



На правах рукописи

Трифонова Екатерина Александровна

**Трансгенные растения табака и картофеля,
экспрессирующие гены гетерологичных секреторных
нуклеаз, как модель для изучения вирусоустойчивости**

Генетика – 03.00.15

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск
2006

Работа выполнена в лаборатории генной инженерии растений Института цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск.

Научный руководитель:

кандидат биологических наук, доцент
Алексей Владимирович Кочетов
Институт цитологии и генетики
СО РАН, г. Новосибирск

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор
Лидия Александровна Першина
Институт цитологии и генетики
СО РАН, г. Новосибирск

доктор биологических наук
Анатолий Борисович Беклемишев
ГУ НИИ биохимии СО РАМН
г.Новосибирск

Ведущее учреждение: Биолого-почвенный институт ДВО РАН, г. Владивосток

Защита состоится 17 Мая 2006 г. на утреннем заседании Диссертационного совета по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук (Д-003.011.01) при Институте цитологии и генетики Сибирского отделения РАН по адресу: 630090, г.Новосибирск, пр. академика Лаврентьева,10. Факс: (383) 333-12-78; e-mail: dissov@bionet.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии и генетики Сибирского отделения РАН

Автореферат разослан 4 апреля 2006 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
доктор биологических наук



А.Д. Груздев

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Создание генно-инженерными методами растений с повышенной устойчивостью к таким быстро эволюционирующем патогенам, как вирусы, является одной из актуальных проблем как современной молекулярной биологии, так и биотехнологии. Однако, недостаточное понимание молекулярных механизмов формирования системной устойчивости и взаимодействия растительных вирусов с защитными системами высших растений затрудняет создание новых способов контроля болезней сельскохозяйственно-ценных растений.

В настоящее время защитные системы высших растений принято классифицировать на белок-опосредованные системы неспецифической приобретенной устойчивости и высокоспецифические системы, основанные на РНК-опосредованных механизмах (Prins, 2003). Общим компонентом всех белок-опосредованных систем неспецифической устойчивости является накопление специфических белков, связанных с патогенезом (pathogenesis-related proteins, PR-proteins). Наиболее изученными считаются салицилат-индукируемые PR-белки, формирующие SAR. В настоящее время различают 14 групп этих белков, в основном выполняющих гидролитические или ингибиторные функции (Van Loon and Van Strien, 1999).

На момент начала наших исследований среди PR-белков не было идентифицировано белков с рибонуклеазной активностью. Совсем недавно было показано, что по крайней мере некоторые из белков PR-10 имеют рибонуклеазную активность и локализованы внутриклеточно (вакуолярно), также было показано участие белка PR-10 горького перца в противовирусной защите растений (Park et al., 2004).

Еще менее изученными являются салицилат-неиндукируемые PR-белки, накапливающиеся в тканях растений после поранения. Эти белки не классифицированы на группы, и наиболее известными из них являются экстраклеточные нуклеазы (Ye and Drost, 1996; Kariu et al., 1998; LeBrasseur et al., 2002) и ингибиторы протеина (Pieterse and Van Loon, 1999). И хотя роль индукции растительных экстраклеточных нуклеаз после поранения окончательно не выяснена, исходя из ферментативной активности этих белков и некоторых экспериментальных данных (Salganic, 1984; Gergerich and Scott, 1988; Атабеков и др., 1990; Wolf, 1991) можно сделать предположение, что экстраклеточные нуклеазы активно участвуют в противовирусной защите растений. Дополнительные исследования взаимодействия этих ферментов с патогенами необходимы для понимания молекулярных механизмов неспецифической устойчивости у высших растений.

Неспецифический характер опосредуемой нуклеазами устойчивости, вне зависимости от локализации этих ферментов в клетках растений, дает возможность создания генно-инженерными методами растений с повышенной устойчивостью к неродственным вирусам, а в свете имеющихся литературных данных, возможно также к грибам и вироидам.

Основной генно-инженерной стратегией повышения устойчивости растений к вирусным инфекциям является перенос в ядерный геном растений

фрагментов геномов патогенов (Wilson, 1993). Попытки создания трансгенных растений, устойчивых к широкому спектру вирусов, в рамках данной стратегии успеха не имели (Van den Boogaart et al., 2001; Rinne et al., 2005).

В настоящее время успешно реализовано два способа повышения устойчивости к широкому спектру вирусов путем трансгенеза. Один из них заключается в экспрессии генов интерферон-индуцируемой 2'-5'-олигоаденилатной противовирусной системы млекопитающих (Truve et al., 1993; 1994; Honda et al., 2003), возникающая в результате устойчивость выражается лишь в небольшой задержке формирования симптомов инфекции. Второй способ заключается в клонировании генов растительных противовирусных белков, инактивирующих рибосомы, и является спорным из соображений биобезопасности (Lodge et al., 1993; Wang et al., 1998; Vandenburg et al., 2004). Создание новых стратегий получения растений с широким спектром устойчивости к вирусам является актуальной задачей современной биотехнологии, и индуцируемое повышение нуклеазной активности может стать одной из таких стратегий.

Цели и задачи исследования. Целью настоящей работы является изучение влияния экстраклеточных нуклеаз на формирование устойчивости растений к вирусным патогенам с использованием трансгенных растений, экспрессирующих гены гетерологичных секреторных нуклеаз. В рамках работы были поставлены следующие задачи:

1. Создать генетические конструкции, несущие гены секреторных нуклеаз, позволяющие повышать уровень нуклеазной активности в трансгенных растениях.
2. Получить трансгенные растения табака и картофеля, экспрессирующие гены секреторных нуклеаз.
3. Оценить уровень нуклеазной активности в полученных трансгенных растениях и ее локализацию.
4. Определить степень вирусоустойчивости трансгенных растений табака с повышенной экстраклеточной нуклеазной активностью.

