

Индукция РНК интерференции и направленная регуляция генов растений с помощью экзогенных РНК

Дубровина А.С.*

*Лаборатория биотехнологии ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН,
Владивосток, 690022, Россия, dubrovina@biosoil.ru



Москва, 2022

Разработка новых экологически чистых подходов для изменения различных характеристик растений без модификации их генома

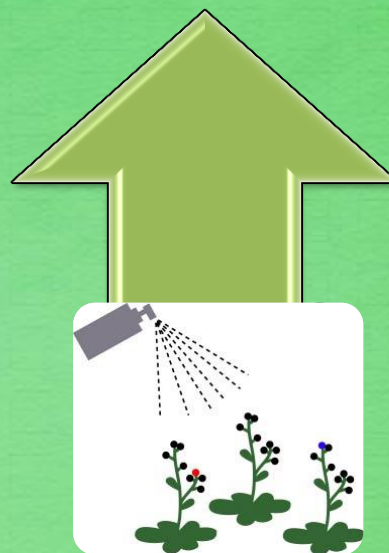


**Трансгенные
растения**

(генно-инженерные
модификации
генома)

Альтернативный подход

Обработка поверхности
растений растворами
нуклеиновых кислот



РНК «вакцинация» растений экзогенными РНК

Вирусы растений



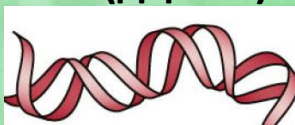
Патогенные грибы



Насекомые-вредители



Двухцепочечная РНК (дцРНК)



Индукция РНК интерференции

Защита растения

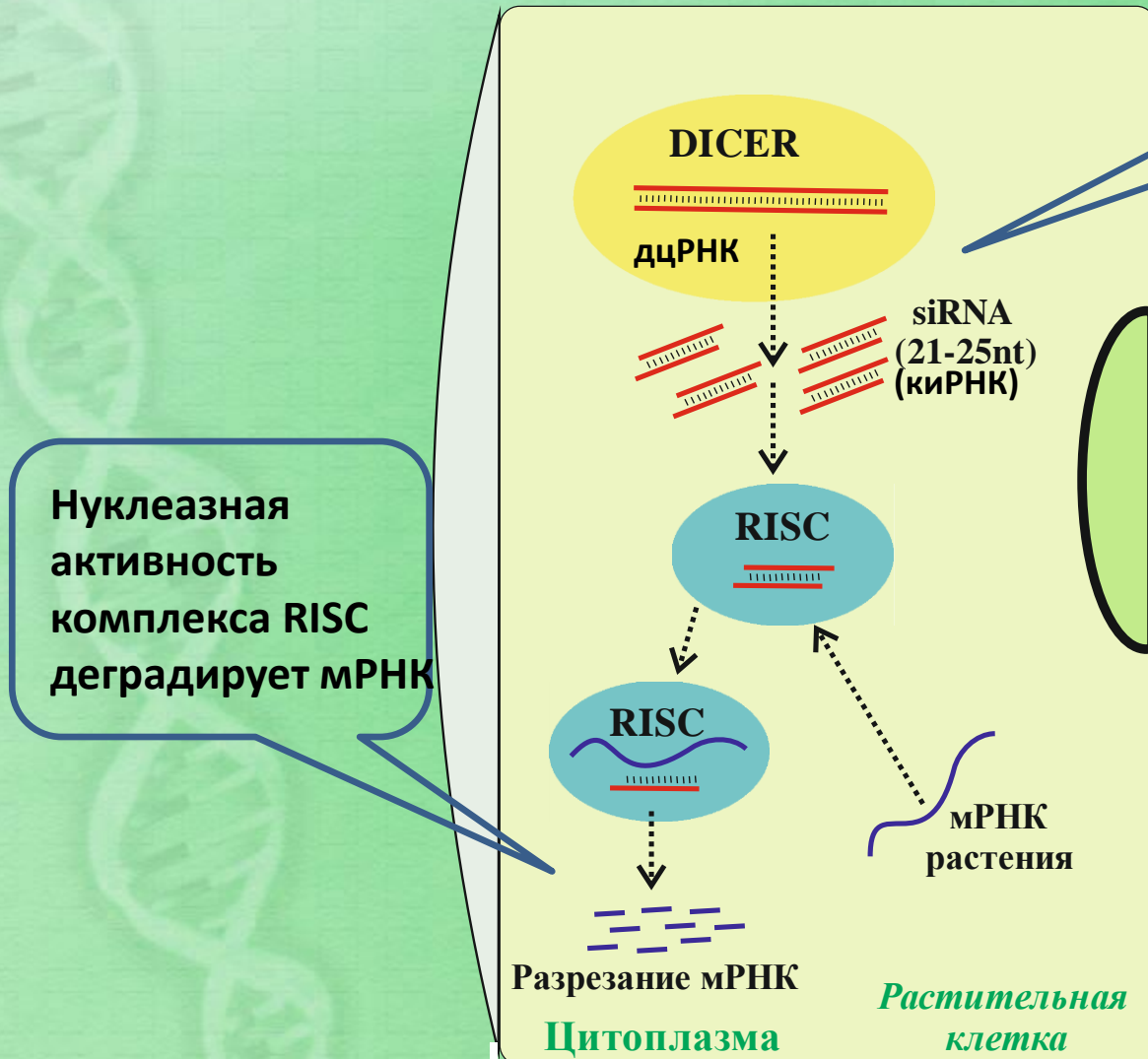


✓ В последнее время обработка поверхности растений экзогенными дцРНК для защиты от патогенов становится все более популярным подходом.

➤ Влияют ли экзогенные дцРНК на экспрессию собственных генов растения?

Механизм РНК-интерференции (замолкание генов)

Появление в клетке дцРНК вызывает каскад событий известный как РНК-интерференция



Нуклеазная активность комплекса RISC деградирует мРНК

- дцРНК – длинные двуцепочечные РНК

- киРНК – короткие интерферирующие РНК

➤ Влияют ли экзогенные дцРНК на экспрессию собственных генов растения?

Общая цель работы – индукция РНК-интерференции и замолкания растительных генов с помощью обработки поверхности растения водными растворами дцРНК и киРНК

1

дцРНК

киРНК

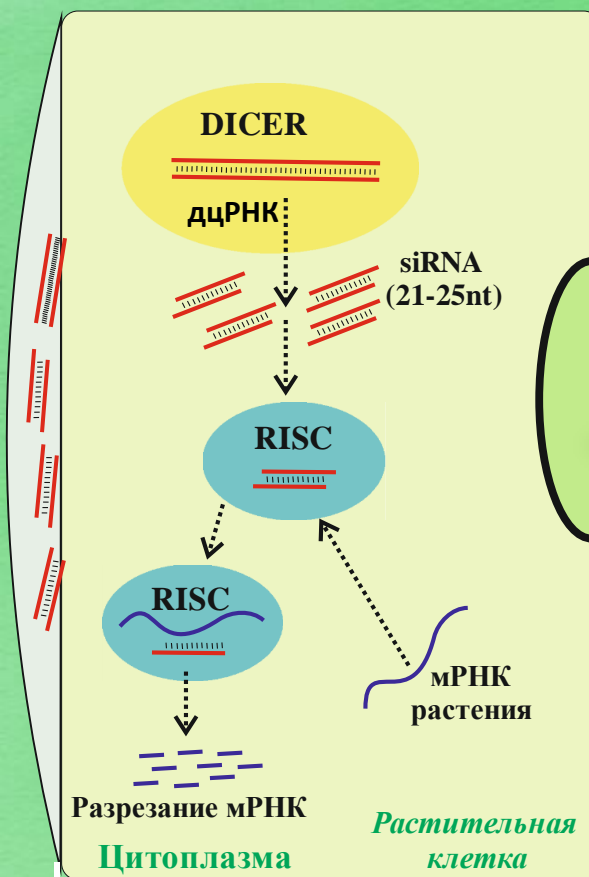
Синтез РНК
(*in vitro* транскрипция)

2



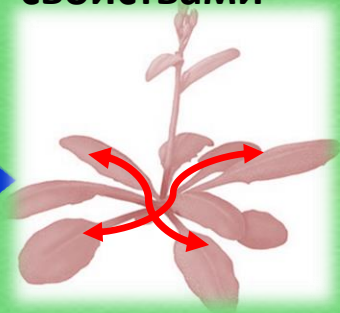
Обработка 4-недельного
Арабидопсиса

3 Проникновение, транспорт
РНК и индукция РНК-
интерференции

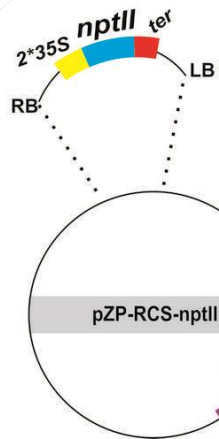


4

Растение с
измененным
свойствами



Ингибирование экспрессии трансгенов неомицин фосфотрансферазы *NPTII* и усиленного зеленого флуоресцентного белка *EGFP* с помощью обработки растений *Arabidopsis thaliana* L. синтетическими дцРНК и киРНК



