

УДК 577.217.3:577.218:578.274.4

Д. К. БЕЙСЕНОВ, Г. Э. СТАНБЕКОВА, Р. В. КРЫЛДАКОВ,
Н. С. ПОЛИМБЕТОВА, А. В. ЖИГАЙЛОВ, Б. К. ИСКАКОВ

ВИРУСНЫЕ ТРАНСЛЯЦИОННЫЕ ЭНХАНСЕРЫ КАК МИШЕНИ ДЛЯ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ ПРИ СОЗДАНИИ РАСТЕНИЙ, УСТОЙЧИВЫХ К ВИРУСАМ

РГП «Институт молекулярной биологии и биохимии им. М. А. Айтхожина», МОН РК, г. Алматы

Работа посвящена исследованию способности 5'-нетранслируемых последовательностей геномных РНК вируса гравировки табака (TEV) и вируса сателлита некроза табака (STNV), а также субгеномной РНК-4 вируса мозаики люцерны (AMV) повышать уровень трансляции мРНК в бесклеточной системе из зародышей пшеницы. Показано, что 5'-нетранслируемые последовательности всех исследуемых в работе вирусных РНК обладают свойствами трансляционных энхансеров, что позволяет их использовать в качестве мишеней для РНК-интерференции при создании растений, устойчивых к этим вирусам.

Введение. Одним из механизмов пост-транскрипционного молчания генов (PTGS) в растительных клетках является РНК-интерференция. РНК-интерференция – это специфический механизм деградации РНК с участием коротких интерферирующих РНК (киРНК), которые представляют собой двуцепочечные РНК длиной 21-25 нуклеотидов с двумя неспаренными выступающими нуклеотидами на 3'-концах [1]. Такая структура киРНК образуется в результате активности фермента Diser, субстратом которого являются длинные двуцепочечные РНК, или РНК, содержащие шпильки [2].

Трансгены, кодирующие предшественники киРНК, мишениями которых являются участки геномных РНК вирусов, могут опосредовать пост-транскрипционное молчание вирусных генов. В качестве мишеней для РНК-интерференции, как правило, выбираются транскрипционно и/или трансляционно важные участки вирусного генома, либо участки вирусного генома, кодирующие жизненно важные для вируса белки.

Большинство вирусных РНК транслируется в клетке-хозяине эффективнее клеточных мРНК, и основными продуктами клеточного синтеза при вирусной инфекции являются, как правило, вирусные белки [3]. Причиной высокой эффективности и конкурентной способности вирусных мРНК обычно связывают с нахождением в их составе энхансерных последовательностей (или трансляционных энхансеров), которые повышают эффективность трансляции мРНК в несколько раз [4]. Таким образом, энхансерные последовательности, входящие в состав вирусных геномных (гРНК), могут использоваться в качестве мишеней для РНК-интерференции при создании трансгенных растений, устойчивых к вирусам.

В качестве объектов исследования были выбраны 5'-НТП гРНК трех вирусов, относящихся к разным систематическим группам и имеющих разных хозяев, а именно вируса гравировки табака (TEV), вируса сателлита некроза табака (STNV) и вируса мозаики люцерны (AMV).

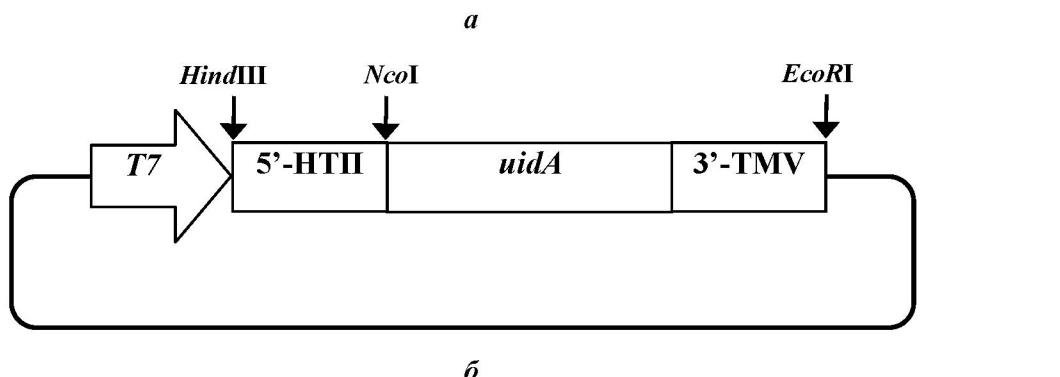
В настоящей работе показано, что 5'-НТП всех исследуемых в работе вирусных РНК способны повышать эффективность трансляции рекомбинантных мРНК в бесклеточной системе из зародышей пшеницы. Трансляционные энхансерные последовательности, выявленные в ходе настоящей работы, могут быть использованы в качестве потенциальных мишеней для создания растений, устойчивых к TEV, STNV и AMV.

