

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

ЕРШОВА Наталия Михайловна

**РОЛЬ ГОМОЛОГА ИНГИБИТОРА ПЕПТИДАЗ КУНИТЦА
Nicotiana benthamiana В СИСТЕМЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ
ВИРУС-РАСТЕНИЕ**

1.5.3 – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2025

Работа выполнена в лаборатории генетического контроля устойчивости к стрессам Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук

- Научный руководитель** – *Комарова Татьяна Валерьевна, доктор биологических наук*
- Официальные оппоненты** – *Соловьев Андрей Геннадьевич, доктор биологических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, заведующий отделом биохимии вирусов растений*
- Голденкова-Павлова Ирина Васильевна, доктор биологических наук, доцент, ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, заведующий лабораторией функциональной геномики*
- Гасанова Татьяна Владимировна, кандидат биологических наук, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», биологический факультет, старший научный сотрудник кафедры вирусологии биологического факультета*

Защита диссертации состоится «03» апреля 2025 г. в 16 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.4 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы МГУ, д. 1, стр. 12, биологический факультет, ауд. М1.

E-mail: mgu.03.01.dissovet@gmail.com

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3363>

Автореферат разослан «__» _____ 2025 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.В. Комарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы. Растения постоянно подвергаются неблагоприятным воздействиям в среде своего роста и развития, сталкиваясь со множеством стрессовых факторов абиотического (температурные колебания, дефицит воды, высокие концентрации солей и др.) и биотического (бактерии, вирусы, грибы и др.) происхождения. Стресс, в частности, биотический (атака патогенов), запускает защитные реакции, такие как иммунные ответы, РНК интерференция (РНКи) или иные. В рамках такого ответа радикально меняется паттерн экспрессии генов и изменяется белковый состав клетки: одни белки подвергаются деградации, а другие накапливаются в клетке, или начинают выполнять другие функции в рамках патогенеза, менять свою локализацию, взаимодействуя с белками патогена. Ответы клетки на патогены вирусного и невирусного происхождения имеют схожие реакционные модули, и в настоящее время антивирусные иммунные ответы включены в зигзагообразную модель врожденного иммунитета (Jones and Dangl, 2006; Mandadi and Scholthof, 2013). Помимо иммунных ответов значительную роль в противовирусной защите играет РНКи. Описано множество вирусных белков, подавляющих данный механизм защиты (Csorba et al., 2015). Вирусные супрессоры сайленсинга связываются с различными компонентами системы РНКи, такими как белки и двуцепочечная РНК (дцРНК), имеющими решающее значение для запуска и работы механизма РНКи. Исследования показывают, что дцРНК может индуцировать реакции врожденного иммунитета, в частности РТИ (Pathogen-associated molecular pattern-Triggered Immunity) (Kørner et al., 2013; Niehl et al., 2016). Врожденный иммунитет и РНКи являются основными защитными механизмами против вирусной инфекции и, как правило, действуют на начальных этапах инфекции (Mandadi and Scholthof, 2013; Moon and Park, 2016; Calil and Fontes, 2017; Gouveia et al., 2017; Wu et al., 2019). В недавнем исследовании была предложена модель, в рамках которой тобамовирусные транспортные и репликазные белки действуют как вирусные эффекторы, подавляя РТИ и РНКи, соответственно (Huang et al., 2023). Репликазные белки мультиплицируют вирусную РНК и выступают в качестве фактора вирулентности в центре очага инфекции. Транспортные белки обеспечивают транспортировку вирусного генома из клетки в клетку и выступают в качестве фактора вирулентности на лидирующем фронте инфекции, подавляя РТИ (Huang et al., 2023). Такая мультифункциональность вирусных белков предполагает множественные взаимодействия с десятками клеточных факторов, роль которых в описанных выше иммунных ответах не определена, либо они являются участниками иных ответов в системе взаимодействий вирус-растение. Множество исследований описывает эти клеточные факторы как белки с провирусной или антивирусной активностью (García-Ruiz, 2018; García-Ruiz, 2019). Но актуальным остается вопрос, какова в действительности динамичная картина этих взаимодействий на всех этапах вирусного патогенеза, начиная с первичной инфицированной клетки до развития системной инфекции.

Подавление защитных механизмов клетки и активная вирусная репродукция, как правило, сопряжены с изменением активности межклеточного транспорта, посредством которого происходит и коммуникация между клетками, и ближний транспорт вирусов. Плазмодесмы (ПД) – это каналы между клетками, которые обеспечивают межклеточный транспорт метаболитов и сигнальных молекул и, следовательно, играют решающую роль в развитии и физиологии растений, а также в реакциях на сигналы окружающей среды и

стрессы. Появляются доказательства, что плазмодесмы контролируются сигналами, исходящими от других органелл, в первую очередь от хлоропластов и митохондрий. Эти сигналы действуют в ядре, изменяя экспрессию генов, которые контролируют как транспорт через плазмодесмы, так и биогенез последних. Взаимосвязь между функционированием хлоропластов и регуляцией функции ПД лежит в основе гипотезы о путях сигнализации между органеллами, ядром и регуляцией функции плазмодесм (ONPS, organelle-nucleus-PD signaling). Данная гипотеза описывает ключевое значение хлоропластов и митохондрий в обеспечении всех жизненных процессов, регуляции метаболизма клетки, синтезе и транспорте фотоассимилятов, а также реакциях на стрессовые воздействия (Burch-Smith et al., 2011; Azim and Burch-Smith, 2020).

Геномы вирусов растений кодируют белки, способные внедряться в различные эндомембранные компартменты клетки, в том числе ядро, где они оказывают влияние на экспрессию генов, и хлоропласты (Qiao et al., 2009; Levy et al., 2013; Levy, 2015; Bhattacharyya and Chakraborty, 2018). Многие хлоропластные белки участвуют в противовирусных ответах (Abbink et al., 2002; Caplan et al., 2008; Bhat et al., 2013), а симптоматика вирусного патогенеза зачастую сопряжена с хлорозом, изменением пигментации или мозаичностью инфицированных листьев, что возникает из-за дисфункции хлоропластов, вызванной истощением энергоресурсов и накоплением вирусных факторов в клетке (Reinero and Beachy, 1989; Qiao et al., 2009; Bhat et al., 2013; Li et al., 2016; Bhattacharyya and Chakraborty, 2018; Budziszewska and Obrępałska-Stepłowska, 2018). В систему взаимодействий вирус-растение вовлечено множество клеточных факторов. Одним из таких факторов является ген, кодирующий гомолог ингибитора пептидаз Кунитца (*KPILP*, *Kunitz peptidase inhibitor-like protein*). Ген *KPILP* обнаружен у представителей семейства Пасленовые, в том числе в табаке, картофеле, томате и других, и кодирует белок, который имеет все структурные элементы, присущие ингибиторам пептидаз Кунитца (KPI), но в отличие от KPI *Arabidopsis thaliana*, *KPILP* не ингибирует сериновые пептидазы (Li et al., 2008a; Sheshukova et al., 2017). Было показано, что уровень мРНК *KPILP* *N. benthamiana* в корнях существенно выше, чем в фотосинтетически активных зрелых листьях. Кроме того, в инфицированном вирусом табачной мозаики (ВТМ) листе табака с проявлением симптомов в виде мозаики в светло-зеленых зонах с измененной пигментацией и активной репродукцией вируса уровень мРНК *KPILP* существенно выше, чем в темно-зеленых зонах (Sheshukova et al., 2017). Данное наблюдение указывает на существование обратной взаимосвязи между фотосинтезом и экспрессией *KPILP*: во-первых, экспрессия *KPILP* активна в корнях, где не происходит фотосинтез; во-вторых, при инфекции ВТМ происходят структурные и функциональные изменения хлоропластов наряду с активацией экспрессии *KPILP*. Нарушение работы хлоропластов приводит к запуску передачи регуляторных сигналов от пластид в ядро, что, в свою очередь, влияет на защитные реакции клетки и экспрессию ядерных генов, ассоциированных с фотосинтезом, и отражается на репродукции вируса (Brunkard and Burch-Smith, 2018; Crawford et al., 2018). Но какую роль *KPILP* играет на фоне тобамовирусного патогенеза, способствует ли он развитию инфекции или, напротив, участвует в противовирусных защитных реакциях, оставалось неясным.

