

ПРИДАНИЕ РАСТЕНИЯМ УСТОЙЧИВОСТИ К ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ ПУТЕМ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ОБРАБОТКИ КОРОТКИМИ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИМИ РНК

© 2017 г. М. Ю. Сутула¹, А. Ж. Акбасова, Т. М. Ергалиев,
Ж. А. Нурбекова, Г. С. Мукиянова, Р. Т. Омаров

Евразийский Национальный университет им. Л.Н. Гумилева, Казахстан, г. Астана

Поступила в редакцию 11.05.2016 г.

РНК-интерференция (РНК-и) является одним из ключевых защитных механизмов, направленных против вирусных инфекций в растениях и других организмах. При этом в растениях, пораженных вирусами, образуются короткие интерферирующие РНК (киРНК) из двухцепочечных репликативных форм вирусных молекул РНК. Данные киРНК программируют один из базовых компонентов РНК-и – РНК-индуцированный комплекс замолкания генов (RISC от *RNA induced silencing complex*) на сиквенс-специфичное уничтожение РНК вируса. Вирусный белок Р19 является супрессором РНК-и и способен к захвату образующихся киРНК до их связывания с RISC. Нами показано, что предварительное внесение (до заражения вирусом) в листья растений *Nicotiana benthamiana* Domin. киРНК, элюированных из комплекса Р19-киРНК от пораженного растения, уменьшает поражение при протекании инфекции, вызванной вирусом кустистой карликовости томатов в инокулированных растениях. Экзогенное внесение супрессор-ассоциированных киРНК приводит не только к уменьшению аккумуляции вируса, но и к выживанию инфицированных растений. Таким образом, установлено, что предварительное внесение вирусных киРНК повышает устойчивость растений к вирусной инфекции путем раннего программирования RISC и активации защитного действия РНК-и.

Ключевые слова: *Nicotiana benthamiana* – РНК-интерференция – киРНК – гель-хроматография – комплекс Р19/киРНК

DOI: 10.7868/S0015330317060100

ВВЕДЕНИЕ

С развитием молекулярной биологии и биотехнологии было открыто множество классов некодирующих РНК, играющих важную роль в регуляции различных биохимических процессов [1]. Из всех типов некодирующих РНК наибольшее внимание привлекают короткие интерферирующие РНК (киРНК) и микро РНК (миРНК). Данные РНК участвуют в регуляции экспрессии генов и могут быть использованы для разработки инновационных лекарств и противовирусных препаратов. Так, потенциал киРНК и миРНК в данной области был продемонстрирован при лечении различных патологий, в том числе раковых

опухолей [2–4] и инфекционных заболеваний [5–7]. Способность киРНК обеспечивать избирательную нейтрализацию строго определенных транскриптов служит основой механизма высокоспецифичной защитной РНК-интерференции (РНК-и) растений от вирусов.

В растительных клетках РНК-интерференция играет важную роль в защите от РНК- и ДНК-содержащих вирусов [8–10]. При вирусном инфицировании растения, фермент Dicer распознает и разрезает длинные двухцепочечные РНК (дцРНК) вируса на короткие интерферирующие РНК (киРНК) [11–15]. Ведущая цепь киРНК включается в состав РНК-индуцированного комплекса замолкания генов (RISC от *RNA induced silencing complex*), программируя на деградацию комплементарной цепи РНК вируса [9, 16]. Большинство известных вирусов растений кодируют специфические белки, способные блокировать РНК-и путем подавления данного защитного механизма на различных его этапах. Структурные особенности вирусных супрессоров обуславливают их специфические функции в эффективном подавлении РНК-и [8, 10, 17].

¹ **Сокращения:** Р19 – вирусный белок супрессор; RISC – РНК-индуцированный комплекс замолкания генов (от *RNA induced silencing complex*); Ago – белок аргонавт; РНК-и – РНК-интерференция; киРНК – короткие интерферирующие РНК; миРНК – микро РНК; ВККТ – вирус кустистой карликовости томатов.

¹ **Адрес для корреспонденции:** Максим Юрьевич Сутула. 010000 Казахстан, г. Астана, ул. Сатпаева, 2, учебно-административный (главный) корпус ЕНУ. Электронная почта: max.sutula@gmail.com

Вирусы из семейства *Tombusviridae* экспрессируют белок с молекулярным весом 19 кДа (P19), который выступает в качестве супрессора РНК-и [11, 17–22]. Белок P19 образует гомодимер с помощью водородных связей, а также гидрофобных взаимодействий и солевых мостиков [19, 20]. В таком виде P19 размер-специфически связывается с дуплексами кРНК (21–23 нт) с высокой степенью афинности. Белок P19 в растении существует в виде димера и связывается с дуплексами кРНК [24], тем самым блокируя программирование RISC. В результате происходит аккумуляция вирусных РНК, и, как следствие, успешное развитие вирусной инфекции [8, 19, 20].

