

И. Г. Богдарина, М. И. Мырхова, Я. И. Бурьянов

ТЕПЛОВАЯ ИНДУКЦИЯ ПОДАВЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ НЕОМИЦИНФОСФОТРАНСФЕРАЗЫ II В КЛЕТКАХ ТРАНСГЕННОГО ТАБАКА

В ходе двух последовательных трансформаций получены трансгенные растения табака с интегрированными в хромосому генетическими конструкциями, включающими ген *nptII* под конститутивным *nos*-промотором, а также его антисмысловую форму под индуцибельным промотором *hsp70* гена белка теплового шока из *Drosophila melanogaster*. Практически полное подавление активности неомоцинофосфотрансферазы II в таких растениях происходило лишь в условиях теплового шока. Такой же эффект наблюдался в экспериментах по временной экспрессии гена *nptII*, введенного в протопласты трансформированного табака, содержащего только антисмысловой ген *nptII* под промотором гена *hsp70*.

Следовательно, в трансгенных растениях промотор гена белка теплового шока может быть использован в антисмысловых генетических конструкциях для индуцированного подавления генетической экспрессии.

Введение. Антисмысловые (ас) РНК — важный современный инструмент анализа функциональных свойств индивидуальных генов в живой клетке. Эффект асРНК напоминает мутацию, однако молекулярные механизмы подавления генетической экспрессии окончательно не установлены [1].

Имеются гипотетические представления о том, что в эукариотической клетке асРНК способны блокировать перенос генетической информации на разных этапах транскрипции, созревания и транспорта мРНК из ядра в цитоплазму и на уровне трансляции мРНК [1]. Благодаря способности подавлять экспрессию «своих» генов-мишеней асРНК все чаще применяются в геноинженерных биотехнологиях. Впервые у высших эукариот биологическая активность искусственных антисмысловых генов показана на растениях. асРНК успешно используют как для подавления экспрессии эндогенных растительных генов, так и чужеродных генов, стабильно интегрированных в ядерный геном растений (см. обзор [1]).

К перспективным для биотехнологии трансгенным растениям следует отнести растения с регулируемой экспрессией генов асРНК, которой можно достичь, сливая гены асРНК с промоторами индуцибельных генов.

В данной работе на модельных трансгенных растениях табака изучено регулирование экспрессии гена неомоцинофосфотрансферазы II (*nptII*) с помощью его ас-конструкций.

Для создания ас-конструкций гена *nptII* использовали индуцибельный промотор гена белка теплового шока *hsp70* из *Drosophila melanogaster*. Этот промотор активен также в растительных клетках [2], что, видимо, связано с исключительной эволюционной консервативностью его регуляторных последовательностей и с функциональной гомологией белковых факторов теплового шока у разных организмов [3].

Материалы и методы. Конструирование плазмид. Для получения плазмид, содержащих смысловой и ас-ген *nptII* под контролем промотора *hsp70*, использовали модульные элементы промотора *hsp70* и кодирующей последовательности гена *nptII* из плазмид *pPCV703* и *pMON129* соответственно [4, 5]. Вектор *pPCV703* расщепляли рестриктазой *BamHI*, обрабатывали бактериальной щелочной фосфатазой и лигировали с *BglII*-*BamHI*-фрагментом плазмиды *pMON129*, кодирующей структурную последовательность гена *nptII*. Ориентацию клонированного фрагмента определяли совместным гидролизом ДНК рестриктазами *EcoRI* и *BamHI*. Полученная плазида *pSnpt* содержала ген *nptII* в смысловой ориентации относительно промотора *hsp70* и сигнала полиаденилирования гена нопалинсинтазы

(*nos*), в плазмиде *pASnpt* — фрагмент с геном *nptII* находился в обратной (*ас*) ориентации. Все этапы молекулярного клонирования проводили по Маниатису [6].