Цели и задачи исследования. Целью настоящей работы было изучение свойств и функций гомолога ингибитора пептидаз Кунитца *Nicotiana benthamiana* (Nb*KPILP*) и определение его роли в системе взаимодействий вирус-растение.

Для достижения цели были решены следующие задачи:

1. Анализ уровня экспрессии *NbKPILP* в условиях системной инфекции X вируса картофеля (ХВК) и тобамовирусов, ВТМ и крВТМ крестоцветных (крВТМ), в модельном растении *N. benthamiana*.
2. Создание модельной системы для анализа функций *NbKPILP* во взаимодействии вирус-растение и исследование влияния *NbKPILP* на физиологический статус растения *N. benthamiana*.
3. Выявление влияния *NbKPILP* на репродукцию и развитие системной инфекции тобамовирусов ВТМ и крВТМ.

Объект и предмет исследования. Объектами исследования были клеточный фактор *KPILP Nicotiana benthamiana* и вирусы растений (потексвирус и тобамовирусы). Предметом исследования было изучение влияния повышенной экспрессии *NbKPILP* на развитие вирусной инфекции.

Научная новизна работы. Полученные в настоящей работе результаты обладают научной новизной и имеют теоретическую и практическую значимость. Проведенное исследование выявило существование нового провирусного фактора, который принимает активную роль в развитии тобамовирусной инфекции в модельном растении *N. benthamiana*, которое относится к семейству Пасленовые. Данные, полученные в исследовании, могут быть экстраполированы на других представителей семейства.

Теоретическая и практическая значимость работы. Охарактеризованные свойства и функции нового клеточного фактора *NbKPILP*, принимающего участие в регуляции физиологических процессов в условиях вирусного патогенеза, расширяют представления о системе взаимодействий вирус-растение. Замедление вирусного патогенеза, вызванное подавлением экспрессии нового провирусного клеточного фактора *NbKPILP*, дает основу для разработки подходов, направленных на создание безвирусного сельского хозяйства.

Методология и методы диссертационного исследования. Экспериментальная работа проведена на модельном растении *N. benthamiana*, относящемся к семейству Пасленовые и экономически значимых тобамовирусах. Для создания генетических конструкций использованы стандартные генно-инженерные методы; заражение растений проводили частицами ВТМ через поранение абразивом поверхностных тканей листа; для инфицирования ХВК или крВТМ были использованы векторы, созданные на основе геномов этих вирусов; доставка генетического материала осуществлялась посредством агробактерии *Agrobacterium tumefaciens*; оценка накопления РНК осуществлена при помощи ПЦР в реальном времени, предваряемой обратной транскрипцией; работа с белками и РНК осуществлена согласно методам, описанным в литературе; оценка глюкозы в тканях выполнена посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии; оценка каллозы произведена с использованием конфокальной лазерной флуоресцентной микроскопии с предварительным окрашиванием флуоресцентным красителем; количественный анализ флуоресцентного сигнала проведен при использовании программного обеспечения ImageJ.

Положения, выносимые на защиту

1. Инфекция ХВК, ВТМ и крВТМ активирует экспрессию *NbKPILP* в листьях растения *Nicotiana benthamiana*.

2. *NbKPILP* участвует в регуляции физиологического статуса растения *N. benthamiana* на фоне вирусного патогенеза.

3. *NbKPILP* способствует репродукции, а также ближнему и системному транспорту тобамовирусов в *Nicotiana benthamiana*.

4. Подавление экспрессии *NbKPILP* приводит к замедлению развития симптоматики и снижению смертности растений при инфицировании тобамовирусами.

Степень достоверности и апробация результатов. В ходе работы использовались общепризнанные современные методы и подходы; достоверность полученных данных подтверждается достаточным количеством воспроизводимых результатов, их статистической обработкой и публикацией результатов в рецензируемых журналах. Апробация проведена на межлабораторном семинаре ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН 19 февраля 2025 г. Работа была представлена на 43-м конгрессе FEBS Open Bio (2018 г.), 44-м и 45-м конгрессе FEBS (2019 и 2021 г.); на VII Съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященному 100-летию кафедры генетики СПбГУ, Санкт-Петербург, (2019 г.); конференции «Биологическая защита растений — основа стабилизации агроэкосистем», Краснодар (2022 г.); II научном форуме «ГЕНЕТИЧЕСКИЕ РЕСУРСЫ РОССИИ», С.-Петербург (2023 г.). По материалам диссертационной работы опубликовано 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в Диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

Личный вклад соискателя. Личный вклад заключался в анализе данных литературы, постановке задач и экспериментов, интерпретации результатов и построении гипотез на основе полученных данных, подготовке публикаций и текста диссертации.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, основной части, обсуждения результатов, заключения и списка цитируемой литературы из 377 наименований. Работа изложена на 118 страницах машинописного текста и включает 17 рисунков и 2 таблицы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Анализ уровня экспрессии NbKPILP в условиях системной инфекции X вируса картофеля и тобамовирусов, ВТМ и крВТМ

В интактных зрелых листьях *N. benthamiana* экспрессия *NbKPILP* подавлена за счет экспрессии вложенной альтернативной рамки считывания, которая находится в составе мРНК *NbKPILP*. Также показано, что при заражении листьев *N. benthamiana* вирусным вектором крВТМ:GFP, созданным на основе генома крВТМ и не способным к системному транспорту, экспрессия *NbKPILP* активируется. Активация экспрессии также показана для *NtKPILP* в растениях *N. tabacum* с системной инфекцией ВТМ, особенно в светло-зеленых зонах мозаичного листа с активной вирусной репродукцией (Sheshukova et al., 2017). Для того чтобы понять, является ли активация экспрессии *NbKPILP* частью генерализованного ответа на вирусную инфекцию, были получены растения *N. benthamiana* с системной инфекцией X вируса картофеля (ХВК), ВТМ и крВТМ. Для этого использовали вирусный вектор рPVX (Komarova et al., 2006), кодирующий инфекционную копию ХВК, вектор с инфекционной копией крВТМ или суспензию частиц ВТМ. Развитие системной инфекции ХВК происходило на 7 день после агроинфильтрации, пробы для анализа собирали на 10-14 день после заражения. Тобамовирусная симптоматика проявлялась на 7 день после инокуляции, пробы собирали на 7-10 день. Помимо видимых симптомов, инфекцию подтверждали, собирая образцы для выделения общего растворимого белка, после чего препараты разделяли методом электрофореза в ПААГ с последующим окрашиванием Кумасси, что позволяло выявить мажорную полосу, соответствующую по массе белку оболочки вирусов (рис. 1А).

