

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-148

**ЭКЗОСОМЫ РАСТЕНИЯ NICOTIANA TABACUM  
В КАЧЕСТВЕ НАНОПЛАТФОРМЫ ТАРГЕТНОЙ ДОСТАВКИ МИКРОРНК**

**EXOSOMES OF THE NICOTIANA TABACUM PLANT AS A NANO-PLATFORM  
FOR TARGETED DELIVERY OF MICRORNA**

Ж. Л. Цыденешиеva, Ю. А. Югай, Ю. Н. Шкрыль

*Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН, Владивосток*

Z. L. Tsydeneshieva, Y.A. Yugay, Y.N. Shkryl

*Federal Scientific Center of Terrestrial Biodiversity of East Asia FEB RAS, Vladivostok*

✉ zhargalma2509@gmail.com

**Аннотация**

Экзосомы растительного происхождения представляют собой небольшие внеклеточные везикулы, способные к транспортировке различных клеточных биомолекул и в данный момент рассматриваются в качестве перспективных наноплатформ доставки и регуляции генов. В данном исследовании мы сообщаем о биоинженерии трансгенных растений табака (*Nicotiana tabacum*), экспрессирующих искусственные микроРНК (амиРНК), предназначенные для нацеливания на зеленый флуоресцентный белок (GFP). Экзосомы были выделены из листьев этих трансгенных растений табака, и их способность накапливать амиРНК была подтверждена путем выделения и количественного определения РНК. Примечательно, что эти экзосомы были способны проникать в клетки табака, экспрессирующие GFP, что приводило к значительному подавлению экспрессии GFP, что было продемонстрировано с помощью флуоресцентной микроскопии и количественной ПЦР. Это первая демонстрация использования биоинженерных растительных экзосом в качестве системы адресной доставки амиРНК для регулирования экспрессии специфических генов *in planta*. Полученные нами результаты подчеркивают потенциал растительных экзосом как эффективных транспортных средств для ингибирования экспрессии генов, предлагая новый подход к точной регуляции генов в растениях и платформу для будущих биотехнологических применений в улучшении сельскохозяйственных культур и терапии на основе растений.

**Abstract**

Plant-derived exosomes are small extracellular vesicles with the potential to serve as natural carriers for biomolecules, offering promising applications in gene delivery and regulation. In this study, we report the bioengineering of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants expressing artificial microRNAs (amiRNAs) designed to target green fluorescent protein (GFP). Exosomes were isolated from the leaves of these transgenic tobacco plants, and their ability to accumulate amiRNAs was confirmed through RNA extraction and quantification. Notably, these exosomes were capable of penetrating into tobacco cells expressing GFP, resulting in a significant suppression of GFP expression, as demonstrated by fluorescence microscopy and quantitative PCR. This is the first demonstration of bioengineered plant exosomes being used as a targeted delivery system for amiRNAs to regulate specific gene expression *in planta*. Our findings highlight the potential of plant exosomes as efficient vehicles for gene silencing, offering a novel approach to precise gene regulation in plants and a platform for future biotechnological applications in crop improvement and plant-based therapies.

Экзосомы представляют собой липидные везикулы размером от 30 до 150 нм, которые секретируются различными типами клеток во внеклеточную среду. Эти везикулы происходят из эндосомального компартмента и способны к транспортировке различных молекул внутри клетки, включая белки, липиды, метаболиты и нуклеиновые кислоты [1]. Предыдущие исследования показали, что растительные экзосомы могут переносить микроРНК (миРНК) и передавать их между клетками (Ref) [2]. МикроРНК — это малые некодирующие РНК, которые играют важнейшую роль в посттранскрипционной регуляции генов, нацеливая определенные мессенджерные РНК (мРНК) на деградацию или трансляционную репрессию. Чтобы проверить возможность использования растительных экзосом в качестве средств доставки амиРНК, мы разработали систему доказательства концепции с использованием сконструированных амиРНК, направленных на глушение экспрессии зеленого флуоресцентного белка (EGFP).