Смысловую и *ас*-касеты, содержащие промотор гена *hsp70*, ген *nptII* и сигнал полиаденилирования *nos*-гена, вырезали рестриктазами *EcoRI* и *HindIII* и встраивали в бипарный вектор *pGDW31* [7], предварительно гидролизованный теми же рестриктазами и обработанный щелочной фосфатазой. В результате получены плазмиды *pHS* и *pHAS*, несущие ген *nptII* в смысловой и *ас*-ориентации относительно промотора гена *hsp70*, а также ген гигромицинофосфотрансферазы под *nos*-промотором, позволяющий проводить селекцию трансформированных растительных клеток. Схема конструирования указанных плазмид приведена на рис. 1.

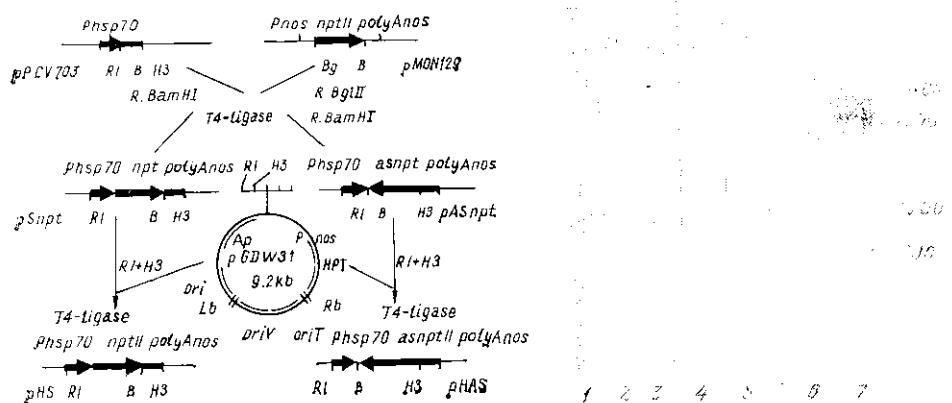


Рис. 1. Конструирование плазмид *pHS* и *pHAS*, содержащих смысловой и антисмысловой ген *nptII* под промотором гена белка теплового шока *hsp70*. *Phsp70* — термощукабельный промотор гена белка теплового шока из *D. melanogaster*; *L* и *R* — левая и правая границы Т-ДНК; *HPT* — гигромицинофосфотрансфераза; *R1* — *R. EcoRI*; *B* — *R. BamHI*; *Bg* — *R. BglIII*; *H3* — *R. HindIII*; *T4-ligase* — ДНК-лигаза фага Т4

Рис. 2. Блот-гибризационный анализ интеграции гена *nptII* в трансгенных растениях: 1, 2, 5 — ДНК индивидуальных растений — двойных трансформантов; 3, 4 — ДНК табака, содержащего химерные гены *Phsp70-nptII-polyAnos* и *Phsp70-asnptII-polyAnos* соответственно; 6 — ДНК нетрансформированного табака; 7 — ДНК плазмиды *pHS* (10 копий), гидролизованная рестриктазой *BamHI*

Трансформация и регенерация табака. Плазмиды *pHS* и *pHAS* переносили в *Agrobacterium tumefaciens* CV3101 (*pMP90RK*) трехродительским скрещиванием при участии конъюгативной плазмиды *pRK2013* [8]. Полученными агробактериями заражали листовые диски табака *Nicotiana tabacum* var. *Samsun* [9]. Селекцию трансформантов и регенерацию трансгенных растений вели на MS-среде, содержащей 1 мкг/мл бензиламинопурина, 0,1 мкг/мл нафтилуксусной кислоты, 250 мкг/мл цефатоксима, 1 мг/мл карбенициллина и 15—20 мкг/мл гигромицина. Через 3—4 недели побеги, устойчивые к гигромицину, переносили на среду MS с гигромицином и 0,1 мкг/мл феруловой кислоты для укоренения.

