

УДК: 57.085.1; 57.088.3; 577.218

ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ САЛАТА, СИНТЕЗИРУЮЩИХ ПОТЕНЦИАЛЬНО АНТИГИПЕРТЕНЗИВНУЮ КОРОТКУЮ ШПИЛЕЧНУЮ РНК

И.М. ГЕРАСИМЕНКО¹, В.В. КЛЕЩЕВНИКОВ², В.Р. КЕДЛЯН², Л.А. САХНО¹,
И.А. АРБУЗОВА¹, Ю.В. ШЕЛУДЬКО¹, В.Е. ДОСЕНКО², Н.В. КУЧУК¹

¹ Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев
E-mail: i-gerasimenko@ukr.net

² Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, Киев

Заинтересованность фармацевтической индустрии в разработке терапевтических препаратов, основанных на РНК-интерференции, быстро растет. Использование растений для синтеза фармацевтически ценных коротких РНК может иметь такие важные преимущества, как низкая себестоимость, возможность получения большого количества материала и сниженный риск загрязнения патогенами, опасными для человека. При использовании съедобных растений можно исключить высокочрезвычайно затратную стадию очистки конечного продукта. В настоящей работе описано получение трансгенных растений салата, синтезирующих короткую шпилечную РНК (кшРНК), для подавления экспрессии гена изоформы дельта протеинкиназы С (ПКС), эффективной цели при лечении артериальной гипертензии, основанном на РНК-интерференции. Трансгенные растения салата получены методом Agrobacterium-опосредованной трансформации с использованием генетических конструкций, несущих гены анти-ПКС и контрольной кшРНК. Присутствие трансгенов подтверждено ПЦР-анализом. Уровень накопления анти-ПКС кшРНК рассчитан на основании данных количественной ПЦР с обратной транскрипцией. Шесть трансгенных линий салата демонстрировали различный уровень экспрессии анти-ПКС кшРНК, наибольшее содержание которой достигало $14 \pm 9\%$ по сравнению с высокоэкспрессирующейся мРНК салата (miR156a), или 12,7 фмоль/г сухой массы. Растения, несущие как ген анти-ПКС, так и контрольной

кшРНК, нормально цвели, однако не завязывали семян. Описанные трансгенные растения салата, содержащие анти-ПКС кшРНК, предполагается использовать для тестирования физиологической активности на животных, а в дальнейшем для разработки новых средств при лечении артериальной гипертензии.

Ключевые слова: РНК-интерференция, короткая РНК, образующая шпильки, артериальная гипертензия, изоформа дельта протеинкиназы С, трансгенные растения, *Lactuca sativa*.

Введение. В настоящее время ряд фармацевтических и биотехнологических корпораций активно разрабатывают терапевтические препараты, основанные на РНК-интерференции. Некоторые из них уже находятся на стадии клинических испытаний [1, 2]. Большинство используемых в современных исследованиях коротких интерферирующих РНК (киРНК) синтезируются химически в виде одноцепочечных олигонуклеотидов, которые ренатурируют в двухцепочечную форму. Часто они несут химические модификации, позволяющие увеличить стабильность киРНК и избежать активации иммунного ответа [3].

Использование растений для производства фармацевтически ценных киРНК может иметь такие важные преимущества, как низкая себестоимость, возможность получения больших количеств растительного сырья и сниженный риск загрязнения опасными для человека патогена-

© И.М. ГЕРАСИМЕНКО, В.В. КЛЕЩЕВНИКОВ,
В.Р. КЕДЛЯН, Л.А. САХНО, И.А. АРБУЗОВА,
Ю.В. ШЕЛУДЬКО, В.Е. ДОСЕНКО, Н.В. КУЧУК, 2017

ми. Особенностью растительных миРНК является 2'-О-метилирование рибозы последнего нуклеотида [4]. Эта модификация повышает устойчивость киРНК к нуклеазному гидролизу и увеличивает их стабильность в крови, что особенно важно при использовании незащищенных киРНК. Вместе с тем 2'-О-метилирование может препятствовать детекции киРНК иммунной системой. В особенности 2'-О-метилирование ослабляет активацию эндосомальных Toll-подобных рецепторов, которая вызывает иммунный ответ в случае применения киРНК, заключенных в микросомы. Учитывая минимальное влияние 2'-О-метилирования на функции киРНК, использование синтезированных растениями киРНК может быть предпочтительным при обоих способах доставки [3].

Способность поглощать двухцепочечные (дцРНК) и киРНК растительного происхождения через пищеварительную систему хорошо известна для беспозвоночных. Трансгенные растения, которые экспрессируют дцРНК и киРНК, направленные против генов паразитических нематод, демонстрируют повышенную устойчивость к этим патогенам [5]. Позднее тот же эффект был показан для разных групп насекомых. Первые сообщения описывают ингибирование активности генов насекомых-вредителей, ведущее к замедлению роста личинок и уменьшению повреждения растений вследствие поедания трансгенных растений, которые экспрессируют дцРНК и киРНК [6, 7]. Недавние исследования показали возможность защиты растений от насекомых-вредителей путем экспрессии генов дцРНК в пластоме [8].

