

УДК 577.152.277:633.71

РОЛЬ АУТО- И ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ РИБОНУКЛЕАЗ СЕМЕЙСТВА III В МЕХАНИЗМАХ УСТОЙЧИВОСТИ К ПАТОГЕНАМ И РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

© 2013 г. И.В. Жирнов^{1,2}, Е.А. Трифонова¹, А.В. Кочетов^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия;

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Новосибирск, Россия, e-mail: zh_lk@list.ru

Поступила в редакцию 27 августа 2013 г. Принята к публикации 2 сентября 2013 г.

В статье рассмотрены современные представления о биологической роли растительных рибонуклеаз семейства III (DCL-рибонуклеаз), и в частности об их взаимосвязи с молекулярными механизмами защиты от фитопатогенов.

Ключевые слова: генная инженерия, рибонуклеазы семейства III, растения, патогены, генетический сайленсинг.

ВВЕДЕНИЕ

Семейство РНКазы III включает в себя группу эндорибонуклеаз, катализирующих гидролиз 3',5'-фосфодиэфирных связей двуцепочечных форм РНК (дцРНК). Рибонуклеазы данного семейства представлены у широкого спектра организмов: вирусов, бактерий, грибов, растений и животных (MacRae, Doudna, 2007; Mukherjee *et al.*, 2012).

Согласно данным рентгеноструктурного анализа, молекулы белков семейства РНКазы III образованы одной полипептидной цепью, которая содержит от ~ 200 до ~ 2 тыс. аминокислотных остатков и характеризуется обязательным наличием двух глобулярных доменов: мотива связывания с дцРНК (dsRNA-binding domain, dsRBD) и каталитического домена РНКазы III (RNase III). В соответствии с наличием указанной каталитической активности различные представители семейства РНКазы III участвуют в процессинге предшественников рибосомной РНК, малых ядерных и ядрышковых РНК, а также играют ключевую роль в генетическом сайленсинге, представляющем собой процесс

инактивации (репрессии, замолкания) экспрессии генов и/или трансгенов, характерный для многих эукариот (MacRae, Doudna, 2007; Bozorov *et al.*, 2012; Mukherjee *et al.*, 2012).

Инактивация экспрессии трансгена/гена может осуществляться как на транскрипционном (transcriptional gene silencing, TGS), так и на посттранскрипционном (posttranscriptional gene silencing, PTGS) уровнях. Во всех случаях, за исключением некоторых вариантов TGS, процесс генетического сайленсинга опосредован образованием различных типов малых РНК, отличающихся по биогенезу. У высших растений выделены следующие основные классы малых РНК: микроРНК (microRNAs, miRNAs, или miPHK); малые интерферирующие РНК (small interfering RNAs, siRNAs, или siPHK); трансдействующие siPHK (trans-acting siRNAs, ta-siRNAs, или ta-siPHK); siPHK, ассоциированные с повторами (repeat-associated siRNAs, ra-siRNAs, или ra-siPHK). Ферментами, связанными с биогенезом данных малых РНК в процессах TGS/PTGS, являются DCL-рибонуклеазы (Dicer-like dsRNases, DCLs), характерные для высших растений и представляющие собой

гомологи белка Dicer млекопитающих (Dunoyer *et al.*, 2005; Mlotshwa *et al.*, 2008; Bozorov *et al.*, 2012; Udriste *et al.*, 2012).

Показано участие различных рибонуклеаз DCLs в процессах, связанных с защитой клеточного генома от транспозонов, супрессии амплификации вирусов/вирионов, регуляции экспрессии собственных генов, репрессии трансонов (Bozorov *et al.*, 2012; Mukherjee *et al.*, 2012). Некоторые экспериментальные данные дают основание выдвинуть предположение о возможности использования продукции трансоновыми растениями гетерологичных рибонуклеаз семейства III для повышения устойчивости к фитопатогенным вирусам/вирионам. Так, экспрессия в трансоновых растениях генов гетерологичных про- или эукариотических РНКаз, участвующих в деградации двуцепочечных форм РНК, способствовала повышению устойчивости полученных трансформантов к ряду указанных патогенов (Watanabe *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2001). В то же время было показано (Kreuze *et al.*, 2005), что некоторые вирусные рибонуклеазы, принадлежащие к семейству РНКазы III, могут выступать в роли супрессоров РНК-интерференции (RNA interference, RNAi). В целом применительно к противовирусному иммунитету растений роль рибонуклеаз, деполимеризующих дцРНК, изучена мало, что свидетельствует о необходимости более детального изучения их функций в молекулярных механизмах устойчивости к фитопатогенным вирусам.

Целью данной работы является обобщение имеющейся к настоящему времени информации относительно роли ауто- и гетерологичных рибонуклеаз семейства III в защитных системах высших растений.