Научная новизна и практическая ценность. В результате проведенных исследований была создана модельная система для изучения механизмов неспецифической устойчивости растений к вирусам. Клонированы гены гетерологичных секреторных нуклеаз и с их использованием созданы векторы для экспрессии в растительных клетках. Впервые получены трансгенные растения, экспрессирующие гены панкреатической секреторной рибонуклеазы быка и секреторной нуклеазы *Serratia marcescens*. Показано, что уровень нуклеазной активности в листьях и стеблях полученных растений значительно повышен по сравнению с контролем.

Исследовано влияние повышенной нуклеазной активности на устойчивость растений к вирусам. Впервые показано, что экстраклеточные нуклеазы непосредственно участвуют в формировании устойчивости растений к вирусным инфекциям, что вносит вклад в понимание молекулярных механизмов неспецифической устойчивости растений.

Получены трансгенные растения картофеля хозяйственно ценных сортов с повышенным уровнем экстраклеточной нуклеазной активности. Предложена

новая стратегия создания растений, устойчивых к широкому спектру вирусных, а возможно также грибковых и вироидных инфекций, с использованием методов генетической инженерии, основанная на противовирусном действии экстраклеточных нуклеаз.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на международных конференциях: «Молекулярная генетика, геномика и биотехнология» (Минск, 2004 г.), Международной научно-практической конференции Института картофелеводства НАН Беларусь (Минск, 2003 г.), Первом Международном Конгрессе «Биотехнология – состояние и перспективы развития» (Москва, 2002 г.); и на российских конференциях: 7-ой пущинской школе–конференции молодых ученых (Пущино, 2003 г.), конференции МОГИС (Москва, 2003), III-ем съезде ВОГИС «Генетика в XXI веке» (Москва, 2004 г.).

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, четырех глав, выводов и списка цитируемой литературы (247 наименований). Работа изложена на 111 страницах, включает 17 рисунков и 5 таблиц в тексте диссертации.

По теме работы опубликовано 5 работ в рецензируемых журналах и подана заявка на патент.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для конструирования были использованы следующие плазмиды: pBlueScript KS (фирма «Stratagene»), pC27 (Alliotte et al., 1988), pGSH160 (Deblaere et al., 1987). Все процедуры, использованные при клонировании, были проведены согласно методикам, приведенным у Маниатиса с соавторами (Маниатис и др., 1984). Секвенирование последовательностей ДНК клонированных генов проводилось на базе Межинститутского центра секвенирования ДНК на однокапиллярном анализаторе фрагментов ДНК (модель ABI PRISM 310 Genetic Analyzer) или четырехканальном анализаторе (модель ABI3100 производства фирмы Applied Biosystems) с использованием специфических праймеров.

Для прямой трансформации клеток *A. tumefaciens* была использована методика (An et al., 1988), с модификациями.

Трансформацию растений табака *Nicotiana tabacum* SR1 проводили методом агробактериальной трансфекции листовых дисков в точности как описано (Deblaere et al., 1987). Трансформанты, устойчивые к канамицину (100 мг/л), переносили в отдельные стерильные пробирки для культивирования в условиях климакамеры, затем хорошо укоренившиеся растения переносили в грунт в теплицу. Для анализа использовались растения, достигшие 4-6 недельного возраста. Трансгенные растения картофеля *Solanum tuberosum L* сортов Белоярский ранний и Каприз были получены методом трансформации клубневых дисков, которая проводилась по (Snyder and Belknap, 1993), с небольшими изменениями. В этой части работы принимали участие сотрудники ИЦИГ М.Л. Комарова, А.В. Романова и Н.С. Леонова.

Определение активности маркерного фермента NPT II в экстрактах из листьев табака и картофеля проводилось по методике (Reiss et al., 1984) с некоторыми модификациями.

Геномную ДНК контрольных и трансгенных растений табака и картофеля выделяли из одного или двух грамм свежих молодых листьев с использованием SDS и протеиназы К по методике Дрейпера и Скотта (Дрейпер и Скотт, 1991).

В качестве зондов для гибридизации использовали ПЦР-фрагменты, амплифицированные с производных плазмиды pC27, несущих гены гетерологичных нуклеаз, со специфичными праймерами. Фрагменты ДНК были помечены (α -³²P)dATP (Amersham Pharmacia Biotech, UK) по методике мечения со случайными праймерами (Feinberg and Vogelsten, 1983). Геномную ДНК гидролизовали соответствующими рестриктазами, разделяли в агарозном геле и переносили на нейлоновую мембрану Hybond N+. Блот-гибридизация по Саузерну осуществлялась по протоколу Amersham Pharmacia Biotech, мембрану помещали на экспозицию с рентгеновской пленкой (Agfa, Belgium).

Нуклеазная активность экстрактов оценивалась по высвобождению кислоторастворимого материала из суммарной дрожжевой РНК по методикам (Blank and McKeon, 1989; Galiana et al., 1997), с различными модификациями. Оптическую плотность кислоторастворимого супернатанта измеряли при 260нм. Анализ спектра белков с нуклеазной активностью в экстрактах трансгенных и контрольных растений проводили в SDS-полиакриламидном геле с добавлением РНК в матрикс разделяющего геля по методике (Yen and Green, 1991), с модификациями.