Молекулярные механизмы связывания супрессора P19 с кРНК были исследованы с помощью рентгеноструктурного анализа комплексов между P19 белком и дуплексами кРНК размером 21 нт. Конформационная структура гомодимера P19 позволяет связывать кРНК дуплексы посредством формирования ионных связей между положительно заряженными аминокислотами белка и 5'-фосфатными группами кРНК. Концевые взаимодействия с липкими концами кРНК блокируют два остатка триптофана (Trp39 и Trp42) в результате укладки активных пар оснований на концах кРНК дуплекса [19, 20]. Высокая афинность белка P19 к кРНК позволяет выделить данные молекулы РНК в чистом виде путем иммуноосаждения вирусного супрессора. Данная возможность представляется перспективным методическим подходом для исследования защитных функций вирусных кРНК и их использования как противовирусного препарата.

Методы, основанные на применении кРНК, представляют собой введение кРНК в клетки-мишени для раннего запуска механизма защитной РНК-и с последующим ингибированием экспрессии специфической мРНК [25].

Целью данной работы было выделение вирусного супрессора P19 в комплексе с вирусными кРНК для последующей диссоциации последних и изучения их протекторной функции. Показано, что экзогенное внесение супрессор-ассоциированных кРНК приводит к уменьшению аккумуляции вируса и к дальнейшему частичному восстановлению растений. Таким образом, нами показано, что внесение вирусных кРНК до заражения вирусом повышает устойчивость растений к инфекции путем раннего программирования RISC и запуска механизма РНК-и.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сведения об объекте исследования и о структуре эксперимента. В качестве объекта исследования были использованы растения *Nicotiana benthamiana* из семейства Пасленовых (*Solanaceae*), сек-

ция *Suaveolentes*, автор классификации Karel Domin. Растения выращивали в ростовой камере с влажностью воздуха 85% и температурой 25°C, при 16-часовом световом дне. При посеве, пересеве и выращивании растений было использовано одинаковое количество почвы и воды для полива каждого растения. В каждом эксперименте было использовано 60 растений и проведено в трех биологических повторностях при одинаковых условиях.

Для инокуляции растений был использован дикий штамм вируса кустистой карликовости томатов (ВККТ). Плазмиду, содержащую кДНК данного вируса, а также специфические к P19 антитела предоставил Herman B. Scholthof (Department of Plant Pathology and Microbiology and Intercollegiate Faculty of Virology, Texas A&M University, 2132 TAMU, College Station, Texas 77843).

Инокуляцию ВККТ и введение кРНК в клетки растений проводили механическим методом путем инъектирования вирусной РНК в листовую пластину в количестве 5 нг/мл в 50 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7.5).

Эксперименты были проведены по следующей схеме:

1. Выращивание растений *N. benthamiana*.
2. Инокуляция растений вирусной РНК ВККТ.
3. Выделение комплексов P19-кРНК из тканей зараженных растений при помощи колоночной гель-фильтрации с последующей очисткой методом иммунопреципитации.
4. Определение условий мягкого разделения комплекса P19-кРНК путем повышения ионной силы раствора с целью получения очищенной кРНК.
5. Обработка растений *N. benthamiana* полученными кРНК и изучение их влияния на иммунную систему растений.

Хроматография комплекса P19/кРНК. Свежий листовый материал зараженных ВККТ растений *N. benthamiana* (5 дней после инокуляции) в количестве 4 г гомогенизировали в буфере для экстракции (200 мМ Трис-НСl, 5 мМ дитиотреитол (ДТТ), рН 7.5). Экстракты фильтровали и центрифугировали 15 мин при 14000 g и 4°C. Супернатант был загружен в колонку объемом 0.5 л, длиной 1.5 м и фракционирован на хроматографической установке Pharmacia (Швеция) с постоянной скоростью 40 мл/ч. В качестве неподвижной фазы был использован Сефакрил S200 ("Sigma", США). Фракции элюировали 50 мМ Трис-НСl буфером (рН 7.5). Анализ белка проходил при длине волны A_{280} нм. С помощью голубого декстрана 1000 ("Sigma", США) был определен свободный объем колонки $V_0 = 150$ мл. Система была откалибрована с помощью маркерных белков с известной молекулярной массой: алкоголь дегид-

рогеназа — 150 кДа, бычий сывороточный альбумин — 68 кДа, углерод ангидраза — 40 кДа и цитохром — 12 кДа (“Sigma”, США). На основании полученных данных была построена калибровочная кривая.

Полученные фракции были собраны с помощью автоматического коллектора в объеме 2 мл с последующим переносом на лед. Для того чтобы определить количество КС1, необходимое для разрыва ионных связей между Р19 белком и кРНК, было проведено градиентное элюирование с повышением концентрации соли до 2 М КС1 в Трис-НС1 буфере.

Иммуноблоттинг. Концентрацию белка в образцах измеряли с помощью спектрального анализатора (“BioRad”, США) при длине волны A_{595} нм по стандартному методу Bradford [26]. Равные количества белка (2 мкг/мл) из каждого образца были смешаны с SDS-буфером для образцов (200 мМ Трис-НС1, рН 6.8; 4% SDS; 400 мМ β -меркаптоэтанол; 0.01% бромфенол синий; 40% глицерин), выдержаны при температуре 95°C в течение 5 мин и фракционированы в 12% полиакриламидном геле с добавлением 10% SDS. Белки из гелей переносили на нитроцеллюлозные мембраны в течение 2 ч при 4°C при помощи камеры для переноса белков (“BioRad”, США). Мембраны блокировали в буфере TBST (50 мМ Трис-НС1, рН 7.4 и 0.05% Твин-20), содержащем 1% обезжиренное молоко, и затем инкубировали со специфическими кроличьими поликлональными антителами анти-Р19 (1 : 10000). После троекратной промывки мембраны инкубировали 1 ч при комнатной температуре с соответствующими антителами, конъюгированными с щелочной фосфатазой (anti-rabbit IgG, 1 : 10000, “Sigma”, США). Для визуализации полос на мембране был использован субстрат NBT/BCIP (“Sigma”, США).