DCL-РИБОНУКЛЕАЗЫ

У растений гены, кодирующие DCLs, представлены семейством с различным числом генов среди разных видов. Так, геном *Arabidopsis thaliana* содержит 4 различных гена *DCL*,

Populus trichocarpa – 5, *Oryza sativa* – 6 и *Solanum lycopersicum* – 7 генов (Margis *et al.*, 2006). Функции всех четырех DCLs *A. thaliana* охарактеризованы. DCL1 участвует в биогенезе различных miРНК, которые играют ключевую роль в подавлении экспрессии генов (посредством расщепления транскриптов этих генов или за счет блокирования трансляции мРНК), принимает участие в контроле уровня накопления цитоплазматической мРНК как клеточного, так и вирусного происхождения. DCL2 задействован в процессе индуцируемого вирусами РНК-сайленсинга (гомолог белка DCL2 *A. thaliana* был идентифицирован и у *Nicotiana tabacum*). DCL3 участвует в РНК-направленном метилировании ДНК и гистонов. Функция DCL4 связана с образованием трансдействующих siРНК (trans-acting siRNAs, ta-siRNAs, или ta-siРНК), которые обладают функциональным сходством с miРНК и направляют деградацию в RISC (RNA-induced silencing complex) мРНК-мишени, происходящей из локуса, отличного от такового ta-siРНК. Гены *DCL1*, *DCL2*, *DCL3* и *DCL4* представлены в геноме единственной копией. Мутации в гене *DCL1* оказались летальными для растений – гибель зародышей происходит уже на стадии глобулы, в то время как инактивация генов *DCL2–DCL4* не оказывала существенного влияния на жизнеспособность *A. thaliana* (Henderson *et al.*, 2006; Margis *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2009; Bozorov *et al.*, 2012).

В типичном случае рибонуклеаза DCL включает в себя несколько функциональных доменов (рис. 1): N-терминальный домен DE×D/H (предположительно, выполняет ингибиторную функцию, уменьшая скорость гидролиза 3',5'-фосфодиэфирных связей дцРНК), домен с неизвестной функцией DUF283, PAZ-домен (функции описаны ниже), две копии домена РНКазы III и С-терминальный домен, содержащий dsRBD-мотив связывания с дцРНК (Schwarz *et al.*, 2003; Mlotshwa *et al.*, 2008).

Процесс деградации двуцепочечных форм РНК проходит в несколько этапов. Посредством dsRBD-мотива DCL осуществляется начальное

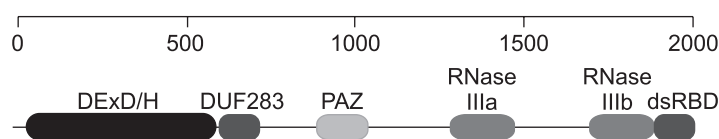


Рис. 1. Доменная структура DCL. Масштабная линейка проградуирована в единицах аминокислотных остатков.

связывание фермента с дцРНК. Домен PAZ обеспечивает специфический контакт с двумя неспаренными 3'-концевыми нуклеотидами дцРНК, образованными в результате первого акта взаимодействия DCL с мишенью (показано, что наличие 3'-концевого одноцепочечного выступа в 2–3 нуклеотида способствует увеличению активности фермента в отношении данного субстрата). На заключительном этапе два домена РНКазы III, взаимодействуя друг с другом и образуя «внутренний димер», катализируют гидролиз 3',5'-фосфодиэфирных связей каждой цепи дцРНК в двух сайтах, отстоящих друг от друга на расстоянии в 2 нуклеотида. В результате описанного процесса деградации мишени происходит образование коротких двуцепочечных фрагментов, называемых малыми РНК (miРНК/siРНК), длиной 21–25 нуклеотидов, с 5'-концевой фосфатной группой и одноцепочечным выступом (оверхенгом) в 2–3 нуклеотида на 3'-конце. Протяженность образующего спиральную структуру неконсервативного района между доменами PAZ и РНКазы III, по-видимому, является основным фактором, определяющим размер образующихся малых дцРНК (Goldbach *et al.*, 2003; Schwarz *et al.*, 2003; Voinnet, 2005; Mlotshwa *et al.*, 2008).

DCL1

РНК-сайленсинг, известный также как пост-транскрипционный сайленсинг генов, представляет собой процесс, который играет ключевую роль в регуляции экспрессии генов многих эукариот. У высших растений важной компонентой PTGS является miРНК-опосредованная регуляция активности генов, осуществляемая с обязательным участием рибонуклеазы DCL1 (Voinnet, 2009).

Класс miРНК включает в себя эндогенные некодирующие РНК, которые играют основополагающую роль в инактивации экспрессии генов или посредством деградации транскриптов этих генов, или за счет прямого блока трансляции мРНК (Llave *et al.*, 2002; Palatnik *et al.*, 2003). Мишенями для miРНК являются гены, контролирующие метаболизм, транспорт ионов, процессы передачи сигналов, стрессовый ответ (Dugas, Bartel, 2004; Sunkar, Zhu, 2004). Значительной частью мишеней являются мРНК,

кодирующие транскрипционные факторы, причем, как правило, одна miРНК регулирует экспрессию нескольких транскрипционных факторов, принадлежащих к одному семейству (Kidner, Martienssen, 2005). Отметим, что мишенями miРНК также оказались мРНК DCL1 и белка AGO1 (см. ниже). Это в свою очередь свидетельствует о существовании механизма обратной связи, посредством которого осуществляется определение miРНК уровня своей собственной продукции (Du, Zamore, 2005).