В данном исследовании мы сначала сконструировали трансгенные растения *Nicotiana tabacum* для экспрессии искусственных микроРНК (амиРНК), нацеленных на экспрессию зеленого флуоресцентного белка (GFP) и заглушающих ее. Для подтверждения успешной трансформации растений табака с конструкцией amiRNA мы

проводили анализ полимеразной цепной реакции (ПЦР) на геномной ДНК, выделенной из устойчивых к канамицину растений (рис. 1).



Рис. 1. Контрольные (а) и трансгенные (б) растения *Nicotiana tabacum*; сравнение экспрессии гена *ntpll* (в) в трансгенных (Nt-amiRNA\_GFP) и контрольных (Wt) растениях

Экзосомы выделяли методом дифференциального ультрацентрифугирования. Выделяли из контрольных растений табака дикого типа (ТЭВ — внеклеточные везикулы табака), а также из растений трансгенных линий (ТТЭВ — внеклеточные везикулы трансгенного табака с GFP). Анализ отслеживания наночастиц (NTA) показал, что средний диаметр ТЭВ составлял  $177 \pm 17$  нм (рис. 2, б), а ТТЭВ —  $142 \pm 12$  нм (см. рис. 2, а). Концентрация выделенных экзосом составила  $2,2 \times 10^{11}$  и  $3,6 \times 10^{11}$  частиц/мл для ТЭВ и ТТЭВ соответственно. Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) подтвердила наличие интактных сферических везикул, размер и структурная целостность которых оставались стабильными в разных образцах (см. рис. 2, б, г).

В данном исследовании мы попытались выяснить, накапливают ли экзосомы, полученные из трансгенных растений табака, амиРНК, нацеленные на GFP. Поскольку миРНК из экзосом растений табака ранее не были охарактеризованы, мы использовали гомологичные миРНК *Arabidopsis thaliana*, которые, как известно, специфически накапливаются в экзосомах, в качестве внутреннего контроля для нашего анализа. Такие представители, как *miR167a*, *miR168a*, которые ранее были определены как наиболее многочисленные виды в секреции экзосом из сока винограда [3], были проанализированы. С помощью qPCR мы определили способность экзосом *N. tabacum* к накоплению маркерных экзосомальных микроРНК (рис. 3)

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 (ТТЭВ). Экзосомы, выделенные из нетрансгенных растений (ТЭВ), служили контролем. В протопластах, обработанных ТТЭВ, наблюдалось снижение интенсивности флуоресценции GFP, что было подтверждено с помощью конфокальной микроскопии.

Конфокальная визуализация выявила снижение флуоресценции GFP в протопластах, обработанных ТТЭВ, через 30 мин инкубации, которое продолжалось в течение следующих 30 мин. В то же время флуоресценция GFP протопластов, обработанных ТЭВ, оставалась относительно стабильной в течение этого периода. Интересно, что через 90 мин инкубации флуоресценция GFP в протопластах, обработанных ТТЭВ, вернулась к исходному уровню. Однако к 120-й минуте было обнаружено заметное снижение флуоресценции как в ТТЭВ-, так и в ТЭВ-обработанных протопластах (рис. 4).

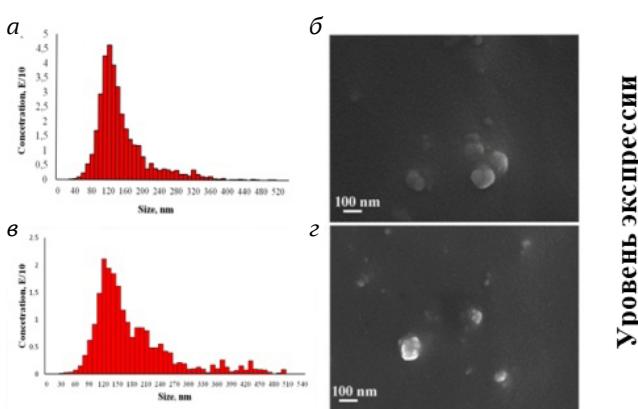


Рис. 2. Анализ отслеживания наночастиц (а, в), изображения сканирующей электронной микроскопии (г, б) ТЭВ и ТТЭВ

