

ПОДАВЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *KPILP* ПОВЫШАЕТ УСТОЙЧИВОСТЬ ТАБАКА К ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Н.М. Ершова¹, Е.В. Шешукова¹, К.А. Камарова^{1,2}, Т.В. Комарова^{1,2}

¹ ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова» РАН, Москва, Россия

² ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Введение

Инфекция вирусом табачной мозаики (ВТМ) начинается с попадания вирусных частиц в клетку растения через повреждения клеточной стенки. Затем происходит «раздевание» геномной РНК (гРНК) вируса и синтез неструктурных белков – компонентов репликазы. На следующем этапе начинается репликация и синтез субгеномных РНК (сгРНК), кодирующих транспортный белок и белок оболочки. Поскольку геном РНК вирусов растений ограничен по размеру, то он зачастую кодирует многофункциональные белки. Кроме того, для успешного заражения и распространения по растению вирусы приспособились использовать клеточные факторы растения-хозяина, создавая тем самым благоприятные условия как для межклеточного (ближнего) транспорта, так и для дальнего (системного) транспорта вирусных частиц по растению. При этом в ходе «гонки вооружений» между вирусом и хозяином, вирусы приобрели способность подавлять защитные механизмы, запускаемые клеткой. Успех системного распространения вирусной инфекции обеспечивается тремя повторяющимися процессами: накопление гРНК и образование транспортной нуклеопротеидной формы в зараженных клетках, ее межклеточное перемещение и, наконец, системный транспорт по всему растению. Межклеточный транспорт ВТМ обеспечивается неструктурным транспортным белком (ТБ) 30 кДа. Функция ТБ состоит во взаимодействии с клеточными компонентами и обеспечения межклеточного распространения вирусной инфекции [1]. Для транспорта гРНК в соседнюю клетку ТБ (а) участвует в увеличении пропускной способности межклеточных симпластных каналов – плазмодесм (ПД), (б) локализуется в ПД и перемещается в соседнюю клетку, и (в) способен связывать РНК [2, 3]. Данные, описывающие регуляцию межклеточного транспорта вируса, указывают на влияние ТБ на множество клеточных факторов, таких как каллоза [4] и белки, ассоциированные с ПД [5, 6].

В дополнение к регуляции межклеточного транспорта, многие вирусы растений влияют на функционирование хлоропластов и хлоропластных белков. Хлоропласты зеленых растений помимо осуществления фотосинтетической функции, синтезируют основные фитогормоны и играют активную роль в защитных ответах растений на патогены. Вирусы, в свою очередь, приспособились использовать энергоресурсы клетки и подавлять противовирусный ответ, воздействуя на хлоропластные белки. Так, например, было показано, что эффективность инфекции ВТМ и репродукция гРНК зависят от активности хлоропластных белков AtpC, RCA, NRIP1 и PsbO, которые необходимы для выполнения фотосинтетической функции и участвуют в регуляции противовирусного ответа [7].

Дальнейшие исследования и поиск клеточных факторов, задействованных в ответах растительной клетки на вирусную инфекцию, расширяют наши представления о противовирусных иммунных ответах и о стратегиях, используемых вирусом для успешного заражения.

В настоящей работе исследована роль гена *Nicotiana benthamiana*, кодирующего гомолог ингибитора пептидаз Кунитца, *KPILP*. Как было показано ранее, его экспрессию стимулирует системная вирусная инфекция табака, вызванная ВТМ, и экспрессия вирусного вектора, созданного на основе генома ВТМ, для продукции целевых белков в листьях *N. benthamiana* [8]. Целью данной работы является выявление роли *KPILP* в системе взаимодействий ВТМ-растение. Для достижения поставленной цели были поставлены следующие задачи: (1) выполнить нокдаун *KPILP* при помощи вирус-индуцируемого сайленсинга генов и (2) оценить эффективность заражения и репродукции ВТМ на фоне подавленной экспрессии *KPILP* в листьях табака.

Материалы и методы

Получение генноинженерных конструкций. Для подавления экспрессии *KPILP* была создана конструкция pPVX:fr*KPILP* на основе генома ХВК. 183-нт фрагмент *KPILP* (с 70 по 253 нт кодирующей области) был выбран путем анализа последовательности с помощью ресурса <https://vigs.solgenomics.net/> и клонирован в вектор PVX-BIN19 [9] под контроль дублированного субгеномного промотора гена белка оболочки ХВК.

Условия выращивания растений. Растения *N. benthamiana* дикого типа выращивали в почве с регуляцией светового и температурного режима: день 16 часов, ночь 8 часов, температура 22 °С.