Гены, кодирующие miРНК растений, расположены в межгенных промежутках и достаточно удалены от белок-кодирующих генов, что указывает на их независимую транскрипцию (Bartel B., Bartel D., 2003; Parizotto *et al.*, 2004). Биогенез miРНК осуществляется в клеточном ядре в несколько стадий. На первом этапе происходит катализируемый РНК-полимеразой II синтез первичных экпированных и полиаденилированных транскриптов (primary miRNAs, pri-miRNAs, или pri-miРНК), обладающих характерной шпильчатой вторичной структурой. На следующей стадии биогенеза под действием рибонуклеазы DCL1 из pri-miРНК-предшественника (~ 1 тыс. нуклеотидов) осуществляется последовательное образование длинной pre-miРНК и ее более короткой формы (short pre-miРНК), имеющей длину от 64 до 303 нуклеотидов и формирующей будущий 3'-конец зрелой miРНК. На третьем, последнем, этапе биогенеза в результате катализа DCL1 происходит расщепление короткой pre-miРНК по 5'-концу зрелой формы miРНК длиной 20–24 нуклеотида (Bonnet *et al.*, 2006; Vazquez, 2006). Наряду с DCL1 необходимым фактором завершения биогенеза miРНК является активность еще двух локализованных в ядре белков: дцРНК-связывающего белка HYL1 (hyponastic leaves 1) и метилтрансферазы HEN1 (HUA enhancer 1), осуществляющей метилирование по 2'-гидроксильной группе 3'-концевых остатков рибозы (Yu *et al.*, 2005). Интересным представляется факт, что наиболее эффективные вирусные супрессоры RNAi (см. ниже), образуя комплекс с малыми РНК, способны блокировать метилирование (Yu *et al.*, 2006).

Перемещение зрелой miРНК из ядра в цитоплазму у растений осуществляется под контролем белка HASTY (HST), представля-

ющего собой гомолог экспортина-5 (exportin-5) животных (Bollman *et al.*, 2003). В цитоплазме miРНК вступают во взаимодействие с белком AGO1 (семейство Argonaute), обладающим активностью РНКазы Н и являющимся каталитическим элементом мультибелкового комплекса RISC. Конечным результатом описанного взаимодействия является деградация мРНК-мишени (Vaucheret, 2008). Следует отметить, что для растений достоверно известен только один случай трансляционной репрессии – это взаимодействие miРНК *A. thaliana* miR172 и мРНК гена *APETALA2* (Chen, 2004).

DCL2

Геномы большинства фитопатогенных вирусов представлены одноцепочечной РНК, однако в ходе жизненного цикла этих патогенов в составе репликативных интермедиатов происходит формирование двуцепочечной РНК. Помимо этого, образование протяженных дцРНК также может быть обусловлено транскрипцией экспрессируемой трансгеном оцРНК вирусной или растительной РНК-зависимой РНК-полимеразой (RNA-dependent RNA polymerase, RdRP). Естественной молекулярной составляющей устойчивости, ответственной за селективное распознавание протяженных дцРНК (в частности вирусного и/или вириоидного происхождения) и их последующую деградацию, у высших растений является система RNAi. Индуцируемый вирусами РНК-сайленсинг, таким образом, может рассматриваться как работающая на уровне нуклеиновых кислот и характеризующаяся высокой специфичностью форма иммунной системы (Vazquez, 2006; Mlotshwa *et al.*, 2008).

К настоящему времени общепринятой является модель, в соответствии с которой механизм РНК-сайленсинга можно представить следующим образом. На первом этапе в результате индукции активности рибонуклеазы DCL2 происходит деградация дцРНК, образованной посредством любого из вышеописанных механизмов. Гидролитическое расщепление протяженной двуцепочечной РНК, катализируемое DCL2, в конечном итоге приводит к образованию коротких двуцепочечных фрагментов, называемых siРНК, длиной 21–26 нуклеотидов, с 5'-концевой фосфатной группой и оверхенгом

в 2–3 нуклеотида на 3'-конце (Goldbach *et al.*, 2003; Mlotshwa *et al.*, 2008).

В последующем шаге RNAi за счет активности АТФ-зависимой РНК-геликазы происходит разделение обеих цепей образованных ранее siРНК. Одна из цепей (характеризующаяся меньшей термодинамической стабильностью 5'-конца) остается в составе зрелого комплекса RISC, где осуществляется ее связывание с мРНК-мишенью (Schwarz *et al.*, 2003; Mlotshwa *et al.*, 2008). Белок AGO1, являющийся каталитической компонентой комплекса RISC, проявляет эндонуклеазную активность по отношению к мРНК, комплементарной связанному фрагменту siРНК (Vaucheret, 2008; Wang *et al.*, 2011). Комплементарные участку мРНК-мишени одноцепочечные фрагменты siРНК могут быть использованы в качестве праймеров для растительной RdRP, которая достраивает вторую цепь, используя РНК-мишень как матрицу (эффект ограничен расстоянием ~300–500 нуклеотидов в 5'-направлении от сайта первоначального расщепления). Показано, что триггерами повторного цикла RNAi могут являться только siРНК длиной 22 нуклеотида, в то время как наиболее типичные siРНК, имеющие длину в 21 нуклеотид, не способны к подобной индукции. В ходе осуществляемой рибонуклеазой DCL2 деградации вновь синтезированных дцРНК происходит образование новых siРНК, которые называют вторичными. Таким образом осуществляется амплификация сигнала (Lipardi *et al.*, 2001; Mlotshwa *et al.*, 2008). Вторичные siРНК в дальнейшем могут не только участвовать в прямой деградации мРНК-мишени в составе RISC, но и транспортироваться между клетками по плазмодесмам в качестве сигнальных молекул. Подобный симпластный транспорт является белок-опосредованным (в частности, достоверно идентифицирован белок, избирательно транспортирующий siРНК длиной 25 нуклеотидов) (Yoo *et al.*, 2004).