Получение двойных трансформантов табака. Стерильный трансгенный табак, содержащий в геноме конструкцию *Pnos-nptII-polyAnos* повторно заражали клетками *A. tumefaciens* (*pMP90RK*, *pHAS*). Материал трансформировали по описанной выше схеме.

Влияние теплового шока на активность нс-мембранной фосфотрансферазы II (NPTII) определяли в каллусной ткани и листьях стерильных растений, выросших до стадии четвертого

листа [9]. Тепловую индукцию проводили, инкубируя ткани растений при 40 °С в течение 1 ч на чашках Петри с MS-агаром. Результаты анализировали после 2-ч восстановительного периода при 24 °С. Белковые экстракты получали из 50 мг растительной ткани. NPTII отделяли от interfering белков электрофорезом в 10 %-м ПААГ в нативных условиях, нанося в каждую лунку геля по 10—20 мкг белка. Концентрацию белка регистрировали по Брэдфорду [10].

Перенос ДНК на Z-мембрану и гибридизацию осуществляли по Маниатису [6]. 10 мкг растительной ДНК гидролизовали рестриктазой *Bam*HI, разделяли в 0,8 %-м агарозном геле, перено-

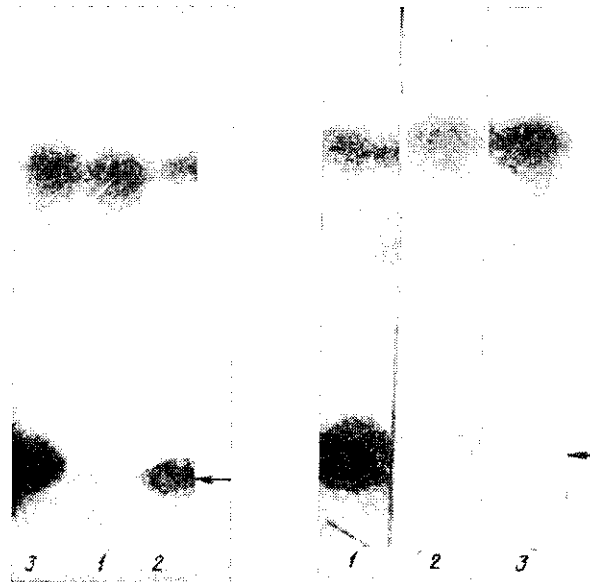


Рис. 3. Анализ активности NPTII (здесь и на рис. 4—6 локализация указана стрелкой) в трансгенных растениях, содержащих смысловой ген *nptII* под *hsp70*-промотором: 1 — экстракт из необработанных листьев; 2 — экстракт из листьев после теплового шока (1 ч, 40 °С) и восстановительного периода (2 ч, 24 °С); 3 — экстракт из каллусной ткани после теплового шока

Рис. 4. Анализ временной экспрессии NPTII в протопластах трансгенного табака, содержащего антисмысловой ген *Phsp70-antnptII-polyA*nos. Плазмиду *pVIL35* (10 мкг) с геном *Pnos-nptII-polyA*nos вводили в протопласты электропорированием. Активность NPTII определяли после обработки тепловым шоком (40 °С, 1 ч) или без него: 1 — протопласты + 10 мкг *pVIL35*; 2 — протопласты + 10 мкг *pVIL35* + тепловой шок; 3 — протопласты без обработки

сили на нейлоновую мембрану и гибридизовали с *Bgl*III-*Bam*HI-фрагментом плазмиды *pMON129*, меченным ³²P с помощью набора Multi-prime («Amersham», Англия), согласно указаниям фирмы. Удельная активность зонда более 5 · 10⁸ имп · мин⁻¹ · мкг⁻¹.

Получение протопластов и анализ временной экспрессии гена *nptII* проводили, как описано ранее [11]. Структура вводимой плазмиды *pVIL35* со смысловым геном *nptII* под *nos*-промотором описана там же.