Возможность влияния поступающих с пищей киРНК на экспрессию генов млекопитающих однозначно не доказана. Опубликованные работы показывают возможность проникновения растительных миРНК через пищеварительный тракт млекопитающих в сыворотку крови и различные органы, особенно печень [9]. Авторы предполагают, что экзогенная MIR168a может регулировать экспрессию белка LDL-RAP1 в печени крыс, поедающих рис. Согласно выдвинутой гипотезе эпителиальные клетки тонкого кишечника могут поглощать миРНК растительного происхождения и заключать их в микровезикулы, из которых миРНК освобождаются в кровь. Позднее растительные миРНК

обнаружены в плазме крови [10], грудном молоке [11], пуповинной крови и амниотической жидкости [12]. Некоторые из этих сообщений были подвергнуты сомнению [13, 14], однако авторы утверждают, что применяемая ими методика позволяет с высокой чувствительностью детектировать миРНК растительного происхождения [15]. Описанные работы позволяют допустить возможность использования трансгенного растительного материала, содержащего терапевтически активные киРНК, для производства пероральных препаратов. Это подтверждается опубликованными недавно данными о терапевтических эффектах натуральной растительной миРНК экстракта выюнка против вирусов гриппа [16] и принятых перорально синтетических 2'-О-метилованных (имитирующих растительные) миРНК, подавляющих опухоли [17], хотя влияние экзогенных 2'-О-метилованных миРНК на экспрессию генов млекопитающих наблюдалось не во всех проведенных исследованиях [18]. Возможность перорального применения терапевтически активных киРНК, синтезированных в трансгенных растениях, еще не была проверена. Использование съедобных видов растений позволило бы исключить дорогостоящую стадию очистки конечного продукта.

Заболевания сердечно-сосудистой системы являются ведущей причиной смертности в современном мире. Регуляция активности генов с помощью миРНК играет важную роль как в нормальном развитии и функционировании сердечно-сосудистой системы [19], так и в появлении патологий [20]. Перспективной мишенью при создании препаратов для лечения артериальной гипертензии, основанного на РНК-интерференции, является изоформа дельта протеинкиназы С (ПКС). Ранее показано, что подавление экспрессии гена ПКС-дельта приводит к понижению кровяного давления у крыс со спонтанной и связанной с диабетом гипертензией [21]. ПКС-дельта регулирует активность нескольких ионных каналов, которые определяют сокращение клеток гладкой мускулатуры артерий, обуславливающее высокое давление [21]. Синтез короткой шпилечной РНК (кшРНК), направленной против ПКС-дельта, в съедобных трансгенных растениях может быть одним из способов практического при-

менения подавления экспрессии гена ПКС-дельта для лечения артериальной гипертензии.

В настоящей работе описывается получение трансгенных растений салата, синтезирующих анти-ПКС кшРНК, которые можно рассматривать как сырье для разработки новых средств при лечении артериальной гипертензии.

Материалы и методы. *Генетические конструкции.* Для конструирования генетических векторов использовали плазмиды, созданные на основе pBIN19: pICBV16 (несущая селективный ген *nptII*) и pICH5290 (содержащая ген *bar*) [22] (обе любезно предоставлены «Icon Genetics GmbH», Халле/Заале, Германия). Последовательность, кодирующая при-анти-ПКС кшРНК и фланкированная одноцепочечными участками, которые совместимы с сайтами *XhoI* и *XbaI*, получена ренатурацией двух олигонуклеотидов (5'-tcgagtgcacatcccagacaacaactcaagagagtggtgtctgggatgtcattt-3' и 5'-ctagaatgacatcccagacaacaactctctgaagttgtctgggatgtcac-3') и лигирована в плазмиды pICBV16 и pICH5290 (гидролизированные соответствующими ферментами) между 35S промотором ВМЦК и терминаторами транскрипции. Все ферменты производства «ThermoScientific», Германия. Полученные векторы названы pNPB0142 и pNPB0143. Контрольные генетические векторы pNPB0144 и pNPB0145, содержащие последовательность, которая кодирует при-кшРНК с измененной последовательностью нуклеотидов, получены аналогично с использованием олигонуклеотидов 5'-tcgagtggtcagcgaataataacctcaagagagttatatttcgctgaacattt-3' и 5'-ctagaatggtcagcgaataataacctctctgaagttatatttcgctgaacac-3' (рис. 1).

Бактериальные штаммы. Полученные векторы вводили в клетки штамма GV3101 *Agrobacterium tumefaciens* методом электропорации с использованием MicroPulser™ («BioRad», США) в соответствии с инструкцией производителя. Для трансформации растений бактерии выращивали в жидкой среде LB, содержащей рифампицин и карбенициллин (оба в концентрации 50 мг/л), при 28 °С на шейкере (180 об/мин) в течение 1 сут. После центрифугирования (5 мин, 1000 g) бактерии ресуспендировали в жидкой среде MS.