Иммунопреципитация комплексов Р19/кРНК с помощью Протеин-Г агарозы. Комплексы Р19 белка с молекулами кРНК во фракциях осаждали с помощью специфичного по отношению к лигандам мышинных антител протеина G, связанного с агарозными гранулами, согласно прилагаемой к коммерческому препарату стандартной методике. Фракции в объеме 1.5 мл смешивали с мышинными антителами (1 : 10000, “Sigma”, США) и инкубировали 12 ч при температуре 4°C. Затем добавляли 30 мкл G-protein (“Thermo Scientific”, США) и инкубировали 2 ч при комнатной температуре. К проинкубированной смеси добавляли 500 мкл буфера для иммунопреципитации (25 мМ Трис, 150 мМ NaCl, рН 7.2), осаждали центрифугированием в течение 3 мин, супернатант удаляли. Процедуру осаждения повторяли 3 раза. Для того чтобы элюировать иммунный комплекс, добавляли 50 мкл буфера для элюции (0.2 М глицин-НС1, рН 2.5), инкубировали 5 мин, центри-

фугировали 3 мин при 2500 g. Было собрано 2 фракции супернатанта с каждого образца. Физиологический уровень рН 7.2 в образцах был достигнут добавлением нейтрализующего буфера (1 М Трис).

Качественный анализ на наличие ДНК/РНК (в том числе кРНК) во фракциях методом ПААГ в присутствии мочевины. Наличие кРНК в хроматографических фракциях было показано с помощью электрофореза в 17% полиакриламидном геле в стандартном TBE буфере (89 мМ Трис, 89 мМ борная кислота, 2 мМ ЭДТА) с добавлением 8 М мочевины. Полосы кРНК были окрашены бромистым этидием и детектированы при помощи камеры с ультрафиолетовым излучением GelDoc (“Bio-Rad”, США). В качестве маркера количества нуклеотидов был использован Gene Ruler DNA Ladder, 100 bp (“Thermo Scientific”, США).

Выделение препаративного количества РНК из растительных образцов и хроматографических фракций. Нуклеиновые кислоты были выделены с помощью модифицированного нами метода с использованием TRI реагента (монофазный раствор фенола и гуанидин тиоционата, “Sigma”, США). Для повышения агрегации РНК, концентрация соли в образцах после иммуноосаждения была доведена до 0.8 М КС1. После этого образцы были последовательно смешаны и проинкубированы с TRI реагентом, хлороформом, изопропанолом (100%), этанолом (70%) в течение 5 мин при комнатной температуре и осаждены центрифугированием в течение 10 мин при 12000 g и 4°C. На последнем этапе осадок был высушен на льду и разбавлен свободной от ферментов и РНКаз дистиллированной водой. Полученные препараты были загружены в ПААГ и анализатор NanoDrop с целью определения количества РНК.

Количественный анализ тотального содержания РНК во фракциях. Определение концентрации нуклеиновых кислот по оптической плотности при длине волны A_{260} , а также оценка качества препарата по соотношению оптической плотности при длинах волн $A_{260/280}$ была проведена с помощью спектрального анализатора NanoDrop 2000c (“Thermo Scientific”, США). Для этого образцы РНК, выделенные из хроматографических фракций, были загружены в считывающий модуль прибора с последующим измерением поглощения света при длине волны A_{260} .

Статистический анализ данных. Все экспериментальные работы проводились не менее, чем в трех аналитических повторностях. Каждый вариант был проанализирован в виде трехкратных повторов образцов растительной ткани, взятых минимум из 5 растений. Статистический анализ полученных данных проводился в виде t-теста (t-критерий Стьюдента) с использованием пакета программного обеспечения GraphPad Prism (GraphPad

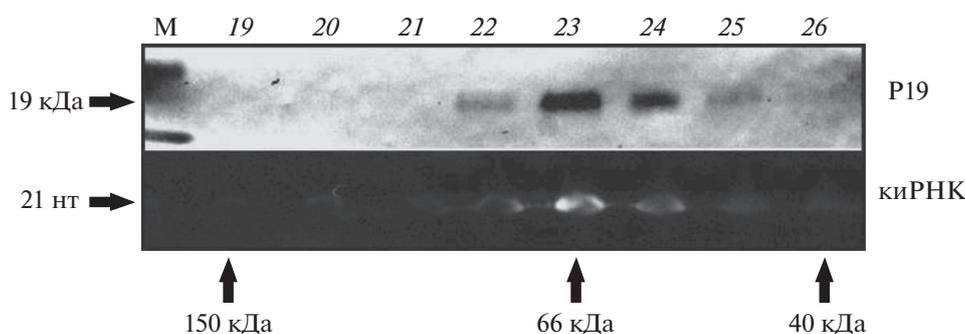


Рис. 1. Анализ хроматографических фракций. Иммуноблоттинг (сверху) на наличие супрессорного белка P19; гель-электрофорез в присутствии мочевины (снизу) для обнаружения 21 нт ВККТ-специфических киРНК; 19–26 – хроматографические фракции; стрелки снизу указывают на молекулярную массу фракции, согласно калибровочному графику хроматографической системы; фракции были выделены из инокулированного ВККТ растительного материала на 5 день после инокуляции (дпи); М – молекулярный маркер.