В экспериментах по инфицированию растений использовалась японская линия вируса табачной мозаики OM BTM (Nozu and Okada, 1968). Очищенные препараты BTM были получены из экстрактов инфицированных растений табака (cv. Samsun) с ярко выраженным мозаичным симптомом. Растения выращивались в теплице с естественным освещением. В листья 14-16 дневных растений втиралась смесь карборунда с суспензией BTM в бидистиллированной воде. Содержание BTM-антитела в образцах определялось количественным методом ELISA (Clark and Adams, 1977) с кроличьими антителами и меченными пероксидазой антителами на использованную линию BTM. Содержание вируса определялось по калибровочной кривой, построенной для очищенного препарата BTM. В этой части работы принимали участие сотрудники БПИ ДВО РАН В.И. Малиновский и М.В. Сапоцкий.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Создание модельных конструкций, экспрессирующих гены гетерологичных секреторных нуклеаз.

Создание растений с измененным уровнем нуклеазной активности с помощью методов генетической инженерии является одним из перспективных подходов для изучения роли нуклеаз в физиологии высших растений. В рамках данной работы было запланировано создать несколько модельных конструкций, экспрессирующих гены секреторных нуклеаз. Мы использовали гены нуклеазы *Serratia marcescens* и панкреатической рибонуклеазы *Bos taurus*.

В качестве первого целевого гена был использован ген экстраклеточной нуклеазы *Serratia marcescens*, фермента, для которого была показана противовирусная активность при экзогенном применении для животных, тутового шелкопряда и пчел (Троицкая и др., 1981; Панфилова и Салганик,

1983) Этот фермент является сахаронеспецифичной гидролазой, гидролизующей как РНК, так и ДНК и в одноцепочечной, и в двуцепочечной форме; требует 0.005M Mg²⁺ в качестве кофактора, активен в широком диапазоне pH от 6 до 10.

В качестве второго целевого гена был использован ген панкреатической рибонуклеазы *Bos taurus*. Этот фермент использует в качестве субстрата исключительно одноцепочечную РНК. Оптимум pH 7.5, хотя фермент активен в очень широком диапазоне pH от 5 до 10 без существенного снижения активности, не нуждается в катионных кофакторах, исключительно стабилен, в том числе и термостабилен, очищается от примесей кипячением (Sorrentino, 1998).

Фрагменты ДНК, полученные в результате амплификации, были клонированы в плазмиде pBlueScript. Оба гена были использованы с последовательностями собственных лидерных пептидов. Далее гены были переклонированы в векторы pC27 и pGSH160 под контроль 2'-промотора маннопинсигнатзы (MAS2') Ti-плазмиды *Agrobacterium tumefaciens*. Особенностью данного промотора является индуцируемость поражением, что позволяет смоделировать с его помощью природный паттерн экспрессии нуклеаз, связанных с патогенезом (Langridge et al., 1989). Получены плазмиды pC27SMN, pGSH160BN, pC27BN. Схемы Т-областей векторов приведены на рисунке 1.

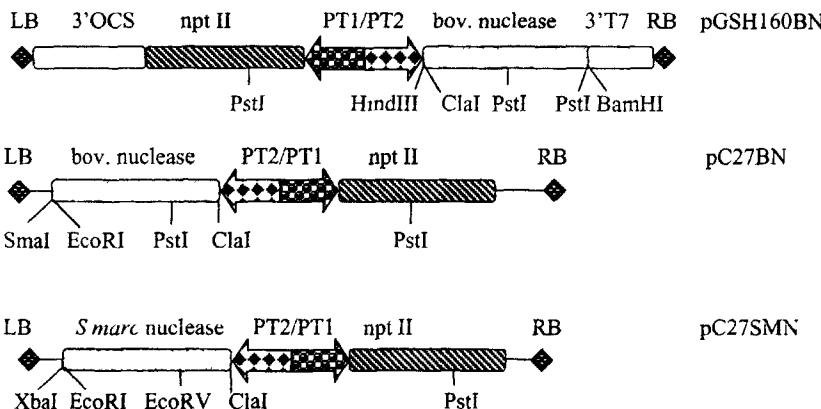


Рис.1. Схемы Т-областей бинарных векторов pGSH160BN и pC27BN со встроенным геном панкреатической рибонуклеазы быка и pC27SMN со встроенным геном нуклеазы *S. marcescens*. Обозначения: LB, RB – повторы, ограничивающие Т-область в бинарных векторах; bov.nuclease – ген панкреатической рибонуклеазы быка; *S. marcescens* nuclease – ген секреторной нуклеазы *Serratia marcescens*; PT1/PT2 – двунаправленный промотор гена маннопинсигнатзы; npt II – ген неомицинфосфотрансферазы II *E.coli*; 3'OCS – 3' часть гена октопинсигнатзы Ti-плазмиды *A. tumefaciens*; 3'T7 – 3' часть гена T7 Ti-плазмиды *A. tumefaciens*; SmaI, XbaI, EcoRI, EcoRV, ClaI, BamHI, PstI - сайты рестрикции, использованные при конструировании и анализе векторов

2. Получение и анализ трансгенных растений табака.

Со всеми описанными выше конструкциями были получены трансформанты табака, устойчивые к канамицину. Трансформанты были проанализированы на экспрессию маркерного фермента неомицинфосфотрансферазы (NPTII). Для дальнейших исследований использовали только растения, устойчивые к канамицину и активно экспрессирующие ген неомицинфосфотрансферазы II (nptII). Геномная ДНК некоторых растений была дополнительно проанализирована с помощью полимеразной цепной реакции на наличие полноразмерной встройки целевого гена со специфическими праймерами (рисунок 2) и blot-гибридизацией по Саузерну (рисунок 3).

