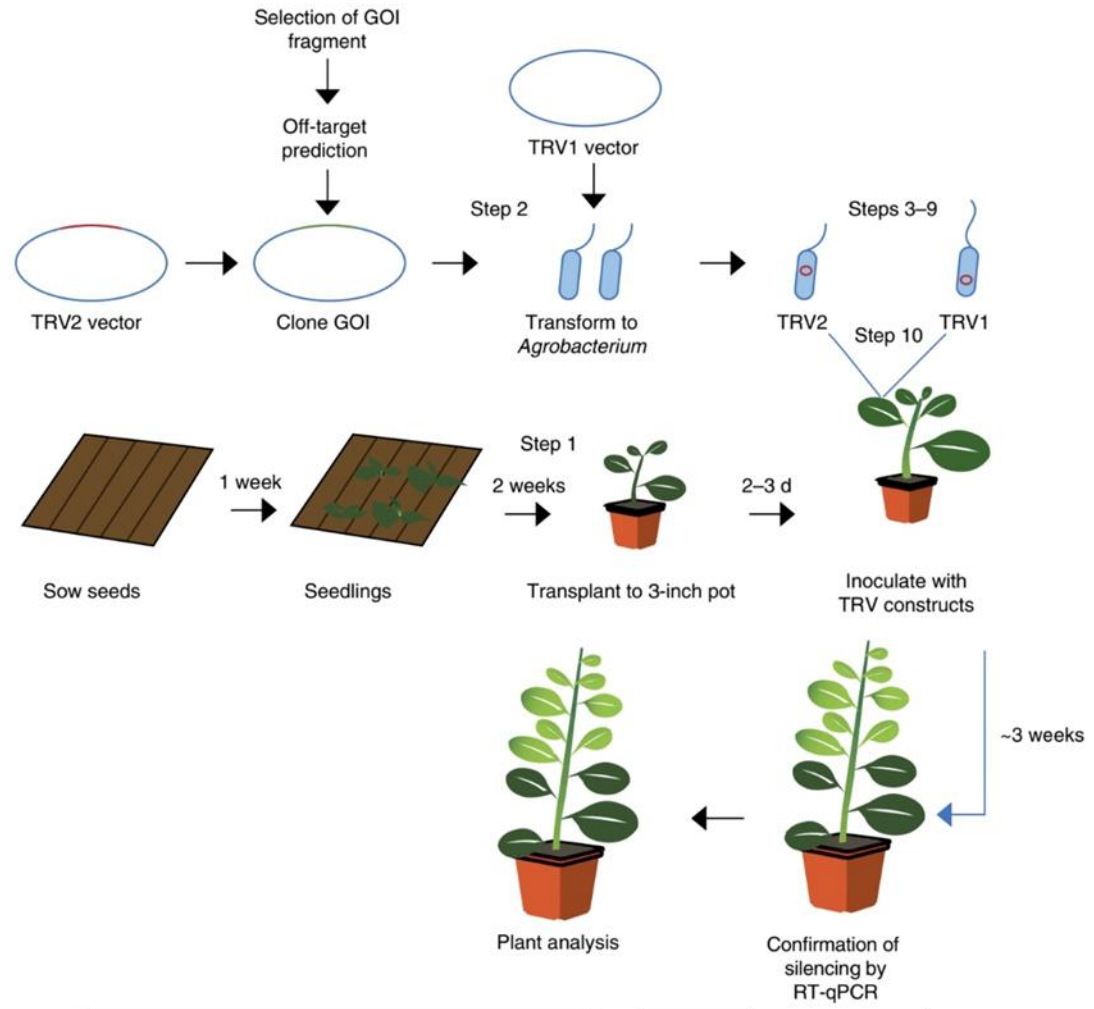


Схема эксперимента
(Senthil-Kumar et al., 2014)

Цель и задачи

Цель работы:

С помощью вирус-индуцированного сайленсинга генов AKR2 в растениях *N. benthamiana* валидировать предложенный ранее AKR2-зависимый механизм повышения пропускной способности плазмодесм белком TGB2 вируса PVX.

