

УДК 577.216.3, 577.218

Р.В. Крылдаков*, О.В. Карпова, Г.Э. Станбекова, Б.К. Искаков
Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина, Алматы, Казахстан
*e-mail: kryldakov@mail.ru

Клонирование открытых рамок считывания М-вируса картофеля, кодирующих супрессоры РНК-интерференции

ДНК двух открытых рамок считывания (ОРС3 и ОРС5) вируса картофеля М (PVM) были клонированы в Gateway-совместимый экспрессионный вектор рMDC32 под контролем двойного 35S промотора. Каждая из этих конструкций была введена путем электропорации в клетки *Agrobacterium tumefaciens*. Затем эти клетки были инфильтрованы в растения *Nicotiana benthamiana* линии 16С, которые тестировались на проявление активности, супрессирующей РНК-интерференцию. Далее последовательности ОРС3 и ОРС5 были клонированы в прямой и обратной ориентации, для создания трансгенных растений, устойчивых к PVM.

Ключевые слова: М-вирус картофеля (PVM), РНК-интерференция (RNAi), PVM белки – супрессоры RNAi.

R. Kryldakov, O. Karpova, G. Stanbekova, B. Iskakov

Cloning of the Open Reading Frames of Potato Virus M, known as suppressors of RNAi

Gene silencing is an important regulatory and defense mechanism in plants. Plant viruses evolved some proteins that suppress cellular RNA interference mechanism. In this work identification of silencing suppressors of potato virus M (PVM) is reported. The cDNA sequences of different PVM open reading frames were cloned into the Gateway-compatible binary T-DNA destination vector рMDC32, harboring a double 35S promoter. Each of these constructs was electroporated into *Agrobacterium tumefaciens* which then were agroinfiltrated into *Nicotiana benthamiana* 16C line. It was shown that viral coat protein (34K) as well as 12K protein possessed suppressor properties of cellular silencing activity. Thereafter, these open reading frames were cloned in both sense and antisense sequences into pUC19.

Keywords: Potato virus M, RNA interference, RNA silencing suppressor proteins.

Р.В. Қырылдақов, О.В. Карпова, Г.Э. Станбекова, Б.Қ. Ысқақов

РНҚ-интерференцияның тежегіш-белоктарын кодтайтын картоп М вирусының ашық оқылатын рамкаларын клондау

Картоп М вирусының М (PVM) ашық оқылатын екі рамкаларының (ОРС3 және ОРС5) ДНК-дары Gateway-мен үйлесімді қосқабат 35S промоторының бақылауындағы экспрессиялайтын рMDC32 векторына клондалды. Олардың екеуі де РНК-интерференцияның тежегіш әрекеттілігі пайда болуына тексерілген *Agrobacterium benthamiana*-ның 16С линиясы жасушаларына электротесу әдісімен енгізілді. Осыдан кейін ОРС3 және ОРС5 тізбектері PVM-ға төзімді трансгендік өсімдіктер шығару үшін түзу және теріс бағытта клондалды.

Түйін сөздер: картоп М вирусы (PVM), РНК-интерференция (RNAi), РНК-интерференцияның (RNAi) тежегіш PVM белоктары.

В настоящее время РНК-интерференция (RNAi) признана одним из важных клеточных механизмов, участвующих в метаболизме РНК. RNAi играет важную роль не только в процессах модуляции стабильности и деградации мРНК, но также в регуляции процессов трансляции мРНК, транскрипции генов, поддержании структуры хроматина и целостности генома [1]. У растений этот механизм первоначально получил название пост-транскрипционного молчания генов или PTGS (от Post-Transcriptional Gene Silencing) и рассматривался как основной клеточный

механизм защиты от вирусов [2]. Было также установлено, что многие вирусные белки способны подавлять (супрессировать) клеточный процесс RNAi (RSS-белки – от RNA silencing suppressor proteins) и тем самым обеспечивать преимущество вирусов при размножении в клетках растений [2, 3]. К настоящему времени для некоторых растительных вирусов RSS-белки установлены и показаны молекулярные механизмы их функционирования [3-5]. Однако для большинства других фитовирусов RSS-белки и механизмы их действия остаются мало

исследованными, хотя некоторые супрессоры сайленсинга М-вируса картофеля были определены [6].