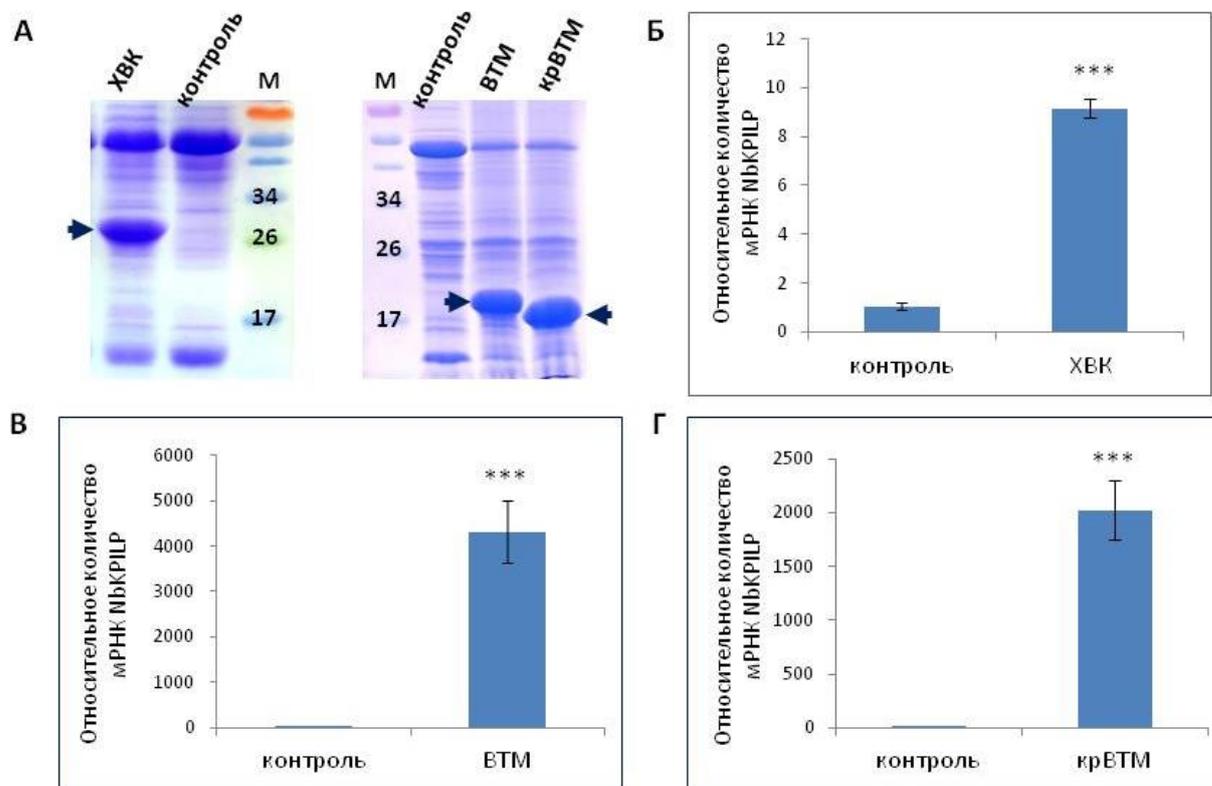


Рисунок 1. Экспрессия *NbKPILP* активируется при вирусной инфекции. А – экстракт растворимых белков из листьев, инфицированных ХВК (слева) и ВТМ и крВТМ (справа). Электрофорез в 12% ПААГ, гель окрашен Кумасси бриллиантовым синим G-250. Зоны,

соответствующие белку оболочки вирусов, маркированы стрелками. М, маркеры молекулярной массы (кДа). Б, В и Г – относительное количество мРНК *NbKPILP* в листьях с системной инфекцией ХВК (Б), ВТМ (В) и крВТМ (Г), оцененное с помощью ОТ-кПЦР. Здесь и далее представлены среднее значение и стандартная ошибка. Уровень накопления мРНК *NbKPILP* в интактном растении того же возраста был принят за 1. Нормировка на значения, полученные для мРНК гена протеин фосфатазы 2А (PP2A). ***, $p < 0,001$ (двухвыборочный t-критерий Стьюдента).

Из верхних листьев с подтвержденной инфекцией выделяли тотальную РНК, после чего анализировали уровень экспрессии *NbKPILP* методом количественной ПЦР в реальном времени, предваряемой обратной транскрипцией (ОТ-кПЦР). Рисунок 1 Б, В и Г показывает, что экспрессия *NbKPILP* повышается в ответ на системную инфекцию ХВК в ~10 раз, ВТМ и крВТМ – более чем в 2000 раз.

Создание модельной системы для анализа функций NbKPILP при взаимодействии вирус-растение

Для того чтобы выяснить роль и функции *NbKPILP* в ответных реакциях растения на вирусную инфекцию, была создана модельная система, основанная на индукции РНК интерференции, приводящей к подавлению экспрессии целевого гена. В данном подходе использовали технику вирус-индуцируемого сайленсинга генов (VIGS). Подход с использованием техники VIGS приводит к уменьшению количества мРНК для эндогенных генов растений, которые имеют сходство с последовательностью, содержащейся в вирусном векторе (Burton et al., 2000; Shimizu et al., 2009). При этом достаточно доставить в клетку последовательность длиной несколько сотен нуклеотидов для формирования двуцепочечной (дц) РНК, которая будет образовываться при репликации вирусного вектора. Такая дцРНК будет индуцировать сайленсинг целевого гена. Таким образом, можно использовать не целый ген, а лишь часть последовательности. Для создания конструкции был выбран участок *NbKPILP* длиной 183 нт с 70 по 253 нуклеотид кодирующей области. Выбранный фрагмент *NbKPILP* клонирован в вектор pPVX (Komarova et al., 2006) под дублированный промотор гена белка оболочки. В результате была получена конструкция pPVX:frKPILP (Рис. 2А).

Доставку конструкции осуществляли методом агротрансформации: в нижние листья молодых 4-5 недельных растений *N. benthamiana* вводили инфильтрацией суспензию агробактерий, несущих вирусный вектор pPVX:frKPILP для индукции сайленсинга. В нижних инфильтрированных листьях образовывались вирусные частицы, способные к дальнему транспорту. В результате распространения по растению они достигали верхних листьев и начинали там репродуцироваться, вызывая подавление экспрессии *NbKPILP*. В качестве контроля использовали вирусный вектор pPVX, кодирующий полную инфекционную копию ХВК, при заражении которым экспрессия *NbKPILP* активируется. Через ~7 дней на верхних листьях появлялись симптомы системной инфекции (рис. 2Б), а анализ накопления мРНК *NbKPILP* в обоих типах инфицированных растений проведен на 10-12 день после инокуляции (д.п.и.).

Техника VIGS позволила подавить экспрессию *NbKPILP* на фоне инфекции ХВК более чем на 87% (рис. 2В). Количественные показатели мРНК *NbKPILP* были сравнимы с интактными растениями того же возраста. Уровень репродукции вируса в растениях с системной инфекцией pPVX:frKPILP или pPVX существенно не отличался, что было продемонстрировано при оценке уровней геномной РНК ХВК (рис. 2Г). Таким образом,

была создана модельная система, позволяющая сравнивать эффекты повышенной и подавленной экспрессии *NbKPILP* на фоне вирусной инфекции.