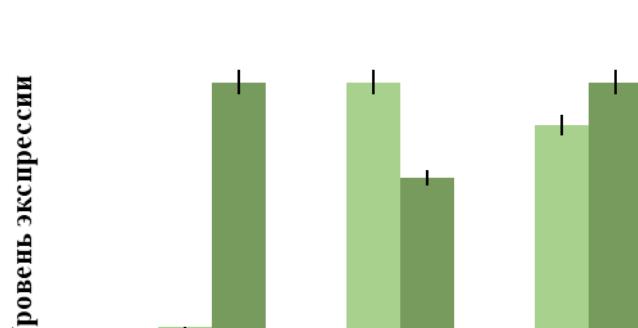
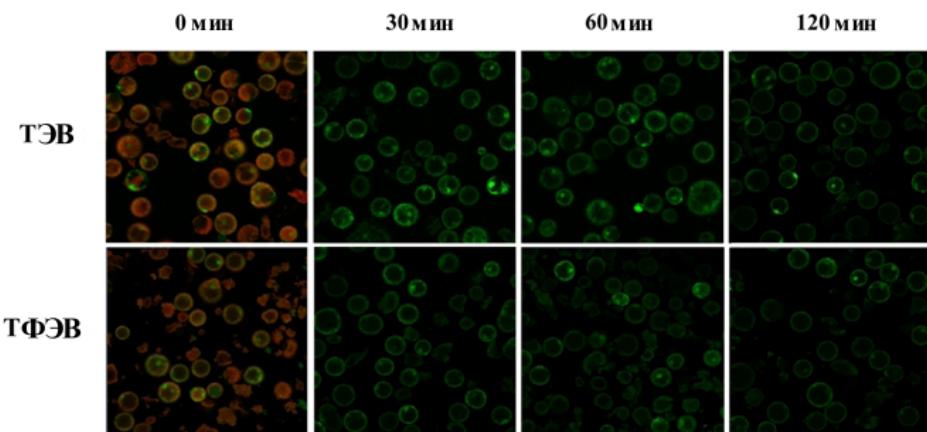


Рис. 3. График уровня экспрессии микроРНК в ТЭВ и ТТЭВ

Таким образом, обработка трансгенных протопластов ТТЭВ приводила к динамической модуляции флуоресценции GFP во времени. Эти результаты подчеркивают потенциал экзосом растительного происхождения в качестве векторов для доставки РНК и глушиения генов в растительных клетках.



*Rис. 4.* Конфокальная флуоресцентная микроскопия протопластов трансформированного растения *N. tabacum*, экспрессирующего флуоресцентный белок GFP, под воздействием двух типов экзосомальных везикул: выделенных из растения *N. tabacum* дикого типа (ТЭВ) и трансгенного растения *N. tabacum*, экспрессирующего амиРНК GFP (ТТЭВ)

### Литература

1. Regente M., Pinedo M., Elizalde M., de la Canal L. Apoplastic exosome-like vesicles: a new way of protein secretion in plants? // Plant Signal. Behav. 2012. No. 7. P. 544–546.
2. Baldrich P., Rutter B.D., Karimi H. Z. et al. Plant extracellular vesicles contain diverse small RNA species and are enriched in 10- to 17-nucleotide “tiny” RNAs // Plant Cell. 2019. No. 31. P. 315–324.
3. Ju S., Mu J., Dokland T. et al. Grape exosome-like nanoparticles induce intestinal stem cells and protect mice from DSS-induced colitis // Mol. Ther. 2018. No. 21. P. 1345–1357.