Software Inc.). Статистически значимыми считались значения при $P < 0.05$. Все данные выражались как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего.

Графические элементы обработаны с помощью компьютерной программы ImageJ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Комплекс вирусного супрессора P19 с киРНК, формирующийся посредством электростатических взаимодействий между белком и фосфатными группами РНК, разрушается при повышении ионной силы

Для оценки молекулярного веса вирусного супрессора экстракты листьев растений *N. benthamiana*, инфицированных ВККТ, были фракционированы с помощью гель-фильтрационной хроматографии на колонке с сефакрилом S-200. Анализ на наличие РНК указал на присутствие киРНК (21–23 нт) во фракциях, содержащих вирусный супрессор. Молекулярный вес элюируемых фракций соответствовал комплексу ~60 кДа. Данная молекулярная масса примерно соответствует суммарной массе P19 димера и связанным с ним киРНК дуплексом (рис. 1).

С целью определения условий для диссоциации комплекса киРНК/P19, экстракты, полученные из зараженных растений, были подвержены фракционированию по описанному выше методу с добавлением соли. Для этого колонка была уравновешена буфером, содержащим KCl в концентрации 0.6 М. В результате фракционирования элюиционный профиль P19 сместился и был локализован во фракциях 44–47, что соответствует молекулярной массе комплекса около 40 кДа (рис. 2). Изменение профиля элюции вирусного белка связано с диссоциацией киРНК от белкового комплекса и, как результат, “уменьшением” его размера. Следовательно, эффективное отсо-

единение киРНК от P19 происходит в результате разрыва электростатических взаимодействий между белком и нуклеиновой кислотой.

Интерпретировать полученные данные позволяют молекулярные свойства P19. На каждом конце P19 димера Trp42 соединяет отдельные мономеры, образуя водородную связь с 5'-фосфорилированным концом дуплекса киРНК. Соседняя аминокислота Arg43 является консервативной у представителей данного семейства вирусов, и ее структурная роль заключается в соединении с другой Trp39, чтобы предотвратить воздействие на поверхности этого гидрофобного остатка. Все вышеперечисленные межмолекулярные взаимодействия, включая связь между мономерами P19, являются электростатическими и легко разрушаются при превышении допустимой концентрации соли в окружающем растворе. Таким образом, под воздействием 0.6 М KCl удалось разрушить водородные связи в комплексе ВККТ P19/киРНК. В результате чего произошло высвобождение киРНК из комплекса без структурных повреждений и потери специфичности.

Для выделения вирусных киРНК хроматографические фракции, содержащие вирусный супрессор (ассоциированный с киРНК), были объединены и подвержены иммунопреципитации с использованием поликлональных антител против белка P19. Таким образом удалось осадить комплекс P19/киРНК, исключив посторонние белковые примеси с идентичной молекулярной массой (рис. 3).

Метод фракционирования на колонке с сефакрилом S-200 до процедуры иммуноосаждения был выбран, поскольку он полностью исключает попадание вирусной РНК в препараты киРНК, которые будут использованы для обработки растений. Дополнительным подтверждением полного удаления геномной вирусной РНК методом гель-фракционирования было отсутствие каких-

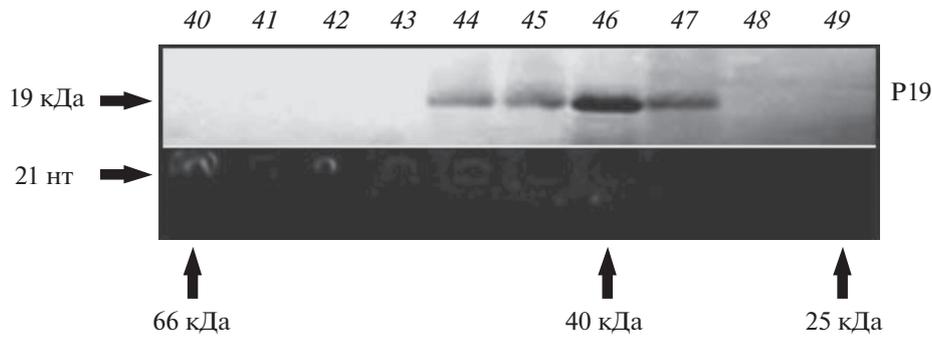


Рис. 2. Анализ хроматографических фракций, полученных с добавлением 0.6 М КСl в элюирующий буфер. Иммуноблоттинг (сверху) на наличие Р19; гель-электрофорез в присутствии мочевины (снизу) для обнаружения 21 нт ВККТ-специфических киРНК; 40–49 – хроматографические фракции; стрелки снизу указывают на молекулярную массу фракции, согласно калибровочному графику хроматографической системы; фракции были выделены из инокулированного ВККТ растительного материала на 5 день после инокуляции (дпи); М – молекулярный маркер.