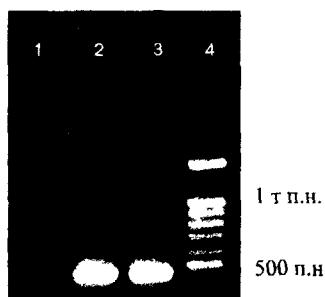


Рис. 2. Тестирование трансгенных растений табака pC27BN-11 на наличие полноразмерной встройки гена панкреатической нуклеазы быка полимеразной цепной реакцией. Нанесения по дорожкам: 1 Нетрансгенный табак SR1; 2 Трансгенный табак SR1, экспрессирующий ген панкреатической нуклеазы быка; 3 Вектор pC27BN, 4 Маркер молекулярных весов

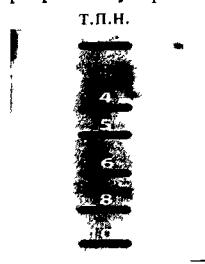


Рис. 3. Саузерн blot-гибридизация *Hind*-III-гидролизатов геномной ДНК контрольного (К) и трансгенного табака линии pC27BN-11 (Т).

В качестве зондов в гибридизации использовали фрагменты, полученные с помощью ПЦР с использованных для трансформации векторов, со специфическими праймерами. Как следует из рис. 3, в геномной ДНК трансгенного табака линии pC27BN-11 присутствует одна встройка целевого гена.

3. Анализ полученных трансгенных растений табака на наличие повышенного уровня нуклеазной активности.

В рамках настоящего исследования необходимо было выбрать из созданных нами конструкций те, которые эффективно повышают уровень нуклеазной активности в трансгенных растениях. Результаты измерений для линий трансгенных растений pC27SMN-12 и pC27SMN-17, экспрессирующих ген нуклеазы *Serratia marcescens* и pGSH160BN-25 и pGSH160BN-27, экспрессирующих ген панкреатической рибонуклеазы быка, представлены в таблице 1, для линий растений pC27 BN – в таблице 2.

Таблица 1 Нуклеазная активность листовых экстрактов трансгенных растений табака линий pC27SMN и pGSH160BN.

Линии растений	Средняя OD	Стандартная ошибка
Контроль 1	0,808	0,117
Контроль 2	0,665	0,020
pC27SMN-12	4,915	0,287
pC27SMN-17	6,647	0,104
pGSH160BN-25	0,761	0,098
PGSH160BN-27	0,777	0,075

Примечания: контроль 1 и 2 – трансгенные растения, не несущие генов гетерологичных нуклеаз. pC27SMN-12 и pC27SMN-17 – трансгенные растения, экспрессирующие ген нуклеазы *Serratia marcescens*; pGSH160BN-25 и PGSH160BN-27 – трансгенные растения, экспрессирующие ген панкреатической рибонуклеазы быка Средняя оптическая плотность представлена в оптических единицах.

Таблица 2 Нуклеазная активность листовых экстрактов трансгенных растений табака линий pC27 BN, экспрессирующих ген панкреатической рибонуклеазы быка

Линии растений	Средняя OD	Стандартная ошибка
Контроль	0.833	0.067
pC27BN-1	2.783	0.356
pC27BN-2	1.033	0.044
pC27BN-3	2.133	0.111
pC27BN-4	1.667	0.111
pC27BN-5	9.000	0.667
pC27BN-6	1.200	0.067
pC27BN-7	5.133	0.511
pC27BN-8	9.667	0.444
pC27BN-9	1.833	0.111
pC27BN-10	7.567	0.156
pC27BN-11	8.100	0.067

Примечания: вектор, использованный для трансформации – pC27BN. 1-11 – номера линий трансгенных растений. Средняя оптическая плотность представлена в оптических единицах.

Согласно полученным нами данным, представленным в таблице 1, нуклеазная активность растений, экспрессирующих ген нуклеазы *Serratia marcescens*, более чем в 6 раз превышает таковую у контрольных растений, в то

время как активность листовых экстрактов растений, экспрессирующих ген панкреатической нуклеазы быка, достоверно не отличается от контроля. Мы предположили, что возможно отсутствие значительного прироста нуклеазной активности у линий трансгенного табака pGSH160BN-25 и pGSH160BN-27 связано с дефектами использованного вектора pGSH160.

Как можно видеть из представленных в таблице 2 данных, уровень нуклеазной активности грубых листовых экстрактов трансгенных растений табака, полученных с использованием конструкции pC27BN, выше уровня активности в листовых экстрактах контрольных растений. Так, нуклеазная активность экстрактов линий pC27BN-5 и pC27BN-8 более чем в 10 раз превышает активность экстрактов контрольных растений. Таким образом, нами были получены трансгенные растения, экспрессирующие ген панкреатической рибонуклеазы быка и характеризующиеся повышенным уровнем нуклеазной активности.

Из того, что трансгенный продукт функционально активен, можно заключить, что трансгенные белки корректно процессыруются и секрециируются. Мы дополнительном проанализировали локализацию трансгенного продукта для линии растений pC27BN. Нами были получены экстракты межклеточной жидкости и сопоставлена нуклеазная активность этих экстрактов с активностью грубых экстрактов и остаточной активностью фракции дебриса. Результаты эксперимента представлены в таблице 3.

Таблица 3. Локализация нуклеазной активности в трансгенных растениях табака, экспрессирующих ген панкреатической рибонуклеазы быка.