DCL3

Как уже было отмечено, инактивация экспрессии трансгенов/генов может осуществляться также и на транскрипционном уровне. Известны 3 основных механизма TGS: РНК-опосредованное метилирование ДНК (RNA-

dependent DNA methylation, RdDM), метилирование ДНК, не связанное с участием малых РНК, и модификация хроматина. RdDM, характерным признаком которого является метилирование промотора гена-мишени в области гомологии с *ta*-siРНК, представляет собой наиболее изученный механизм репрессии транскрипции ДНК (Маренкова, Дейнеко, 2010).

Одним из источников появления протяженных дцРНК в данном случае могут быть транскрипты, считываемые РНК-полимеразой II с инвертированных повторов и образующие двуцепочечную структуру по сайтам комплементарности. Другим источником возникновения протяженных дцРНК могут являться высоко- или низкоповторяющиеся метилированные последовательности (включая мобильные элементы), которые транскрибируются ДНК-зависимой РНК-полимеразой IV или ДНК-зависимой РНК-полимеразой V и далее переводятся в двуцепочечную форму в результате катализа уникальной для растений РНК-зависимой РНК-полимеразой RdRP2 или RdRP6 (Baulcombe, 2004; Vazquez, 2006; Маренкова, Дейнеко, 2010). Образование *ta*-siРНК, имеющих размер 24 нуклеотида, осуществляется под действием рибонуклеазы DCL3. В цитоплазме *ta*-siРНК вступает во взаимодействие с комплексом RISC, включающим в себя белки AGO4 или AGO6. На конечном этапе данный эффекторный комплекс направляет специфическое метилирование ДНК-мишени и компактизацию хроматина (Qi *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2007).

DCL4

У мхов и покрытосеменных растений был идентифицирован еще один класс малых РНК, получивших название трансдействующих siРНК. Класс *ta*-siРНК включает в себя эндогенные некодирующие РНК, которые обладают функциональным сходством с miРНК и направляют деградацию в RISC мРНК-мишени, происходящей из локуса, отличного от такового *ta*-siРНК (Allen *et al.*, 2005; Talmor-Neiman *et al.*, 2006).

Найдено 5 генов, в результате транскрипции которых образуются полиаденилированные и кэпированные предшественники *ta*-siРНК (*pre*-*ta*-siРНК): TAS1a, TAS1b, TAS1c, TAS2

и TAS3 (Yoshikawa *et al.*, 2005). *Pre*-*ta*-siРНК TAS1a, TAS1b, TAS1c и TAS2 не консервативны (найлены только у *A. thaliana*). В противоположность этому, TAS3 РНК обнаружена у многих цветковых растений, хотя сходство предполагаемых гомологов сохраняется только в пределах фрагмента, дающего начало (см. ниже) зрелой форме *ta*-siРНК (Vazquez *et al.*, 2004; Allen *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2012).

Все TAS-РНК служат мишенями miРНК, которые направляют следующий этап биогенеза *ta*-siРНК: TAS1a, TAS1b, TAS1c и TAS2-РНК взаимодействуют с miРНК miR173, а TAS3 РНК – с miR390. Результатом подобного взаимодействия является гидролитическое расщепление TAS РНК, которое приводит к образованию более короткой формы *ta*-siРНК-предшественника, представляющей собой 5'-концевой (в случае TAS3) или 3'-концевой (для TAS1a, TAS1b, TAS1c и TAS2) фрагменты первичного транскрипта. Образовавшиеся на этом этапе одноцепочечные фрагменты далее переводятся в двуцепочечную форму РНК-зависимой РНК-полимеразой RdRP6. На последнем этапе биогенеза в результате катализа DCL4 происходит расщепление этих дцРНК-фрагментов с образованием зрелой формы *ta*-siРНК длиной 21 нуклеотид (Allen *et al.*, 2005; Yoshikawa *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2012).

Мишенью продуктов процессинга TAS3-РНК служат мРНК транскрипционных факторов ARF2, ARF3 и ARF4 (auxin response factors). Мишенями остальных *ta*-siРНК являются несколько генов с неидентифицированными к настоящему времени функциями (Vazquez *et al.*, 2004; Allen *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2012).

СУПРЕССОРЫ РНК-САЙЛЕНСИНГА

Наиболее эффективной стратегией, выработанной фитопатогенными вирусами в ходе эволюции и позволяющей им преодолевать действие RNAi, является блокирование генетического сайленсинга посредством специфических белков-супрессоров. Большинство вирусных белков, известных в настоящее время как супрессоры РНК-сайленсинга, изначально были идентифицированы как факторы патогенности, так как их экспрессия во многом определяла образование и выраженность симптомов

вирусной инфекции (деформацию и мозаику листьев, некрозы, карликовость, замедление темпов роста и пр.). В большинстве случаев экспрессия указанной группы белков не является обязательным фактором для осуществления репликации генома инфекционного агента, однако вирусные супрессоры RNAi являются необходимыми для эффективной аккумуляции вирионов в тканях растения и их дальнейшей диссеминации (Scholthof, 2005; Li, Ding, 2006; Scholthof, 2007).