Материалы и методы исследования

В работе использовали зародыши яровой пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта «Казахстанская 10». Зародыши пшеницы получали по методу Ф. Джонстона и Х. Стерн [5] и компетентные клетки *Escherichia coli* штамма DH5.

Создание рекомбинантных ДНК. Для создания ДНК-конструкций использовали любезно предоставленную Д.Р. Галли (Gallie D., Отдел Биохимии, Университет Калифорнии) плазмиду

«*pl-GUS*», сконструированную на основе вектора pBluescript KS II(+) и содержащую репортерный ген, кодирующий β-глюкуронидазу [6]. Рекомбинантные ДНК «*T7-TEV-GUS-TMV*», «*T7-STNV-GUS-TMV*» и «*T7-PVM-GUS-TMV*» были получены путем встраивания в исходную плазмиду «*pl-GUS*» по сайтам рестрикции *Hind*III и *Nco*I (рис. 1, а) фрагментов ДНК, содержащих 5'-НТП соответствующих вирусных гРНК, flankированных теми же сайтами рестрикции. Эти конструкции содержали промотор бактериофага T7, фрагмент, соответствующий 5'-НТП модельных мРНК, ген *uidA* и 3'-НТП гРНК вируса табачной мозаики. Нуклеотидные последовательности конструкций проверяли с помощью рестрикционного анализа и секвенирования.



мРНК «*pl-GUS*»

5' – GCCUAAGCUUUGUCGACC **AUGG uidA** 3' – TMV

мРНК «*TEV-GUS*»

5' – GCCUAAGCUUAAACAAACAAACAUUAACAAAACAAACGA
AUCUCAAGCAAUCAAGCAUUCUACUUCUAUUGCAGCAAUUAAAUCAUUUCU
UUAAAAGCAAAGCAAUUUCUGAAAAUUUCACCAUUACGAACGAUAGCC **AUGG uidA** 3' – TMV

мРНК «*STNV-GUS*»

5' – GCCUAAGCUUAGTAAAGACAGGAAACTTACTGACTAAC **AUGG uidA** 3' – TMV

мРНК «*AMV-GUS*»

5' – GCCUAAGCUUGUUUUUAUUUUAAUUUUCUUUCAAAUACUCCACC **AUGG uidA** 3' – TMV

Обозначения: Т7 – промотор бактериофага Т7; 5'-НТП – фрагмент ДНК, соответствующий 5'- НТП рекомбинантной мРНК; *uidA* – ген, кодирующий β-глюкуронидазу (GUS); 3'-ТМВ – фрагмент ДНК, соответствующий 3'-НТП гРНК вируса табачной мозаики; стрелками показаны сайты рестрикции. В 5'-НТП мРНК подчеркнуты последовательности, соответствующие 5'-НТП геномных РНК соответствующих вирусов растений.

Рис. 1. Карта плазмиды для получения рекомбинантных мРНК (а) и схематическое представление использующихся в работе рекомбинантных мРНК (б)

Рекомбинантные мРНК (рис. 1б) получали транскрипцией *in vitro* с помощью РНК-полимеразы бактериофага Т7 согласно [7]. В качестве матрицы использовали описанные выше ДНК-конструкции, линеаризованные по *Eco*RI-сайту.

Компьютерный анализ последовательностей вирусных РНК, взятых из базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), проводили с помощью программы *Vector NTI 8.0*.