Линии растений	OD, гр. экстракт	OD, апопласт	OD, дебрис
Контроль	0.833	0.500	0.300
pC27BN-1	2.783	2.300	1.300
pC27BN-3	2.133	2.400	1.100
pC27BN-4	1.667	1.900	1.100
pC27BN-8	9.667	12.00	1.400
pC27BN-10	7.567	8.000	1.400
pC27BN-11	8.100	7.100	1.400

Примечания вектор, использованный для трансформации – pC27BN 1-11 – номера линий трансгенных растений. Средняя оптическая плотность представлена в оптических единицах. Апопласт – нуклеазная активность в апопластной фракции, дебрис – остаточная нуклеазная активность грубых экстрактов, полученных после вымывания апопластной фракции.

Как следует из таблицы 3, основной прирост нуклеазной активности наблюдается именно во фракции межклеточной жидкости. В случае линии pC27BN-8, нуклеазная активность экстракта апопласта в 24 раза выше активности экстракта контроля и в 9 раз выше остаточной нуклеазной активности дебриса. Таким образом, мы можем сделать вывод, что трансгенные растения, полученные с использованием вектора pC27BN, не только экспрессируют ген панкреатической нуклеазы быка, но и активно секретируют трансгенный белок.

Мы оценили количественно содержание трансгенного продукта в экстрактах растений табака линий pC27BN в процентах к суммарному растворимому белку. Для этого мы добавляли препарат коммерческой панкреатической рибонуклеазы быка к экстрактам нетрансгенного табака и оценивали прирост нуклеазной активности по методике, описанной выше. Для линий pC27BN-5, pC27BN-8, pC27BN-10 и pC27BN-11, экспрессирующих ген рибонуклеазы быка на высоком уровне, содержание трансгенного продукта составляло 0.02-0.04% по отношению к суммарному растворимому белку.

В целом, высокий уровень нуклеазной активности в экстрактах полученных нами трансгенных растений табака не сопровождался видимыми изменениями фенотипа, сроков развития и плодовитости, что позволило нам сделать вывод о возможности использования полученных модельных конструкций для модификации других видов растений с целью повышения уровня экстраклеточной нуклеазной активности.

4. Анализ спектра белков с нуклеазной активностью с помощью электрофореза в SDS-полиакриламидном activity-геле.

Мы проанализировали полученные нами трансгенные растения табака на присутствие в них белкового продукта, соответствующего по подвижности продукту привнесенного гена, в SDS-полиакриламидном activity-геле с добавлением субстрата (в нашем случае РНК) в матрикс разделяющего геля. Результаты эксперимента представлены на рисунке 4.

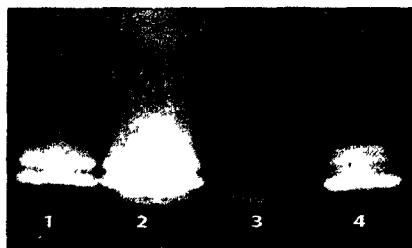


Рисунок 4 Анализ нуклеазной активности трансгенных и контрольных растений табака в SDS-полиакриламидном геле с добавлением РНК в матрикс разделяющего геля. Нанесения по дорожкам: 1 – грубый экстракт трансгенного растения линии pC27BN-8, 10 мкг; 2 – грубый экстракт трансгенного растения линии pC27BN-8, 50 мкг; 3 – грубый экстракт нетрансгенного растения табака, 50 мкг, 4 - панкреатическая рибонуклеаза быка, коммерческий препарат.

Как видно из рисунка 4, в трансгенных растениях табака, экспрессирующих ген рибонуклеазы быка, присутствуют две дополнительных нуклеазных активности. По подвижности эти активности соответствуют двум (из четырех различимых на форезе) изоформам коммерческого препарата панкреатической рибонуклеазы. Интенсивность полос на форезе подтверждает десятикратное увеличение нуклеазной активности в трансгенных табаках линий pC27BN 5, 8, 10 и 11 по сравнению с контролем.

На рисунке 5 можно увидеть, что в трансгенных растениях табака, экспрессирующих ген нуклеазы *Serratia marcescens*, также присутствует дополнительная активность, соответствующая по подвижности коммерческому препаратору нуклеазы *Serratia marcescens*. Как следует из фореграммы, активность бактериальной нуклеазы заметно меньше активности панкреатической рибонуклеазы быка.

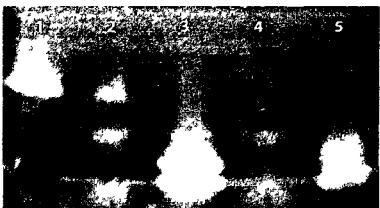


Рисунок 5. Анализ нуклеазной активности трансгенных и контрольных растений табака в SDS-полиакриламидном геле с добавлением РНК в матрикс разделяющего геля Нанесения по дорожкам 1 – нуклеаза *Serratia marcescens*, коммерческий препарат, ~ 26 kDa; 2 – грубый экстракт трансгенного табака линии pC27SMN-12, 3 – грубый экстракт трансгенного табака линии pC27BN-11; 4 – грубый экстракт нетрансгенного растения табака; 5 – панкреатическая рибонуклеаза быка, коммерческий препарат, ~ 14 kDa

Суммируя все проведенные нами эксперименты можно сказать, что неспецифическая нуклеаза *Serratia marcescens*, продуцируемая трансгенными растениями табака, значительно менее активна, менее стабильна и/или хуже секрециируется, чем продуцируемая растениями панкреатическая рибонуклеаза быка.