Результаты и обсуждение. Для изучения влияния ас-гена *nptII* в условиях его конститутивной и индуцибельной экспрессии на активность NPTII в клетках трансгенного табака использовали сконструированные в данной работе плазмиды *pHS* и *pHAS*, содержащие ген *nptII* в прямой и обратной ориентации относительно промотора гена *hsp70*. Указанные конструкции вводили в табак с помощью агробактерий. В результате получены трансгенные растения следующих типов:

1) *Phsp70-nptII-polyA*nos (растения содержат смысловой ген *nptII* под промотором гена белка теплового шока);

2) *Phsp70-antisense nptII-polyAnos* (в этих растениях под тем же промотором находится ген *nptII* в ас-ориентации);

3) *Pnos-nptII-polyAnos* (*Phsp70-antisense nptII-polyAnos* (двойные трансформанты, содержащие интегрированные в хромосому смысловой ген *nptII* под *nos*-промотором и ас-ген под промотором гена белка теплового шока).

Геномную ДНК этих растений анализировали гибридизацией по Саузерну [9], используя в качестве ДНК-зонда меченный ^{32}P *BglIII-BamHI*-фрагмент плазмиды *pMON129*, содержащий полную кодирующую последовательность гена *nptII*. Сравнение интенсивности сигналов

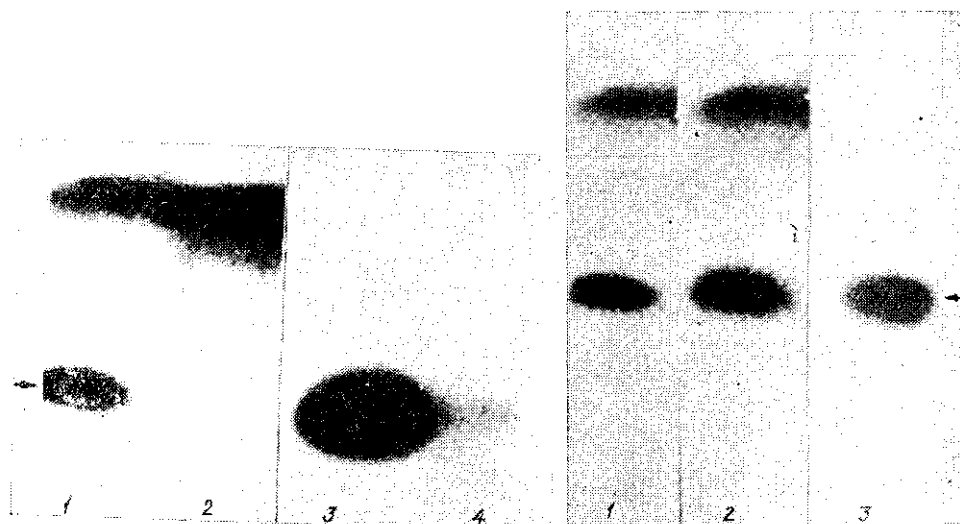


Рис. 5. Определение активности NPTII в двойных трансформантах, содержащих *Pnos-nptII-polyAnos* и *Phsp70-asnptII-polyAnos*: 1 — необработанные листья; 2 — листья после теплового шока; 3 — необработанный каллус; 4 — каллус после теплового шока

Рис. 6. Анализ активности NPTII в трансформированных растениях, содержащих: 1 — *Pnos-nptII-polyAnos*; 2 — *Phsp70-nptII-polyAnos* (после теплового шока); 3 — контроль (агробактерии с плазмидой *pGV3850npt*)

с сигналом, который дают 10 копий плазмиды *pHS*, показали, что полученные растения содержат около 5 копий гена *nptII* на геном (рис. 2).

