
ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ
МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН
MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

Л.Н. ГУМИЛЕВ АТЫНДАҒЫ
ЕУРАЗИЯ ҰЛТТЫҚ
УНИВЕРСИТЕТІ



ЕВРАЗИЙСКИЙ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ
ИМ. Л.Н. ГУМИЛЕВА

L.N. GUMILYOV EURASIAN
NATIONAL UNIVERSITY

ХАБАРШЫ

1995 жылдың қантарынан жылына 6 рет шығады

II бөлім

№ 6 (97) · 2013

ВЕСТНИК

выходит 6 раз в год с января 1995г.

II часть

HERALD

Since 1995

II part

Астана

УДК 578.24

А.Ж. Акбасова, Г.С. Мукиянова

Изучение механизмов супрессии РНК - интерференции Р19 белком

(Евразийский национальный университет им. Л.Н.Гумилева, Астана, Казахстан)

Значение РНК- интерференции заключается в защите против вторгающихся вирусов и в ответе на их действия, в то время когда вирусы «освоили» метод подавления защитных реакции хозяина. Р19 белок экспрессируется томбусвирусами (*tombusvirus*) в качестве супрессора РНК- интерференции и занимается захватыванием маленьких РНК дуплексов, предотвращая при этом индукцию защитных путей. Р19 является размер- специфичным и последовательность-независимым белком, связывающим малые РНК лиганды, которые в свою очередь связаны высоко- аффинной связью с 20-22 нуклеотидной последовательностью. Специфичность связывания р19 и возможность захватывания малых РНК делает его уникальным белковым инструментом для изучения молекулярных механизмов путей РНК- интерференции в различных системах.

Ключевые слова: РНК – интерференция, р19, ВСРІ- вирусные супрессоры РНК - интерференции

Открытие того, что двух цепочечная РНК (дцРНК) в клетках вызывает последовательность- специфичное ингибирование экспрессии гена при помощи РНК- интерференции перевернуло наше понимание об эндогенной регуляции генов и хозяин - патоген взаимодействии [1]. В этой системе, эндогенные и экзогенные предшественники дцРНК являются субстратом ферментов РНКазы III из семейства Dicer, которые порождают малые РНК(мРНК) дуплексы длиной в 21-24 нуклеотидов (нт). Микро РНК (миРНК) - это эндогенные мРНК с ядерным предшественником, которые образуются в цитоплазме [1]. Присутствие миРНК в эукариотической пост- транскрипционной регуляции практически всех генов является критическим, поэтому отклонения в их экспрессии влекут за собой некоторые болезни у людей, включая и рак [2]. В растениях и беспозвоночных РНК- интерференция является противовирусным механизмом защиты, и к тому же, как выяснилось позже, такую же роль она выполняет у позвоночных [3, 4] (Рис.1). Растения экспрессируют некоторые Dicer-Like (DCL) ферменты, как DCL4, которые ответственны за расщепление дцРНК или шпилечные структуры в вирусном геноме, образуя вирус- производные короткие интерферирующие РНК (киРНК), с 21нт последовательностью с 3' 2-х нт. лишним концом и 5' фосфатной группой [4], [5], [6]. МалыеРНК являются эффекторными молекулами РНК – интерференции и вовлеченными в РНК- индуцированный сайленсинг комплекс- RISC (RNA-induced silencing complex) при помощи белков семейства Argonaute (AGO). Растения экспрессируют различные белки Argonaute, но вирус- производимые киРНК изначально связываются с AGO1 или AGO2, для создания анти- вирусного эффекторного комплекса RISC [7,8,9]. RISC связанный с мРНК позволяет специфичное отключение гена, соответствующего последовательности иРНК мишени, при помощи деградации иРНК или ингибировании трансляции [3,10].