Одним из наиболее известных супрессоров РНК-сайленсинга является протеаза HC-Pro (helper component proteinase), найденная у представителей семейства Potyviridae, в частности вируса картофеля Y (potato virus Y, PVY). Протеаза HC-Pro является классическим примером вирусного мультифункционального белка, задействованного в многочисленных процессах: репликации геномной РНК, протеолитическом процессинге продукта трансляции полицистронной вирусной РНК, межклеточном транспорте вирионов, – однако наиболее важной функцией HC-Pro является участие в супрессии RNAi (Ebhardt *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2006; Scholthof, 2007). Механизм действия HC-Pro до конца не изучен, однако на модели *A. thaliana* было показано, что экспрессия данного белка приводит к дефектам в процессах роста и дифференцировки растений, что, предположительно, может быть связано с ингибированием miРНК-ассоциированного гидролиза мРНК транскрипционных факторов. Кроме того, супрессия РНК-сайленсинга протеазой HC-Pro может быть обусловлена связыванием образующихся siРНК, а также снижением их стабильности, так как было обнаружено, что HC-Pro препятствует функциональному метилированию siРНК и miРНК (Lakatos *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2006). Довольно интересным также представляется факт взаимодействия протеазы HC-Pro с белком ggsCaM, который является эндогенным супрессором RNAi в растениях (Shiboleth *et al.*, 2007).

Белок P19, являющийся важным фактором патогенности у представителей семейства Tombusviridae, обладает максимальным сродством к siРНК и miРНК длиной в 21 нуклеотид независимо от наличия 3'-концевых оверхенгов (Scholthof, 2006; Hsieh *et al.*, 2009). Эффектив-

ность связывания белком P19 siРНК/miРНК значительно снижается при увеличении длины указанных малых РНК даже на один нуклеотид. Как и в случае с HC-Pro, было показано, что P19 препятствует функциональному метилированию siРНК и miРНК, снижая, таким образом, их стабильность (Omarov *et al.*, 2007; Pantaleo *et al.*, 2007).

В отличие от большинства известных вирусных супрессоров RNAi, транспортный белок 2b (обнаружен у представителей семейства Cucumoviridae) непосредственно взаимодействует *in vitro* и *in vivo* с AGO1, который обладает слайсерной активностью (slicer activity) и представляет собой каталитический центр RISC (Zhang *et al.*, 2006). Показано, что результатом подобного взаимодействия между 2b и AGO1 является специфическое ингибирование ферментативного гидролиза мРНК-мишени. Кроме того, на модели *A. thaliana* было продемонстрировано сопряженное с экспрессией 2b существенное уменьшение пула всех типов siРНК (Diaz-Pendon *et al.*, 2007; Goto *et al.*, 2007).

Интересная особенность механизма супрессии РНК-сайленсинга была показана для капсидного белка P38 вируса морщинистости турнепса (turnip crinkle virus, TVC), принадлежащего к семейству Carmoviridae. В отличие от описанных выше вирусных супрессоров HC-Pro, P19 или 2b, белок P38 TVC обладает способностью связывания двуцепочечных форм РНК вне зависимости от размера молекул (Qu *et al.*, 2003). Следствием данной особенности P38 может являться уменьшение доступности дцРНК-субстрата для DCL-рибонуклеаз, что, в свою очередь, ингибировало бы продукцию siРНК. Интересно, что хотя подобная зависимость была продемонстрирована для DCL4 *A. thaliana*, белок P38 TVC не оказывает ингибирующего воздействия на активность DCL2 (Thomas *et al.*, 2003; Merai *et al.*, 2006).

Супрессоры RNAi уже идентифицированы у представителей по меньшей мере 15 семейств ДНК- и РНК-содержащих вирусов растений. Обнаружение вирусных супрессоров RNAi в целом согласуется с идеей о том, что РНК-сайленсинг скорее является естественным механизмом противовирусной защиты растений, чем исключительно способом контроля экспрессии собственных генов. Показано, что супрессия

РНК-сайленсинга осуществляется по различным механизмам, однако большая часть изученных вирусных супрессоров RNAi оказывает свое действие, связываясь с двуцепочечными формами РНК. Было высказано предположение, что связывание дцРНК может быть общей стратегией супрессии РНК-сайленсинга, которую используют фитопатогенные вирусы. Так, было показано, что геном вируса хлоротичной карликовости батата (sweet potato chlorotic stunt virus, SPCSV) содержит ген РНКазы III, которая является синергистом белка-супрессора РНК-сайленсинга P22 SPCSV. Гомологи данной РНКазы III так же, как и примеры использования двух кооперативно действующих белков для супрессии RNAi, у других РНК-содержащих вирусов (в том числе и внутри семейства Closteroviridae, к которому принадлежит SPCSV), найдены не были. Интересно, что гомологи РНКазы III SPCSV были обнаружены у *A. thaliana* и *O. sativa*, однако их функции в растениях остаются неизвестными (Kreuze *et al.*, 2005; Cuellar *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2012).

ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ РИБОНУКЛЕАЗ СЕМЕЙСТВА III

Геномы большинства фитопатогенных вирусов представлены оцРНК, однако в ходе их жизненного цикла, а именно на этапе репликации, происходит формирование дцРНК. Предполагается, что знание механизма экспрессии в трансгенных растениях генов гетерологичных РНКаз, способных к гидролизу подобных репликативных дцРНК-интермедиатов, может лечь в основу разработки перспективной стратегии создания вирусоустойчивых форм растений (Watanabe *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2001).