В тканях растений первого типа со смысловым геном *nptII* под промотором гена белка теплового шока (рис. 3) активность NPTII наблюдалась только после теплового шока (40 °C), причем в каллусных тканях она была значительно выше, чем в листьях, что соответствует результатам, полученным другими авторами [12].

Ткани растений второго типа, содержащие ас-ген *nptII* под *hsp70*-промотором, были проанализированы в экспериментах по временной экспрессии генов. Для этого в протопласты табака (1 млн) электропорированием вводили плазмиду *pVIL35* (10 мкг), содержащую ген *nptII* в смысловой ориентации относительно *nos*-промотора. Условия теплового шока создавали через 1 сут после электропорирования, помещая чашки Петри с протопластами в термостат с температурой 40 °C (1 ч), затем их инкубировали при 24 °C в течение 2 ч. Тепловой шок вызывал полное подавление экспрессии гена *nptII*, тогда как при 24 °C продолжалось проявление активности NPTII (рис. 4).

В листьях и каллусе двойных трансформантов активность NPTII практически полностью исчезала только после теплового шока, в то время как в неиндуцированных тканях ингибирующий эффект асРНК отсутствовал (рис. 5). Таким образом, эффект ас-конструкций гена *nptII* под промотором гена *hsp70* наблюдался в экспериментах *in vivo* и *in vitro* только в ответ на тепловой шок. Известно, что индукция гена теплового шока *hsp70* наблюдается в растениях при 37 и 40 °C [12].

Следует отбросить возможное альтернативное объяснение наблюдаемого подавления активности NPTII вследствие неспецифического действия тепловой индукции, против чего свидетельствуют контрольные эксперименты с трансгенными растениями табака, содержащими ген *nptII* под *hsp70*-промотором. У таких растений NPTII индуцировалась только после теплового шока.

Важно отметить, что, по-видимому, сила промотора гена белка теплового шока *hsp70* в клетках табака соизмерима с таковой *nos*-промотора. Это вытекает из сравнительного анализа активности NPTII в трансгенных растениях табака, содержащих смысловой ген *nptII* под *nos*-промотором, и в растениях табака, содержащих этот же ген под *hsp70*-промотором в условиях его тепловой индукции (рис. 6).

Таким образом, в нашей работе показана возможность эффективного ингибирования активности NPTII в трансгенных растениях с помощью *ас*-конструкций ее гена, а также применимость для этих целей *hsp70*-промотора. Результаты наших экспериментов с модифицированным геном *nptII*, а также канадских исследователей с геном β -глюкурононидазы [13] указывают на возможность применения *hsp70*-промотора *Drosophila* при изучении функционирования генов с помощью *ас*РНК. В литературе имеются сообщения об ингибировании экспрессии чужеродных генов в трансгенных растениях, повторно трансформированных генетическими конструкциями, содержащими полную или частичную копию этих генов [14, 15]. Полученные нами данные свидетельствуют об отсутствии супрессии гена *nptII* его «молчащей» *ас*-копией в двойных трансформантах табака. Подавление активности NPTII в двойных трансформантах наблюдалось только в ответ на тепловой шок.

В развитие этой работы мы планируем установить скорость и длительность ответа двойных трансформантов на тепловой шок. Для выяснения механизмов антисмыслового ингибирования, а также функционирования *hsp70*-промотора необходим дальнейший анализ смысловых и *ас*РНК в полученных растениях.

Резюме. Протягом двох послідовних трансформацій отримано трансгенні рослини тютюну з інтегрованими до хромосоми генетичними конструкціями, які мають ген *nptII* під конститутивним *nos*-промотором, а також його антисенсову форму під індукційним промотором *hsp70*-гена білка теплового шоку з *Drosophila melanogaster*. Практично повне пригнічення активності неоміцинофосфотрансферази II у таких рослинах відбувалося лише за умов теплового шоку. Той самий ефект спостерігався в експериментах з почасової експресії гена *nptII*, введеного до протопластів трансформованого тютюну, який містив лише антисенсовий ген *nptII* під промотором гена *hsp70*.