либо симптомов ВККТ на контрольных растениях, обработанных только киРНК без последующей инокуляции вирионами ВККТ (данные не показаны).

Предварительная киРНК-обработка N. benthamiana замедляет развитие симптомов вирусной инфекции ВККТ

Как было указано выше, система инактивации генов в клетках эукариот происходит при участии коротких РНК. Молекулярное распознавание РНК является ключевым моментом для многочисленных биологических процессов, таких, как транскрипция, репарация, созревание клеточной РНК, а также РНК-и. Одна из ключевых функций РНК-и – это защитные действия против различных вирусов растений.

ВККТ использует одноцепочечную РНК для репликации своего генома в клетке хозяина. При попадании в растительную клетку вирусная РНК дублируется (дцРНК) и разрезается ферментом Dicer на короткие фрагменты, именуемыми киРНК. Затем 21 нт киРНК вовлекаются в RISC, путем связывания специальными каталитическими компонентами – белками аргонавтами (Ago). Все циркулирующие в клетках растения дцРНК ВККТ обнаруживаются RISC и гидролизуются эндонуклеазной активностью Ago [27]. В ходе эволюции вирусы выработали специальные механизмы для подавления защитной РНК интерференции. Белок ВККТ Р19 захватывает антивирусные киРНК, которые генерируются ферментом Dicer в ответ на аккумуляцию репликативных двухцепочечных вирусных РНК в клетки растения. Р19 связывается с высоким сродством и блокирует двухцепочечные короткие интерферирующие РНК (киРНК), предотвращая их участие в последующих стадиях РНК-и. Данное свойство Р19 является основным средством в доступном

арсенале вируса против защитной системы растения. Следовательно, если ввести в растения специфичные к ВККТ киРНК до заражения вирусом и начала экспрессии супрессорного белка Р19, происходит ранняя активация RISC и растение приобретает относительную устойчивость к ВККТ.

Данные спектрального анализа выявили присутствие характерного спектра РНК в образцах, подверженных процедуре иммуноосаждения во фракциях, содержащих Р19 (рис. 4). Применение метода иммуноосаждения комплекса Р19/киРНК гарантирует выделение в очищенном виде вирус-специфичных киРНК. Для исследования протекторной роли вирусных киРНК, растения *N. benth-*

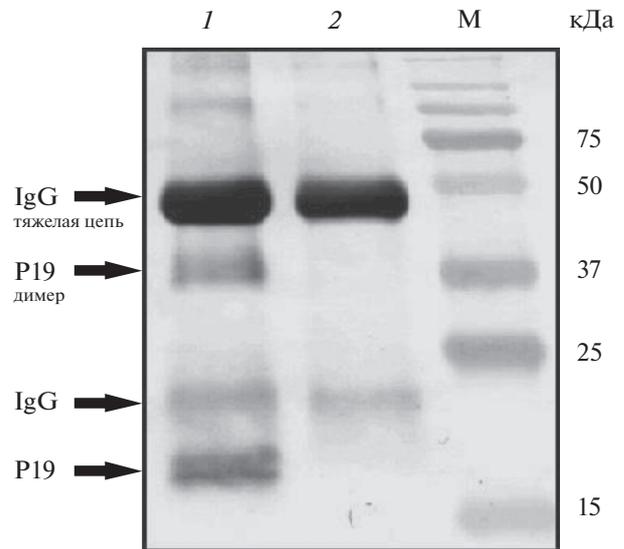


Рис. 3. Иммунопреципитация комплекса Р19/киРНК. 1 – комплекс Р19/киРНК, 2 – здоровое растение, М – белки-маркеры, IgG – иммуноглобулины класса G.

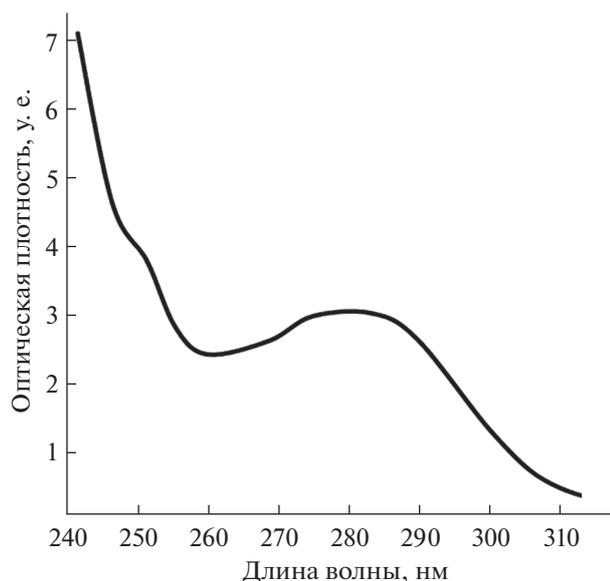


Рис. 4. Спектральный анализ образца, подверженно-го процедуре иммуносаждения во фракции 23, содержащего супрессорный белок Р19. Примечание: эксперимент был проведен в трех независимых повторностях.

atiana (21 день после посадки) были обработаны полученными препаратами киРНК после иммуносаждения.