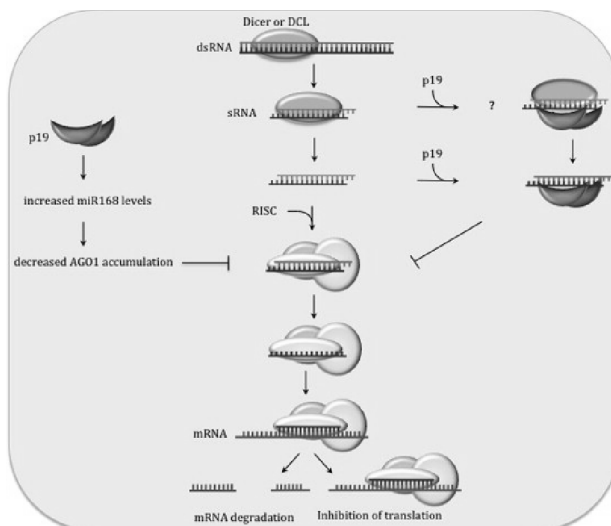


Рисунок 1.- механизм супрессии РНК- интерференции р19 белком семейства *Tombusvirus*

РНК- интерференция и ее супрессия р19 белком семейства *Tombusvirus* Dicer или Dicer – подобные (Dicer-like DCL) ферменты расщепляют дцРНК (dsRNA) в малые РНК дуплексы длиной в 21-24 нт., которые затем связываются с RISC комплексом. RISC комплекс использует одну из цепей дуплекса для поиска специфичной последовательности при помощи нокдауна идентичного ему гена [10]. Р19 это вирусный супрессор РНК- интерференции, который изолирует вирус- продуцируемые мРНК и предотвращает их связь с RISC [11,12]. В результате кинетических исследований предполагается тройной комплекс между Dicer, мРНК и р19 [13]. р19 также выполняет функцию супрессии при помощи предотвращения аккумуляции AGO1, компонента антивирусного RISC комплекса, путем индуцирования аккумуляции микроРНК и микроR168 хозяина, которые затем ингибируют экспрессию AGO1 [13].

Вирусные супрессоры РНК- интерференции

В ответ на РНК- интерференцию все вирусы растения и некоторые насекомые, вирусы млекопитающих развили в себе вирусные супрессоры РНК- интерференции (ВСРИ) [3,15,16]. ВСРИ с различных семейств вирусов имеют экстраординарные различия в последовательности и структуре, а также в использовании отличительных механизмов супрессии РНК- интерференции хозяина, в результате их независимой эволюции [3,17]. Функциональное значение вирусных генов, таких как ВСРИ, в период инфицирования занимает значительную роль в защите вируса [3]. Разновидность механизмов супрессии РНК- интерференции зависит от разнообразия ВСРИ. Некоторые ВСРИ, такие как р38 вируса сморщенности репы и 2b белок вируса мозаики огурца, интерферируют путем связывания с AGO1, в результате чего предотвращается погрузка в активный RISC комплекс. Помимо этих ВСРИ имеются и другие их разновидности, которые связываются с дцРНК, предотвращая Dicer-опосредованное расщепление [18] или связывают киРНК блокируя образование активного RISC комплекса (р19 белок Томбусвирусов) [19,20]. Структурные анализы показали поражающие различия в стратегиях связывания этих супрессорных белков с дцРНК, 3 из которых было установлено при помощи рентгено-кристаллографии (Рисунок 2).

А - р19 белок Итальянского вируса кольцевой пятнистости гвоздики (*CIRV*) в комплексе с 21нт киРНК показывает размер - специфичное связывание малых РНК, где он функционирует как димер , чтобы сформировать 8 - цепочечный лист связывающей поверхности, который взаимодействует с одной стороной основами малой РНК и концевой спиралью, что скрепляет концы малых РНК дуплексов, осуществляемых консервативными остатками триптофана (W39 и W42, выделенные красным). Почти такую же стратегию связывания показывает р19 белок вируса кустистой карликовости томатов в комплексе с малой РНК. (В) В2 белок Flockhouse вируса (FHV в комплексе с18 п.о. дцРНК демонстрирует последовательность и длина независимое связывание дцРНК , где он функционирует как димер с образованием четырех-спиральной связки, которая взаимодействует с одной стороной сахара - фосфатного остова. (С) 2b белок вируса аспермии томата (TAV) в комплексе с19 п.о. малой РНК демонстрирует последовательность независимое связывание дцРНК , где он функционирует как димер , где обеспечивает подгонку α -спиральных белковых структур к большой бороздке РНК дуплекса. 2b белок TAV преимущественно связывается дсРНК, которые в свою очередь связаны с киРНК благодаря остаткам триптофана (W50 , выделены красным цветом).