Задачи:

- ☐ Получить генетическую конструкцию для VIGS
- ☐ Провести сайленсинг генов AKR2
- ☐ Подтвердить эффективность сайленсинга
- ☐ Определить влияние сайленсинга на межклеточный транспорт PVX
- ☐ Оценить влияние сайленсинга на локализацию транспортных белков

Сайленсинг генов AKR2

Получение конструкции для сайленсинга AKR2

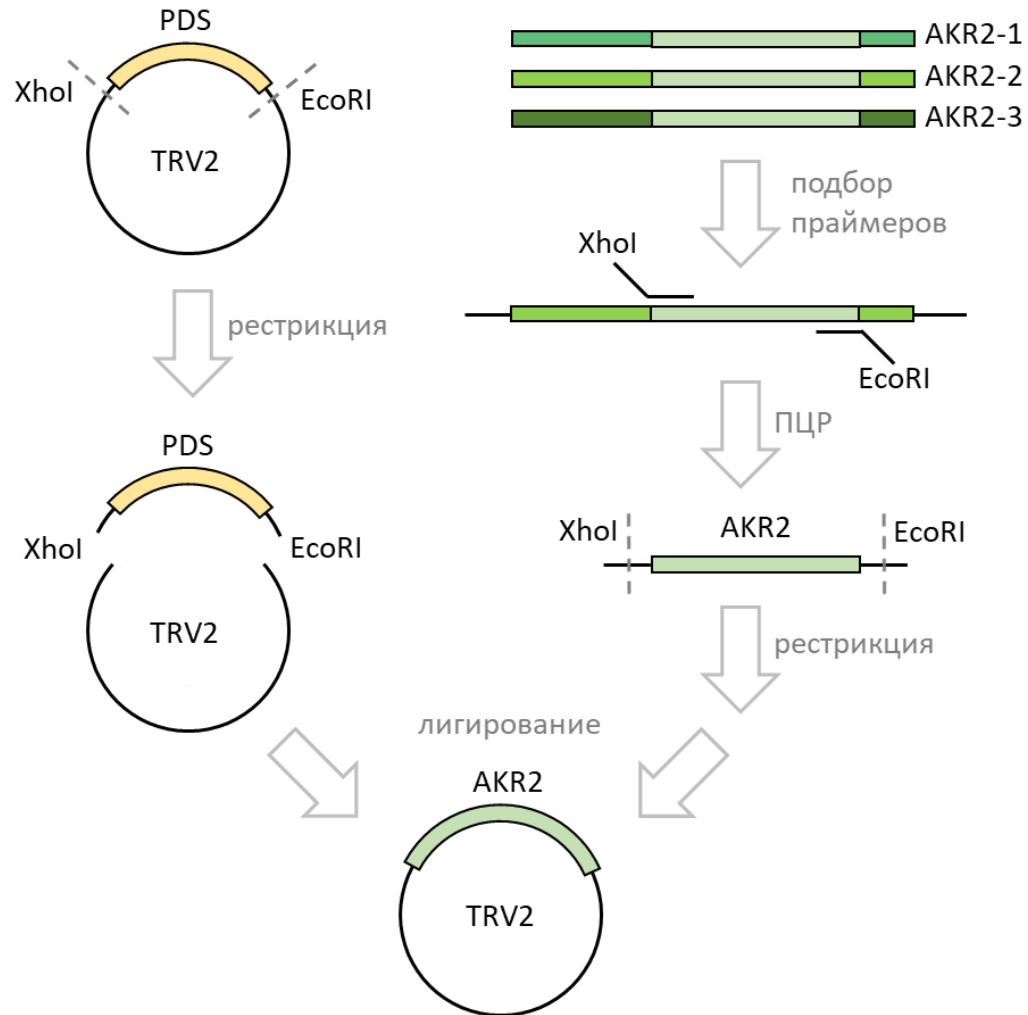
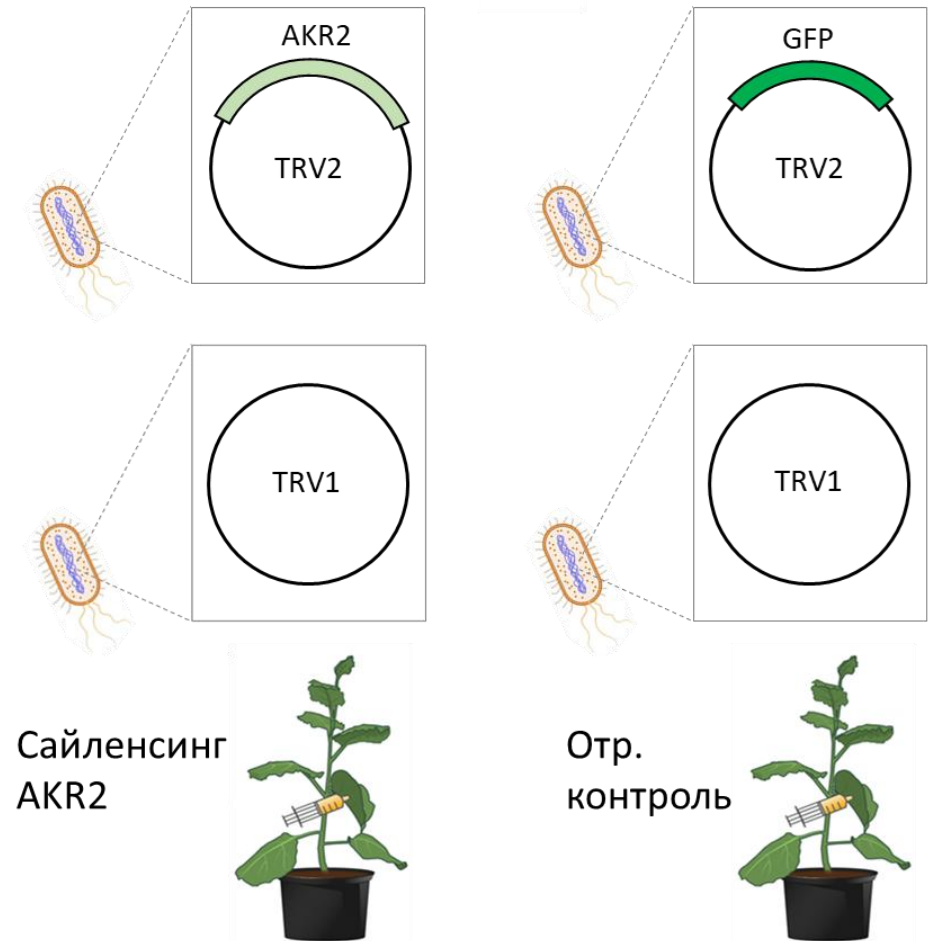