После внесения экзогенных вирусных киРНК (5 дней после обработки) растения были инокулированы диким типом ВККТ. Через 5 дней по-

сле инфицирования на растениях, не подверженных предварительной обработке вирусными киРНК, появились характерные для ВККТ симптомы: скручивание листьев и развитие апикального некроза. Наличие вирусной инфекции определялось при помощи иммуноблоттинга с использованием антител против вирусного белка Р19 (данные не показаны). Растения, обработанные вирусными киРНК, незначительно отставали в росте от здоровых растений и сохраняли признаки жизнедеятельности даже на 21 день после инокуляции (рис. 5а). Контрольные растения, зараженные только ВККТ, полностью погибли на 14–15 день после инокуляции вирусом (рис. 5). У растений, обработанных киРНК, на 21 день некоторые листья сохраняли жизнеспособность (Рис. 5б). Однако с течением времени листья зараженных растений постепенно отмирали, приводя к некрозу наземной части растения. Более того, в отличие от растений, не подверженных обработке вирусными киРНК, корни “иммунизированных” растений сохраняли жизнеспособность и после перенесенного вирусного заболевания регенерировали наземную часть (рис. 6). Однако данные растения претерпевали значительные морфологические деформации (рис. 6б). Яркое проявление характерных симптомов болезни свидетельствуют о значительном распространении вирусной РНК по клеткам растения-хозяина, в результате чего наземная часть погибает. В природе после заражения вирусом защитные механизмы растения запускаются с задержкой до 5 дней. Именно по этой причине по-

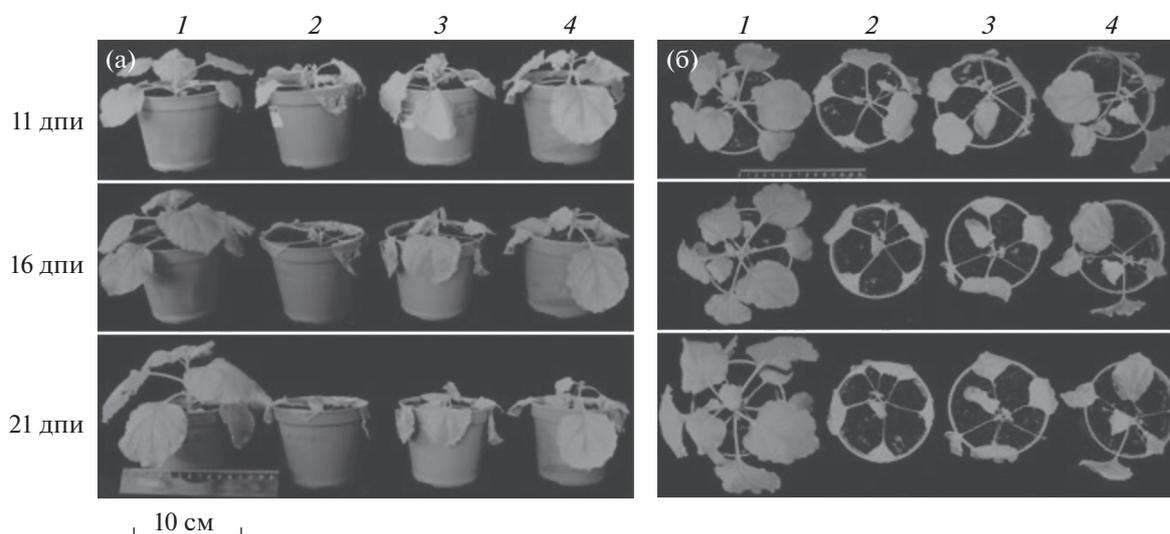


Рис. 5. Профилактический эффект и устойчивость к ВККТ на растениях *N. benthamiana* после применения киРНК с течением времени. а – разница в росте экспериментальных растений, вид спереди; б – разница в количестве живых листьев на экспериментальных растениях, вид сверху. 1 – контрольная группа, здоровые; 2 – контрольная группа, зараженные диким типом ВККТ; 3 – экспериментальная группа, введение 5 нг/мл киРНК и инокуляция ВККТ одних и тех же листьев; 4 – экспериментальная группа, введение 5 нг/мл киРНК и инокуляция ВККТ разных листьев. Слева указано количество дней после инокуляции ВККТ (дпи).