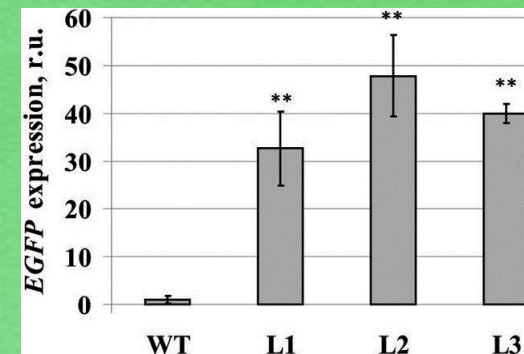
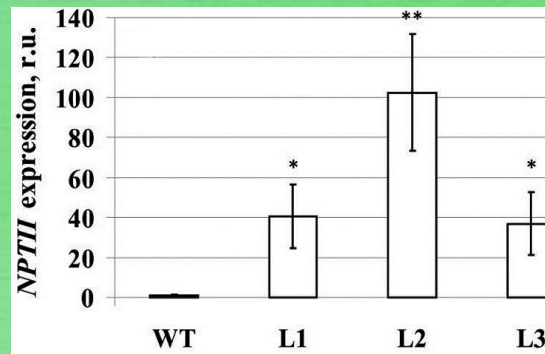
Получение трансгенных растений *Arabidopsis thaliana* L. с помощью агробактериальной трансформации (цветочное погружение)



NPTII- и *EGFP*-трансгенные растения

Зачем выключать экспрессию трансгенов?

Трансгены более подвержены РНК-индуцированному замолканию, чем эндогенные гены растений, поэтому мы в первую очередь анализировали, возможно ли повлиять на активность трансгенов в геноме арабидопсиса путем внешней обработки поверхности растений дцРНК и киРНК.



Экспрессия трансгенов *NPTII* и *EGFP* в трансгенных линиях растений *A. thaliana*.

Ход эксперимента

1. Получение длинных дцРНК для генов *NPTII* и *EGFP* с помощью MEGAscript RNAi Kit (ThermoFisher Scientific, USA)

2. Очистка и измерение концентрации дцРНК



4. Выращивание растений, выделение РНК и белков из листьев 1, 7 и 14 дней после обработки

3. Обработка 4-недельных растений Арабидопсиса



6 недель

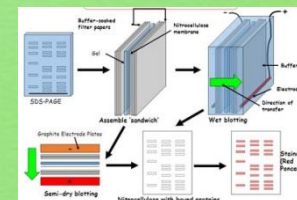
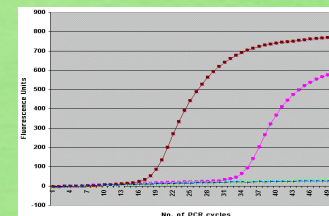
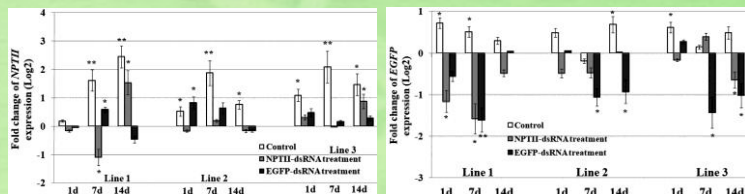
5 недель

4 недели

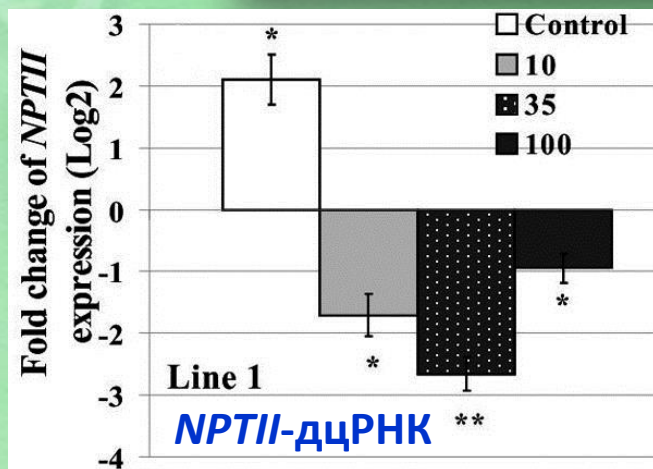
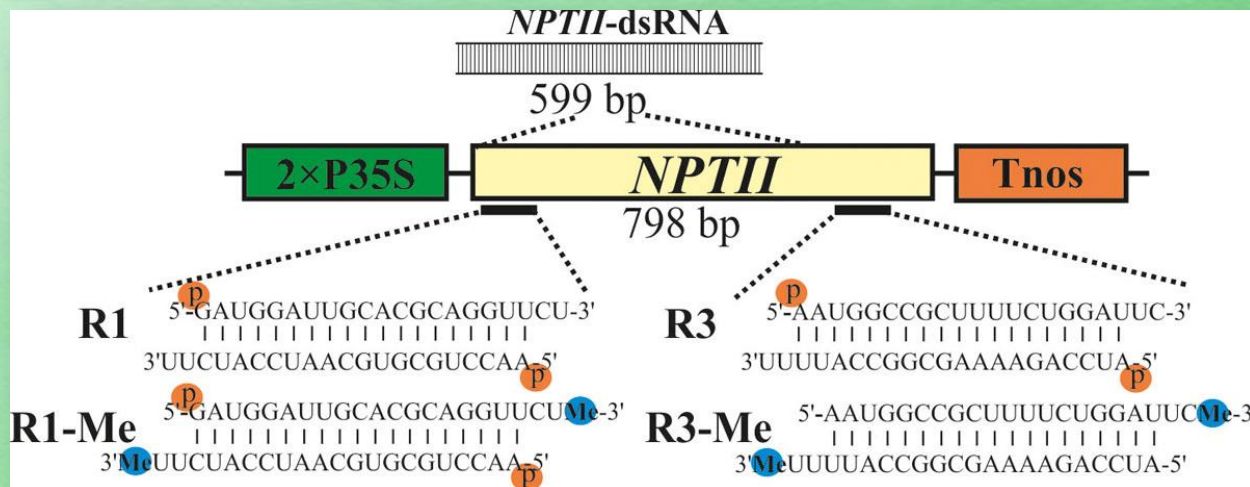


5. Анализ экспрессии генов *NPTII* и *EGFP* с помощью ПЦР с детекцией результатов в реальном времени и Вестерн-блоттинга

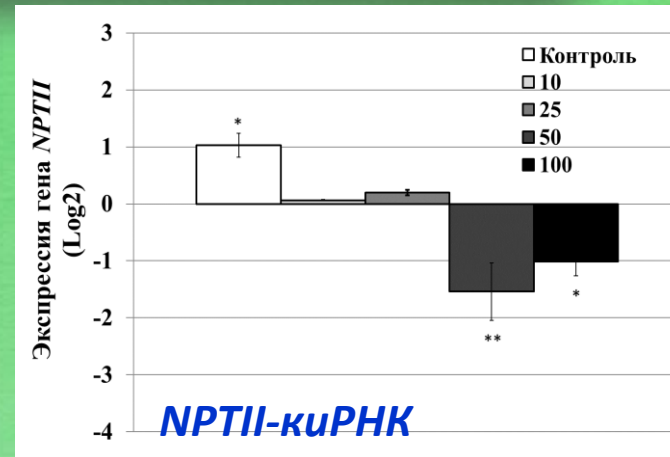
6. Обработка и обсуждение полученных результатов



Экзогенные трансген-кодирующие дцРНК и киРНК значительно снижают экспрессию целевых трансгенов у *A. thaliana*