5. Анализ полученных трансгенных растений табака на устойчивость к вирусу табачной мозаики (ВТМ).

Мы проанализировали полученные трансгенные растения табака на устойчивость к вирусу табачной мозаики (ВТМ). Анализ был проведен на базе БПИ ДВО РАН. Для анализа были использованы растения табака второго поколения от самоопыления линии pC27BN, для которых blot-гибридизацией и анализом расщепления маркерного гена NPT II в поколениях было показано наличие одной встройки целевого гена. Трансгенные и контрольные растения были инокулированы различными концентрациями ВТМ. Было протестировано проявление симптомов инфекции и накопление вирусного антигена (капсидного белка). Результаты эксперимента представлены в таблице 4.

Мы обнаружили, что накопление вирусного антигена в трансгенных растениях существенно снижено по сравнению с контрольными, а симптомы болезни развивались со значительной задержкой или полностью отсутствовали в зависимости от концентрации вируса в инокулюме. В целом, при низких и физиологических концентрациях вируса в инокулюме (0.01-0.1 мкг/мл) трансгенные растения характеризовались отсутствием или существенной задержкой накопления вируса и проявления симптомов инфекции по сравнению с контрольными. При высоких концентрациях вируса (10 мкг/мл) различия

между контрольными и трансгенными растениями становились менее заметными на поздних стадиях (14-28 DAI – дней после инфицирования) инфекции.

Таблица 4. Проявление симптомов и содержание ВТМ-антитела в листьях контрольного и трансгенного табака в зависимости от концентрации ВТМ в инокулюме и DAI (days after infection) – дней после инфицирования.

Линии	Концентрация ВТМ в инокулюме, мкг/мл				
	0.001	0.01	0.1	1	10
7 DAI					
SR1	0	0	19.1±1.2	33.4±2.1	93.4±2.6
11-2	0	0	0	0	0
11-3	0	0	0	8.9±1.6	19.7±2.1
11-8	0	0	0	0	0
11-10	0	0	0	0	24.8±1.3
14 DAI					
SR1	0 ⁻	0 ⁻	59.9±4.4 ⁺	100.0±4.2 ⁺	162.4±2.5 ⁺
11-2	0 ⁻	0 ⁻	0 ⁻	70.1±3.3	127.4±6.8 ⁺
11-3	0 ⁻	0 ⁻	0 ⁻	31.8±2.2	86.0±4.4 ⁺
11-8	0 ⁻	0 ⁻	0 ⁻	41.4±2.0	76.4±3.1 ⁺
11-10	0 ⁻	0 ⁻	0 ⁻	65.3±4.1 ⁺	59.9±2.9 ⁺
21 DAI					
SR1	0 ⁺⁺	29.3±3.6 ⁺	146.5±6.4 ⁺	125.8±8.4 ⁺	191.1±5.3 ⁺
11-2	0 ⁻	0 ⁻	0 ⁻	103.5±6.4 ⁺	136.9±6.0 ⁺
11-3	0 ⁻	0 ⁻	0 ⁻	87.6±5.9 ⁺	149.7±4.8 ⁺
11-8	0 ⁻	0 ⁻	0 ⁻	74.8±3.4 ⁺	133.8±2.7 ⁺
11-10	0 ⁻	0 ⁻	11.5±2.3 ⁺	95.5±5.1 ⁺	121.0±3.5 ⁺

Примечания: - симптомы отсутствовали; + симптомы присутствовали; -- симптомы отсутствовали даже на 28 DAI; -+ симптомы были зафиксированы только на 28 DAI.
Накопление антигена приведено в мкг на см² листовой поверхности.

Итак, мы показали, что полученные нами трансгенные растения табака, экспрессирующие ген панкреатической рибонуклеазы быка, более устойчивы к инфекции вирусом табачной мозаики. Судя по литературным данным, это устойчивость высокого уровня, поскольку она проявляется в отсутствии или существенной задержке появления мозаичных симптомов инфекции и накопления вирусного антигена. Уровень полученной у трансгенных растений устойчивости зависит от концентрации вируса в инокулюме. Мы предполагаем, что экстраклеточные рибонуклеазы могут прямо гидролизовать геномную РНК

вируса табачной мозаики на некоторых стадиях инфекционного процесса. С другой стороны, возможно, что экстраклеточные нуклеазы проникают в поврежденные в процессе инфицирования и поранения клетки, что приводит к гибели как вируса, так и клетки. Только в случае, если концентрация вируса в инокулюме достаточно высока, ВТМ преодолевает нуклеазный барьер. Наши экспериментальные данные находятся в соответствии с опубликованными ранее сообщениями об антивирусном эффекте гетерологичных нуклеаз при их введении в экстраклеточное пространство растений (Атабеков и др., 1990; Gergerich and Scott, 1988; Wolf, 1991; Galiana et al., 1997).

Повышение уровня экстраклеточной нуклеазной активности, вероятнее всего, усиливает уже существующую у растений систему защиты от вирусных и грибных патогенов, проявляющуюся в увеличении активности S-подобных экстраклеточных рибонуклеаз (Galiana et al., 1997; Hugot et al., 2002; LeBrasseur et al., 2002). Как известно, многие растительные экстраклеточные рибонуклеазы индуцируются поранением (Ye and Droste, 1996; Kariu et al., 1998; LeBrasseur et al., 2002) и вообще не детектируются в неповрежденных тканях растений, что дает основания считать их PR-белками, неиндуцируемыми салициловой кислотой и связанными с индукцией системной устойчивости IRN-типа. Кроме того, по крайней мере одна из S-подобных экстраклеточных рибонуклеаз табака индуцируется также и салициловой кислотой (Galiana et al., 1997; Hugot et al., 2002), что делает возможным участие этих ферментов в формировании SAR.