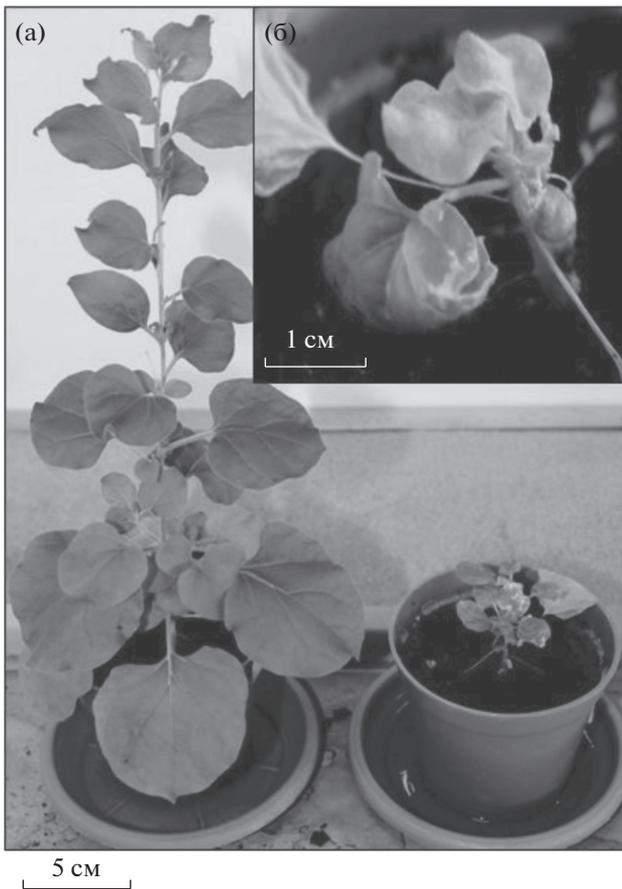


Рис. 6. Оздоровительный эффект применения киРНК на растениях *N. benthamiana* (64 дня после посадки). а – 1 – контрольное, здоровое растение; 2 – обработанное киРНК (30 дней после инокуляции ВККТ); б – растение, перенесшее инфекцию дикого типа ВККТ в увеличенном виде.

явление явных симптомов происходит на 5–7 день после инокуляции вирусом, когда вирусная РНК распространилась по всему растению. Тем не менее, присутствие даже минимального количества специфических к данному вирусу коротких интерферирующих РНК при инфицировании не делает растение толерантным к внедрению вируса, но обеспечивает выживание растения после вирусной инфекции благодаря раннему запуску защитной РНК-интерференции.

Несмотря на значительную степень тяжести протекания симптомов у растений заболевание не приводило к их полной гибели. Очевидно, нам удалось предотвратить блокирование и выведение из процесса РНК-интерференции всех молекул киРНК супрессорным белком Р19.

На рис. 7 показана динамика уменьшения накопления Р19 в цитоплазме растений, предварительно обработанных киРНК. При внедрении вирионов в те же листья, в которые были введены киРНК, накопление Р19 происходило в значи-

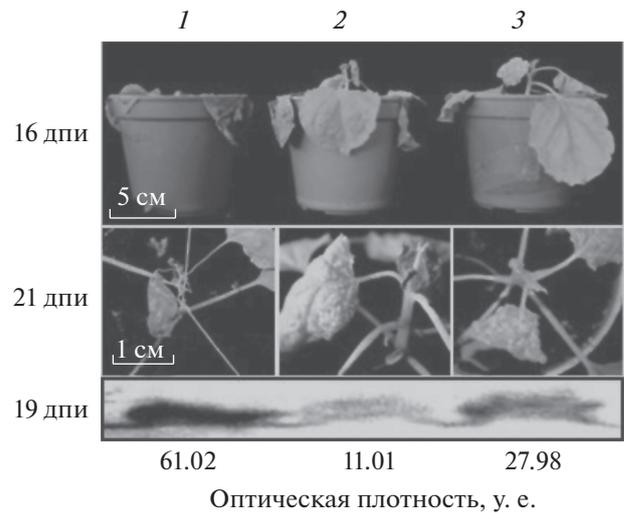


Рис. 7. Динамика снижения накопления супрессорного белка Р19 в растениях после их обработки киРНК. Сверху – экспериментальные растения с симптомами ВККТ на 16 и 21 день после инокуляции (dpi); снизу – иммуноблоттинг со специфическими к Р19 антителами на 21 день после инокуляции. Наблюдается динамика уменьшения накопления Р19 в растительных тканях. 1 – инфицированное ВККТ контрольное растение; 2 – введение киРНК и вирионов ВККТ проводилось в одни и те же листья; 3 – введение киРНК и вирионов ВККТ проводилось в разные листья. Примечание: эксперимент был проведен в трех независимых повторностях. Величина, представленная внизу рисунка – среднее значение из трех повторностей.

тельно меньшей степени, чем при внедрении вирионов в необработанные киРНК листья.

При введении киРНК в различные листья и их инокуляции ВККТ, программирование RISC происходило с задержкой в разных частях растения, что приводило к более обширному распространению вируса по клеткам растения-хозяина, и как следствие, к большему накоплению Р19. Однако разница в накоплении Р19 в растениях на фенотип обработанных киРНК растений существенного влияния не оказывала.