Выводы

Понимание механизмов РНК-интерференции является очень важным для исследований в сфере здравоохранения и создания вирусоустойчивых линии растений, а так же во многих других отраслях, как пререквизиты используемые в терапии и биотехнологии. Эволюционное борьба между хозяином и патогенном дают нам уникальный набор белков подавляющих РНК-интерференцию, характеристики которых порождают фундаментальные знания о возможных путях супрессии РНК-интерференции в различных организмах. А более интересные открытия

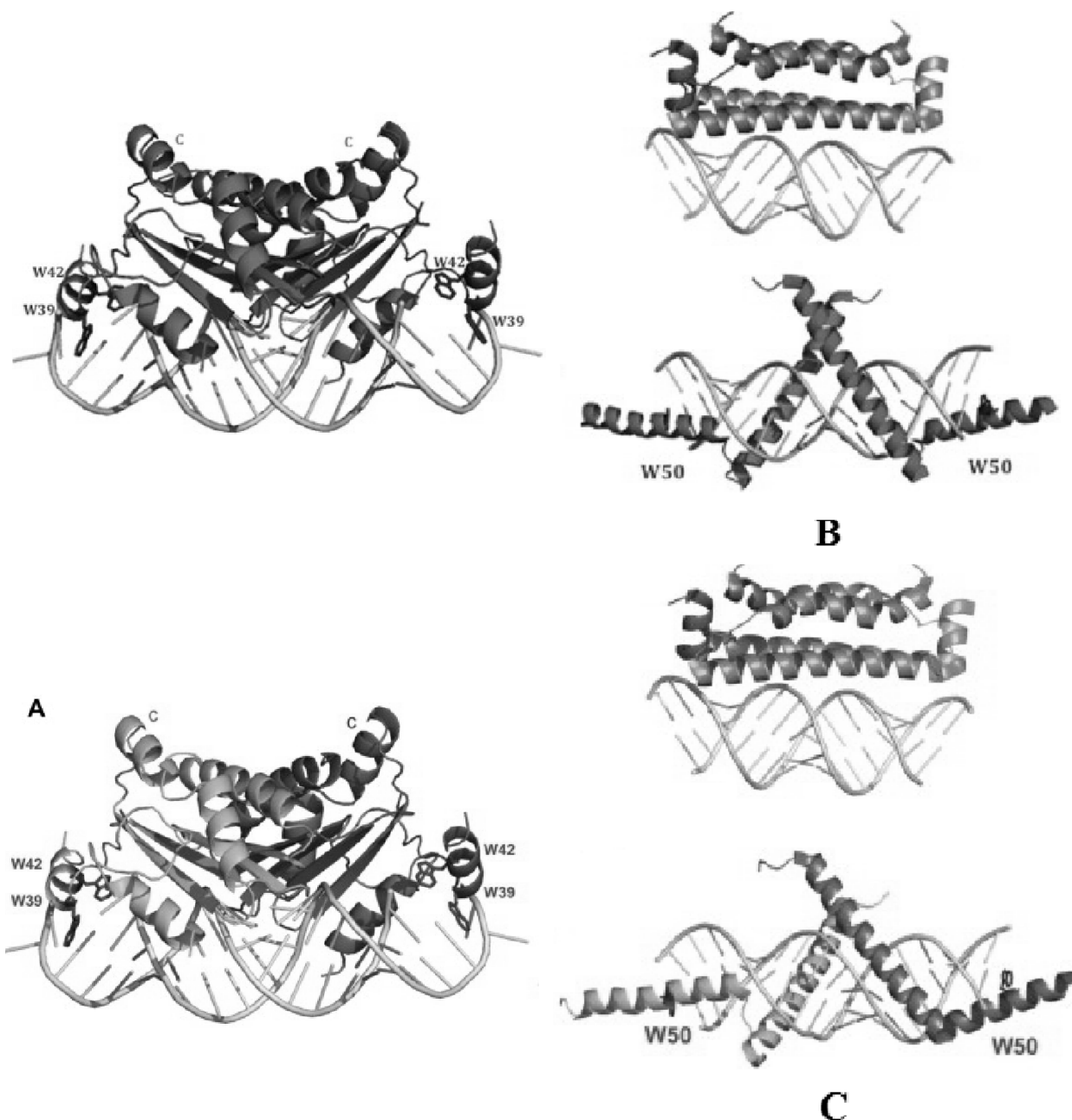


Рисунок 2.- Различия в структурах и механизмах связывания дцРНК среди разновидностей вирусных супрессоров РНК - интерференции показанные Рентгено - кристаллографией

могут быть сделаны в ближайшем будущем, в связи с обширными изучениями белков ВСРП. Р19 белок Томбувирусов является уникальным инструментом для захватывания малых РНК в живых системах и в результате усилия белковой инженерии, вероятно, откроются более широкие сферы его применения.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 M. Ghildiyal, P.D. Zamore. Small silencing RNAs: an expanding universe// Nat. Rev. Genet., 10, 2009. - P. 94–108.
- 2 G.A. Calin, C.M. Croce. MicroRNA signatures in human cancers// Nat. Rev. Cancer, 6, 2006. -P. 857–866.

3 F. Li, S. Ding. Virus counterdefense: diverse strategies for evading the RNA-silencing immunity// *Annu. Rev. Microbiol.*, 60, 2006. - P. 503–531.

4 P. Dunoyer, C. Himber, O. Voinnet. 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// *Nat. Genet.*, 37, 2005. - P. 1356–1360.