Отже, у трансгенних рослинах промотор теплового шоку може використовуватися в антисенсових генетичних конструкціях для індукованого пригнічення генетичної експресії.

Summary. Double transformed tobacco plants were obtained by successive transformation using two *nptII* gene constructs: the sense gene under the control of the constitutive *nos* promoter and the antisense form under the control of the inducible *Drosophila melanogaster hsp70* promoter.

Virtually total inhibition of the neomycin phosphotransferase II activity was observed in these plants only in response to heat shock.

The same effect was observed in experiments on transient expression of the *nptII* gene in protoplasts of single transformed plants carrying the antisense *nptII* gene under the *hsp70* promoter.

Therefore, the *hsp70* promoter can be used in antisense gene construction to inducibly repress gene expression in transgenic plants.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Van der Krol A., Mol J., Stuitje A. Antisense genes in plants: an overview // *Gene*.— 1988.— 72.— P. 45—50.
2. Spena A., Hain R., Ziervogel U. et al. Construction of a heat-inducible gene for plants // *EMBO J.*— 1985.— 4.— P. 2739—2743.
3. Sorger P. K. Heat shock factor and the shock response // *Cell*.— 1991.— 65, N 3.— P. 363—366.
4. Koncz C., Martini N., Mayerhofer R. et al. High-frequency T-DNA-mediated gene tagging in plants // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.— 1989.— 86.— P. 8467—8471.
5. Fraley R. T., Rogers S., Horsch R. et al. Expression of bacterial genes in plant cells // *Ibid.*— 1983.— 80.— P. 4803—4807.
6. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.— 477 с.
7. Wing D., Koncz C., Schell J. Conserved function on *Nicotiana tabacum* of a single *Drosophila hsp70* promoter heat shock element when fused to a minimal T-DNA promoter // *Mol. and Gen. Genet.*— 1989.— 219.— P. 9—16.
8. Ditta G., Stanfield S., Corbin D., Helinski D. R. Broad host range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: Construction of gene bank of *Rhizobium meliloti* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.— 1980.— 77.— P. 7347—7351.
9. Herrera-Estrella L., Teeri T. H., Simpson J. Use of reporter genes to study gene expression in plant cells // *Plant molecular. biol. manual* / Eds S. B. Gelvin, R. A. Schilperoort, D. P. S. Verma.— Dordrecht; Boston; London: Kluwer Acad. Publ., 1991.— P. 1—22.
10. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.*— 1976.— 72.— P. 248—254.
11. Зинкевич В. Е., Богдарина И. Г., Рукавцова Е. Б. и др. Ингибирование экспрессии гена неоминифосфотрансферазы II в протопластах табака с помощью антисмысловой РНК // *Докл. АН СССР*.— 1988.— 300, № 3.— С. 727—730.
12. Spena A., Schell J. The expression of a heat-inducible chimeric gene in transgenic tobacco plants // *Mol. and Gen. Genet.*— 1987.— 207.— P. 436—440.
13. Roberi L., Donaldson P., Ladaique C. et al. Antisense RNA inhibition of glucuronidase gene expression in transgenic tobacco can be transiently overcome using a heat-inducible-glucuronidase gene construct // *Biotechnology*.— 1990.— 8.— P. 459—463.
14. Matzke M. A., Primig M., Trnovsky J., Matzke A. J. M. Reversible methylation and inactivation of marker genes in sequentially transformed tobacco plants // *EMBO J.*— 1989.— 8, N 3.— P. 643—649.
15. Goring D. R., Thompson L., Rothstein S. J. Transformation of a partial nopaline synthase gene into tobacco suppress the expression of a resident wild-type gene // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.— 1991.— 88, N 5.— P. 1770—1774.

Филнал Ин-та биоорг. химии
им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова
РАИ, Пушкино

Получено 12.01.93