

Наноплатформа для доставки микроРНК на основе экзосом *Nicotiana tabacum*

Ж.Л. Цыденешиева^{1,2*}, Ю.Н. Шкрыль², Т.Ю. Горпенченко²

¹ Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

² ФНИЦ Биоразнообразия Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия

* zargalma2509@gmail.com

Цель: Изучение способности экзосом из растения *Nicotiana tabacum* к таргетной доставке микроРНК (antimirGFP) в клетки трансгенного растения *N. tabacum*, экспрессирующего флюоресцентный белок – GFP.

Материалы и методы: Трансгенные растения получали методом Floral-dip. Экзосомы выделяли из апопластической жидкости листьев растения *N. tabacum* методом дифференциального ультрацентрифугирования. Визуализировали экзосомы, а также измеряли уровень флюоресценции с помощью метода сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Концентрацию экзосом, а также гидродинамический диаметр измеряли с помощью анализа траектории движения наночастиц (NTA). Экспрессию генов измеряли методом количественной ПЦР в реальном времени.

Результаты: Выделили экзосомы из растения *Nicotiana tabacum* дикого типа (ТЭВ), а также из трансгенного *N. tabacum*, экспрессирующего антимирРНК к гену GFP (ТФЭВ). По результатам СЭМ оба типа экзосом имели округлую везикулярную форму, средний размер варьировался от 90 до 150 нм. Концентрация экзосом в среднем составила $2,2 \times 10^{11}$ для ТЭВ и $3,6 \times 10^{11}$ частиц/мл для ТФЭВ. Поглощение растительных экзосом клетками-мишенями имеет решающее значение для эффективной доставки лекарств и терапевтических средств. Для этого мы обработали протопласты, полученные из растений табака экзосомами ТФЭВ, меченными флуоресцентным красителем. Конфокальная микроскопия показала, что экзосомы интернализовались в протопласты в течение 1 часа после инкубации, что свидетельствует об их эффективном поглощении растительными клетками.

Для оценки снижения флюоресценции, опосредованной экзосомами, использовали протопласты трансгенных растений с геном GFP. Протопласты обрабатывали экзосомами, полученными из трансгенных растений, содержащих амиРНК, нацеленные на GFP (ТФЭВ). Экзосомы, выделенные из нетрансгенных растений (ТЭВ), служили контролем. В протопластах, обработанных ТФЭВ, наблюдалось снижение интенсивности флуоресценции GFP, что было подтверждено с помощью конфокальной микроскопии. Таким образом, обработка трансгенных протопластов ТФЭВ приводила к динамической модуляции флуоресценции GFP во времени. Эти результаты подчеркивают потенциал экзосом растительного происхождения в качестве векторов для доставки РНК и глушения генов в растительных клетках.

Чтобы оценить эффективность сконструированных антимирРНК в подавлении экспрессии GFP в растении, мы провели серию экспериментов с использованием листьев растений табака, экспрессирующих GFP. Листья инфильтровали физиологическим буфером с двумя типами экзосом ТЭФ и ТФЭВ. Результаты сканирующей электронной микроскопии согласуются с результатами эксперимента на протопластах. Происходило снижение флюоресценции GFP уже через 1 час после инфильтрации, продолжающееся на протяжении 3 часов. Затем, как и в предыдущем эксперименте, происходило восстановление флюоресценции.

Выводы: Данное исследование представляет собой первую демонстрацию использования биоинженерных экзосом растений в качестве систем таргетной доставки антимирРНК, предлагая новый и эффективный метод подавления экспрессии генов в растениях. Способность точно воздействовать на определенные гены с помощью микроРНК, доставляемых экзосомами, имеет важное значение для биотехнологии растений, особенно для выведения культур с повышенной устойчивостью к стрессам, болезням и повышенной урожайностью. Более того, использование экзосом растительного происхождения в качестве естественных носителей генетического материала представляет собой устойчивую и биосовместимую альтернативу традиционным методам доставки генов. Будущие исследования могут способствовать широкому применению этой технологии в сельском хозяйстве, функциональной геномике и растительной терапии, тем самым открывает путь к новым стратегиям выращивания сельскохозяйственных культур.