Агроинфильтрация. *Agrobacterium tumefaciens* штамм GV3101, трансформированная соответствующими генноинженерными конструкциями, выращивали при 28°C в среде LB, содержащей рифампицин 50 мг/л, гентамицин 25 мг/л, канамицин 50 мг/л. Бактериальную суспензию смешивали с буфером для инфильтрации, содержащим 10 mM MES (pH 5.5) и 10 mM MgSO₄ до финальной OD₆₀₀ 0.01 о.е. при заражении pPVX и pPVX:frKPILP, 0.3–0.4 о.е. при заражении BTM: GFP.

Количественная ПЦР (кПЦР) в режиме реального времени и анализ экспрессии. Суммарную РНК выделяли из листьев в соответствии с протоколом ExtractRNA (Евроген, Россия). Для обратной транскрипции использовали RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, США), согласно протоколу производителя. Анализ экспрессии генов выполняли методом кПЦР в режиме реального времени на матрице кДНК с использованием смеси Eva Green master mix (Синтол, Россия). Список праймеров для кПЦР приведен в таблице 1.

Таблица 1. Олигонуклеотиды для кПЦР

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер
PP2A	ATTGCTGCCTGTGGTTATTAC	ATAGACTGAAGTGCTTGATTGG
18S rRNA	ACGGCTACCACATCCAAG	ACTCATTCCAATTACCAGACTC
KPILP	TGAGCACTGGCGGAATTAAGG	ATACCAATATACCCACACAACAATCTG
ТБ	GGTGTGAGCGTGTGTCTGG	GCGTCCTGGGTGGTTATAGC
GFP	GCAGAAGAACGGCATCAAG	GCTCAGGTAGTGGTTGTCTG

Результаты

Ранее было показано, что экспрессия гена гомолога ингибитора пептидаз Кунитца (*KPILP*) повышена в корнях, но практически не детектируется в интактных листьях *N. benthamiana*. Индукция его экспрессии в листьях происходит в ответ на заражение BTM, причем как в случае системной инфекции, так и в системе транзientной экспрессии в листьях вирусного вектора на основе BTM для продукции целевых белков [8]. При заражении *N. benthamiana* BTM развитие системной инфекции сопровождается некрозами и приводит к гибели растения в течение двух недель после заражения (Рис. 1А). Для подтверждения системной инфекции BTM до возникновения некрозов выделяли суммарный растворимый белок из инфицированных листьев, разделяли в полиакриламидном геле с последующей окраской Кумасси. В результате наблюдали характерную зону, соответствующую по подвижности белку оболочки BTM (17,5 кДа) (Рис. 1Б). Также из этих листьев была выделена РНК и с помощью кПЦР показано, что уровень мРНК *KPILP* резко повышался в ответ на вирусную инфекцию (Рис. 1В).

Для исследования роли гена *KPILP* в ответных реакциях растения на инфекцию BTM, была создана модельная система, в которой экспрессию *KPILP* подавляли посредством вирус-индуцируемого сайленсинга. Была получена генетическая конструкция pPVX:frKPILP (Рис. 2А) на основе генома Х вируса картофеля (ХВК), содержащая фрагмент гена *KPILP*. В качестве контроля использовали вирусный вектор на основе ХВК, pPVX (Рис. 2А). Заражение pPVX и pPVX:frKPILP производили с помощью агроинфильтрации: нижние листья молодых растений *N. benthamiana* в возрасте 4–5 недель инфильтровали бактериальной суспензией, трансформирующей клетки ткани и передающей генетический материал, кодирующий вирусный геном. В результате в клетках листьев происходила репродукция вирусной РНК, синтез вирусных белков и сборка вирусных частиц, которые путем дальнего транспорта распространялись по растению, вызывая так называемую системную инфекцию через 10–14 дней после агроинфильтрации (Рис. 2Б). Растения, зараженные pPVX и pPVX:frKPILP, практически не отличались от интактных растений того же возраста, проявляя незначительную задержку в росте. На верхних листьях наблюдалось изменение пигментации и мозаичность, что являлось свидетельством успешной инфекции. Анализ белковых экстрактов, выделенных из верхних листьев с симптомами инфекции, показал наличие белка оболочки ХВК (рис. 2В). Данная модельная система позволила при помощи индуцируемого вирусом сайленсинга эффективно подавить экспрессию *KPILP*: относительное количество мРНК *KPILP* в листьях, зараженных pPVX:frKPILP было в ~10 раз меньше, чем при заражении pPVX (рис. 2Г).