Растительный материал и генетическая трансформация. Семена салата (*Lactuca sativa* L.) сортов Королева лета и Верна инкубиро-

вали 5 мин в 70%-ном этаноле, затем 15 мин в растворе гипохлорита натрия (моющее средство «Белизна», смешанное с равным объемом воды). После тщательной отмывки в автоклавируемой дистиллированной воде семена помещали на агаризованную среду MS без фитогормонов для прорастания. Для *Agrobacterium*-опосредованной трансформации использовали пятидневные проростки. Их котиленоны помещали на 30 мин в суспензию агробактерий, промакивали фильтровальной бумагой и инкубировали на агаризованной среде MS без фитогормонов в течение 2 сут. После этого экспланты отмывали в жидкой среде MS и помещали на агаризованную среду MS, содержащую кинетин (3 мг/л), нафтилуксусную кислоту (0,5 мг/л) и цефотаксим (500 мг/л) [23]. В зависимости от генетической конструкции для селекции трансформированных клеток добавляли канамицинсульфат (50 мг/л) или глюфоцинат аммония (5 мг/л), приготовленный из раствора Basta («Bayer», Германия). Регенерирующие побеги переносили на свежую среду каждые 2 недели. Полностью сформированные растения (примерно через 2 месяца) поддерживали на агаризованной среде MS без фитогормонов, антибиотиков и селективных агентов.

Выделение нуклеиновых кислот. ДНК выделяли из свежих листьев с использованием цетилтриметиламмоний бромидом [24]. Концентрацию ДНК определяли по поглощению ультрафиолета при 260 нм; ее чистоту оценивали по соотношению поглощения при 260 и 280 нм, используя BioPhotometer («Eppendorf», Германия).

Общую РНК выделяли из лиофилизированных листьев, используя TRIzol® («Ambion», США), осаждали изопропанолом и растворяли в свободной от РНКаз воде. Концентрацию РНК определяли с помощью NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer («NanoDrop Technologies», США).

ПЦР-анализ. Растительную ДНК для детекции перенесенной Т-ДНК амплифицировали, используя праймеры 35CaMV1 (5'-tcattgcgataaaggaaaggc-3') и Tnos-F (5'-cgataattatcctagttgcg-3'), оба в концентрации 0,25 мкМ. Для подтверждения достаточного качества препаратов растительной ДНК использовали праймеры, комплементарные гену актина [25], оба в концентрации 0,5 мкМ. Реакционная смесь со-

держала 1 мкг растительной ДНК, 0,5 U Taq ДНК-полимеразы («Helicon», РФ) в соответствующем буфере, нуклеозидтрифосфаты (общая концентрация 0,5 мМ) и упомянутые праймеры. Реакцию проводили в 2720 Thermal Cycler («Applied Biosystems», США) в следующих условиях: денатурация в течение 5 мин при 94 °С; 30 циклов, включающих денатурацию в течение 30 с при 94 °С, отжиг праймеров 30 с при 60 °С, синтез 30 с при 72 °С; завершающий синтез в течение 5 мин при 72 °С. Амплифицированные фрагменты ДНК разделяли в 1%-ном агарозном геле, используя 1× буфер TAE (40 мМ Tris-ацетат, 1 мМ ЭДТА) при 150 В в течение 45 мин, и визуализировали с помощью бромистого этидия. В качестве маркера молекулярной массы ДНК использовали GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder («Fermentas», Литва).

Обратную транскрипцию проводили в Applied Biosystems® 2720 Thermal Cycler, используя набор TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, США) и праймеры, включенные в TaqMan® MicroRNA Assays. Последовательности праймеров для зрелой анти-ПКС-дельта кшРНК и зрелой растительной miR156a, которая служила в качестве эндогенного контроля, созданы с использованием открытого ресурса Thermo Fisher Scientific (Thermo Fisher Scientific, cat#4398987, ID CST95GM, siRNApKcD; и cat# 4427975 (000333) соответственно). Перед проведением обратной транскрипции концентрация РНК была доведена до 10 нг/мкл.

ПЦР в реальном времени осуществляли с помощью TaqMan® MicroRNA Assays (специфичные для анти-ПКС-дельта кшРНК и miR156a) и TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2X) в 7500 Fast Real-Time PCR System («Applied Biosystems», США) при условиях, описанных в инструкции производителя TaqMan® MicroRNA Assays. Стандартные кривые для абсолютного количественного определения построили, используя разведения химически синтезированного олигонуклеотида, аналогичного направляющей цепи зрелой анти-ПКС-дельта кшРНК («Methabion», Германия). При построении стандартных кривых для miR156a использовали разведения фрагмента ДНК, полученного в результате амплификации контрольной растительной РНК методом ПЦР с обратной

транскрипцией в реальном времени. Количество анти-ПКС-дельта кшРНК относительно miR156a рассчитывали с помощью Applied Biosystems 7500 Fast Software v2.0.6.

Результаты исследований и их обсуждение. Как показали недавние исследования, изоформа дельта протеинкиназы С (ПКС-дельта) является перспективной мишенью для РНК-опосредованного сайленсинга с целью ослабления симптомов артериальной гипертензии у крыс [21]. Внутривенное введение плазмиды, которая кодирует короткую шпилечную РНК, направленную против ПКС-дельта (анти-ПКС кшРНК), привело к нормализации артериального давления у крыс со спонтанной и связанной с диабетом гипертензией.