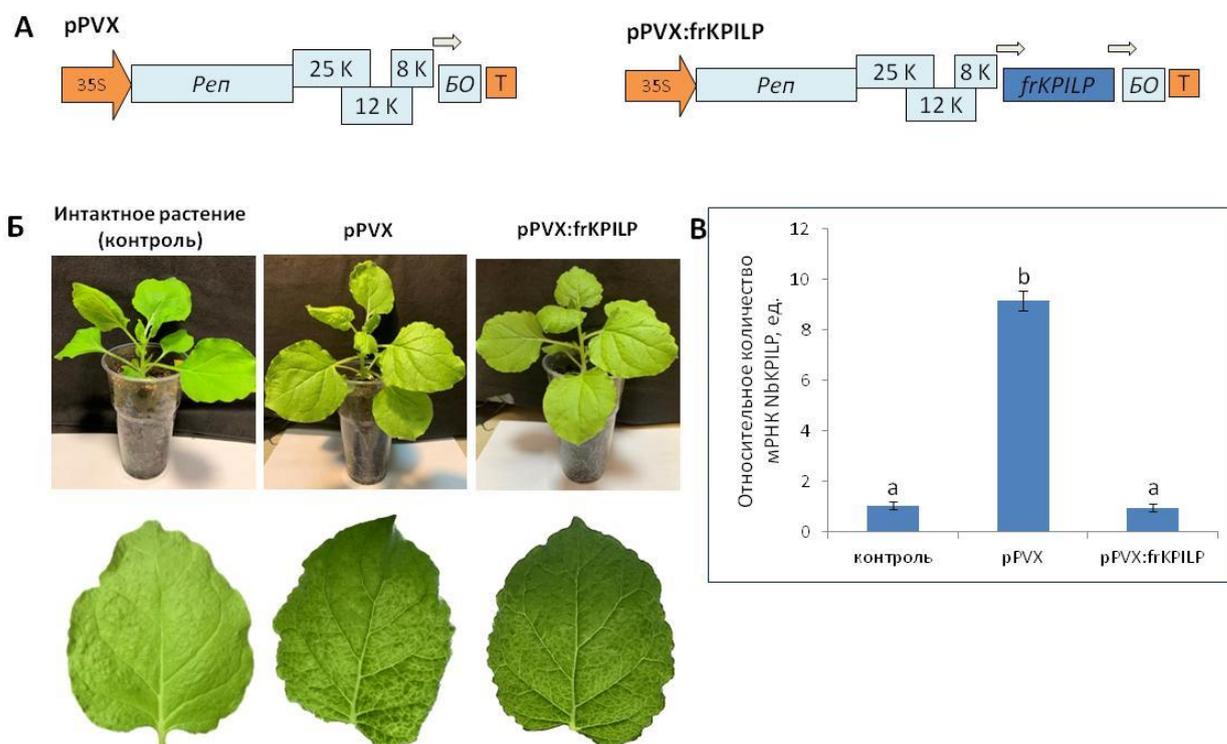


Рисунок 2. Модельная система для анализа функций *NbKPILP*. А – схематическое изображение векторов, созданных на основе генома ХВК, используемых для индукции (pPVX, слева) и подавления (pPVX:frKPILP, справа) экспрессии *NbKPILP*; 35S – 35S промотор вируса мозаики цветной капусты, Rep – ген репликазы ХВК, 25К, 12К и 8К – гены тройного блока ХВК, БО – ген белка оболочки ХВК, стрелка обозначает субгеномный промотор гена БО, frKPILP – фрагмент последовательности *NbKPILP*. Б – растения *N. benthamiana* модельной системы на 10 д.п.и, используемые в экспериментах. В – относительное количество мРНК *NbKPILP* в растениях модельной системы, оцененное ОТ-кПЦР. Уровень накопления мРНК *NbKPILP* в интактном растении был принят за 1. Данные были проанализированы с использованием ANOVA. Разные буквы над столбцами указывают, что различия статистически значимы при $p < 0,05$ (HSD Tukey). Контроль – интактное контрольное растение, pPVX – с системной инфекцией ХВК, pPVX:frKPILP – с подавленной экспрессией *NbKPILP* на фоне системной инфекции ХВК. Г – относительное количество геномной РНК ХВК в растениях, инфицированных pPVX и pPVX:frKPILP, оцененное ОТ-кПЦР и праймерами к гену репликазы ХВК. Различия в экспрессии статистически не значимы (двухвыборочный t-критерий Стьюдента).

Исследование влияния повышенной экспрессии *NbKPILP* на физиологический статус растения *N. benthamiana* в условиях системной инфекции ХВК

NbKPILP участвует в регуляции передачи ретроградных сигналов от хлоропластов в ядро

Ранее было показано, что уровень мРНК *NbKPILP* в корнях существенно выше, чем в фотосинтетически активных зрелых листьях. Кроме того, в инфицированном ВТМ листе табака с проявлением симптомов в виде мозаики в светло-зеленых зонах с измененной пигментацией и активной репродукцией вируса уровень мРНК *NbKPILP* существенно выше, чем в темно-зеленых зонах (Sheshukova et al., 2017). В совокупности эти наблюдения позволяют предположить, что активация *NbKPILP* на фоне инфекции

приводит к разрушению хлорофилла и/или может быть направлена на подавление функции хлоропластов и фотосинтеза в целом. В хлоропластах осуществляются многие метаболические процессы, продукты которых определяют физиологический статус клетки, поскольку представляют собой компоненты путей передачи ретроградных сигналов от пластид к ядру. Для проверки предположения об участии *NbKPILP* в регуляции передачи ретроградных сигналов хлоропластов (CRS), была оценена экспрессия ядерных генов, ассоциированных с фотосинтезом, (photosynthesis-associated nuclear genes, PhANG), продукты которых в норме локализуются в хлоропластах и обеспечивают их нормальное функционирование. *GOLDEN2-LIKE1 (GLK1)* кодирует транскрипционный фактор, необходимый для нормального развития хлоропластов (Fitter et al., 2002). Экспрессия *GLK1* коррелирует с экспрессией генов, ассоциированных с фотосинтезом, и подавляется при нарушении функционирования хлоропластов (Kakizaki et al., 2009). *LHCB1* и *2* кодируют антенные белки светособирающих комплексов фотосистем (Song et al., 2018); *RBCS1A* кодирует одну из изоформ малой субъединицы RUBISCO, которая участвует в противовирусном иммунном ответе растений (Bhat et al., 2013). Изменения экспрессии *LHCB1*, *2* и *RBCS1A* координируют ретроградные сигналы, которые определяют физиологический статус хлоропластов (Susek et al., 1993; Burch-Smith et al., 2011). *HEMA1* кодирует белок хлоропластов, глутамил-тРНК редуктазу, которая обеспечивает первую стадию биосинтеза тетрапиррола (метаболического пути, промежуточные продукты которого служат сигналами регуляции экспрессии ядерных генов) (Schmied et al., 2011; Song et al., 2018). Анализ экспрессии вышеперечисленных генов осуществляли методом ОТ-кПЦР, оценивая, таким образом, уровни накопления соответствующих мРНК (рис. 3). На рисунке 3А представлены результаты анализа образцов РНК, выделенной из листьев растений (i) с системной инфекцией ХВК и повышенной экспрессией *NbKPILP*, вызванной заражением рPVX, (ii) с системной инфекцией ХВК и подавленной экспрессией *NbKPILP*, вызванной заражением рPVX:frKPILP, (iii) и из контрольных, интактных растений того же возраста. По результатам анализа видно, что в зараженных рPVX растениях, где *NbKPILP* активирован, экспрессия анализируемых генов подавлена по сравнению с интактными растениями. В то время как в растениях, инфицированных рPVX:frKPILP, где *NbKPILP* подавлен, экспрессия *GLK1* подавлена, как и в растениях, зараженных рPVX, экспрессия *LHCB1* и *LHCB2* подавлена, но в меньшей степени, чем в растениях, зараженных рPVX, и эта разница статистически значима. Экспрессия генов *RBCS1A* и *HEMA1* в растениях с подавленным *NbKPILP*, остается на том же уровне, что и в интактных растениях.