Трансляцию *in vitro* проводили в бесклеточной системе из зародышей пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта “Казахстанская 10”, полученной согласно [8]. Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 20 мМ Трис-OAc (рН 7.6), 90 мМ KOAc, 2.0 мМ Mg(OAc)₂, 1 мМ ATP, 0.1 мМ GTP, 10 мМ креатинфосфат (“Fluka”), 0.12 мг/мл креатинфосфоркиназы (“Sigma”), 0.1 мМ спермидин, по 0.1 мМ каждой из 20 аминокислот, 1 мкг мРНК и 11 мкл экстракта из зародышей пшеницы, приготовленного согласно [5]. Реакционную смесь инкубировали в течение 1 ч при 26°C. Эффективность трансляции рекомбинантных мРНК определяли по активности β-глюкуронидазы (GUS), которую измеряли флуориметрически [6] и выражали в условных единицах.

Общие методы. Выделение ДНК, приготовление компетентных клеток *Escherichia coli*, электрофорез ДНК и РНК в агарозном и поликариламидном геле и трансформацию клеток *E. coli* проводили по стандартным методикам [9].

Результаты и их обсуждение

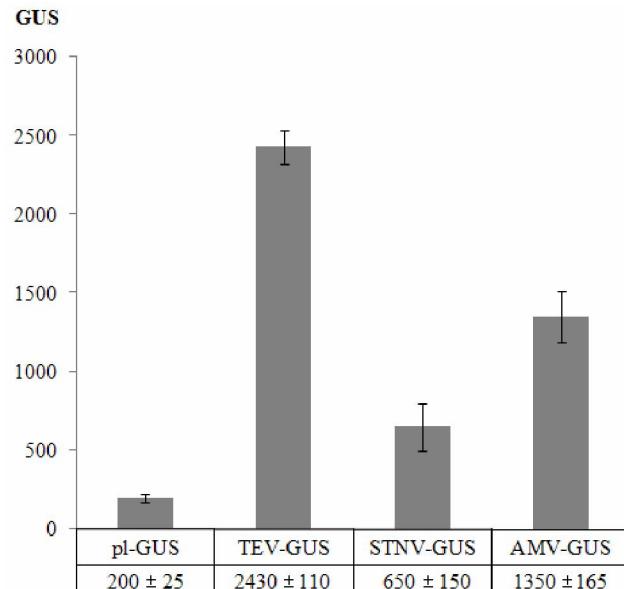
Геном TEV и STNV представлен единственной «+»-цепью РНК. В качестве мишени для РНК-интерференции в случае этих двух вирусов были выбраны 5'-НТП их гРНК (коды доступа GenBank – соответственно V01468.1 и V01468.1). Геном AMV представлен тремя гРНК (РНК-1, РНК-2 и РНК-3) и одной субгеномной РНК (РНК-4). В качестве потенциальной мишени для РНК-интерференции в этом случае была выбрана 5'-НТП РНК-4 AMV (код доступа GenBank: M10851.1), поскольку РНК-4 AMV кодирует капсидный белок, скорость синтеза которого в зараженной вирусом клетке теоретически должна превышать скорость синтеза остальных вирусных белков. К тому же фрагмент РНК, соответствующий 5'-НТП РНК-4 AMV, входит еще и в состав геномной РНК-3 AMV, кодирующей вирусный белок, необходимый для распространения вируса от растения к растению.

Чтобы проверить, обладают ли 5'-НТП гРНК TEV, STNV и 5'-НТП РНК-4 AMV способностью повышать уровень трансляции мРНК в растительных системах, были созданы три ДНК-конструкции, позволяющие синтезировать мРНК с репортерной последовательностью, кодирующую β-глюкуронидазу и имеющие разные 5'-НТП. Для этого кДНК, соответствующие 5'-НТП гРНК TEV, STNV и 5'-НТП РНК-4 AMV встраивались в плазмиду «pl-GUS» (рис. 1, а) по сайтам рестрикции *Hind*III и *Nco*I. Таким образом, перед фрагментом, кодирующим β-глюкуронидазу в ДНК-конструкции «T7-TEV-GUS-TMV» располагался фрагмент, соответствующий 5'-НТП гРНК TEV, в ДНК-конструкции «T7-STNV-GUS-TMV» - фрагмент, соответствующий 5'-НТП гРНК STNV, а в ДНК-конструкции «T7-AMV-GUS-TMV» - фрагмент, соответствующий 5'-НТП РНК-4 AMV.