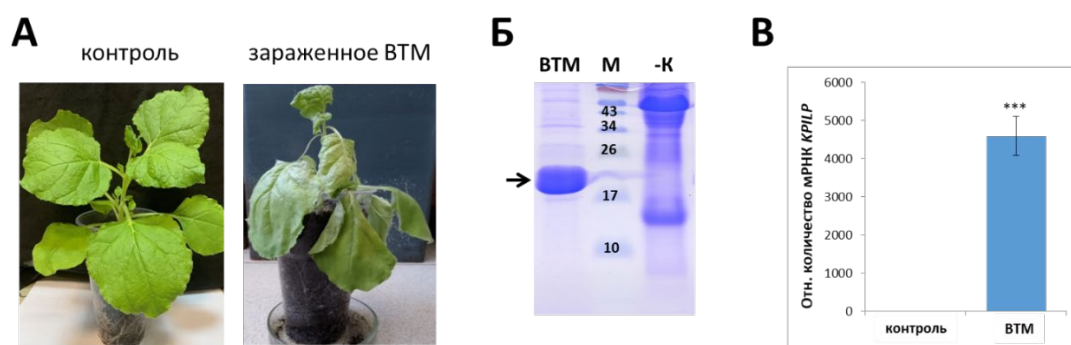


Рисунок 1. Инфекция *N. benthamiana* BTM вызывает значительное повышение уровня накопления мРНК KPIIP. (А) Зараженное BTM растение *N. benthamiana* на 14 день после инокуляции (справа) и контрольное интактное растение того же возраста (слева). (Б) Накопление белка оболочки BTM в верхних листьях зараженного растения на 10 день после инокуляции. – К, интактное растение; М, маркеры молекулярного веса. Разделение растворимых белков в 15 % полиакриламидном геле с последующим окрашиванием Кумасси. Стрелкой отмечена зона, соответствующая белку оболочки BTM. (В) Относительное количество мРНК KPIIP в листьях с системной инфекцией BTM по результатам кПЦР. Представлены среднее значение и стандартная ошибка. ***, $p < 0.001$ (t-критерий Стьюдента).