Полученное в данной диссертационной работе доказательство того, что повышение экстраклеточной нуклеазной активности, привносимое гетерологичными ферментами, повышает вирусоустойчивость растений, позволяет выдвинуть предположение об участии собственных экстраклеточных нуклеаз в формировании индуцируемой противовирусной устойчивости высших растений.

В настоящее время вирусы являются одним из основных источников потерь урожая сельскохозяйственных растений и создание устойчивых к вирусам сортов генно-инженерными методами - одна из актуальных проблем как молекулярной биологии, так и биотехнологии. Основной стратегией повышения устойчивости растений к вирусным инфекциям является генерация устойчивости патогенного происхождения (*pathogen-derived resistance* - PDR) (Powell-Abel et al., 1986). Попытки создания трансгенных растений, устойчивых к широкому спектру вирусов, в рамках данной стратегии успеха не имели

Существует несколько успешных стратегий создания растений, устойчивых к широкому спектру вирусных инфекций. Одна из них заключается в экспрессии генов интерферон-индуцируемой 2'-5'-олигоаденилатной противовирусной системы млекопитающих (Truve et al., 1993; 1994; Honda et al., 2003), но уровень возникающая в этом случае устойчивости невысок. Второй стратегией является экспрессия генов белков, инактивирующих рибосомы (Lodge et al., 1993; Wang et al., 1998; Vandenbussche et al., 2004), но общезвестна токсичность рибосом-инактивирующих белков (они избирательно повреждают рРНК 60S-субъединицы эукариотической рибосомы).

Нами предложена новая стратегия повышения устойчивости растений к широкому спектру вирусов с использованием методов генной инженерии:

экспрессия в растениях генов секреторных нуклеаз. К безусловным плюсам этой стратегии относится неспецифический характер и достаточно высокий уровень генерируемой таким образом устойчивости.

При использовании генов нуклеаз также возникает вопрос о цитотоксичности данных ферментов. Было предложено несколько вариантов решения этой проблемы. Во-первых, использовать гены рибонуклеаз, избирательно гидролизующих только двуцепочечный субстрат, и потому нетоксичных для большинства внутриклеточных РНК, за исключением вирусных репликативных интермедиатов (Watanabe et al., 1995; Sano et al., 1997). Во-вторых, использовать мутантные гены, лишенные ферментативной активности, но сохранившие способность связывать РНК (Zhang et al., 2001). И в том, и в другом случае авторы продемонстрировали генерацию высокой устойчивости в трансгенных растениях, выражющуюся в отсутствии проявления симптомов инфекции и снижении накопления зрелых вирионов.

Нами предложен третий вариант решения проблемы цитотоксичности нуклеаз: использование для трансгена генов секреторных нуклеаз, чья активность проявляется исключительно в апопласте растений. Кроме того, количественная оценка содержания панкреатической рибонуклеазы быка, проведенная нами, показала, что даже в наиболее высокоэкспрессирующих трансгенных линиях количество гетерологичной нуклеазы не превышает 0,04% от суммарного растворимого белка. Для сравнения можно заметить, что количество отдельных PR-белков при формировании SAR может достигать 1% суммарного растворимого белка (Heil and Bostock, 2002). Это означает, что продукция трансгенной панкреатической рибонуклеазы не является слишком большой нагрузкой для клеток растений, что и отражается в отсутствии задержки роста и развития полученных нами трансгенных растений. Насколько нам известно, это первая работа о получении вирусоустойчивых трансгенных растений, экспрессирующих гены гетерологичных секреторных нуклеаз.

6. Получение и анализ трансгенных растений картофеля *Solanum tuberosum L.*

Для проверки предложенной стратегии нами был получен трансгенный картофель сортов Белоярский ранний и Каприз. Для этого эксперимента был использован ген нуклеазы *S marcescens* из-за способности данного фермента гидролизовать двуцепочечную РНК. Кроме вирусов, для картофеля большой проблемой является инфицирование вироидом веретеновидности клубней. Геномная РНК вироида сильно структурирована и в основном находится в двуцепочечной форме. Создание вироидоустойчивых сортов картофеля является трудной биотехнологической задачей (Hammond, 1997).

Трансгенный картофель был получен методом трансформации клубневых дисков. Полученные трансформанты были проанализированы на экспрессию маркерного гена. Результаты эксперимента представлены на рисунке 6.



Рис. 6. Активность маркерного гена неомицинфосфотрансферазы II (*nptII*) в экстрактах трансгенных и контрольного растений картофеля сорта Белоярский Ранний Нанесения по дорожкам: 1 - экстракт нетрансгенного растения картофеля; 2 - экстракт трансгенного растения картофеля линии pC27SMN-b4; 3 - экстракт трансгенного растения картофеля линии pC27SMN-b5; 4 - экстракт трансгенного растения картофеля линии pC27SMN-b7; 5 - экстракт трансгенного растения картофеля линии pC27SMN-b8; 6 - экстракт трансгенного растения картофеля линии pC27SMN-b11.

Трансформанты были также проанализированы на наличие встройки в геноме методом blot-гибридизации геномной ДНК. В качестве зонда был использован ген нуклеазы *Serratia marcescens*, полученный с помощью полимеразной цепной реакции на векторе pC27SMN.