Дополнительно была произведена проверка вышеперечисленных генов, ассоциированных с фотосинтезом, в условиях транзientной экспрессии *NbKPILP*. Для этого использовали генно-инженерную конструкцию *35S-NbKPILP*, содержащую последовательность *NbKPILP* под контролем 35S промотора вируса мозаики цветной капусты в составе бинарного вектора рCambia1300. Доставку генетического материала осуществляли в листья *N.benthamiana* методом агротрансформации, а пробы для анализа собирали на третий день после инфильтрации, выделяя из листьев тотальную РНК.

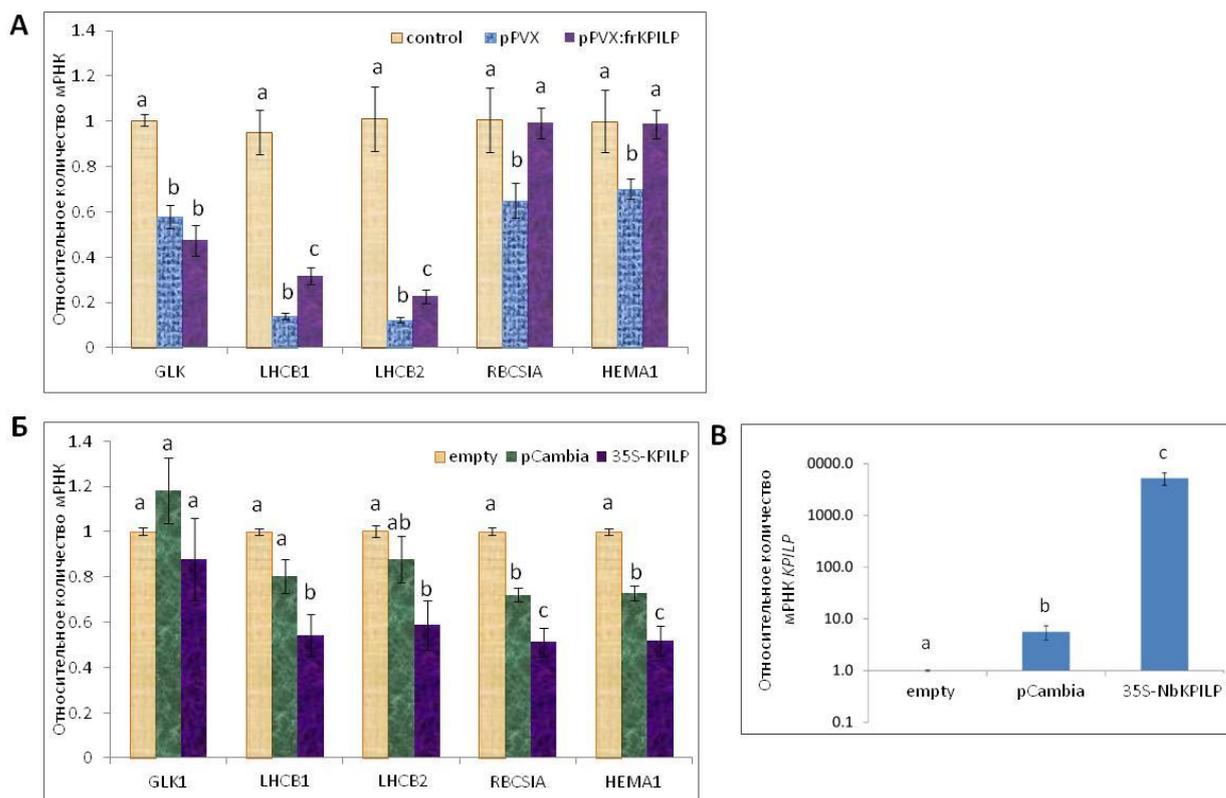


Рисунок 3. *NbKPILP* регулирует экспрессию генов, ответственных за передачу ретроградных сигналов хлоропластов. А – Относительное количество мРНК генов, ответственных за передачу ретроградных сигналов хлоропластов, при повышенной (pPVX) и подавленной (pPVX:frKPILP) экспрессии *NbKPILP*, оцененное с помощью ОТ-кПЦР. Уровень накопления мРНК каждого гена в контрольном растении (control) принят за 1. Данные проанализированы с использованием теста Краскела-Уоллиса. Столбцы с разными буквами указывают на статистически значимую разницу в соответствии с *post-hoc* тестом Данна при $p < 0,05$. Б и В – Относительное количество мРНК генов-маркеров запуска передачи ретроградных сигналов хлоропластов (Б) и мРНК *NbKPILP* (В) на 3 д.п.и. суспензией агробактерий, содержащих pCambia или 35S-*NbKPILP*, по результатам ОТ-кПЦР. Уровень накопления мРНК каждого гена в интактном листе (empty) принят за 1. Разные буквы над столбцами указывают, что различия статистически значимы при $p < 0,05$ (ANOVA, HSD Tukey).

Анализ ОТ-кПЦР показал, что в условиях транзientной экспрессии 35S-*NbKPILP* происходит подавление экспрессии *LHCB1*, *LHCB2*, *RBCS1A* и *HEMA1* по сравнению с интактными листьями, а экспрессия *GLK1* не меняется. Стоит отметить, что агроинfiltrация контрольным бинарным вектором pCambia1300, которая сама по себе индуцирует небольшое повышение уровня мРНК *NbKPILP* (рис. 3В), также приводит к колебаниям в экспрессии анализируемых генов, участвующих в ретроградном сигналинге (рис. 3Б): *RBCS1A* и *HEMA1* подавлены, но в меньшей степени, чем при экспрессии 35S-*NbKPILP*; разница в экспрессии *LHCB1*, *LHCB2* между интактными и контрольными (pCambia1300) листьями статистически не значима; а экспрессия *GLK1* не меняется. Таким образом, было показано, что *NbKPILP* принимает участие в негативной регуляции экспрессии генов *LHCB1*, *LHCB2*, *RBCS1A* и *HEMA1* и, таким образом, участвует в регуляции передачи ретроградных сигналов от пластид в ядро.