Схема эксперимента



Результаты сайленсинга

Растения с сайленсингом генов AKR2 отличаются некоторой задержкой роста и хлоротической пятнистостью верхних листьев. Вероятно, такой фенотип связан с подавлением AKR2-зависимого транспорта мембранных белков в хлоропласты.

TRV2-GFP

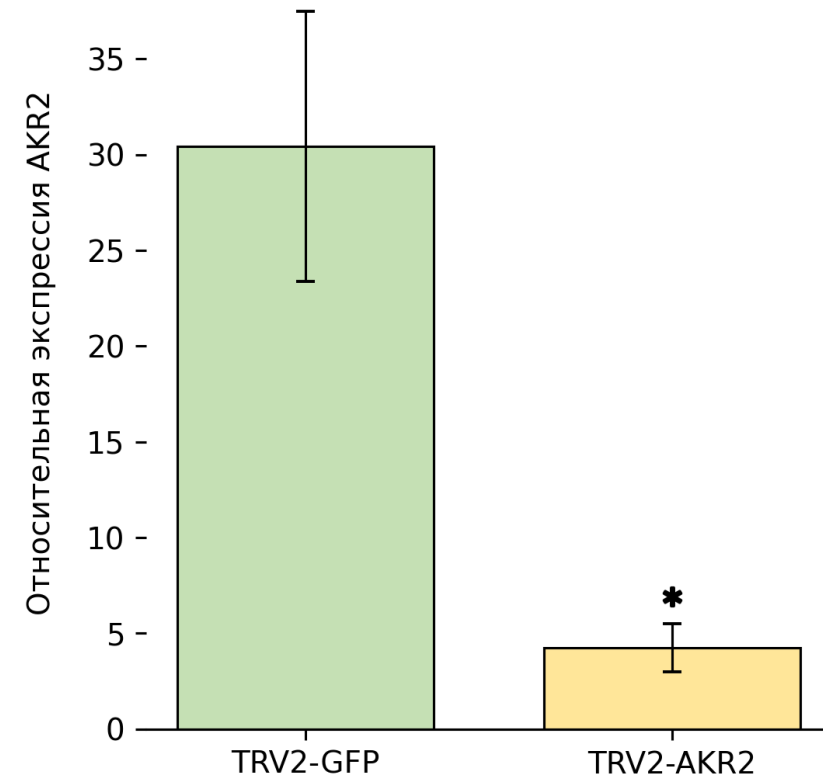


TRV2-AKR2



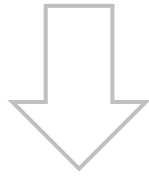
Эффективность сайленсинга была проверена методом RT-qPCR.