М-вирус картофеля (МВК или PVM от potato virus M) является фитовирусом, относящимся к роду *Carlavirus* семейства *Flexiviridae* [7]. Частицы этих вирусов имеют вид гибких палочек и состоят из единственной однонитевой плюс-цепи геномной (г)РНК с мол. массой $2,4 \times 10^6$ Да (8534 нуклеотида) и множества одинаковых субъединиц капсидного белка с мол. массой 34 кДа, которые упаковывают гРНК в виде спирали [8-10]. Вирус PVM может передаваться при механическом контакте между растениями, а также непersistентно тлями. Круг хозяев является достаточно узким, тем не менее, PVM распространен повсеместно и, особенно, в областях с умеренным климатом, где произрастает картофель (*Solanum tuberosum*). Вирус PVM является экономически важным, т.к. потери урожая, вызванные инфекцией растений картофеля PVM, обычно составляет около 20 %, но в сочетании с другими вирусами могут быть значительно выше, до 85 % [11].

Материалы и методы

1. Целевые кДНК-фрагменты гРНК PVM были амплифицированы с помощью реакции обратной транскрипции (РОТ) и полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием специфических олигонуклеотидных праймеров. Для удобства клонирования праймеры содержали на концах короткие последовательности, необходимые для дальнейшего встраивания в плазмидный вектор и клонирования в бактериях.

Амплификацию ДНК проводили в следующем температурном режиме:

Стадия 1 5 мин. 94°C – 1 цикл.

Стадия 2 1 мин. 94°C, 1 мин. 47°(55°)C, 1 мин. 72°C – 30 циклов.

Стадия 3 10 мин. 72°C – 1 цикл.

Для каждой ОРС подбиралась оптимальная температура гибридизации олигонуклеотидов - 47°C либо 55°C.

Продукты ПЦР анализировались в 1% агарозном геле и в дальнейшем использовались для клонирования.

2. ВР и LR реакции по Gateway технологии, с использованием кита фирмы “Invitrogen”, проводились по методике [12].

3. Стратегия определения супрессорной активности выполнялась по методике [13]

4. Общие методы. Трансформация компетентных клеток бактерий *Escherichia coli* штамма DH5α методом теплового шока, реакции рестрикции и лигирования, электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле, выделение и очистка ДНК, определение концентрации ДНК проводили по стандартным методикам [14].

Результаты и их обсуждение

Для определения супрессорной активности каждого из этих белков мы применили метод агроинфильтрации. Для этого каждый агробактериальный штамм, трансформированный различными генами PVM (ОРС3 и ОРС5), был смешан со штаммом, несущим только 35S-dsGFP (GFP-IR), и инфильтрирован в листья *N.benthamiana* линии 16С. В качестве отрицательного контроля были использованы компетентные клетки *A.tumefaciens*, выросшие на среде без антибиотиков. В качестве положительного контроля были использованы конструкции, несущие гены HC-Pro Y-вируса картофеля и P19 вируса пушистой остановки роста томата (TBSV), известные как явные супрессоры сайленсинга.