Описанные выше ДНК-конструкции были использованы нами для синтеза РНК-транскриптов, названных «pl-GUS», «TEV-GUS», «STNV-GUS» и «AMV-GUS» (рис. 1, б), которые транслировали в качестве мРНК в бесклеточной системе биосинтеза белка из зародышей пшеницы. Транскрипт «pl-GUS» служил контролем при изучении энхансерных свойств вирусных последовательностей. Эта мРНК несла репортерную последовательность и не содержала трансляционных энхансеров в своей 5'-НТП [8].

Как видно из результатов, представленных на рис. 2, все исследуемые вирусные последовательности проявили свойства трансляционных энхансеров. Так, 5'-НТП гРНК TEV повышала уровень трансляции мРНК приблизительно в 12 раз, 5'-НТП гРНК STNV – в 3,25 раза, а 5'-НТП РНК-4 AMV – в 6,75 раза.

Ранее было установлено, что 5'-НТП РНК-4 AMV обладает способностью повышать уровень кэпированных мРНК [10]. В настоящей работе мы показали, что данная последовательность также способна повышать уровень трансляции некэпированных мРНК в бесклеточной системе из зародышей пшеницы. Причем энхансерные свойства данная последовательность проявляла в отсутствии капсидного белка AMV, который, как было установлено, отвечает за эффективную трансляцию всех РНК AMV [11].



Обозначения: GUS – активность β-глюкуронидазы в относительных единицах флуоресценции.

Рис. 2. Уровень трансляции РНК-транскриптов в бесклеточной системе биосинтеза белка из зародышей пшеницы при 26°C в течение 1 ч

В литературе широко известен трансляционный энхансер, расположенный в 3'-НТП гРНК STNV [12]. Позже было установлено, что для эффективной трансляции гРНК STNV требуется как 3'-НТП, так и 5'-НТП этой РНК [13]. В этом случае 5'- и 3'-НТП гРНК STNV функционируют синергично, осуществляя посредством комплементарных взаимодействий циклизацию гРНК STNV [14]. Однако в настоящей работе показано, что 5'-НТП гРНК STNV может проявлять энхансерные свойства сам по себе, даже в отсутствии 3'-НТП гРНК STNV.

Широко известный способ получения устойчивых к вирусам растений основан на встраивании в геном растений фрагментов ДНК, позволяющих продуцировать в их клетках длинные двухцепочечные РНК, соответствующие полноразмерным гРНК вируса, либо крупным сегментам вирусных гРНК [15]. Однако встраивание в растительный геном больших фрагментов чужеродной ДНК сопряжено с определенными трудностями [16]. Также возникают вопросы, связанные с безопасностью употребления в пищу растений, содержащих в своем геноме участки ДНК, кодирующие вирусные белки. Таких сложностей и вопросов можно избежать, используя в качестве мишени для РНК-интерференции короткие участки вирусного генома, не кодирующие вирусных белков.