Было показано, что трансгенные растения *N. tabacum*, экспрессирующие ген *PAC1* *Schizosaccharomyces pombe* (кодирует внутриклеточную рибонуклеазу, катализирующую гидролиз двуцепочечных форм РНК), демонстрировали устойчивость к нескольким инфекционным агентам: PVY, вирусу мозаики огурца (cucumber mosaic virus, CMV), а также вирусу мозаики томатов (tomato mosaic virus, ToMV). Во всех указанных случаях устойчивость трансформантов выражалась в задержке развития

симптомов вирусного поражения (Watanabe *et al.*, 1995). В дальнейших исследованиях было продемонстрировано, что продукция трансгенными растениями РНКазы PAC1 также способна индуцировать формирование устойчивости к ряду инфекций виroidной этиологии. Было показано, что для трансформантов *Solanum tuberosum*, экспрессирующих ген *PAC1*, в случае заражения виroidом веретеновидности клубней картофеля (potato spindle tuber viroid, PSTVd) были характерны супрессия инфекции и снижение накопления соответствующей инфекционной РНК в тканях (Sano *et al.*, 1997). Продукция PAC1 трансгенными растениями *Dendranthema grandiflorum* способствовала развитию повышенной устойчивости к вириду карликовости хризантем (chrysanthemum stunt viroid, CSVd) и вирусу пятнистого увядания томатов (tomato spotted wilt virus, TSWV) (Ogawa *et al.*, 2005).

Отметим, что экспрессия в трансгенных растениях генов, кодирующих гетерологичные рибонуклеазы, может быть сопряжена с рядом фенотипических отклонений, обусловленных выраженным цитотоксическим действием ферментов данной группы. Так, трансгенные растения *N. tabacum*, экспрессирующие мутантную форму гена *rnc* *Escherichia coli*, кодирующего внутриклеточную РНКазу III, оказались устойчивыми к вирусу кольцевой пятнистости перца (pepper ringspot virus, PepRSV), вирусу некротической пятнистости бальзамина (impatiens necrotic spot virus, INSV), вирусу гравировки табака (tobacco etch virus, TEV), вирусу мозаики люцерны (alfalfa mosaic virus, AMV), вирусу табачной мозаики (tobacco mosaic virus, TMV) и TSWV. Трансформанты *Triticum aestivum*, экспрессирующие ту же мутантную форму *rnc*, демонстрировали устойчивость к инфекции, вызываемой вирусом штриховатой мозаики ячменя (barley stripe mosaic virus, BSMV). Продукт мутантной формы гена имел замену Glu₃₉→Lys₃₉ и не обладал соответствующей каталитической активностью при сохраненной способности к связыванию дцРНК. В эксперименте была показана одинаковая эффективность при использовании как нормальной, так и мутантной форм *rnc*, однако трансформанты *N. tabacum* и *T. aestivum*, экспрессирующие трансген дикого типа, характеризовались задержкой в развитии.

Помимо этого, было отмечено, что в случае использования конструкции, несущей нормальную форму трансгена, имело место существенное снижение эффективности агробактериальной трансформации растений (Langenberg *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2001).

Таким образом, к настоящему времени доказано участие различных рибонуклеаз семейства III как в индукции (DCL-рибонуклеазы), так и в супрессии (РНКза III SPCSV) РНК-сайленсинга. Этот факт, а также наличие данных о повышенной вирусоустойчивости трансгенных растений, экспрессирующих гетерологичные белки этого семейства, свидетельствуют о необходимости более детального изучения роли ауто- и гетерологичных рибонуклеаз семейства III в защитных системах высших растений.

Работа поддержана грантом РФФИ № 12-04-01478-а, Интеграционным проектом СО РАН – ДВО РАН и программой РАН «Живая природа: современное состояние и проблемы развития»