В опытной группе относительная экспрессия исследуемых генов была снижена в среднем на 86% по сравнению с контрольной.

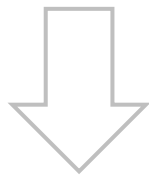


Влияние сайленсинга на межклеточный транспорт PVX

Инфильтрация листьев *Nicotiana benthamiana* суспензией клеток *A. tumefaciens* с конструкцией PVX-GFP в высоком разведении.



4-5 dpi: сравнение эффективности межклеточного транспорта PVX по размерам локусов.



Заметных различий в эффективности транспорта нет.

TRV2-GFP



TRV2-AKR2

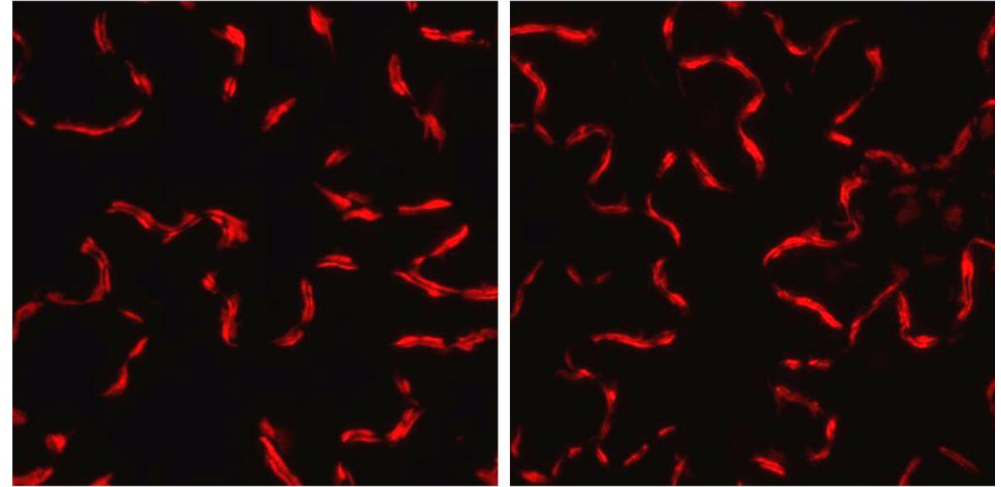
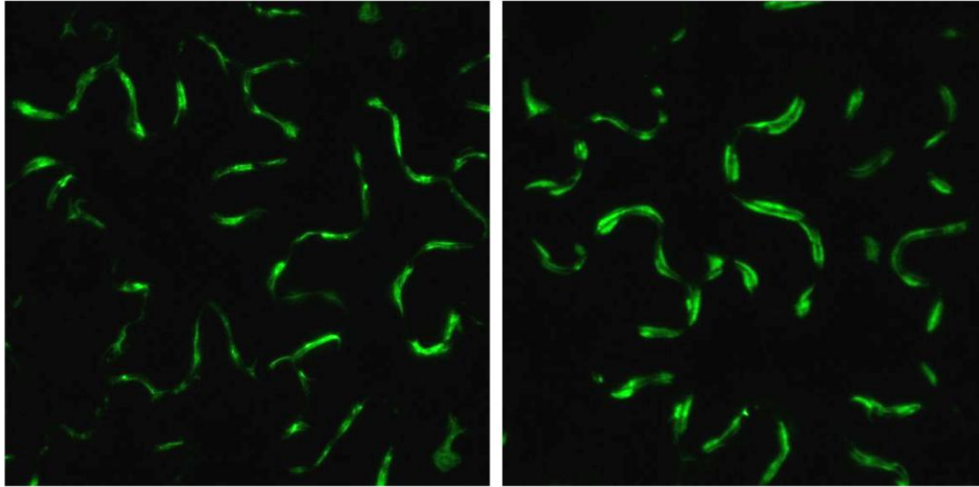