***NbKPILP* участвует в регуляции углеродного метаболизма**

Фотоассимиляты являются продуктом фотосинтеза, и их физиологическое распределение по всему растению необходимо для правильного роста, созревания и размножения. Вирусная инфекция негативно влияет на фотосинтез и приводит к дисфункции хлоропластов и истощению ресурсов, поэтому была проведена оценка уровня накопления глюкозы в source-листьях и в sink-частях трех групп растений модельной системы: в интактных, в инфицированных pPVX и в инфицированных pPVX:frKPILP. Source-листья – это зрелые листья, которые производят основной объем фотоассимилятов, служащих запасом питательных веществ для всего растения. Sink-части растений – это акцепторные части, которые включали в себя верхушечные части растения с молодыми листьями длиной менее 1 см, цветки и цветочные почки. В source-листьях, инфицированных как pPVX, так и pPVX:frKPILP, наблюдалось снижение уровня глюкозы по сравнению с интактными растениями: в 6 и 2 раза, соответственно (рис. 4). Это указывает на подавление фотосинтеза и углеродного метаболизма, вызванное вирусной инфекцией. Однако в sink-частях растений с подавленной экспрессией *NbKPILP* уровень глюкозы был таким же, как и в интактных растениях, а в инфицированных pPVX растениях, где экспрессия *NbKPILP* повышена, содержание глюкозы было в 2 раза ниже, чем в интактных. Эти результаты указывают на то, что *NbKPILP* участвует в регуляции накопления и распределения фотоассимилятов во время инфекции ХВК, а снижение уровня глюкозы связано с активацией экспрессии *NbKPILP*, вызванной ХВК.

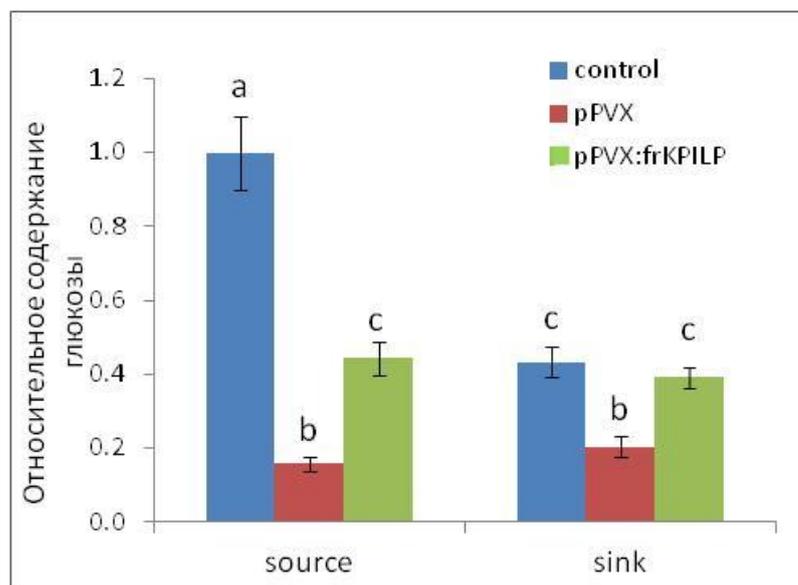


Рисунок 4. *NbKPILP* участвует в регуляции углеродного метаболизма. Относительное содержание глюкозы в source и sink тканях растений *N. benthamiana* с системной инфекцией pPVX или pPVX:frKPILP. Уровень глюкозы в исходных листьях контрольных растений (control) принят за 1. Разные буквы над столбцами указывают, что различия статистически значимы при $p < 0,05$ (ANOVA, HSD Tukey).

***NbKPILP* участвует в регуляции отложений каллозы вокруг плазмодесм**

В соответствии с гипотезой о том, что биогенез и функционирование ПД во много зависят от физиологического статуса пластид, которые посредством ретроградных сигналов регулируют межклеточный транспорт (Burch-Smith et al., 2011), было сделано

предположение о том, что данная регуляция на фоне вирусной инфекции может происходить при участии *NbKPILP*. Одним из механизмов регуляции пропускной способности ПД является модуляция отложений каллозы вокруг канала. Увеличение отложения каллозы вызывает уменьшение апертуры ПД, а деградация каллозы приводит к расширению ПД и активации межклеточного транспорта. Чтобы исследовать влияние повышенной экспрессии *NbKPILP* на регуляцию проницаемости ПД, был оценен уровень отложений каллозы в листьях интактных растений *N. benthamiana* и в системно инфицированных pPVX и pPVX:frKPILP растениях. Каллозу окрашивали анилиновым синим (рис. 5А) и оценивали количественно по интенсивности флуоресценции красителя, связанного с каллозой (Zavaliev and Epel, 2015).