Ранее в нашей лаборатории было показано, что 5'-НТП гРНК M-вируса картофеля (PVM), проявляющая свойства трансляционного энхансера, может успешно использоваться в качестве мишени для РНК-интерференции при создании трансгенных растений картофеля, устойчивых к этому вирусу [17]. Поэтому можно предположить, что трансляционные энхансерные последовательности, выявленные в ходе настоящей работы, также могут быть использованы в качестве мишеней для создания растений, устойчивых к STNV, AMV и TEV.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Waterhouse P.M., Wang M.B., Finnegan E.J. Role of short RNAs in gene silencing // TRENDS in Plant Science. – 2001. – Vol. 6, N 7. – P. 297-301.
- 2 Bernstein E, Caudy A, Hammond S, Hannon G. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference // Nature. – 2001. –Vol. 409. – P. 363-366.
- 3 Bailey-Serres J. Selective translation of cytoplasmic mRNAs in plants // Trends in Plant Science. – 1999. – Vol. 4, N 4. – P. 142-148.
- 4 Hellen Ch.U.T., Sarnow P. Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules // Genes Dev. – 2001. – Vol. 15. – P. 1593-1612.
- 5 Johnston F.B., Stern H. Mass isolation of viable wheat embryo // Nature. – 1957. – N 179. – P. 160-161.
- 6 Gallie D.R., Feder J.N., Schimke R.T., Walbot V. Post-transcriptional regulation in higher eukaryotes: The role of the reporter gene in controlling expression // Mol. Gen. Genet. – 1991. – Vol. 228. – P. 258-264.
- 7 Gurevich. V., Pokrovskaya I.D., Obukhova T.A. Preparative in vitro mRNA synthesis using SP6 and T7 RNA polymerases // Anal. Biochem. – 1991. – Vol. 195. – P. 207-213.
- 8 Akbergenov R.Zh., Zhanybekova S.Sh., Kryldakov R.V., Zhigailov A.V., Polimbetova N.S., Hohn T., Iskakov B.K. ARC-1, a sequence element complementary to an internal 18S rRNA segment, enhances translation efficiency in plants when present in the leader or intercistronic region of mRNAs // Nucleic Acids Research. – 2004. – Vol. 32, N 1. – P. 239-247.
- 9 Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular cloning (a laboratory manual). – New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. – 3 vol.
- 10 Rakotondrafaraand A.M., Miller W.A. In Vitro Analysis of Translation Enhancers // Plant Virology Protocols Methods in Molecular Biology. – 2008. – Vol. 451, N 2. – P. 113-124.
- 11 Krab I.M., Caldwell Ch., Gallie D.R., Bol J.F. Coat protein enhances translational efficiency of Alfalfa mosaic virus RNAs and interacts with the eIF4G component of initiation factor eIF4F // Journal of General Virology. – 2005. – Vol. 86. – P. 1841-1849.
- 12 Danthinne X., Seurinck J., Meulewaeter F., Van Montagu M., Cornelissen M. The 3'-untranslated region of satellite tobacco necrosis virus RNA stimulates translation in vitro // Mol. Cell Biol. – 1993. – Vol. 13. – P. 3340-3349.
- 13 Meulewaeter F., Danthinne X., Van Montagu M., Cornelissen M. 5'- and 3'-sequences of Satellite Tobacco Necrosis Virus RNA promoting translation in tobacco // The Plant J. – 1998. – Vol. 14, N 2. – P. 169-176.
- 14 Lipzic R., Gul'tyaev A. P., Pleij C.W., Montagu M., Cornelissen M., Meulewaeter F. The 5' and 3' extremities of the satellite tobacco necrosis virus translational enhancer domain contribute differentially to stimulation of translation // RNA. – 2002. – Vol. 8. – P. 229-223.
- 15 Tenllado F., Diaz-Ruiz J.R. Double-stranded RNA-mediated interference with plant virus infection // Journal of Virology. – 2001. – Vol. 75, N 24. – P. 12288-12297.
- 16 Пирузян Э.С., Андрианов В.М. Плазмиды агробактерий и генетическая инженерия растений. – М.: Наука, 1985. – 280 с.
- 17 Карпова О.В., Станбекова Г.Э., Низкородова А.С., Назарова Л.М., Лигай Г.Л., Исаков Б.К. Создание трансгенных растений картофеля, трансформированных фрагментами 5'-нетранслируемого района геномной РНК M-вируса картофеля // Известия научно-технического общества «КАХАХ». – 2006. – Т. 14, № 1. –С. 103-106.

