

Оценка взаимодействия факторов инициации трансляции eIF4E с белком VPg Y-вируса картофеля *in planta*

О.Л. Ражина^{1*}, В.В. Никаноркина¹, А. Сущенко², М.В. Лебедева¹, В.В. Таранов¹

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия

² Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

* Oksana-razhina@yandex.ru

Цель: Создать систему *in planta* для оценки способности факторов инициации трансляции 4E табака и картофеля поддерживать трансляцию белков вируса Y (PVY).

PVY вызывает опасные заболевания, которые поражают широкий спектр растений семейства Solanaceae, включая помидоры, картофель и табак. Белок VPg (Viral Protein Genome-linked) имитирует кэп-структуру мРНК клетки-хозяина, что позволяет ему рекрутировать кэп-связывающие факторы инициации трансляции семейства eIF4E для синтеза вирусных белков. Ранее было показано, что eIF4E-1 является главным фактором восприимчивости у картофеля, именно с первым фактором в первую очередь взаимодействует вирусный белок VPg. Внося мутации в данный фактор, можно добиться прекращения взаимодействия с VPg и повышения устойчивости картофеля к PVY. Для оценки белок-белковых взаимодействий существуют разные методы, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки. Одним из таких широко используемых методов является дрожжевая двугибридная система. Эта технология не требует специального оборудования, отличается высокой эффективностью, простой и низкой себестоимостью. Однако на практике, чтобы подтвердить наличие белок-белковых взаимодействий *in vivo* или *in vitro*, выявленных в дрожжевой двугибридной системе, необходимо провести дополнительные исследования, это связано с различием в физиологии дрожжей и растений. Таким образом, встает необходимость в создании модели *in planta*, в которой полученные результаты о взаимодействии будут более достоверны и позволят провести проверку различных вариантов модифицированного белка непосредственно в растениях. *N. tabacum* является удобным объектом для сверхэкспрессии белков, на основе которого может быть создана система *in planta* для проверки способности мутантных факторов картофеля поддерживать трансляцию вирусных белков. Тем более табак и картофель относятся к семейству Solanaceae и поражаются одними штаммами PVY. Однако у табака есть свое семейство факторов eIF4E значительно больше, чем у картофеля (8 и 3 соответственно). Поэтому сначала необходимо установить какой или какие факторы могут использоваться PVY и нокаутировать их с помощью подходов геномного редактирования.

Материалы и методы: В этом исследовании, используя дрожжевой двугибридный анализ (YTH), была проведена проверка взаимодействия между факторами eIF4E табака с различными формами белка VPg вируса PVY штамма NTN. Были созданы две генетические конструкции на основе вектора pKSE401 для мультиплексного редактирования факторов eIF4E1-S и eIFiso4E-T табака с помощью системы CRISPR-Cas9. Была проведена агробактериальная трансформация листовых эксплантов *N. tabacum* созданными генетическими конструкциями для внесения нокаут-мутаций в два гена. Полученные после регенерации и селекции растения проверялись на наличие вставки Т-ДНК и редактирования. Было получено поколение T1. Для последующего анализа на заражение вирусом были отобраны растения, лишённые вставки Т-ДНК и гомозиготные по eIF4E1-S и eIFiso4E-T.

Результаты: В рамках работы нами были определены основные факторы eIF4E табака, используемые VPg PVY штамма NTN. Были созданы две генетические конструкции для получения нокаут-мутантов по генам eIF4E1-S и eIFiso4E-T. После агробактериальной трансформации и регенерации всего было отобрано 85 трансгенных растений табака, среди которых 2 растения содержали мутации в eIF4E1-S и 3 растения – в eIFiso4E-T. Из них только одно растение было отредактированным по обоим генам. После получения поколения T1 были отобраны растения без вставки Т-ДНК и проведено заражение вирусом Y для подтверждения повышения устойчивости в сравнении с контролем.

Выводы: Таким образом, была создана геномно-отредактированная линия *N. tabacum*, которая может быть использована для сверхэкспрессии мутантных факторов инициации трансляции eIF4E для последующей проверки их способности поддерживать трансляцию белков PVY *in planta*.

Финансирование: Исследование выполнено в рамках государственного задания номер FGUM-2022-0004.