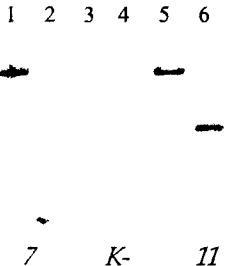


Рис. 7. Саузерн blot-гибридизация негидролизованной геномной ДНК (дорожки 1, 3 и 5) и EcoRI-гидролизатов геномной ДНК (дорожки 2, 4 и 6) контрольного и трансгенных растений картофеля линий pC27SMN-b7 и pC27SMN-b11

Из рисунка 6 видно, что все проанализированные линии экспрессируют маркерный ген неомицинфосфотрансферазы II. Рисунок 7 демонстрирует, что линии pC27SMN-b7 и pC27SMN-b11 имеют по одной инсерции в геномной ДНК.

Был проведен анализ полученных трансгенных растений картофеля на наличие повышенного уровня нуклеазной активности. Результаты данного эксперимента приведены в таблице 5.

Таблица 5 Нуклеазная активность листовых экстрактов трансгенных растений картофеля, экспрессирующих ген нуклеазы *Serratia marcescens*

Линии растений	Средняя OD	Стандартная ошибка
Контроль	0.980	0.125
PC27SMN-b4	2.999	0.369
PC27SMN-b5	3.035	0.356
PC27SMN-b7	3.123	0.243
PC27SMN-b8	2.655	0.172
PC27SMN-b11	2.650	0.074
PC27SMN-k1	1.863	0.327
PC27SMN-k2	2.338	0.431

Примечания: вектор, использованный для трансформации – pC27SMN b4, b5, b7, b8, b11 - линии трансгенного картофеля сорта Белоярский ранний, k1 и k2 – линии трансгенного картофеля сорта Каприз. Средняя оптическая плотность представлена в оптических единицах.

Из приведенных в таблице 5 данных видно, что нуклеазная активность грубых листовых экстрактов трансгенного картофеля достоверно отличается от нетрансгенного. В среднем, уровень нуклеазной активности в экстрактах трансгенных растений в 2-3 раза выше, чем в экстрактах контрольных растений. Следует отметить, что повышенный уровень нуклеазной активности в целом не сопровождался видимыми изменениями фенотипа и темпов роста, как и в случае растений трансгенного табака. В настоящее время полученный нами трансгенный картофель тестируется на вирусоустойчивость.

Выводы:

1. Созданы генетические конструкции, несущие гены нуклеазы бактерии *Serratia marcescens* и панкреатической рибонуклеазы быка.
2. Впервые получены трансгенные растения табака и картофеля, экспрессирующие гены гетерологичных секреторных нуклеаз и характеризующиеся нуклеазной активностью, повышенной по сравнению с нетрансгенным контролем в 2-10 раз.
3. Показано, что трансгенные растения табака, экспрессирующие панкреатическую рибонуклеазу, характеризуются высокой вирусоустойчивостью. При концентрации вируса в инокулюме от 0,01 до 0,1 мкг/мл трансгенные растения не проявляли симптомов заражения, что позволяет сделать вывод об участии секреторных нуклеаз в формировании противовирусного иммунитета растений.
4. Высокая вирусоустойчивость в сочетании с отсутствием видимых фенотипических отклонений позволяет использовать полученные трансгенные растения в качестве модельной системы для изучения молекулярных механизмов неспецифической устойчивости высших растений к патогенам.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Кочетов А.В., Шакирова Н.В., Лукашева В.В., Комарова М.Л., Пилюгин М.В., **Трифонова Е.А.**, Дейнеко Е.В., Ривкин М.И., Шумный В.К. Экспрессия модельных бицистронов в трансгенных растениях // Докл. Акад. Наук. 1996. Т.349. N.4. С.549-552.
2. **Трифонова Е.А.**, Кочетов А.В., Шумный В.К. Роль нуклеаз в физиологических процессах высших растений // Успехи совр. биол. 2000. Т.120. С.395-405.
- 3 **Трифонова Е.А.**, Комарова М.Л., Сырник О.А., Кочетов А.В., Шумный В.К. Трансгенные растения табака *Nicotiana tabacum* SR1, экспрессирующие нуклеазу *Serratia marcescens* // Генетика. 2002. Т.38. С.274-277
4. Кочетов А.В., Титов С.Е., Колодяжная Я.С., Комарова М.Л., Коваль В.С., Макарова Н.Н., Илинский Ю.Ю., **Трифонова Е.А.**, Шумный В.К Повышение содержания пролина и осмотического давления клеточного сока у трансформантов табака, несущих антисмысловой супрессор гена пролиндегидрогеназы // Генетика. 2004. Т.40.С. 282-285.
- 5 **Трифонова Е.А.**, Комарова М.Л., Леонова Н.С., Щербань А.Б., **Кочетов А.В.**, Малиновский В.И., Шумный В.К. Трансгенные растения картофеля *Solanum tuberosum* L., экспрессирующие ген секреторной нуклеазы *Serratia marcescens* // Доклады РАН. 2004. Т.394.С. 411-413.
6. **Трифонова Е.А.**, Кочетов А В., Комарова М.Л., Шумный В.К., Малиновский В.И., Сапоцкий М.В. Способ получения трансгенных растений, устойчивых к вирусной инфекции. Заявка № 2005130280 от 28.09.2005.

Подписано к печати 28.03.2006 г.
Формат бумаги 60 x 90 1/16. Печ. л. 1. Уч. изд. л. 0,7.
Тираж 100 экз. Заказ 40.

Ротапринт Института цитологии и генетики СО РАН
630090, Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 10.

2006A
7464

#-7464