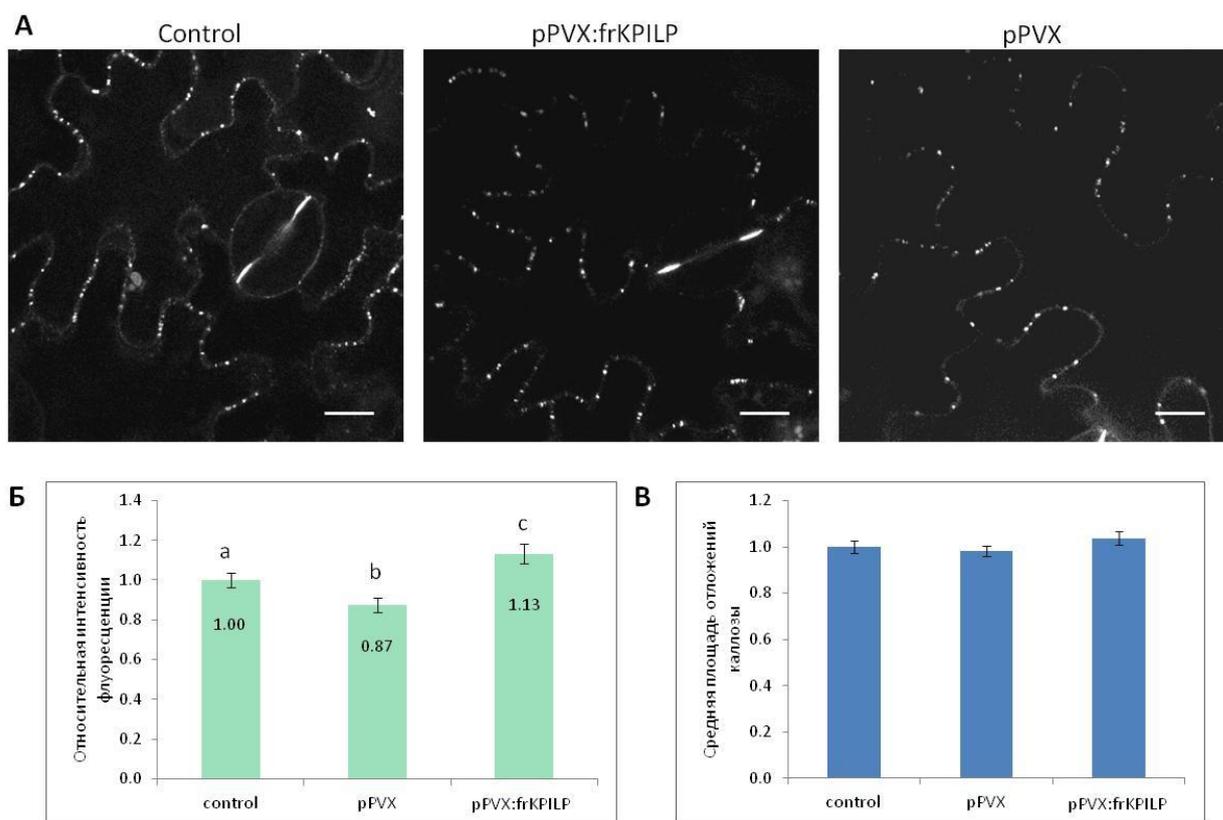


Рисунок 5. *NbKPILP* участвует в регуляции отложений каллозы вокруг плазмодесм. А – флуоресцентные изображения каллозы, окрашенной анилиновым синим. Листья контрольных незараженных растений и растений с системной инфекцией pPVX или pPVX:frKPILP инфильтрировали раствором анилинового синего и анализировали с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Масштабная линейка = 20 мкм. Б и В – относительная интенсивность флуоресценции, отражающая количество каллозы вокруг ПД (Б) и средняя площадь каллозных отложений (В) в листьях растений с системной инфекцией pPVX и pPVX:frKPILP по сравнению в интактными. Уровень каллозы в контрольных растениях принят за 1. Разные буквы над столбцами указывают, что различия статистически значимы при $p < 0,05$ (ANOVA, HSD Tukey).

Уровень отложений каллозы в зараженных ХВК растениях с повышенной экспрессией *NbKPILP* был снижен на 13% по сравнению с интактными растениями, в то время как в листьях с подавленной экспрессией *NbKPILP* наблюдалось увеличение на 13% (рис. 5Б). Примечательно, что количество флуоресцентных точек и их средняя площадь не различались между проанализированными образцами. Это указывает на отсутствие существенных изменений количества ПД на единицу площади и морфологии ПД по

сравнению с контрольными растениями. Таким образом, показано, что *NbKPILP* участвует в регуляции отложений каллозы вокруг плазмодесм во время вирусной инфекции, способствуя ее деградации.

Выявление роли *NbKPILP* в регуляции ближнего транспорта и репродукции ВТМ и крВТМ

Способствуя деградации каллозы вокруг ПД, *NbKPILP*, таким образом, может являться позитивным регулятором межклеточного транспорта, в том числе и при вирусной инфекции. Для оценки влияния *NbKPILP* на ближний транспорт вируса были использованы вирусные векторы на основе генома ВТМ (TMV:GFP, рис. 6А) и крВТМ (сгTMV:GFP, рис. 7А), в которых ген белка оболочки заменен на ген *GFP*. Три группы растений вышеописанной модельной системы: (1) с повышенной экспрессией *NbKPILP* (группа pPVX), (2) с подавленной экспрессией *NbKPILP* (группа pPVX:fr*KPILP*) и (3) контрольные, заражали вирусными векторами на основе генома тобамовирусов. Доставку генетического материала осуществляли с помощью агроинфильтрации. Для получения одиночных клеток, трансформированных TMV:GFP или сгTMV:GFP, с дальнейшим развитием отдельных очагов инфекции, использовали оптимизированные разведения суспензий аргобактерий. Визуализация отдельных фокусов инфекции, содержащих GFP, была произведена через 4 дня после агроинфильтрации (рис. 6Б и рис. 7Б), а последующая количественная оценка позволила оценить эффективность репликации и межклеточного транспорта. Результаты, представленные на рисунках 6 и 7, демонстрируют, что количество фокусов, содержащих GFP, значительно ниже в контрольных растениях и растениях с подавленной экспрессией *NbKPILP* по сравнению с растениями с активированной экспрессией *NbKPILP*.

Для оценки эффективности ближнего транспорта и репродукции тобамовирусов была количественно определена площадь фокусов, содержащих GFP, и интенсивность флуоресценции в каждой экспериментальной группе. Количество более крупных очагов (100-300 пикселей) является самым высоким у растений с повышенной экспрессией *NbKPILP*, в то время как количество мелких очагов (2-49 пикселей) является самым низким в этой группе (рис. 6В и 7В), то есть наиболее эффективный межклеточный транспорт исследуемых тобамовирусов связан с повышенной экспрессией *NbKPILP*. Интенсивность флуоресценции GFP в каждом очаге отражает уровень репродукции вирусного вектора и накопления GFP. Наибольшая интенсивность также наблюдается у растений с повышенной экспрессией *NbKPILP* (рис. 6Г и 7Г).

Дополнительно была проведена оценка уровня накопления вирусной РНК, кодирующей ТБ и *GFP* в зонах инфильтрации TMV:GFP. При повышенной экспрессии *NbKPILP* соответствующие транскрипты накапливались примерно в 20 раз эффективнее, чем в растениях с подавленной экспрессией *NbKPILP* и контрольных растениях (рис. 6Д и Е). Аналогичные результаты были получены на растениях, инокулированных сгTMV:GFP (рис. 7Д и Е). Это указывает на то, что репродукция тобамовирусов подавляется при подавлении экспрессии *NbKPILP*.