Последовательности, кодирующие анти-ПКС кшРНК или контрольную кшРНК (с измененной последовательностью нуклеотидов), описанные ранее [21], поместили под контроль 35S промотора вируса мозаики цветной капусты в бинарные векторы для *Agrobacterium*-опосредованной трансформации растений (рис. 1). Согласно литературным данным природные растительные miРНК транскрибируются РНК-полимеразой II в виде предшественника при-miРНК, который процессируется в шпильковидную пре-miРНК и далее в зрелую двухцепочечную miРНК при участии белкового комплекса DCL1-Hy1 [26]. Можно предположить, что анти-ПКС кшРНК и контрольная кшРНК процессируются таким же образом (рис. 2), поскольку другие известные растительные белковые комплексы, участвующие в метаболизме РНК, не используют кшРНК в качестве субстратов [27].

Трансгенные растения салата получали путем трансформации генетическими конструкциями, несущими гены анти-ПКС кшРНК (pNPB0142) и контрольной кшРНК (pNPB0145). Сорта Королева лета и Верна выбраны для настоящей работы в связи с их раннеспелостью и негорьким вкусом, что особенно важно при проведении дальнейших опытов, включающих кормление животных. В целом получены 33 трансгенные линии, среди них 26 устойчивых к глюфоzinату на основе сорта Королева лета и 7 устойчивых к канамицину на основе сорта Верна. Растения способны расти на питательных средах, содержащих 10 мг/л глюфоzinата аммония или 100 мг/л канамицинсульфата. В

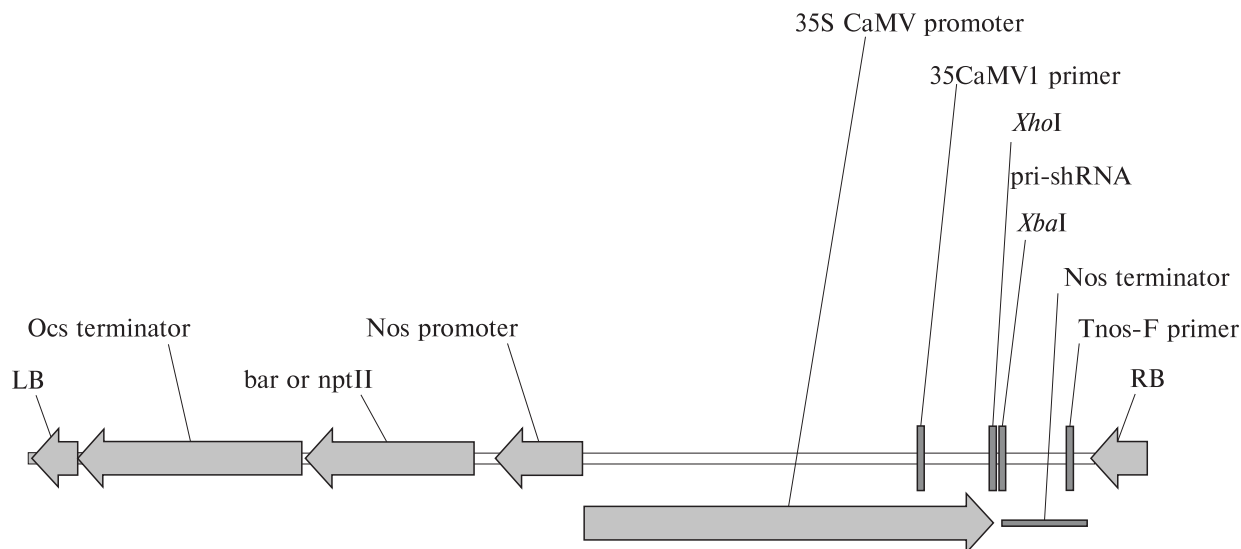
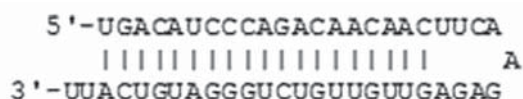


Рис. 1. Схема Т-ДНК генетических векторов для экспрессии кшРНК в растениях: RB, LB – границы Т-ДНК; 35S CaMV promoter – 35S промотор вируса мозаики цветной капусты, Nos promoter – промотор гена нопалинсинтазы, Nos terminator – терминатор гена нопалинсинтазы, Ocs terminator – терминатор гена октопинсинтазы; bar – ген устойчивости к глюфофизинату (pNPB0142 и pNPB0144); nptII – ген устойчивости к канамицину (pNPB0143 и pNPB0145); pri-shRNA – целевые гены, кодирующие при-кшРНК, фланкированные сайтами *XhoI* и *XbaI* (анти-ПКС кшРНК в конструкциях pNPB0142 и pNPB0143, контрольная кшРНК в конструкциях pNPB0144 и pNPB0145). Праймеры 35S CaMV1 и Tnos-F комплементарны участкам Т-ДНК по разные стороны целевого гена

При-кшРНК (93 нк)



Пре-кшРНК (49 нк)



Зрелая кшРНК (2 × 21 нк)

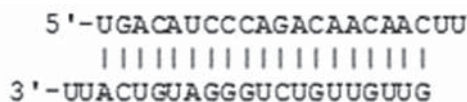


Рис. 2. Предполагаемые стадии созревания анти-ПКС кшРНК в растениях

условиях *in vitro* трансформированные растения морфологически не отличались от растений соответствующих исходных сортов.

