

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 miРНК); малые интерферирующие РНК (small interfering RNAs, siRNAs, или siРНК); трансдействующие siРНК (trans-acting siRNAs, ta-siRNAs, или ta-siРНК); siРНК, ассоциированные с повторами (repeat-associated siRNAs, ra-siRNAs, или ra-siРНК). 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/виридов, регуляции экспрессии собственных генов, репрессии трансгенов (Bozorov *et al.*, 2012; Mukherjee *et al.*, 2012). Некоторые экспериментальные данные дают основание выдвинуть предположение о возможности использования продукции трансгенными растениями гетерологичных рибонуклеаз семейства III для повышения устойчивости к фитопатогенным вирусам/виридам. Так, экспрессия в трансгенных 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

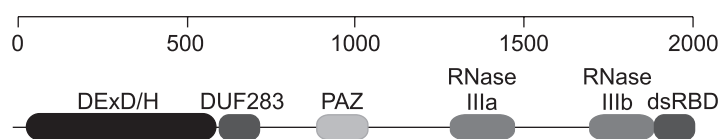


Рис. 1. Доменная структура DCL. Масштабная линейка проградуирована в единицах аминокислотных остатков.

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 кэпированных 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 виroidного 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 деграцию 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 **НС-Pro (helper component proteinase)**, найденная у представителей семейства Potyviridae, в частности вируса картофеля Y (**potato virus Y, PVY**). Протеаза **НС-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 **НС-Pro** является участие в супрессии RNAi (Ebhardt *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2006; Scholthof, 2007). Механизм действия **НС-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 **НС-Pro может быть обусловлена связыванием** образующихся siРНК, а также снижением их стабильности, так как было обнаружено, что **НС-Pro** препятствует функциональному метилированию siРНК и miРНК (Lakatos *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2006). Довольно интересным также представляется факт взаимодействия протеазы **НС-Pro** с белком rgsCaM, который является эндогенным супрессором RNAi в растениях (Shibolet *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 **НС-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 **НС-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 вирусной этиологии. Было показано, что для трансформантов *Solanum tuberosum*, экспрессирующих ген *PAC1*, в случае заражения виридом 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. Integ. 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., Kreuzer 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.
- Kreuzer 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.
- Merai 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., Burgyan 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., Udornporn 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_ik@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.