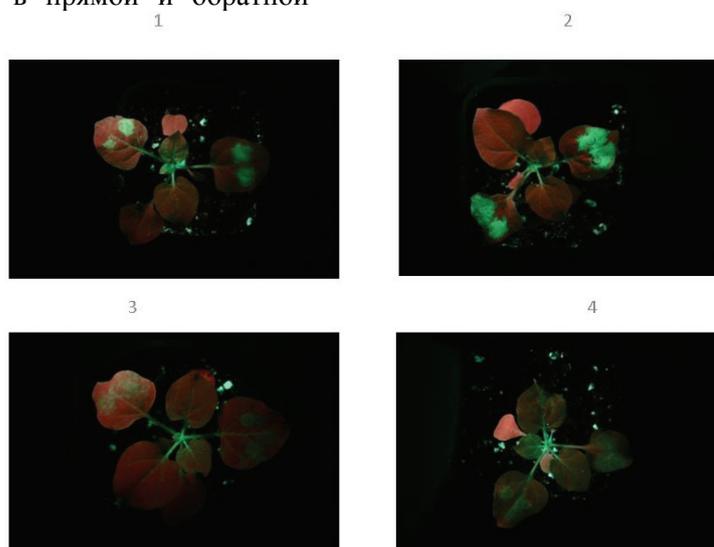
Растения *N.benthamiana* трансгенной линии, экспрессирующие GFP (линия 16С), демонстрируют сильный зеленый флюоресцирующий сигнал под ультрафиолетовым светом. При агроинфильтрации листьев 6-7-недельных растений *N.benthamiana* линии 16С агробактериальными штаммами, несущими 35S-GFP или 35S-dsGFP конструкции, инфильтрированные ткани изменяют цвет на красный под ультрафиолетом спустя неделю. Исчезновение зеленого цвета свидетельствует о сокращении уровня экспрессии GFP или, другими словами, указывает на специфический GFP сайленсинг.

Экспрессия GFP достигала высокого уровня во всех инфильтрованных листьях на 5-7 день после инфильтрации (дпи). Тем не менее, интенсивность зеленого свечения оставалась сильной в листьях, инфильтрованных ОРС3 и ОРС5, спустя 9-12 дпи, и могла быть сравнима с таковой у контрольных растений, инфильтрованных HC-Pro и P19 (рисунок 1).

Для каждого варианта использовалось от 4 до 5 растений *N.benthamiana*. Эксперимент был независимо повторен.

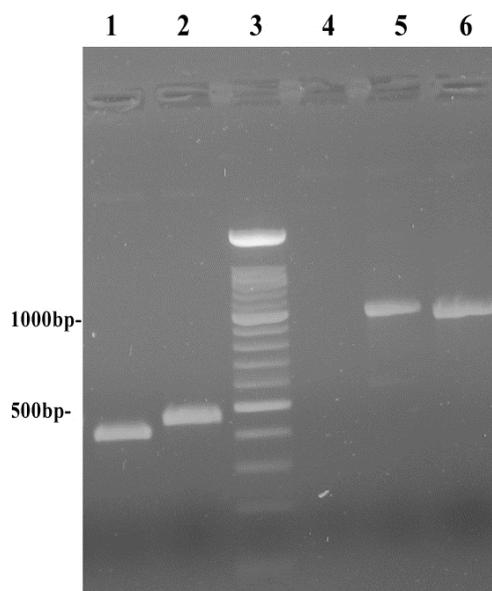
Также OPC3 и OPC5 PVM были клонированы в бактериальный и растительный вектор для получения трансгенных растений в прямой и обратной

последовательности. Т.о. векторная кассета состояла из необходимого гена (OPC3 или OPC5) в прямой (sense) последовательности, затем следовал интрон длиной 200 нуклеотидов, и потом находился этот же ген в обратной (antisense) последовательности.