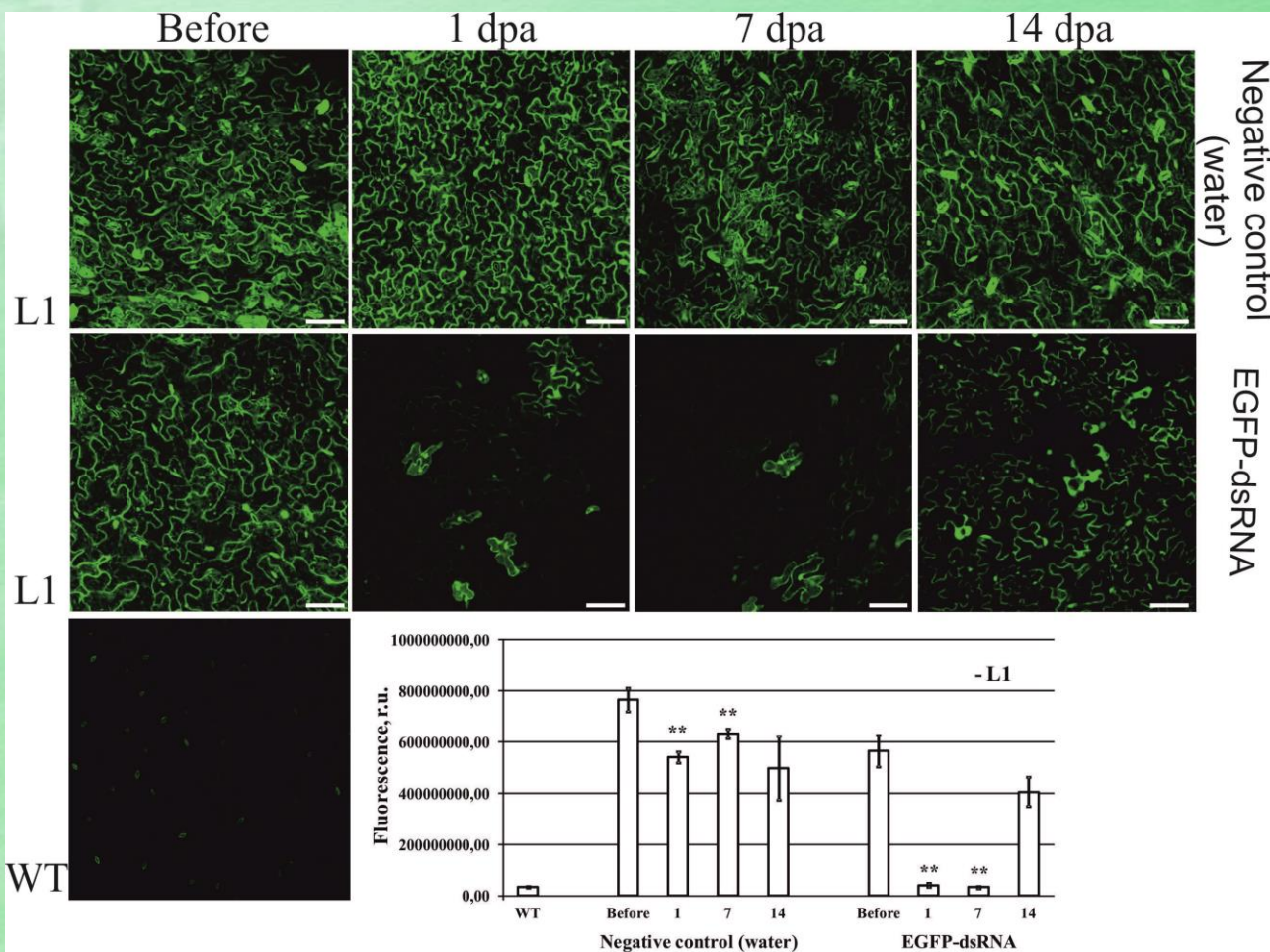


10, 35, 100 — количество EGFP-дцРНК и NPTII-дцРНК (µg) на одно растение



10, 25, 50, 100 — 10 pmol/µl, 25 pmol/µl, 50 pmol/ µ l, and 100 pmol/ µ l of R3-Me NPTII-ки

Подавление флуоресценции EGFP и накопления белка EGFP с помощью прямой обработки растений синтетическими дцРНК



Данные конфокальной микроскопии (Zeiss LSM 780, excitation 488 nm / emission 520-525 nm), данные получены в Дальневосточном центре электронной микроскопии ННЦМБ ДВО РАН к.б.н. Калачевым А.В.



Данные Вестерн-блоттинга, полученные на специфических антителах против EGFP

Цель работы – определение наиболее эффективных условий для подавления экспрессии трансгена (оптимизация подхода).

Изучали влияние следующих факторов:

- Возраст растений на момент обработки
- Время суток на момент обработки
- Условия культивирования, различные абиотические стрессовые факторы
- Методы нанесения дцРНК

- ✓ **Возраст растений в момент обработки важен! (4-недельные растения наиболее оптимальны)**
- ✓ **Обработку растений необходимо проводить в вечернее или ночное время суток!**
- ✓ **Наиболее эффективны обработка растений стерильными кисточками и опрыскивание.**
- ✓ **Низкая влажность почвы.**
- ✓ **Лучше использовать 35 мкг на растение для дцРНК и киРНК.**



The diagram illustrates the metabolic pathway of flavonoid biosynthesis, starting from Coumaroyl-CoA (Кумарил-КоА) and proceeding through several intermediates to the final products, Cyanidin (Цианидин) and Pelargonidin (Пеларгонидин).

Key Enzymes and Regulators:

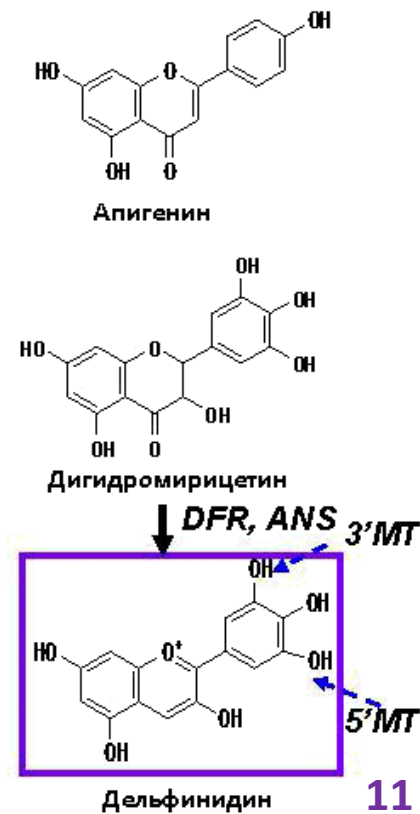
- CHS (Chalcone Synthase):** Catalyzes the condensation of Coumaroyl-CoA and 3 x Malonyl-CoA (3 x Малонил-КоА) to form Chalcone (2',4',6',4'-Тетрагидроксиалкон). This step is regulated by **MybL2** and **ANAC032**.
- CHI (Chalcone Isomerase):** Converts Chalcone to Narinengin (Нарингенин).
- FNS (Flavone Synthase):** Converts Narinengin to Fisetin (Физетин).
- FLS (Flavonol Synthase):** Converts Fisetin to Dihydroquercetin (Дигидрокверцетин).
- F3'H (Flavone 3-Hydroxylase):** Converts Fisetin to Dihydrokaempferol (Дигидрокемпферол).
- DFR (Dihydroflavonol 4-Reductase) and ANS (Anthocyanidin Synthase):** These enzymes convert Dihydroquercetin and Dihydrokaempferol into the final products, Cyanidin and Pelargonidin, respectively.

Chemical Structures and Modifications:

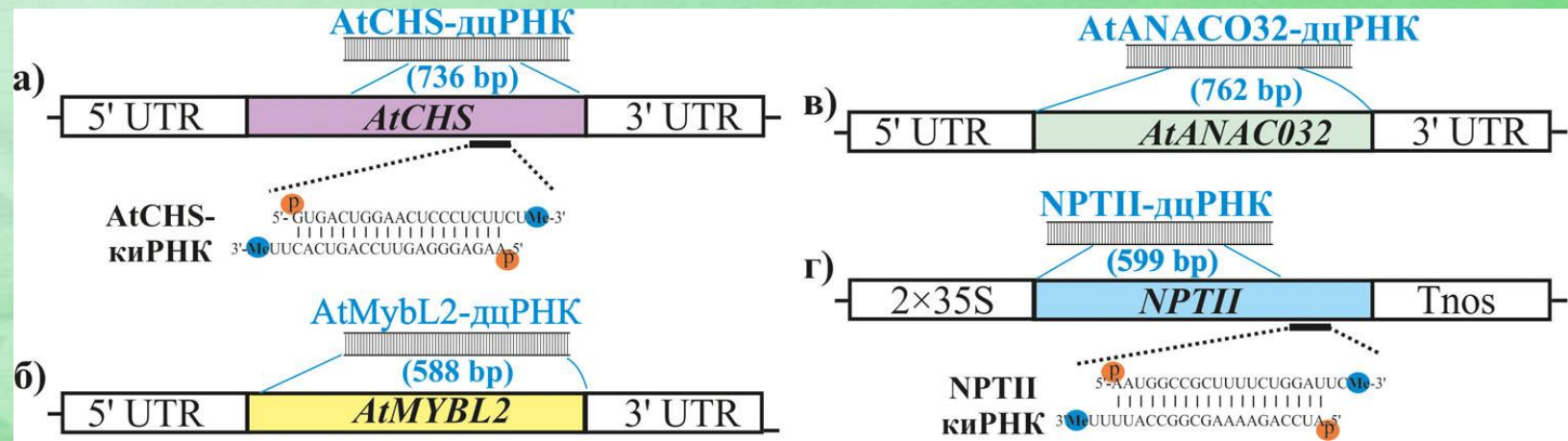
- Chalcone:** 2',4',6',4'-Тетрагидроксиалкон
- Narinengin:** 2',4',6',4'-Тетрагидроксиалкон
- Fisetin:** 2',4',6',4'-Тетрагидроксиалкон
- Dihydroquercetin:** 2',4',6',4'-Тетрагидроксиалкон
- Dihydrokaempferol:** 2',4',6',4'-Тетрагидроксиалкон
- Cyanidin:** 2',4',6',4'-Тетрагидроксиалкон
- Pelargonidin:** 2',4',6',4'-Тетрагидроксиалкон