Присутствие трансгенов доказано ПЦР-анализом растительной ДНК. В работе использо-

вали праймеры, комплементарные 35S промотору ВМЦК и терминатору транскрипции гена нопалинсинтазы (рис. 1), фланкирующим гены кшРНК, с целью получить более длинный продукт амплификации (содержащий целевой

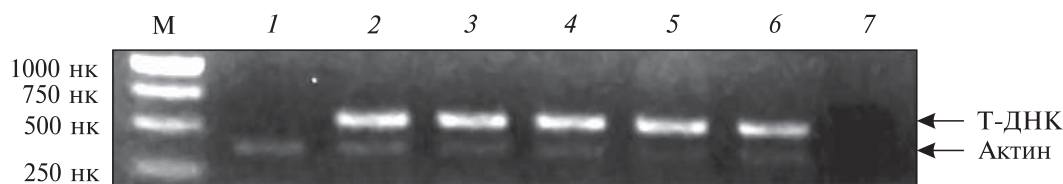


Рис. 3. ПЦР-анализ трансформированных растений салата: М – маркер молекулярной массы ДНК. Цифры над дорожками обозначают источник ДНК-матрицы, использованной в реакции: 1 – нетрансформированное растение салата; 2–6 – трансформированные растения салата, несущие ген анти-ПКС кшРНК; 7 – реакция без матрицы. Стрелками обозначены амплифицированные фрагменты гена актина и Т-ДНК

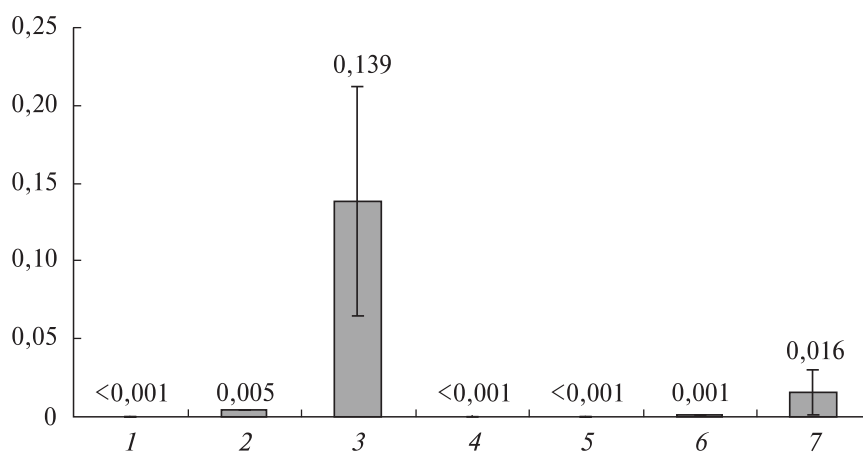


Рис. 4. Относительное количество анти-ПКС-дельта кшРНК в трансгенных растениях салата (по сравнению с эндогенной miR156a): 1 – нетрансформированные растения; 2 – pNPB0142/1; 3 – pNPB0142/2; 4 – pNPB0142/8; 5 – pNPB0142/13; 6 – pNPB0142/15; 7 – pNPB0142/16. Линии на диаграмме представляют стандартное отклонение

ген кшРНК), что облегчает его детекцию после электрофореза в агарозном геле. Для подтверждения достаточного качества используемой ДНК-матрицы и нормального протекания реакции использовали дополнительную пару праймеров для амплификации растительного гена актина [25]. Все проанализированные растения содержали Т-ДНК (рис. 3). Для дальнейших экспериментов отобрали шесть линий салата, несущих анти-ПКС кшРНК, и одну линию с контрольной кшРНК.

Абсолютное количество анти-ПКС кшРНК на 1 г растительного материала и ее относительное количество по сравнению с растительной miR156a определяли методом ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией, используя коммерчески доступные наборы для измерения концентрации малых РНК. Для обратной транскрипции применяли специальные петлеобразные праймеры, как подробно описано

Kramer [28]. Праймеры этого типа имеют длину около 70 нуклеотидов и формируют петлю с шестинуклеотидным одноцепочечным участком, комплементарным целевой малой РНК. В результате обратной транскрипции образуется кДНК, включающая последовательность петлеобразного праймера, удлиненную на 14–15 нуклеотидов за счет обратной транскрипции малой РНК. В ходе ПЦР в реальном времени кДНК амплифицируется с помощью праймеров, один из которых комплементарен 12–13 нуклеотидам на 3'-конце целевой малой РНК, а второй – последовательности петлеобразного праймера. Флюоресцентный сигнал возникает в результате расщепления Taqman-зонда, комплементарного как малой РНК, так и петлеобразному праймеру.

Нами определена абсолютная концентрация анти-ПКС кшРНК и рассчитано ее относительное количество по сравнению с натив-

ной миРНК салата miR156a. Трансгенные линии демонстрируют различные уровни экспрессии анти-ПКС кшРНК. Среди шести проанализированных линий в двух (pNPB0142/8 и 13) рассчитанное соотношение анти-ПКС кшРНК/miR156a было сравнимо с результатом, полученным для нетрансформированных растений. Относительный уровень экспрессии анти-ПКС кшРНК в остальных четырех линиях (pNPB0142/1, 2, 15 и 16) превышал контрольные значения (рис. 4). Трансгенная линия pNPB0142/2 накапливала значительные количества анти-ПКС кшРНК, составляющие $14 \pm 9 \%$ (среднее значение \pm стандартное отклонение) от количества высокоэкспрессируемой эндогенной миРНК салата miR156a. Рассчитали также концентрацию анти-ПКС кшРНК на 1 г лиофильно высушенных листьев салата. Используя данные, полученные для трех независимых образцов растительного материала линии pNPB0142/2, получили среднее значение 12,7 фмоль/г сухой массы. На основании этих данных можно рекомендовать трансгенную линию салата pNPB0142/2, содержащую анти-ПКС кшРНК, для дальнейших физиологических опытов, включающих кормление лабораторных животных.