Влияние сайленсинга на локализацию МР

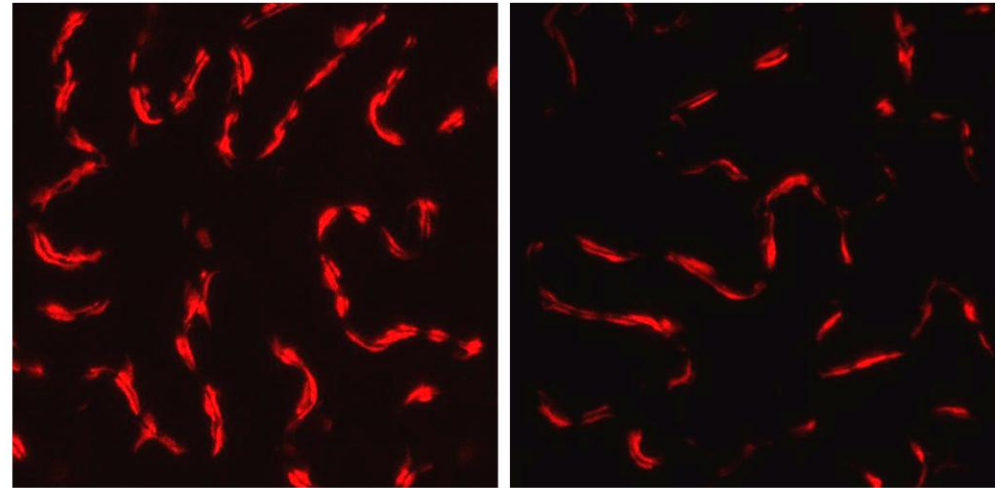
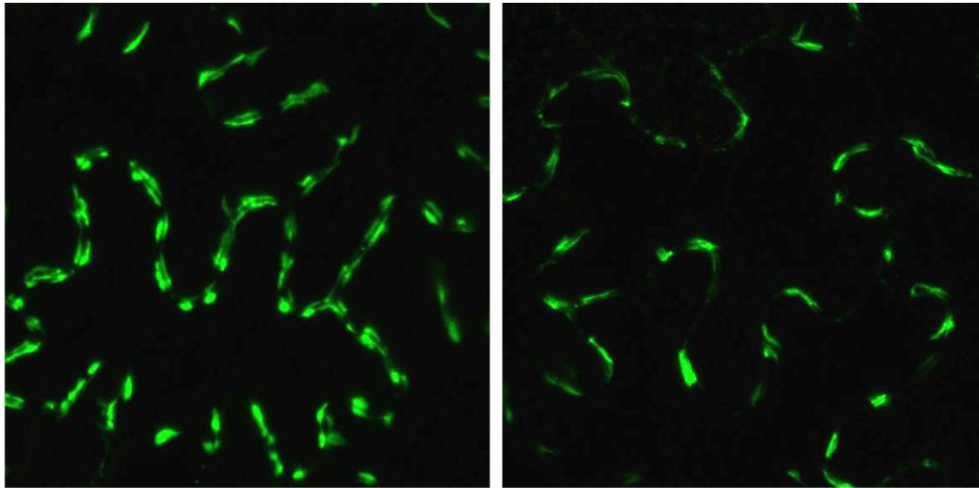
GFP-BMB1 + BMB2

BMB2-mRFP + BMB2

TRV2-GFP



TRV2-AKR123



100 μ m

Выводы

- ❑ Получена культура *A. tumefaciens* для сайленсинга генов AKR2 в растениях *Nicotiana benthamiana*.
- ❑ Вирус-индуцированный сайленсинг AKR2 имеет высокую эффективность и приводит к появлению характерного фенотипа.
- ❑ Сайленсинг не оказывает значительного воздействия на локализацию вирусных транспортных белков.
- ❑ Понижение уровня экспрессии AKR2 не снижает эффективность межклеточного транспорта PVX.

Заключение

Отсутствие видимого влияния сайленсинга на вирусную инфекцию может означать, что белки AKR2 не являются необходимыми для межклеточного транспорта PVX или что они могут выполнять свою функцию даже при пониженной концентрации.