5 P. Brodersen, O. Voinnet. The diversity of RNA silencing pathways in plants// *Trends Genet.*, 22, 2006.- P. 268–280.

6 A. Deleris, J. Gallego-Bartolome, J. Bao, K.D. Kasschau, J.C. Carrington, O. Voinnet. Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense// *Science*, 313, 2006. - P. 68–71.

7 J. Morel, C. Godon, P. Mourrain, C. Beclin, S. Boutet, F. Feuerbach, F. Proux, H. Vaucheret. Fertile hypomorphic ARGONAUTE (ago1) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance// *Plant Cell*, 14, 2002. - P. 629–639.

8 F. Qu, X. Ye, T.J. Morris. Arabidopsis DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1// *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 2008. - P. 14732–14737.

9 X. Zhang, Y. Yuan, Y. Pei, S. Lin, T. Tuschl, D.J. Patel, N. Chua. Cucumber mosaic virus-encoded 2b suPpressor inhibits Arabidopsis ARGONAUTE1 cleavage activity to counter plant defense// *Genes Dev.*, 20, 2006. - P. 3255–3268.

10 R.W. Carthew, E.J. Sontheimer. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs// *Cell*, 136, 2009. - P. 642–655.

11 H.B. Scholthof. The tombusvirus-encoded P19: from irrelevance to elegance// *Nat. Rev. Microbiol.*, 4, 2006. - P. 405–411.

12 R. Omarov, K. Sparks, L. Smith, J. Zindovic, H.B. Scholthof. Biological relevance of a stable biochemical interaction between the tombusvirus-encoded P19 and short interfering RNAs// *J. Virol.*, 80, 2006. - P. 3000–3008.

13 R.A. Rawlings, V. Krishnan, N.G. Walter. Viral RNAi suPpressor reversibly binds siRNA to outcompete Dicer and RISC via multiple turnover// *J. Mol. Biol.*, 408, 2011. - P. 262–276.