Трансгенные растения салата были адаптированы к условиям теплицы. Растения на основе обоих сортов салата, несущие как анти-ПКС, так и контрольную кшРНК, нормально цвели, но не завязывали семян. Следует отметить, что трансформация салата аналогичными генетическими конструкциями, которые несут гены, кодирующие белки (например, ген интерферона альфа-2b человека), не препятствовала образованию семян. Поскольку синтез обеих кшРНК, имеющих различные последовательности и потенциальные мишени, приводит к одинаковым последствиям, можно предположить, что избыточная экспрессия чужеродных кшРНК насыщает растительные системы процессинга малых РНК, что приводит к нарушениям развития цветов и/или образования семян. РНК-интерференция принимает участие в регуляции развития цветов [29] и формировании семян [30]. Явление токсичности, вызванной кшРНК, описано у животных [31]. Использование искусственных миРНК может повысить уровень экспрессии [32], а также уменьшить токсичность [33].

Выводы. Насколько нам известно, это первое сообщение о получении трансгенных растений, накапливающих потенциально терапевтически ценную кшРНК. Нами создана линия салата, экспрессирующая анти-ПКС кшРНК на уровне, сравнимом с одной из самых высокоэкспрессирующихся эндогенных миРНК. Изоформа дельта протеинкиназы С, мишень экспрессируемой кшРНК, играет важную роль в развитии артериальной гипертензии, что делает полученные растения возможным сырьем для разработки новых антигипертензивных препаратов. Существуют стратегии, которые могут позволить в дальнейшем увеличить уровень накопления кшРНК в растениях.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта НАН Украины, № UkrISTEI 0115U002920.

ESTABLISHMENT OF TRANSGENIC LETTUCE PLANTS PRODUCING POTENTIALLY ANTI-HYPERTENSIVE shRNA

I.M. Gerasymenko, V.V. Kleschevnikov, V.R. Kedlian, L.O. Sakhno, I.A. Arbuzova, Y.V. Sheludko, V.E. Dosenko, N.V. Kuchuk

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
E-mail: i-gerasimenko@ukr.net
Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

Development of RNAi-based therapeutics is a fast growing field of pharmaceutical industry. Using plants for production of pharmaceutically valuable siRNAs may have significant advantages of cost-effectiveness, scalability and low risk of contamination with human pathogens. If edible plant species are genetically engineered to synthesize siRNAs, the costly stage of target product purification may be omitted. We describe the establishment of transgenic lettuce plants producing shRNA targeting delta isoform of protein kinase C (PKC-delta), an effective target for RNAi-based treatment of arterial hypertension. Transgenic lettuce plants were obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation with genetic constructs harboring antiPKC and scrambled (control) shRNA genes. The presence of transgenes was proved by PCR analysis, and the accumulation of antiPKC shRNA was estimated using RT-qPCR technique. Six transgenic lettuce lines showed varying levels of antiPKC shRNA expression with the highest value reaching $14 \pm 9 \%$ of highly abundant endogenous lettuce micro RNA (miR156a), or 12.7 fmol/g dry weight. Plants carrying either antiPKC

or scrambled shRNA genes flowered normally, but did not produce seeds. The described transgenic lettuce plants accumulating antiPKC siRNA are the subject for animal testing and can be considered as a raw material for the development of novel antihypertensive drugs.

ОДЕРЖАННЯ ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН САЛАТУ, ЩО СИНТЕЗУЮТЬ ПОТЕНЦІЙНО АНТИГІПЕРТЕНЗИВНУ КОРОТКУ ШПИЛЬКОВУ РНК

И.М. Герасименко, В.В. Клещевников,
В.Р. Кедлян, Л.О. Сахно, І.А. Арбузова,
Ю.В. Шелудько, В.Є. Досенко, М.В. Кучук