ЛИТЕРАТУРА

- Маренкова Т.В., Дейнеко Е.В. Инактивирование генов у растений на уровне транскрипции // Генетика. 2010. Т. 46. С. 581–592.
- Allen E., Xie Z., Gustafson A.M., Carrington J.C. microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants // Cell. 2005. V. 121. P. 207–221.
- Bartel B., Bartel D. MicroRNAs: at the root of plant development? // Plant Physiol. 2003. V. 132. P. 709–717.
- Baulcombe D. RNA silencing in plants // Nature. 2004. V. 431. P. 356–363.
- Bollman K.M., Aukerman M.J., Park M.Y. *et al.* HASTY, the *Arabidopsis* ortholog of exportin 5/MSN5, regulates phase change and morphogenesis // Development. 2003. V. 130. P. 1493–1504.
- Bonnet E., van de Peer Y., Rouze P. The small RNA world of plants // New Phytol. 2006. V. 171. P. 451–468.
- Bozorov T.A., Pandey S.P., Dinh S.T. *et al.* DICER-like proteins and their role in plant-herbivore interactions in *Nicotiana attenuata* // J. Integr. Plant Biol. 2012. V. 54. P. 189–206.
- Chen X. A microRNA as a translational repressor of *APETALA2* in *Arabidopsis* flower development // Science. 2004. V. 303. P. 2022–2025.
- Cuellar W.J., Tairo F., Kreuze J.F., Valkonen J.P.T. Analysis of gene content in sweet potato chlorotic stunt virus RNA1 reveals the presence of the p22 RNA silencing suppressor in only a few isolates: implications for viral evolution and synergism // J. General Virology. 2008. V. 89. P. 573–582.
- Diaz-Pendon J.A., Li F., Li W.X., Ding S.W. Suppression of antiviral silencing by cucumber mosaic virus 2b protein in *Arabidopsis* is associated with drastically reduced accumulation of three classes of viral small interfering RNAs // Plant Cell. 2007. V. 19. P. 2053–2063.
- Du T., Zamore P.D. microPrimer: the biogenesis and function of microRNA // Development. 2005. V. 132. P. 4645–4652.
- Dugas D., Bartel B. microRNA regulation of gene expression in plants // Curr. Opin. Plant Biol. 2004. V. 7. P. 512–520.
- Dunoyer P., Himber C., Voinnet O. DICER-LIKE 4 is required for RNA interference and produces the 21-nucleotide small interfering RNA component of the plant cell-to-cell silencing signal // Nature Genet. 2005. V. 37. P. 1356–1360.
- Ebhardt H.A., Thi E.P., Wang M.B., Unrau P.J. Extensive 3'-modification of plant small RNAs is modulated by helper component-proteinase expression // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. P. 13398–13403.
- Goldbach R., Bucher E., Prins M. Resistance mechanisms to plants viruses: an overview // Virus Res. 2003. V. 92. P. 207–212.
- Goto K., Kobori T., Kosaka Y. *et al.* Characterization of silencing suppressor 2b of Cucumber mosaic virus based on examination of its small RNA-binding abilities // Plant Cell Physiol. 2007. V. 48. P. 1050–1060.
- Henderson I.R., Zhang X., Lu C. *et al.* Dissecting *Arabidopsis thaliana* DICER function in small RNA processing, gene silencing and DNA methylation patterning // Nature Genet. 2006. V. 38. P. 721–725.
- Hsieh Y.C., Omarov R.T., Scholthof H.B. Diverse and newly recognized effects associated with short interfering RNA binding site modifications on the tomato bushy stunt virus p19 silencing suppressor // J. Virology. 2009. V. 83. P. 2188–2200.
- Kidner C.A., Martienssen R.A. The developmental role of microRNA in plants // Curr. Opin. Plant Biol. 2005. V. 8. P. 38–44.
- Kreuze J. F., Savenkov E. I., Cuellar W. *et al.* Viral class 1 RNase III involved in suppression of RNA silencing // J. Virology. 2005. V. 11. P. 7227–7238.
- Lakatos L., Csorba T., Pantaleo V. *et al.* Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors // EMBO J. 2006. V. 25. P. 2768–2780.
- Langenberg W.G., Zhang L., Court D.L., *et al.* Transgenic tobacco plants expressing the bacterial *rnc* gene resist virus infection // Mol. Breeding. 1997. V. 3. P. 391–399.
- Li F., Ding S.W. Virus counterdefense: diverse strategies for evading the RNA-silencing immunity // Annu. Rev. Microbiol. 2006. V. 60. P. 503–531.
- Lin J., Chun H.W., Yi L. Viral suppression of RNA silencing // Sci. China, Life Sciences. 2012. V. 55. P. 109–118.
- Lipardi C., Wei Q., Paterson B.M. RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs // Cell. 2001. V. 107. P. 297–307.
- Liu Q., Feng Y., Zhu Z. Dicer-like (DCL) proteins in plants // Funct. Integr. Genomics. 2009. V. 9. P. 277–286.
- Llave C., Xie Z., Kasschau K., Carrington J. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis*

