

Новый гомолог ингибитора пептидазы Кунитца *Nicotiana benthamiana* участвует в межклеточном транспорте макромолекул в растительной клетке**Научный руководитель – Дорохов Юрий Леонидович***Гавриш Г.Е.¹, Ершова Н.М.¹*¹ - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

Современное представление о вирусном и бактериальном патогенезе предполагает возможность конкурентных взаимоотношений между транспортом макромолекул хозяина и патогена. Например, бактерии синтезируют и «впрыскивают» в растительную клетку пептидазы, обеспечивающие трофику патогена. В ответ на это растительная клетка индуцирует транскрипционную активность генов, обеспечивающих синтез разнообразных ингибиторов пептидаз, включая *Kunitz peptidase inhibitor (KPI)*. Ранее мы идентифицировали и выделили из генома *Nicotiana benthamiana* ген, имеющий гомологию с генами, кодирующими *KPI (NbKPI)*. Однако в отличие от известных *KPI* исследуемый нами *NbKPI* потерял способность ингибировать сериновые пептидазы. Мы предположили, что *NbKPI* приобрел способность влиять на межклеточный транспорт макромолекул, обеспечивая защиту растения. Для доказательства этого предположения мы использовали несколько экспериментальных приемов. Первый подход состоял в исследовании состояния межклеточного транспорта в листьях растений при использовании реперных молекул. В норме плазмодесмы листа не способны пропускать молекулы размером более 40 кДа. В своих экспериментах мы использовали молекулу 2xGFP (мол. масса 54 кДа). Транспорт 2xGFP из одной клетки в другую свидетельствует об «открытом» состоянии плазмодесм, характерном для листа, подвергающегося атаке патогена. Мы проводили совместную агроинфильтрацию листьев 35S-2xGFP с пустым бинарным вектором или с конструкцией, обеспечивающей повышенную экспрессию *NbKPI*. Затем через 24-30 часов после агроинъекции подсчитывали кластеры светящихся клеток с помощью флуоресцентного светового микроскопа. Мы показали, что при повышенном синтезе *NbKPI*, отмечается усиление межклеточного транспорта, когда более чем 50% флуоресцентных сигналов было распределено между 2-3-4- клеточными кластерами. Другой прием состоял в использовании известного генетикам метода комплементации. Известно, что транспортный белок (ТБ) вируса табачной мозаики (ВТМ) способен эффективно увеличивать пропускную способность плазмодесм и участвует в транспорте как вирусной РНК, так и GFP, синтезируемого с вирусного вектора на основе ВТМ (ВТМ-GFP). При введении в ВТМ-GFP мутаций, приводящих к нарушению синтеза ТБ, GFP детектируется в одиночных клетках. Если функция *NbKPI* состоит в открытии плазмодесмальных «ворот», то совместное введение в клетку ВТМ-GFP, кодирующего дефектный ТБ, и *NbKPI* приведет к комплементации функции транспорта дефектного ТБ, в результате чего появятся многоклеточные кластеры, содержащие GFP. И действительно, мы выявили способность *NbKPI* комплементировать функцию транспорта дефектного ТБ ВТМ. Мы заключили, что идентифицированный нами *KPI N. benthamiana* обладает способностью взаимодействовать с плазмодесмой и стимулировать межклеточный транспорт макромолекул в растении.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ МД-5697.2016.4 и гранта РФ-ФИ 16-34-00062_мол_а.