Regulatory Elements:

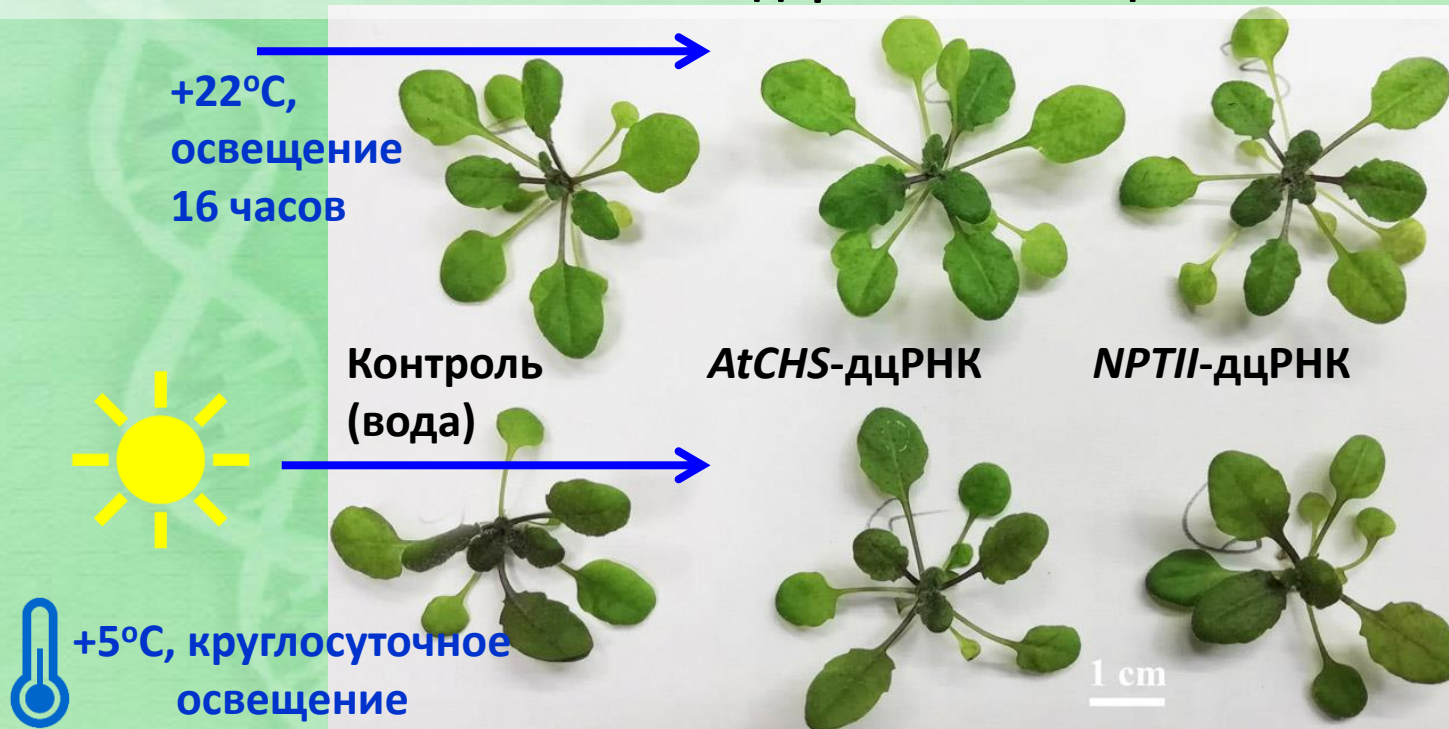
- MybL2** and **ANAC032** are shown as transcription factors regulating the **CHS** gene.
- 3'MT** (3-Methyltransferase) is indicated as a modification step in the pathway.



Использованные в дальнейшей работе дцРНК и киРНК

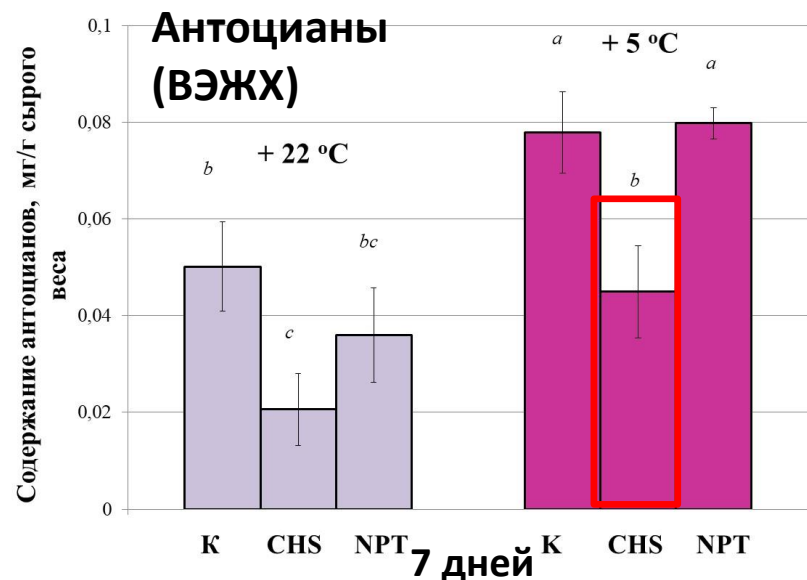
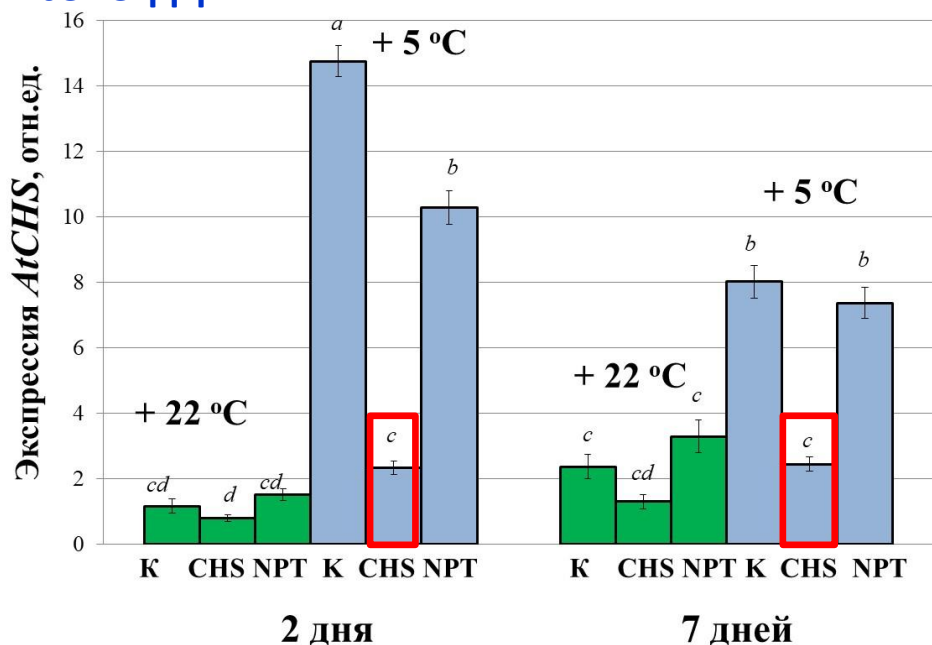


Влияние экзогенной *AtCHS*-кодирующей дцРНК на накопление мРНК гена *AtCHS* и содержание антоцианов