- miRNA // Science. 2002. V. 297. P. 2053–2056.
- MacRae I.J., Doudna J.A. Ribonuclease revisited: structural insights into ribonuclease III family enzymes // Curr. Opin. Struct. Biol. 2007. V. 17. P. 1–8.
- Margis R., Fusaro A.F., Smith N.A. *et al.* The evolution and diversification of Dicers in plants // FEBS Lett. 2006. V. 580. P. 2442–2450.
- Meraï Z., Kerenyi Z., Kertesz S. *et al.* Double-stranded RNA binding could be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing // J. Virology. 2006. V. 80. P. 5747–5756.
- Mlotshwa S., Pruss G.J., Vance V. Small RNAs in viral infection and host defense // Trends Plant Sci. 2008. V. 13. P. 375–382.
- Mukherjee K., Campos H., Kolaczowski B. Evolution of animal and plant Dicers: early parallel duplications and recurrent adaptation of antiviral RNA binding in plants // Mol. Biol. Evol. 2012. V. 30. P. 627–641.
- Ogawa T., Toguri T., Kudoh H. *et al.* Double-stranded RNA-specific ribonuclease confers tolerance against chrysanthemum stunt viroid and tomato spotted wilt virus in transgenic chrysanthemum plants // Breeding Sci. 2005. V. 55. P. 49–56.
- Omarov R., Ciomperlik J., Scholthof H.B. RNAi-associated ssRNA-specific ribonucleases in Tombusvirus P19 mutant-infected plants and evidence for a discrete siRNA-containing effector complex // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. P. 1714–1719.
- Palatnik J.F., Allen E., Wu X. *et al.* Control of leaf morphogenesis by microRNAs // Nature. 2003. V. 425. P. 257–263.
- Pantaleo V., Szittya G., Burgyn J. Molecular bases of viral RNA targeting by viral siRNA programmed RISC // J. Virology. 2007. V. 81. P. 3797–3806.
- Parizotto E., Dunoyer P., Rahm N. *et al.* *In vivo* investigation of the transcription, processing, endonucleolytic activity, and functional relevance of the spatial distribution of a plant miRNA // Genes Dev. 2004. V. 18. P. 2237–2242.
- Qi Y., He X., Wang X.J. *et al.* Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation // Nature. 2006. V. 443. P. 1008–1012.
- Qu F., Ren T., Morris T.J. The coat protein of turnip crinkle virus suppresses posttranscriptional gene silencing at an early initiation step // J. Virology. 2003. V. 77. P. 511–522.
- Sano T., Nagayama A., Ogawa T. *et al.* Transgenic potato expressing a double-stranded RNA-specific ribonuclease is resistant to potato spindle tuber viroid // Nature Biotechnol. 1997. V. 15. P. 1290–1294.
- Scholthof H.B. Plant virus transport: motions of functional equivalence // Trends Plant Sci. 2005. V. 10. P. 376–382.
- Scholthof H.B. Tombusvirus-encoded P19: from irrelevance to elegance // Nat. Rev. Microbiol. 2006. V. 4. P. 405–411.
- Scholthof H.B. Heterologous expression of viral RNAi suppressors: RISC management // Plant Physiol. 2007. V. 145. P. 1110–1117.
- Schwarz D.S., Hutvagner G., Du T. *et al.* Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex // Cell. 2003. V. 115. P. 199–208.
- Shibolet Y.M., Haronsky E., Leibman D. *et al.* The conserved FRNK box in plant viral suppressor of gene silencing HC-Pro is required for small RNA binding and mediates symptom development // J. Virology. 2007. V. 81. P. 13135–13148.
- Sunkar R., Zhu J. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis* // Plant Cell. 2004. V. 16. P. 2001–2019.
- Talmor-Neiman M., Stav R., Klipcan L. *et al.* Identification of trans-acting siRNAs in moss and an RNA-dependent RNA polymerase required for their biogenesis // Plant J. 2006. V. 48. P. 511–521.
- Thomas C.L., Leh V., Lederer C., Maule A.J. Turnip crinkle virus coat protein mediates suppression of RNA silencing in *Nicotiana benthamiana* // Virology. 2003. V. 306. P. 33–41.
- Udriste A.A., Stan V., Radu G.L. *et al.* Identification of a dicer homologue gene (DCL2) in *Nicotiana tabacum* // Plant Biol. 2012. V. 14. P. 980–986.
- Vaucheret H. Plant ARGONAUTES // Trends Plant Sci. 2008. V. 13. P. 350–357.
- Vazquez F. *Arabidopsis* endogenous small RNAs: highways and byways // Trends Plant Sci. 2006. V. 11. P. 460–468.
- Vazquez F., Vaucheret H., Rajagopalan R. *et al.* Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of *Arabidopsis* mRNAs // Mol. Cell. 2004. V. 16. P. 69–79.
- Voinnet O. Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections // Nat. Rev. Genet. 2005. V. 6. P. 206–220.
- Voinnet O. Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs // Cell. 2009. V. 136. P. 669–687.
- Wang X.B., Jovel J., Udomporn P. *et al.* The 21-nucleotide, but not 22-nucleotide, viral secondary small interfering RNAs direct potent antiviral defense by two cooperative argonautes in *Arabidopsis thaliana* // Plant Cell. 2011. V. 23. P. 1625–1638.
- Watanabe Y., Ogawa T., Takahashi H. *et al.* Resistance against multiple plant viruses in plants mediated by a double stranded-RNA specific ribonuclease // FEBS Lett. 1995. V. 372. P. 165–168.
- Williams L., Carles C.C., Osmont K.S., Fletcher J.C. A database analysis method identifies an endogenous trans-acting short-interfering RNA that targets the *Arabidopsis* ARF2, ARF3, and ARF4 genes // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. P. 9703–9708.
- Yoo B.C., Kragler F., Varkonyi-Gasic E. *et al.* A systemic small RNA signaling system in plants // Plant Cell. 2004. V. 16. P. 1979–2000.
- Yoshikawa M., Peragine A., Park M.Y., Poethig R.S. A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis* // Genes Dev. 2005. V. 19. P. 2164–2175.
- Yu B., Chapman E.J., Yang Z. *et al.* Transgenically expressed viral RNA silencing suppressors interfere with microRNA methylation in *Arabidopsis* // FEBS Lett. 2006. V. 580. P. 3117–3120.
- Yu B., Yang Z., Li J., Minakhina S. *et al.* Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis // Science. 2005. V. 307. P. 932–935.
- Zhang C., Ng D.W., Lu J., Chen Z.J. Roles of target site location and sequence complementarity in trans-acting siRNA formation in *Arabidopsis* // Plant J. 2012. V. 69. P. 217–226.

- Zhang L.Y., French R., Langenberg W.G. Accumulation of barley stripe mosaic virus is significantly reduced in transgenic wheat plants expressing a bacterial ribonuclease // *Transgenic Res.* 2001. V. 10. P. 13–19.
- Zhang X., Yuan Y. R., Pei Y. *et al.* Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits *Arabidopsis* Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense // *Genes Dev.* 2006. V. 20. P. 3255–3268.
- Zheng X., Zhu J., Kapoor A., Zhu J.K. Role of *Arabidopsis* AGO6 in siRNA accumulation, DNA methylation and transcriptional gene silencing // *EMBO J.* 2007. V. 26. P. 1691–1701.

ROLE OF AUTO- AND HETEROLOGOUS RIBONUCLEASE III FAMILY ENZYMES IN THE RESISTANCE TO PATHOGENS AND REGULATION OF GENE EXPRESSION IN HIGHER PLANTS

I.V. Zhirnov^{1,2}, E.A. Trifonova¹, A.V. Kochetov^{1,2}

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia;

² Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia, e-mail: zh_lk@list.ru

Summary

The current view on the biological role of ribonuclease III family plant enzymes (Dicer-like dsRNAses) is considered. Emphasis is placed on their role in molecular mechanisms conferring resistance to pathogens.

Key words: genetic engineering, ribonuclease III family enzymes, plants, pathogens, gene silencing.