Зацікавленість фармацевтичної індустрії в розробці терапевтичних препаратів, заснованих на РНК-інтерференції, швидко зростає. Використання рослин для синтезу фармацевтично цінних коротких РНК може мати такі важливі переваги, як низька собівартість, можливість одержання великої кількості матеріалу й знижений ризик забруднення патогенами, небезпечними для людини. При використанні їстівних рослин можна виключити високовитратну стадію очищення кінцевого продукту. В даній роботі описано одержання трансгенних рослин салату, які синтезують коротку шпилькову РНК (кшРНК) для пригнічення експресії гена ізоформи дельта протеїнази С (ПКС), ефективною цілю при заснованому на РНК-інтерференції лікуванні артеріальної гіпертензії. Трансгенні рослини салату отримано методом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації з використанням генетичних конструкцій, які несуть гени анти-ПКС і контрольної кшРНК. Присутність трансгенів підтверджено ПЛР-аналізом. Рівень накопичення анти-ПКС кшРНК був вимірний за допомогою кількісної ПЛР зі зворотною транскрипцією. Шість трансгенних ліній салату демонстрували різний рівень експресії анти-ПКС кшРНК, найбільший вміст якої досягав 14 ± 9 % у порівнянні з високоекспресованою міРНК салату (mir156a), або 12,7 фмоль/г сухої маси. Рослини, що несуть як ген анти-ПКС, так і контрольної кшРНК, нормально цвіли, однак не зав'язували насіння. Описані трансгенні рослини салату, що містять анти-ПКС кшРНК, передбачається використовувати для тестування фізіологічної активності на тваринах, а надалі для розробки нових засобів при лікуванні артеріальної гіпертензії.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Sibley, C.R., Seow, Y., and Wood, M.J., Novel RNA-based strategies for therapeutic gene silencing, *Mol. Ther.*, 2010, vol. 18, no. 3, pp. 466–476.
2. Gavrillov, K., and Saltzman, W.M., Therapeutic

siRNA: principles, challenges, and strategies, *Yale J. Biol. Med.*, 2012, vol. 85, no. 2, pp. 187–200.

3. Behlke, M.A., Chemical modification of siRNAs for in vivo use, *Oligonucleotides*, 2008, vol. 18, no. 4, pp. 305–319.
4. Yu, B., Yang, Z., Li, J., Minakhina, S., Yang, M., Padgett, R.W., Steward, R., and Chen, X., Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis, *Science*, 2005, vol. 307, no. 5711, pp. 932–935.
5. Lilley, C.J., Bakhetia, M., Charlton, W.L., and Urwin, P.E., Recent progress in the development of RNA interference for plant parasitic nematodes, *Mol. Plant Pathol.*, 2007, vol. 8, no. 5, pp. 701–711.
6. Baum, J.A., Bogaert, T., Clinton, W., Heck, G.R., Feldmann, P., Pagan, O., Johnson, S., Plaetinck, G., Munyikwa, T., Pleau, M., Vaughn, T., and Roberts, J., Control of coleopteran insect pests through RNA interference, *Nat. Biotechnol.*, 2007, vol. 25, no. 11, pp. 1322–1326.
7. Mao, Y.B., Cai, W.J., Wang, J.W., Hong, G.J., Tao, X.Y., Wang, L.J., Huang, Y.P., and Chen, X.Y., Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol, *Nat. Biotechnol.*, 2007, vol. 25, no. 11, pp. 1307–1313.
8. Jin, S., Singh, N.D., Li, L., Zhang, X., and Daniell, H., Engineered chloroplast dsRNA silences cytochrome p450 monooxygenase, V-ATPase and chitin synthase genes in the insect gut and disrupts *Helicoverpa armigera* larval development and pupation, *Plant Biotechnol J.*, 2015, vol. 13, no. 3, pp. 435–446.
9. Zhang, L., Hou, D., Chen, X., Li, D., Zhu, L., Zhang, Y., Li, J., Bian, Z., Liang, X., Cai, X., Yin, Y., Wang, C., Zhang, T., Zhu, D., Zhang, D., Xu, J., Chen, Q., Ba, Y., Liu, J., Wang, Q., Chen, J., Wang, J., Wang, M., Zhang, Q., Zhang, J., Zen, K., and Zhang, C.Y., Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA, *Cell Res.*, 2012, vol. 22, no. 1, pp. 107–126.
10. Liang, H., Zhang, S., Fu, Z., Wang, Y., Wang, N., Liu, Y., Zhao, C., Wu, J., Hu, Y., Zhang, J., Chen, X., Zen, K., and Zhang, C.Y., Effective detection and quantification of dietetically absorbed plant microRNAs in human plasma, *J. Nutr. Biochem.*, 2015, vol. 26, no. 5, pp. 505–512.
11. Lukasik, A., and Zielenkiewicz, P., In silico identification of plant miRNAs in mammalian breast milk exosomes – a small step forward? *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 6, e99963.
12. Li, J., Zhang, Y., Li, D., Liu, Y., Chu, D., Jiang, X., Hou, D., Zen, K., and Zhang, C.Y., Small non-coding RNAs transfer through mammalian placenta