14 E. Varallyay, A. Valoczi, A. Agyi, J. Burgyan, Z. Havelda. Plant virus-mediated induction of miR168 is associated with repression of ARGONAUTE1 accumulation// *EMBO J.*, 29, 2010. - P. 3507–3519.

15 O. Voinnet, Y. Pinto, D. Baulcombe. SuPpression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants// *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 1999. - P. 14147–14152.

16 F. Li, S. Ding. Virus counterdefense: diverse strategies for evading the RNA-silencing immunity // *Annu. Rev. Microbiol.*, 60, 2006. - P. 503–531.

17 J. Burgyan, Z. Havelda. Viral suPpressors of RNA silencing// *Trends Plant Sci.*, 16, 2011. - P. 265–272.

18 D. Silhavy, A. Molnar, A. Lucioli, G. Szitty, C. Hornyik, M. Tavazza, J. Burgyan. A viral protein suPpresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs// *EMBO J.*, 21, 2002. - P. 3070–3080.

19 J. Azevedo, D. Garcia, D. Pontier, S. Ohnesorge, A. Yu, S. Garcia, L. Braun, M. Bergdoll, M.A. Hakimi, T. Lagrange, O. Voinnet. Argonaute quenching and global changes in Dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded GW repeat protein// *Genes Dev.*, 24, 2010. - P. 904–915.

20 L. Lakatos, G. Szitty, D. Silhavy, J. Burgyan. Molecular mechanism of RNA silencing suPpression mediated by p19 protein of tombusviruses// *EMBO J.*, 23, 2004. - P. 876–884.

Акбасова А.Ж., Мукиянова Г.С.

РНҚ - интерференциясының р19 белогымен тежелу механизмдерін зерттеу

Бұл мақалада РНҚ- интерференциясының механизмдерін қызанақтың бұталы қортықтығы вирусының р19 супрессорлық белогының көмегімен тежелуі сипатталған.

РНҚ- интерференциясының мәні қожайын организмнің вирустың енуіне қарсы бағытталған қорғаныс реакциясын вирустың тежеуінде. Р19 белогы томбусвирустарда (Tombusvirus) түзілетін РНҚ- интерференциясының супрессоры. Оның негізгі қызметі кішкентай РНҚ дуплекстерін тұзақтап, организмнің қорғаныс механизмін тежейді. Р19 белогы арнайы 20-22 нуклеотидті тізбектермен байланысқан РНҚ лигандаларын ғана байланыстырады. Спецификалық түрде

кішіРНҚ-мен байланысатындығы Р19 белогын РНҚ- интерференциясының механизмдерін түрлі жүйелерде зерттеуде уникальді құрал ретінде пайдалануға мүмкіндік тудырады.

Түйін сөздер: РНҚ - интерференциясы, p19, РИВС, қызанақтың бұталы қортықтығы вирусы

Akbasova A.Zh., Mukiyanova G.S.

Studying the mechanisms of suppression of RNA - protein P19 interference

RNA interference is value in protecting against invading viruses and in response to their actions , while the viruses "mastered" method of suppressing the protective response of the host . P19 protein was expressed tombusvirus (tombusvirus) as a suppressor of RNA interference and small RNA involved capture of duplexes , while preventing the induction of protective pathways. P19 is the size - specific and sequence - independent binding protein small RNA ligands , which in turn are connected high - affinity bond with the 20-22 nucleotide sequence. The specificity and the ability to bind p19 entrainment of small RNA protein makes it unique tool to study the molecular mechanisms of RNA interference ways in different systems.

Keywords: RNA silencing, p19, VSRS, tomato bushy stunt virus

Поступила в редакцию 15.10.13

Рекомендована к печати 30.10.13

Об авторах:

Акбасова А. Ж. - докторант 3-го курса специальность Биология факультета естественных наук Евразийского национального университета им. Л.Н.Гумилева

Мукиянова Г. С. - докторант 2-го курса специальность Биология факультета естественных наук Евразийского национального университета им. Л.Н.Гумилева