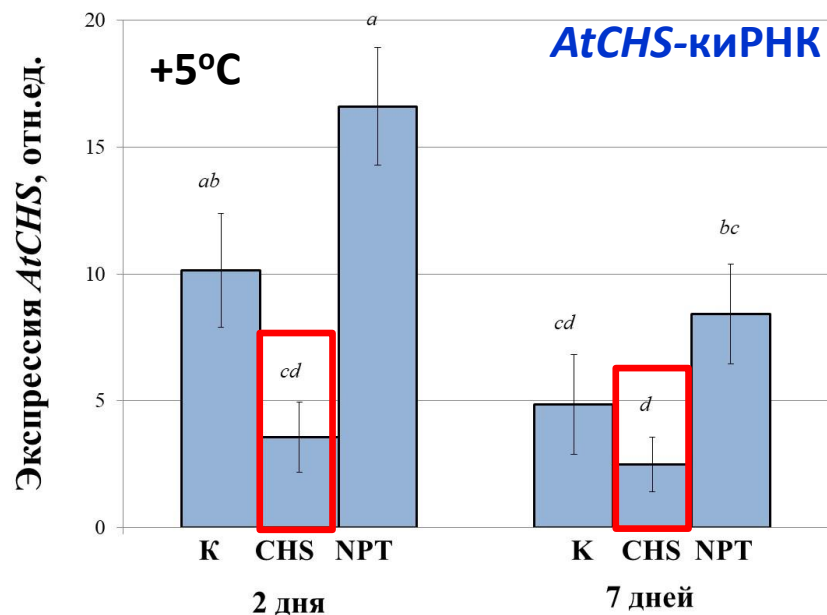


Влияние экзогенной *AtCHS*-дцРНК на накопление мРНК гена *AtCHS* и содержание антоцианов у *A. thaliana*

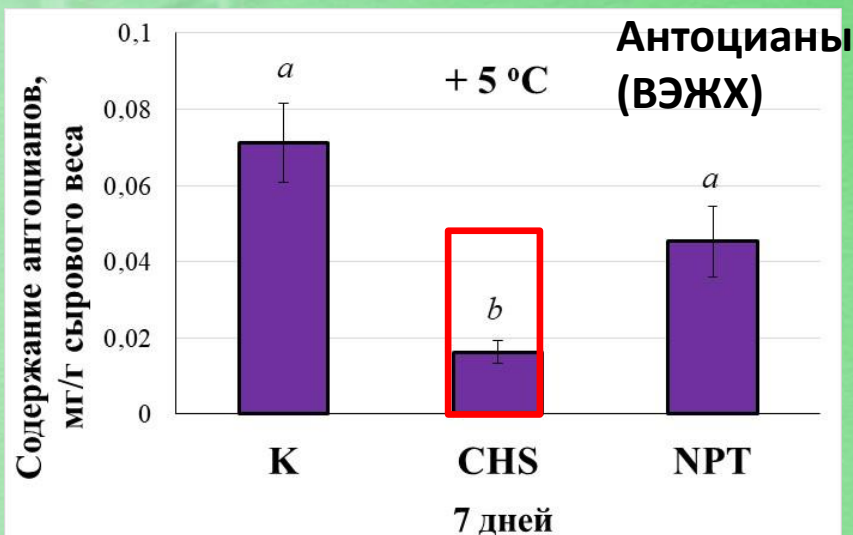
AtCHS-дцРНК



Влияние экзогенных *AtCHS*-киРНК на накопление мРНК гена *AtCHS* и содержание антоцианов у *A. thaliana*



К – контроль (обработка водой);
CHS – обработка раствором *AtCHS*-
кодирующей дцРНК;
NPT – обработка раствором *NPTII*-
кодирующей дцРНК.



Влияние экзогенной *MYBL2*-дцРНК и *ANAC032*-дцРНК на накопление мРНК этих генов

+22°C, освещение 16 часов



Контроль
(вода)



AtMybL2-дцРНК

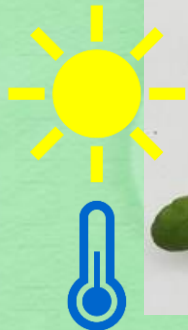


AtANAC032-дцРНК



NPTII-дцРНК

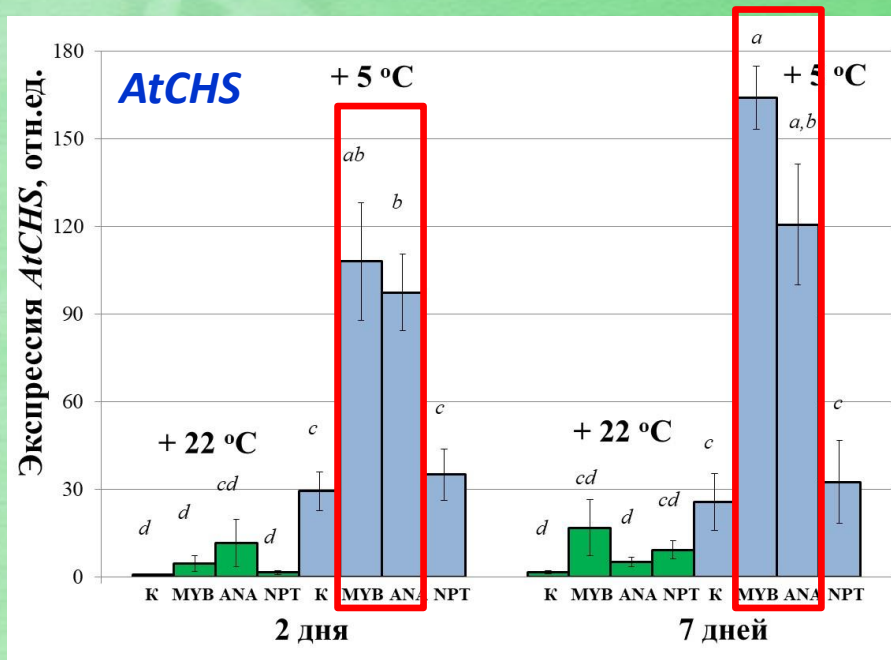
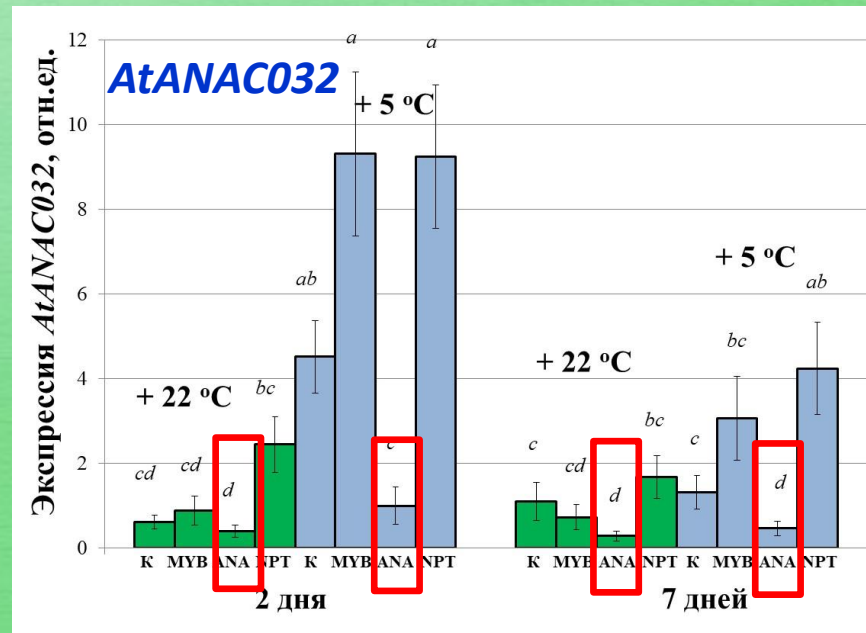
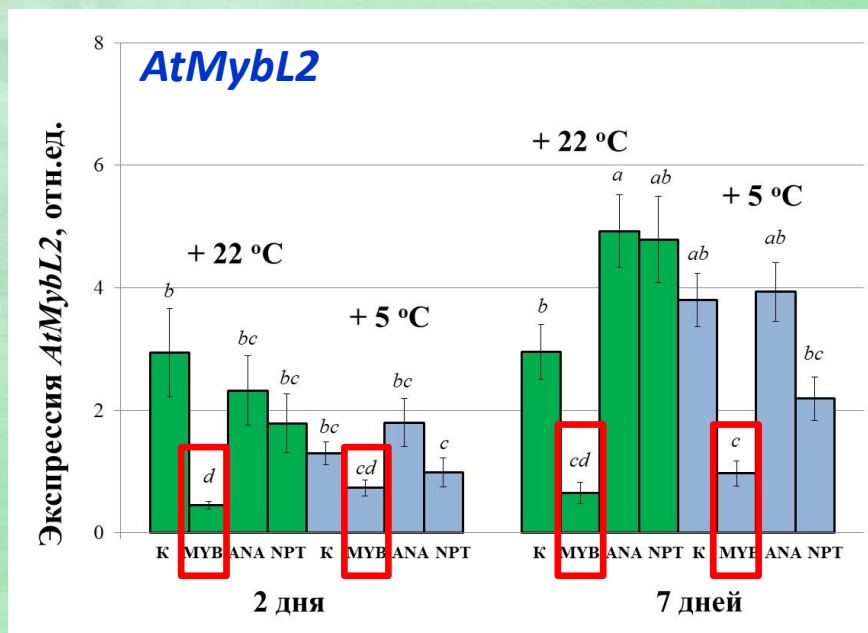
1 cm