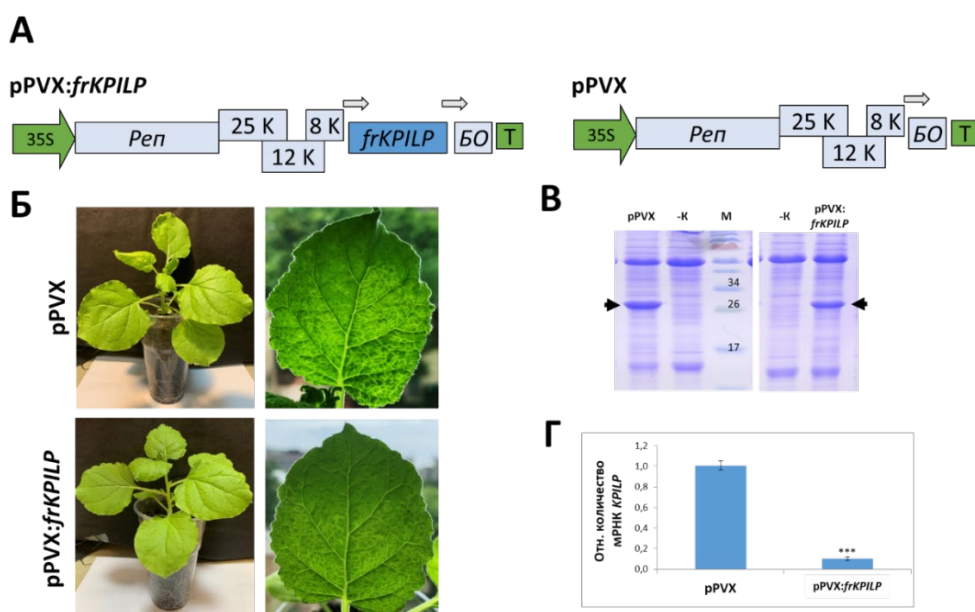


Рисунок 2. Система вирус-индуцируемого сайленсинга на основе X вируса картофеля для нокдауна KPIIP. (А) Схемы векторов для инокуляции растений *N. benthamiana* с помощью агроинфильтрации. 35S, промотор 35S РНК вируса мозаики цветной капусты; Rep, ген репликазы; 25K, 12K, 8K, гены транспортных белков; БО, ген белка оболочки; frKPIIP, фрагмент последовательности KPIIP, использованный для сайленсинга. Серыми стрелками обозначен субгеномный промотор БО. (Б) Растения *N. benthamiana*, инокулированные pPVX или pPVX:frKPIIP, с симптомами системной инфекции. (В) Накопление БО ХВК в верхних листьях зараженных растений на 10 день после инокуляции. – К, интактное растение; М, маркеры молекулярного веса. Разделение растворимых белков в 12 % полиакриламидном геле с последующим окрашиванием Кумасси. Стрелкой отмечена зона, соответствующая БО ХВК. (Г) Относительное количество мРНК KPIIP в листьях с системной инфекцией ХВК (pPVX или pPVX:frKPIIP) по результатам кПЦР. Представлены среднее значение и стандартная ошибка. ***, $p < 0.001$ (t-критерий Стьюдента).

Для выяснения роли *KPILP* в системе взаимодействий между ВТМ и растением была проведена оценка эффективности инфекции на фоне подавленной экспрессии *KPILP*. В листья с системной инфекцией pPVX:frKPILP, в которых экспрессия *KPILP* снижена, с помощью агроинфильтрации вводили вирусный вектор ВТМ: GFP, созданный на основе генома ВТМ, в котором ген белка оболочки вируса заменен на *GFP* для визуализации распространения инфекции. При заражении ВТМ: GFP происходит только локальное межклеточное распространение вируса (ближний транспорт). Бактериальную суспензию разводили до $OD_{600} \sim 0,3-0,4$, что позволяло визуализировать отдельные фокусы заражения и межклеточное распространение. В листьях с подавленной экспрессией *KPILP* заражение ВТМ: GFP происходит крайне неэффективно и ограничено несколькими фокусами инфекции (Рис. 3А), в отличие от контрольных листьев. Уровень накопления мРНК гена ТБ ВТМ и *GFP* оказался в три раза ниже в растениях с подавленной экспрессией *KPILP* по сравнению с контрольными, что отражает сниженную эффективность репродукции и межклеточного распространения ВТМ: GFP в этих листьях.

Таким образом, было показано, что *KPILP* необходим вирусу табачной мозаики для быстрого и эффективного заражения и является провирусным агентом.

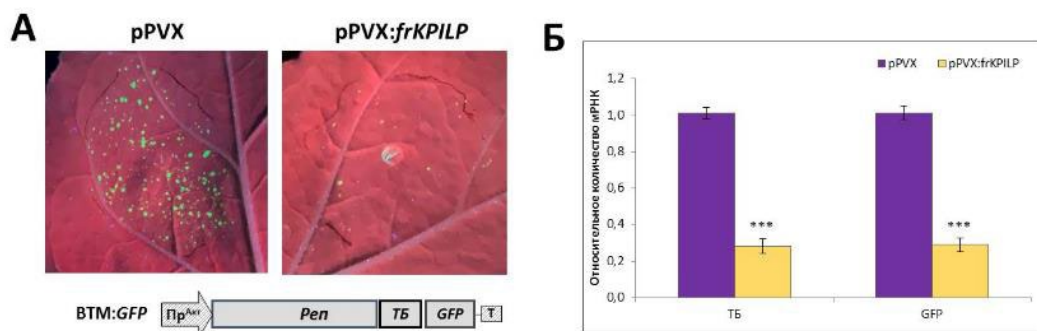


Рисунок 3. Подавление экспрессии *KPILP* негативно влияет на эффективность заражения и репродукцию ВТМ. (А) Изображения листьев на 4 день после агроинфильтрации ВТМ: GFP в ультрафиолетовом свете. Снизу приведено схематическое изображение вирусного вектора: ПрАкт, промотор гена Act2 *Arabidopsis thaliana*; Реп, ген репликазы, ТБ, ген транспортного белка; Т, терминатор транскрипции. (Б) Относительное количество мРНК ТБ и GFP в листьях, описанных в (А), по результатам кПЦР. Представлены среднее значение и стандартная ошибка. ***, $p < 0.001$ (t-критерий Стьюдента).