Полученные результаты позволяют с уверенностью утверждать, что обработка молодых растений *N. benthamiana* препаратами, содержащими около 5 нг/мл киРНК специфичных ВККТ, предотвращает полную гибель растения и придает обработанным растениям устойчивость к данному заболеванию.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mattick J.S., Makunin I.V. Non-coding RNA // Hum. Mol. Genet. 2006. V. 15. P. 17–29.
2. Taberero J., Shapiro G.I., LoRusso P.M., Cervantes A., Schwartz G.K., Weiss G.J., Paz-Ares L., Cho D.C., Infante J.R., Alsina M., Gounder M.M., Falzone R.,

- Harrop J., White A., Toudjarska I., Bumcrot D., Meyers R.E., Hinkle G., Svrzikapa N., Hutabarat R.M., Clausen V.A., Cehelsky J., Nochur S.V., Gamba-Vitalo C., Vaishnav A.K., Sah D.W., Gollob J.A., Burris III H.A.* First-in-humans trial of an RNA interference therapeutic targeting VEGF and KSP in cancer patients with liver involvement // *Cancer Discov.* 2013. V. 3. P. 406–417.
3. *Schultheis B., Strumberg D., Santel A., Vank C., Gebhardt F., Keil O., Lange C., Giese K., Kaufmann J., Khan M., Dreys J.* First-in-human phase I study of the liposomal RNA interference therapeutic Atu027 in patients with advanced solid tumors // *J. Clin. Oncol.* 2014. V. 32. P. 4141–4148.
 4. *Bader A.G., Brown D., Stoudemire J., Lammers P.* Developing therapeutic microRNAs for cancer // *Gene Ther.* 2011. V. 18. P. 1121–1126.
 5. *DeVincenzo J., Lambkin-Williams R., Wilkinson T., Cehelsky J., Nochur S., Walsh E., Meyers R., Gollob J., Vaishnav A.* A randomized, double-blind, placebo-controlled study of an RNAi-based therapy directed against respiratory syncytial virus // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. P. 8800–8805.
 6. *Chandra P.K., Kundu A.K., Hazari S., Chandra S., Bao L., Ooms T., Morris G.F., Wu T., Mandal T.K., Dash S.* Inhibition of hepatitis C virus replication by intracellular delivery of multiple siRNAs by nanosomes // *Mol. Ther.* 2012. V. 20. P. 1724–1736.
 7. *Sendi H., Mehrab-Mohseni M., Foureau D.M., Ghosh S., Walling T.L., Steuerwald N., Zamor P.J., Kaplan K.J., Jacobs C., Ahrens W.A., Russo M.W., Clemens M.G., Shrum L.W., Bonkovsky H.L.* MiR-122 decreases HCV entry into hepatocytes through binding to the 3' UTR of OCLN mRNA // *Liver Int.* 2015. V. 35. P. 1315–1323.
 8. *Burgyan J.* Virus induced RNA silencing and suppression: defense and counter defense // *J. Plant Pathol.* 2006. V. 88. P. 233–244.
 9. *Hannon G.J.* RNA interference // *Nature.* 2002. V. 418. P. 244–251.
 10. *Baulcombe D.* RNA silencing in plants // *Nature.* 2004. V. 431. P. 356–363.
 11. *Omarov R.T., Ciomperlik J.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.
 12. *McManus M.T.* Small RNAs and immunity // *Immunity.* 2004. V. 21. P. 747–756.
 13. *Manoharan M.* RNA interference and chemically modified small interfering RNAs // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2004. V. 8. P. 570–579.
 14. *Fire A., Xu S.Q., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* // *Nature.* 1998. V. 391. P. 806–811.
 15. *Bernstein E., Caudy A.A., Hammond S.M., Hannon G.J.* Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference // *Nature.* 2001. V. 409. P. 363–366.
 16. *Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells // *Nature.* 2001. V. 411. P. 494–498.
 17. *Zamore P.D.* Plant RNAi: how a viral silencing suppressor inactivates siRNA // *Curr. Biol.* 2004. V. 14. P. 198–200.
 18. *Molnar A., Csorba T., Lakatos L., Varallyay E., Lacomme C., Burgyan J.* Plant virus-derived small interfering RNAs originate predominantly from highly structured single stranded viral RNAs // *J. Virol.* 2005. V. 79. P. 7812–7818.
 19. *Vargason J.M., Szitty G., Burgyan J., Hall T.M.* Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. *Cell.* 2003. V. 115. P. 799–811.
 20. *Ye K.Q., Malinina L., Patel D.J.* Recognition of small interfering RNA by a viral suppressor of RNA silencing // *Nature* 2003. V. 426. P. 874–878.
 21. *Lakatos L., Szitty G., Silhavy D., Burgyan J.* Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses // *EMBO J.* 2004. V. 23. P. 876–884.
 22. *Scholthof H.B.* The Tombusvirus-encoded P19: from irrelevance to elegance // *Nat. Rev. Microbiol.* 2006. V. 4. P. 405–411.
 23. *Calabrese J.M., Sharp P.A.* Characterization of the short RNAs bound by the P19 suppressor of RNA silencing in mouse embryonic stem cells // *RNA.* 2006. V. 12. P. 2092–2102.
 24. *Silhavy D., Molnar A., Lucioli A., Szitty G., Hornyik C., Tavazza M., Burgyan J.* A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs // *EMBO J.* 2002. V. 21. P. 3070–3080.
 25. *Behlke M.A.* Progress towards in vivo use of siRNAs // *Mol. Ther.* 2006. V. 13. P. 644–670.
 26. *Bradford M.M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254.
 27. *Rand T.A., Petersen S., Du F., Wang X.* Argonaute 2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation // *Cell.* 2005. V. 123. P. 621–629.