+5°C, круглосуточное
освещение



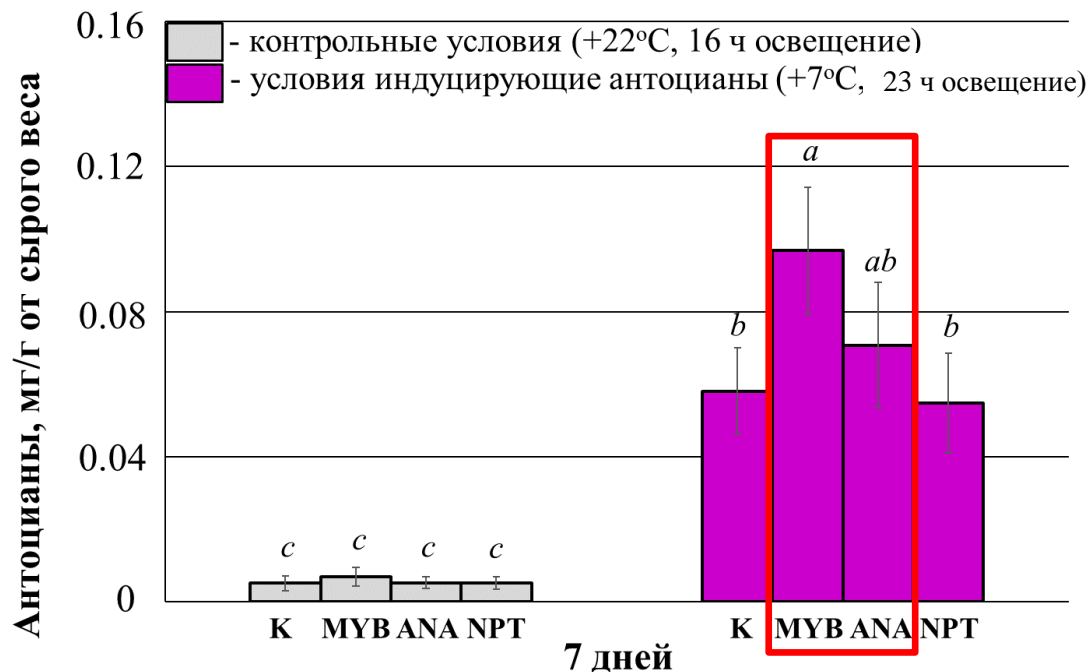
Влияние экзогенной *MYBL2*-дцРНК и *ANAC032*-дцРНК на накопление мРНК этих генов



К – контроль (обработка водой);
MYB – обработка раствором *AtMYBL2*-
 кодирующей дцРНК;
ANA – обработка раствором *AtANAC032*-
 кодирующей дцРНК;
NPT – обработка раствором *NPTII*-кодирующей
 дцРНК.

Kiselev KV, Suprun AR, Aleynova OA, Ogneva ZV, Kalachev AV, Dubrovina AS. External dsRNA downregulates anthocyanin biosynthesis-related genes and affects anthocyanin accumulation in *Arabidopsis thaliana* // *Int J Mol Sci*. 2021. 22:6749

Влияние экзогенной *MYBL2*-дцРНК и *ANAC032*-дцРНК на накопление антоцианов *A. thaliana*



К – контроль (обработка водой);

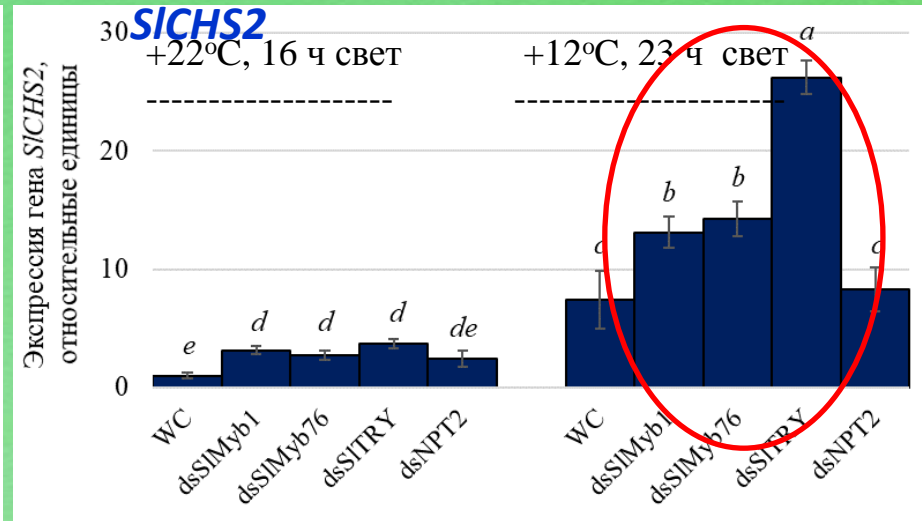
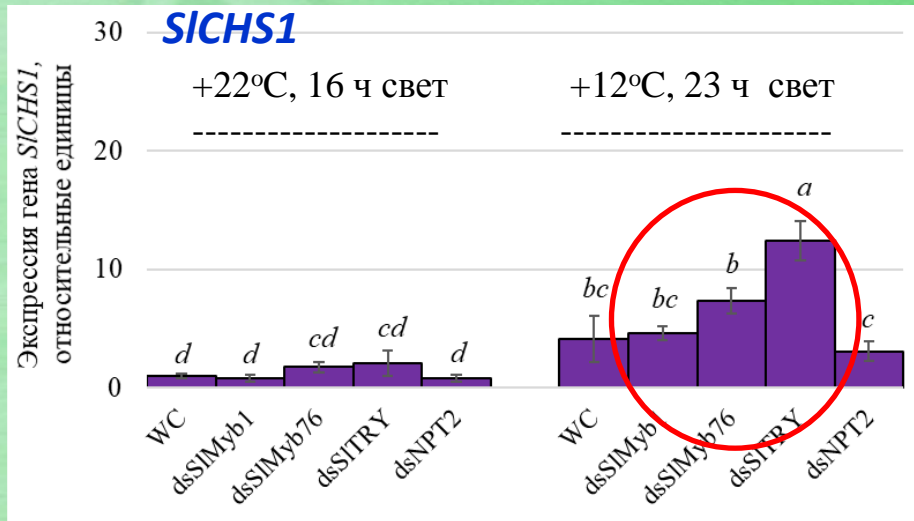
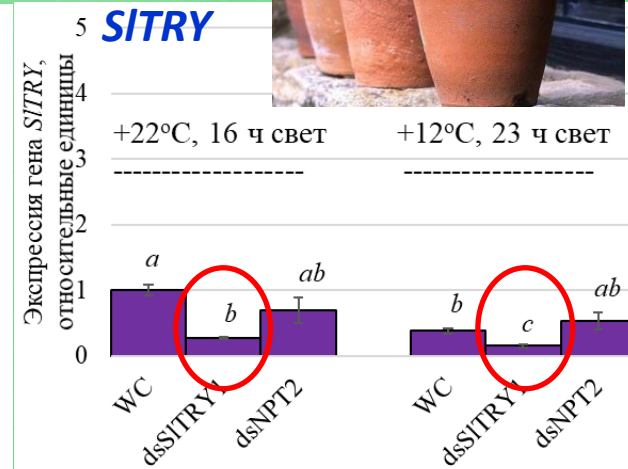
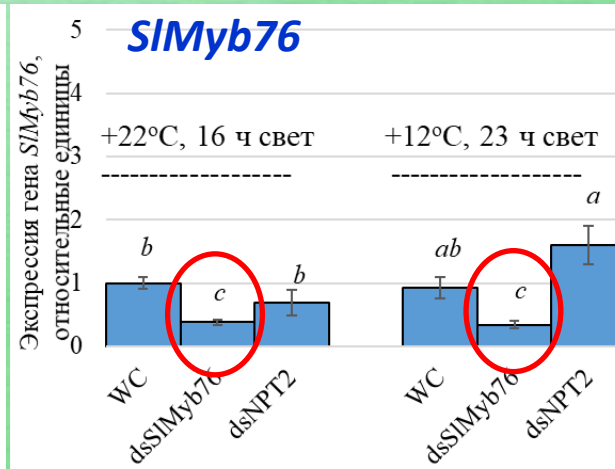
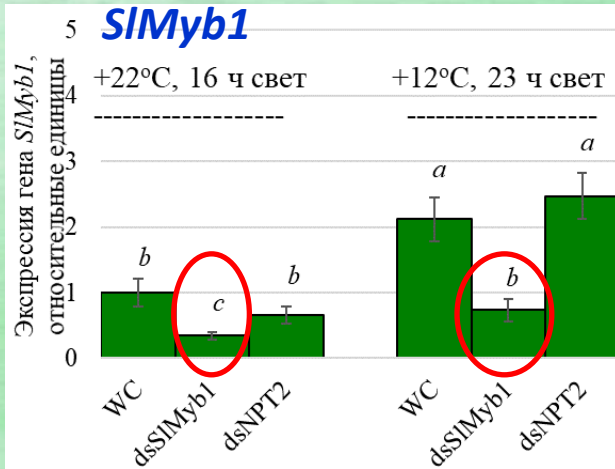
MYB – обработка раствором *AtMYBL2*-кодирующей дцРНК;

ANA – обработка раствором *AtANAC032*-кодирующей дцРНК;

NPT – обработка раствором *NPTII*-кодирующей дцРНК.