Обсуждение

Вирусы растений используют различные стратегии, которые обеспечивают им успешное заражение и распространение по всему растению. Настоящее исследование посвящено изучению взаимодействий между ВТМ и растением *N. benthamiana*, в котором ген *KPILP* имеет регуляторную, а возможно и решающую, роль. В зрелых интактных листьях экспрессия *KPILP* подавлена, но при попадании в ткани листа ВТМ его экспрессия резко активизируется. В предшествующей работе [8] было показано, что уровень мРНК *KPILP* в корнях существенно выше, чем в фотосинтетически активных зрелых листьях. Кроме того, в инфицированном ВТМ листе табака с проявлением симптомов в виде мозаики в светло-зеленых зонах с измененной пигментацией и активной репродукцией вируса уровень мРНК *KPILP* существенно выше, чем в темно-зеленых зонах. Данное наблюдение указывает на существование обратной взаимосвязи между фотосинтезом и экспрессией *KPILP*: (1) экспрессия *KPILP* активна в корнях, где не происходит фотосинтез; (2) при инфекции ВТМ происходят структурные и функциональные изменения хлоропластов наряду с активацией *KPILP*. Нарушение работы хлоропластов приводит к запуску передачи регуляторных сигналов от пластид в ядро, влияя на экспрессию ядерных генов, ассоциированных с фотосинтезом [10, 11]. Так, например, исследования мутантных эмбрионов *ise2* стадии средней торпеды выявили участие кодируемой ядром хлоропластной РНК хеликазы ISE2 в регуляции межклеточного трафика макромолекул и формировании плазмодесм,

а подавление экспрессии *ise2* в листьях *N.benthamiana* при помощи вирус-индуцируемого сайленсинга приводит к хлорозу и усилению межклеточного трафика за счет образования вторичных ПД [12]. Взаимосвязь между пластидами, экспрессией ядерных генов и регуляцией межклеточного трафика лежит в основе гипотезы о том, что хлоропластные сигналы регулируют не только свой собственный метаболизм, но и межклеточный транспорт, таким образом являясь ключевыми регуляторами обеспечения всех жизненных процессов и защитных реакций [13]. Хотя не было показано локализации KPILP в хлоропластах, но обнаружено существование обратной корреляция между фотосинтезом и активацией экспрессии KPILP на фоне вирусной инфекции. Остается открытым вопрос, влияет ли ВТМ на экспрессию KPILP напрямую, запуская таким образом подавление фотосинтетической активности хлоропластов, или это воздействие опосредованно транскрипционными факторами или другими клеточными белками. Результаты, представленные в данной работе, убедительно показывают, что при подавлении экспрессии KPILP растения становятся более устойчивыми к инфекции ВТМ, а эффективность вирусной репродукции становится существенно слабее, чем в контрольных растениях. Учитывая существование обратной связи между экспрессией KPILP и функционированием хлоропластов, можно предположить, что ВТМ, вероятно, «использует» KPILP для подавления их активности, тем самым получая возможность влиять как на противовирусный иммунитет, так и регулировать межклеточный транспорт.

Заключение

Данное исследование демонстрирует важную роль клеточного вирус-индуцируемого гена KPILP в инфекции ВТМ. В растениях с подавленной экспрессией KPILP эффективность заражения и уровень репродукции ВТМ резко снижены. Таким образом, мы заключили, что KPILP является провирусным клеточным фактором.

Благодарности:

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19–74–20031).

Литература

- [1] C. Liu, R.S. Nelson, *Frontiers in Plant Science*, 2013, **4**, 12.
- [2] M. Heinlein, *Virology*, 2015, **479–480**, 657.
- [3] E.V. Sheshukova *et al.*, *Frontiers in Plant Science*, 2020, **11**, 959.
- [4] S. Amsbury, P. Kirk, Y. Benitez-Alfonso, *Journal of Experimental Botany*, 2017, **69**, 105.
- [5] S. Ueki, V. Citovsky, *Plant Signaling & Behavior*, 2014, **9**, e27899.
- [6] Y.L. Dorokhov *et al.*, *Plants*, 2019, **8**, 595.
- [7] D. Bhattacharyya, S. Chakraborty, *Molecular Plant Pathology*, 2017, **19**, 504.
- [8] E.V. Sheshukova *et al.*, *Frontiers in Plant Science*, 2017, **8**, 2137.
- [9] T.V. Komarova *et al.*, *Biochemistry (Moscow)*, 2006, **71**, 846.
- [10] T. Crawford, N. Lehotai, Å. Strand, *Journal of Experimental Botany*, 2018, **69**, 2783.
- [11] J.O. Brunkard, T.M. Burch-Smith, *Essays in biochemistry*, 2018, **62**, 95.
- [12] T.M. Burch-Smith, P.C. Zambryski, *Current Biology*, 2010, **20**, 989.
- [13] M.F. Azim, T.M. Burch-Smith, *Current Opinion in Plant Biology*, 2020, **58**, 48.