- and directly regulate fetal gene expression, *Protein Cell*, 2015, vol. 6, no. 6, pp. 391–396.
13. Dickinson, B., Zhang, Y., Petrick, J.S., Heck, G., Ivashuta, S., and Marshall, W.S., Lack of detectable oral bioavailability of plant microRNAs after feeding in mice, *Nat. Biotechnol.*, 2013, vol. 31, no. 11, pp. 965–967.
 14. Bagci, C., and Allmer, J., One step forward, two steps back; xeno-microRNAs reported in breast milk are artifacts, *PLoS One*, 2016, vol. 11, no. 1, e0145065.
 15. Chen, X., Zen, K., and Zhang, C.Y., Reply to Lack of detectable oral bioavailability of plant microRNAs after feeding in mice, *Nat. Biotechnol.*, 2013, vol. 31, no. 11, pp. 967–969.
 16. Zhou, Z., Li, X., Liu, J., Dong, L., Chen, Q., Kong, H., Zhang, Q., Qi, X., Hou, D., Zhang, L., Zhang, G., Liu, Y., Zhang, Y., Li, J., Wang, J., Chen, X., Wang, H., Zhang, J., Chen, H., Zen, K., and Zhang, C.Y., Honeysuckle-encoded atypical microRNA2911 directly targets influenza A viruses, *Cell Res.*, 2015, vol. 25, no. 1, pp. 39–49.
 17. Mlotshwa, S., Pruss, G.J., MacArthur, J.L., Endres, M.W., Davis, C., Hofseth, L.J., Pena, M.M., and Vance, V., A novel chemopreventive strategy based on therapeutic microRNAs produced in plants, *Cell Res.*, 2015, vol. 25, no. 4, pp. 521–524.
 18. Petrick, J.S., Moore, W.M., Heydens, W.F., Koch, M.S., Sherman, J.H., and Lemke, S.L., A 28-day oral toxicity evaluation of small interfering RNAs and a long double-stranded RNA targeting vacuolar ATPase in mice, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 2014, vol. 71, no. 1, pp. 8–23.
 19. Liu, N., and Olson, E.N., MicroRNA regulatory networks in cardiovascular development, *Dev. Cell.*, 2010, vol. 18, no. 4, pp. 510–525.
 20. Silvestri, P., Di Russo, C., Rigattieri, S., Fedele, S., Todaro, D., Ferraiuolo, G., Altamura, G., and Loschiavo, P., MicroRNAs and ischemic heart disease: towards a better comprehension of pathogenesis, new diagnostic tools and new therapeutic targets, *Recent Pat. Cardiovasc. Drug. Discov.*, 2009, vol. 4, no. 2, pp. 109–118.
 21. Novokhatska, T., Tishkin, S., Dosenko, V., Boldyriev, A., Ivanova, I., Strielkov, I., and Soloviev, A., Correction of vascular hypercontractility in spontaneously hypertensive rats using shRNAs-induced delta protein kinase C gene silencing, *Eur. J. Pharmacol.*, 2013, vol. 718, no. 1–3, pp. 401–407.
 22. Marillonnet, S., Thoeringer, C., Kandzia, R., Klimyuk, V., and Gleba, Y., Systemic Agrobacterium tumefaciens-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants, *Nat. Biotechnol.*, 2005, vol. 23, no. 6, pp. 718–723.
 23. Matveeva, N.A., Vasylenko, M., Shakhovsky, A.M., and Kuchuk, N.V., Agrobacterium-mediated transformation of lettuce (*Lactuca sativa* L.) with genes coding bacterial antigens from *Mycobacterium tuberculosis*, *Cytol. Genet.*, 2009, vol. 43, no. 2, pp. 94–98.
 24. Querci, M., Jermini, M., and Van der Eede, G., *The analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms*, Luxembourg, Office for Official Publications of the European Communities, 2006.
 25. Berdichevets, I.N., Shimshilashvili, H.R., Gerasyenko, I.M., Sindarovska, Y.R., Sheludko, Y.V., and Goldenkova-Pavlova, I.V., Multiplex PCR assay for detection of recombinant genes encoding fatty acid desaturases fused with lichenase reporter protein in GM plants, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, vol. 397, no. 6, pp. 2289–2293.
 26. Kurihara, Y., Takashi, Y., and Watanabe, Y., The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis, *RNA*, 2006, vol. 12, no. 2, pp. 206–212.
 27. Arif, M.A., Frank, W., and Khraiweh, B., Role of RNA interference (RNAi) in the moss *Physcomitrella patens*, *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, vol. 14, no. 1, pp. 1516–1540.
 28. Kramer, M.F., Stem-loop RT-qPCR for miRNAs, *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, 2011, vol. 15, Unit 15–10.
 29. Hong, Y., and Jackson, S., Floral induction and flower formation – the role and potential applications of miRNAs, *Plant Biotechnol. J.*, 2015, vol. 13, no. 3, pp. 282–292.
 30. Wang, C.Y., Zhang, S., Yu, Y., Luo, Y.C., Liu, Q., Ju, C., Zhang, Y.C., Qu, L.H., Lucas, W.J., Wang, X., and Chen, Y.Q., MiR397b regulates both lignin content and seed number in Arabidopsis via modulating a laccase involved in lignin biosynthesis, *Plant Biotechnol. J.*, 2014, vol. 12, no. 8, pp. 1132–1142.
 31. Barik, S., RNAi in moderation, *Nat. Biotechnol.*, 2006, vol. 24, no. 7, pp. 796–797.
 32. Tiwari, M., Sharma, D., and Trivedi, P.K., Artificial microRNA mediated gene silencing in plants: progress and perspectives, *Plant Mol. Biol.*, 2014, vol. 86, no. 1–2, pp. 1–18.
 33. McBride, J.L., Boudreau, R.L., Harper, S.Q., Staber, P.D., Monteys, A.M., Martins, I., Gilmore, B.L., Burstein, H., Peluso, R.W., Polisky, B., Carter, B.J., and Davidson, B.L., Artificial miRNAs mitigate shRNA-mediated toxicity in the brain: implications for the therapeutic development of RNAi, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2008, vol. 105, no. 15, pp. 5868–5873.

Поступила 14.03.16