REFERENCES

1. Waterhouse P.M., Wang M.B., Finnegan E.J. *TRENDS in Plant Science*, **2001**, 6 (7), 297-301 (in Engl.).
2. Bernstein E., Caudy A., Hammond S., Hannon G. *Nature*, **2001**, 409, 363–366 (in Engl.).
3. Bailey-Serres J. *Trends in Plant Science*, **1999**, 4 (4), 142-148 (in Engl.).
4. Hellen Ch.U.T., Sarnow P. *Genes Dev.*, **2001**, 15, 1593-1612 (in Engl.).
5. Johnston F.B., Stern H. *Nature*, **1957**, 179, 160-161 (in Engl.).
6. Gallie D.R., Feder J.N., Schimke R.T., Walbot V. *Mol.Gen.Genet.*, **1991**, 228, 258-264 (in Engl.).
7. Gurevich V., Pokrovskaya I.D., Obukhova T.A. *Anal.Biochem.*, **1991**, 195, 207-213 (in Engl.).
8. Akbergenov R.Zh., Zhanybekova S.Sh., Kryldakov R.V., Zhigailov A.V., Polimbetova N.S., Hohn T., Iskakov B.K. *Nucleic Acids Research*, **2004**, 32 (1), 239-247 (in Engl.).
9. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. *Cold Spring Harbor Lab.Press*, **1989**, 3 vol. (in Engl.).
10. Rakotondrafaraand A.M., Miller W.A. *Plant Virology Protocols Methods in Molecular Biology*, **2008**, 451 (2), 113-124 (in Engl.).
11. Krab I.M., Caldwell Ch., Gallie D.R., Bol J.F. *Journal of General Virology*, **2005**, 86, 1841–1849 (in Engl.).
12. Danthinne X., Seurinck J., Meulewaeter F., Van Montagu M., Cornelissen M. *Mol. Cell Biol.*, **1993**, 13, 3340-3349 (in Engl.).
13. Meulewaeter F., Danthinne X., Van Montagu M., Cornelissen M. *The Plant J.*, **1998**, 14 (2), 169-176 (in Engl.).
14. Lipzig R., Gulyaev A. P., Pleij C.W., Montagu M., Cornelissen M., Meulewaeter F. *RNA*, **2002**, 8, 229-223 (in Engl.).
15. Tenllado F., Diaz-Ruiz J.R. *Journal of Virology*, **2001**, 75 (24), 12288-12297 (in Engl.).
16. Piruzjan Je.S., Andrianov V.M. Plazmidy agrobakterij i geneticheskaja inzhenerija rastenij. M.: Nauka, **1985**, 280 s. (in Russ.).
17. Karpova O.V., Stanbekova G.Je., Nizkorodova A.S., Nazarova L.M., Ligaj G.L., Iskakov B.K. *Izvestija nauchno-tehnicheskogo obwestva "КАНАН"*, **2006**, 14(1), 103-106 (in Russ.).

Д. К. Бейсенов, Г. Э. Станбекова, Р. В. Қырылдақов,
Н. С. Полымбетова, А. В. Жигайлов, Б. К. Ыскаков

ВИРУСТЫҚ ТРАНСЛЯЦИЯЛЫҚ КУШЕЙТКІШТЕР – ВИРУСТАРҒА
ТӨЗІМДІ ӨСІМДІКТЕР ШЫҒАРҒАНДА РНҚ-ИНТЕРФЕРЕНЦИЯҒА ЛАЙЫҚ НЫСАНА

Жұмыс темекі қырнақшы вирусының (TEV) және темекі некрозы сателлиті вирусының (STNV) геномдық РНҚ, соңдай-ақ жонышқа мозаикасы вирусының (AMV) субгеномдық РНҚ-4 5'-трансляцияланбайтын тізбектері қабілеттің зерттеуге арналған. Осы жұмыста зерттелген барлық вирустық РНҚ-дарының 5'-трансляцияланбайтын тізбектері трансляциялық күшейткіш қабілетіне ие екендігі, оларды вирустарға төзімді өсімдіктер шығарғанда РНҚ-интерференцияға лайық нысана ретінде қолдануға болатындығы көрсетілді.

D. K. Beisenov, G. E. Stanbekova, R.V. Kryldakov,
N. S. Polymbetova, A. V. Zhigailov, B. K. Iskakov

THE VIRAL TRANSLATION ENHancers AS TARGETS
FOR RNA-INTERFERENCE TO PRODUCE PLANTS, RESISTANT TO VIRAL INFECTION

The work is devoted to investigation of ability of tobacco etch virus (TEV) and satellite tobacco necrosis virus (STNV) genomic RNAs as well as alfalfa mosaic virus (AMV) subgenomic RNA-4 5'-untranslated regions to enhance translation level in wheat germ cell free system. It was shown, that the 5'-untranslated regions of all investigated virus RNAs possess translation enhancers features. This allows using them as targets for RNA-interference to produce plants, resistant to viral infection.