1 – HC Pro; 2 - P19; 3 - OPC3; 4 - OPC5

Рисунок 1 - Эффект различных OPC PVM на сайленсинг в GFP трансформантах *Nicotiana benthamiana* линии 16C



1 – OPC3 PVM в прямой ориентации; 2 – OPC3 в обратной ориентации;
3 – маркеры; 4 – отрицательный контроль; 5 – OPC5 в обратной ориентации;
6 – OPC5 в прямой ориентации

Рисунок 2 – Результаты электрофореза в 1% геле продуктов ПЦР с участием гРНК PVM и специфических праймеров

Эта кассета была клонирована в плазмиду pUC19, с 35S промотором, терминатором и геном устойчивости к селективному антибиотику ампициллину. Наличие и корректность вставок были проверены методами ПЦР (рисунок 2) и рестрикции. Сайленсинг генов является важным генетическим механизмом и в теоретическом (фундаментальном), и в практическом (прикладном) смысле. Открытие вирусных последовательностей, которые являются супрессорами сайленсинга, открывает новые, многообещающие горизонты для понимания механизмов, регулирующих пути белкового

синтеза в растениях. Практическая же польза состоит в том, что открывает возможности для манипулирования сайленсингом. Эффективность технологий, которые используют растения для экспрессии чужеродных генов или суперэкспрессии своих генов, часто падает вследствие активации сайленсинга генов, который препятствует длительной экспрессии трансгенов на высоком уровне. В этой связи представляется возможным использование выявленных нами супрессоров сайленсинга PVM для прямого противодействия сайленсингу в этой ситуации.

Литература

- 1 Baulcombe D. RNA silencing in plants // *Nature*. - 2004. - V. 431. - P. 356-363.
- 2 Voinnet O. Post-transcriptional RNA silencing in plant-microbe interactions: a touch of robustness and versatility // *Curr. Opin. Plant Biol.* - 2008. - V. 11. - №4. - P. 464-470.
- 3 Ruiz-Ferrer V., Voinnet O. Roles of plant small RNAs in biotic stress responses // *Annual Review of Plant Biology*. - 2009. - V. 60. - P. 485-510.
- 4 Alvarado V., Scholthof H.B. Plant responses against invasive nucleic acids: RNA silencing and its suppression by plant viral pathogens // *Semin. Cell. Dev. Biol.* - 2009. - V. 20. - №9. - P. 1032-1040.
- 5 Омаров Р.Т., Берсимбай Р.И. Биохимические механизмы супрессии РНК-интерференции вирусами растений // *Биохимия*. - 2010. - Т. 75. - Вып. 8. - С. 1062-1069.
- 6 Kryldakov R., Akbergenov R., Hohn T., Iskakov B. Identification of silencing suppressors of potato virus M // *Journal of Cell and Molecular Biology*. - 2011. - V. 9. - №1. - P. 15-20.
- 7 Zavriev S.K., Kanyuka K.V., Levay K.E. The genome organization of potato virus M RNA // *J. Gen. Virol.* - 1991. - V. 72. - P. 9-14.
- 8 Proll E., Leiser R.M., Ostermann W.D., Spaar D. Some physicochemical properties of potato virus M // *Potato Res.* - 1981. - V. 24. - P. 1-10.
- 9 Flatken S., Ungewickell V., Menzel W., Maiss E. Construction of an infectious full-length cDNA clone of potato virus M // *Arch. Virol.* - 2008. - V. 153. - P. 1385-1389.
- 10 Tavantzis S.M. Physicochemical properties of potato virus M // *Virology*. - 1984. - V. 133. - P. 427-430.
- 11 Sozinova L., Abay A., Ramankulov E., Nachmias A., Loebenstein G. Reducing Virus Incidence in Potato Seed Tubers by Rapid Propagation: A Pilot Scheme in Kazakhstan // *Phytoparasitica*. - 2007. - V. 35. - № 2. - P. 201.
- 12 Curtis M.D., Grossniklaus U. A Gateway Cloning Vector Set for High-Throughput Functional Analysis of Genes in Planta // *Plant Physiology*. - 2003. - V. 133. - P. 462-469.
- 13 Voinnet O., Pinto Y.M., Baulcombe D.C. Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants // *PNAS*. - 1999. - V. 96. - № 24. - P. 14147-14152.
- 14 Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. *Molecular cloning. A laboratory manual* - 1ed. - New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. - 3 vols.