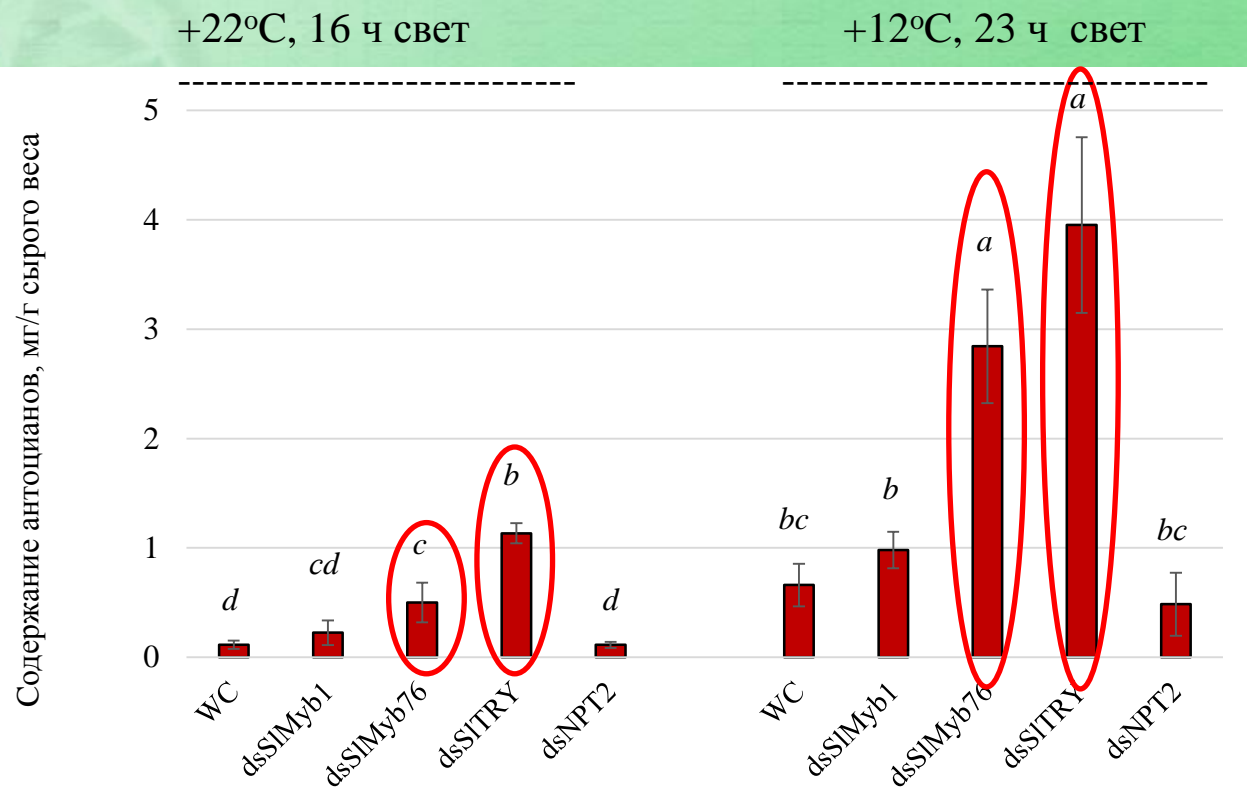
Kiselev KV, Suprun AR, Aleynova OA, Ogneva ZV, Kalachev AV, Dubrovina AS. External dsRNA downregulates anthocyanin biosynthesis-related genes and affects anthocyanin accumulation in *Arabidopsis thaliana* // *Int J Mol Sci*. 2021. 22:6749

Уровень экспрессии генов *SlMyb1*, *SlMyb76*, *SlTRY* после обработки дцРНК в растениях томата *Solanum lycopersicum* L. (сорт микротом)



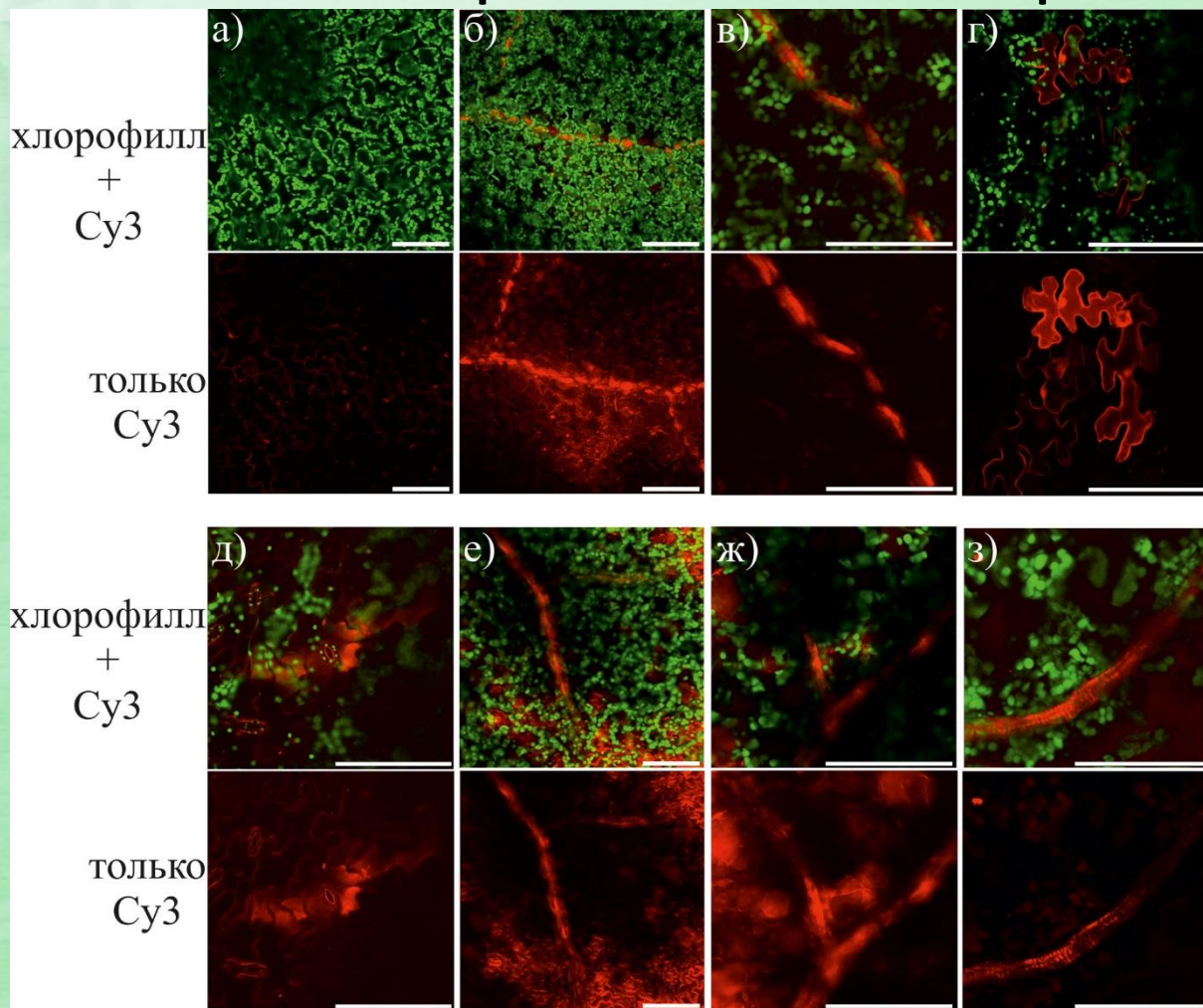
WC – контрольные растения; dsSlMyb1 – растения, обработанные dsSlMyb1-дцРНК; dsSlMyb76 – растения, обработанные dsSlMyb76-дцРНК; dsSlTRY – растения, обработанные dsSlTRY-дцРНК; dsNPT2 – растения, обработанные NPTII-дцРНК

Влияние экзогенной *SlMyb1*, *SlMyb76*, *SlTRY*-дцРНК на накопление антоцианов *S. lycopersicum*



WC – контрольные растения; **dsSlMyb1** – растения, обработанные dsSlMyb1-дцРНК; **dsSlMyb76** – растения, обработанные dsSlMyb76-дцРНК; **dsSlTRY** – растения, обработанные dsSlTRY-дцРНК; **dsNPT2** – растения, обработанные NPTII-дцРНК;. Данные qRT-ПЦР представлены как среднее значение \pm SE. Средние значения в каждом столбце, над которыми есть одинаковые буквы, не различались по критерию Стьюдента ($p < 0.05$).

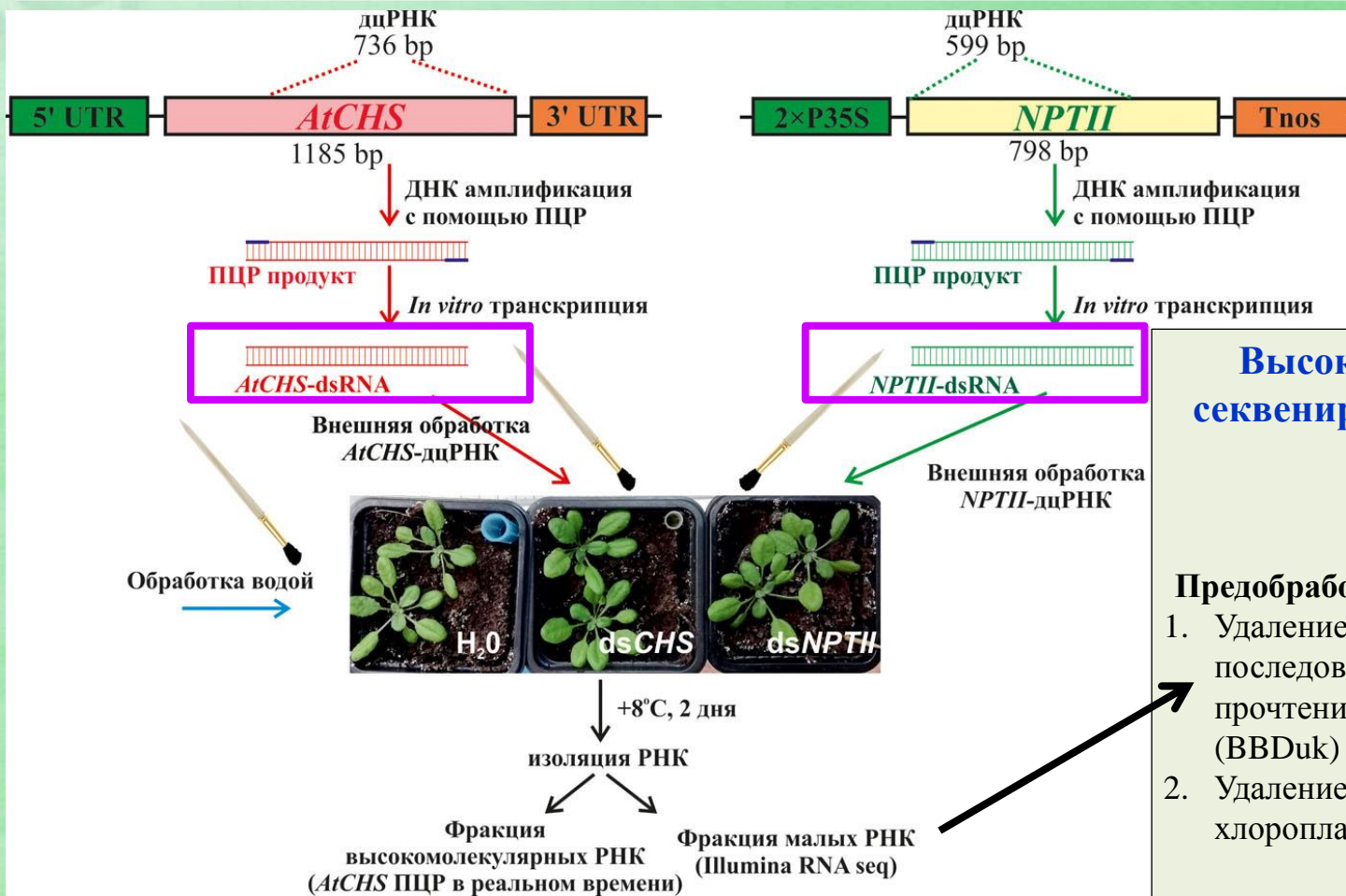
Распространение Cu3 -меченной *AtCHS*-кодирующей дцРНК после обработки листовой поверхности растений



Данные конфокальной микроскопии (Zeiss LSM 780, excitation 488 nm / emission 520-525 nm), данные получены в Дальневосточном центре электронной микроскопии ННЦМБ ДВО РАН к.б.н. Калачевым А.В.

Обнаружение Cu3 -меченных *AtCHS*-дцРНК (красный цвет) в обработанных листьях *A. thaliana*. Адаксиальная (а-г) и абаксиальная (д-з) поверхность листьев 4-х недельных растений *A. thaliana* была обработана Cu3 -мечеными *AtCHS*-дцРНК с помощью мягких стерильных кисточек и проанализированы на флуоресценцию через 13-15 ч. Зеленым отмечена автофлуоресценция хлоропластов. Шкала 100 μm .

Секвенирование фракции малых РНК в растениях *A. thaliana*, обработанных *AtCHS*-дцРНК и *NPTII*-дцРНК



Высокопроизводительное секвенирование по технологии Illumina

Предобработка полученных прочтений:

1. Удаление адапторных последовательностей и оставление прочтений длиной 17-30 нуклеотидов (BBduk)
2. Удаление прочтений с рибосомальной и хлоропластной РНК (Bowtie1).

Биоинформатический анализ:

1. Анализ распределение длин малых РНК (Bowtie1).
2. Количественный анализ малых РНК, выравненных на dsCHS и dsNPT (Bowtie1 и Bedtools).
3. Количественный анализ микроРНК (Bowtie1)
4. Определение дифференциально экспрессированных (ДЭ) микроРНК (HTSeq и DESeq2)
5. Определение генов-мишеней ДЭ микроРНК (psRNATarget)
6. Анализ обогащения по функциональной принадлежности генов-мишеней (BinGO)

Выводы:

- ✓ Разработана оригинальная методика внешней обработки растений растворами дцРНК и киРНК и определены наиболее оптимальные условия для специфичного подавления активности трансгенов в геноме растений.
- ✓ Обработка листовой поверхности *A. thaliana* водными растворами синтетической дцРНК, кодирующей ген халкон синтазы CHS (ключевой фермент в биосинтезе антоцианов), приводила к значительному падению уровня мРНК гена *AtCHS* и снижению содержания антоцианов в обработанных растениях.
- ✓ Обработка листовой поверхности *A. thaliana* растворами дцРНК, кодирующими транскрипционные репрессоры синтеза антоцианов (*AtMybL2*- и *AtANAC032*), ингибировала экспрессию этих генов, в то время как содержание антоцианов и экспрессия *AtCHS* в растениях *A. thaliana* возрастали.
- ✓ Установлено, что экзогенная дцРНК проникает в сосудистую систему и отдельные клетки растения, предположительно через устьица, и распространяется по сосудистой системе и в группах клеток паренхимы.

Выводы:

- ✓ Обработка поверхности томата *S. lycopersicum* растворами дцРНК, кодирующими транскрипционные репрессоры синтеза антоцианов томата (*SlMyb1*, *SlMyb76*, *SlTRY*), ингибировала экспрессию этих генов, в то время как содержание антоцианов и экспрессия *CHS* в растениях возрастали.
- ✓ Данные высокопроизводительного секвенирования фракций малых РНК в растениях *A. thaliana* показали, что снижение уровня мРНК гена *AtCHS* в обработанных растениях связано с появлением фракции малых РНК против этого гена и, следовательно, вызвано индукцией процессов РНК интерференции.
- ✓ Полученные данные свидетельствуют о возможности направленной регуляции экспрессии растительных генов с помощью экзогенных дцРНК и киРНК, и, соответственно, регуляции количества конечного продукта (в данном случае антоцианов) без модификации генома растения.

Спасибо за внимание!

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда
(19-74-10023, рук. Дубровина А.С.)



Лаборатория биотехнологии ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН
(Руководитель лаборатории Киселев Константин Вадимович)