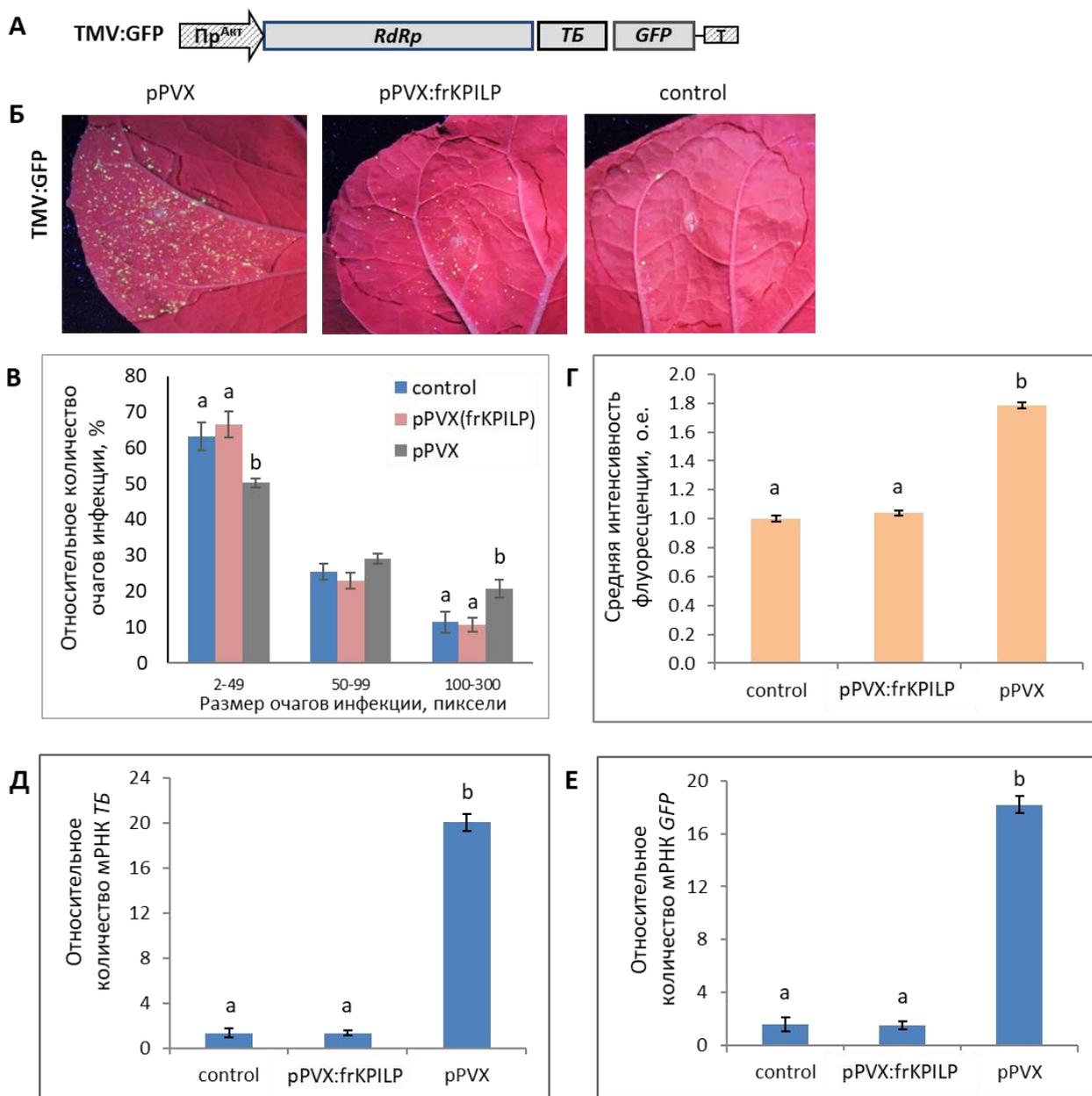


Рисунок 6. NbKPILP стимулирует репродукцию и межклеточный транспорт ВТМ. А – схематическое изображение вектора TMV:GFP на основе генома ВТМ. Пр^{Акт} – промотор гена *Act2 Arabidopsis thaliana*; *RdRp*, ген репликазы; *ТБ*, ген транспортного белка; *GFP* – ген зеленого флуоресцентного белка, замещающего ген *ВО*; Т, терминатор транскрипции. Б – изображения листьев в ультрафиолетовом свете на 4 день после агроинфильтрации TMV:GFP. В – процент очагов разного размера, экспрессирующих TMV:GFP. Г – средняя интенсивность флуоресценции GFP в анализируемых очагах. Д и Е – относительное количество транскриптов генов *ТБ* и *GFP*, синтезированных с вирусного вектора TMV:GFP. Представленные на гистограммах В-Е данные проанализированы с использованием ANOVA. В качестве контроля (control) использованы листья не инфицированных ХБК растений. Разные буквы над столбцами указывают, что различия статистически значимы при $p < 0.05$ (HSD Tukey).

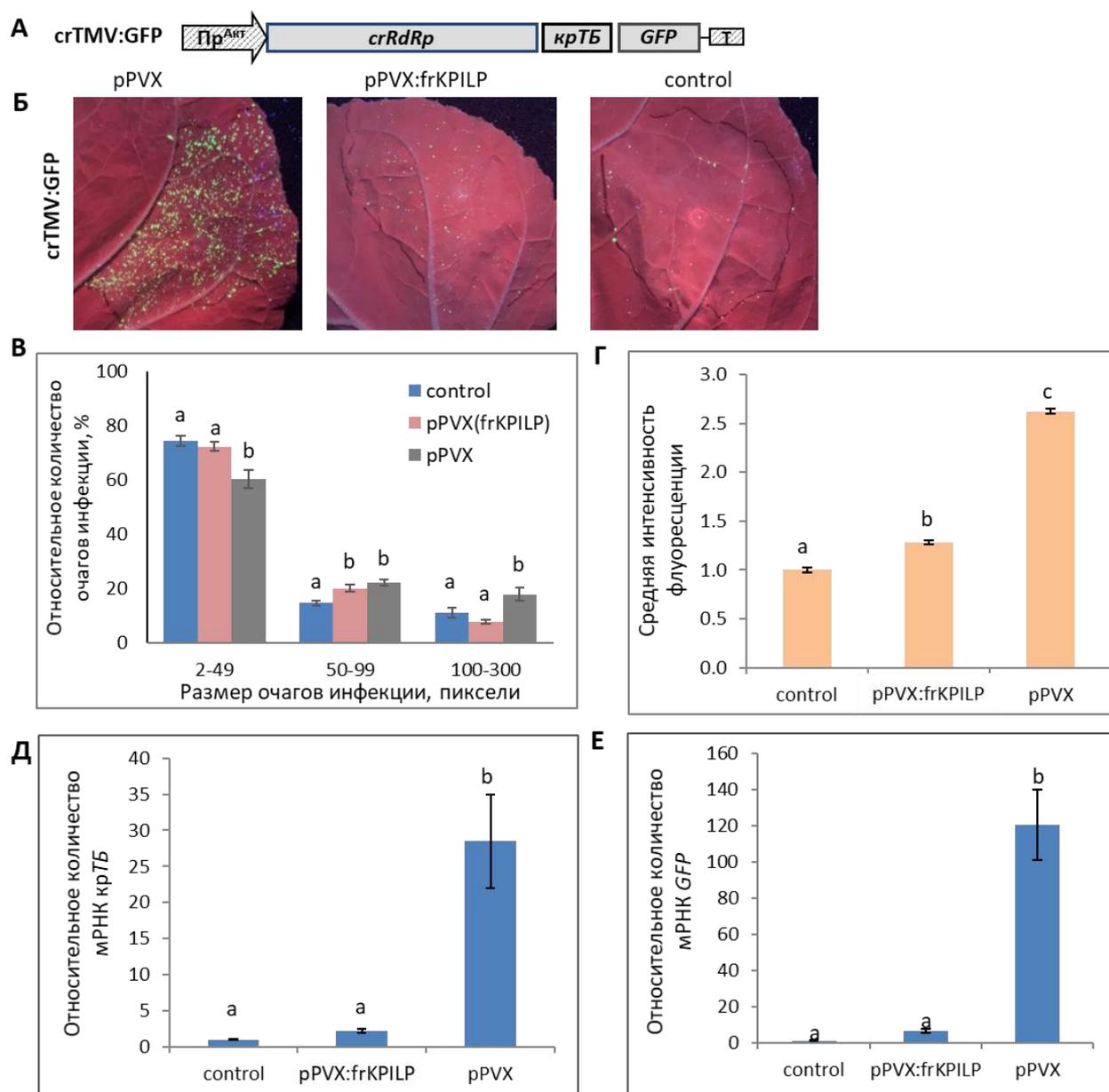


Рисунок 7. NbKPILP стимулирует репродукцию и межклеточный транспорт крВТМ. А – схематическое изображение вектора crTMV:GFP на основе генома крВТМ. Пр^{Акт} – промотор гена *Act2 Arabidopsis thaliana*; *crRdRp*, ген репликазы; *крТБ*, ген транспортного белка крВТМ; *GFP* – ген зеленого флуоресцентного белка, замещающего ген *БО*; Т, терминатор транскрипции. Б – изображения листьев в ультрафиолетовом свете на 4 день после агроинfiltrации crTMV:GFP. В – процент очагов разного размера, экспрессирующих crTMV:GFP. Г – средняя интенсивность флуоресценции GFP в анализируемых очагах. Д и Е – относительное количество транскриптов генов *крТБ* и *GFP*, синтезированных с вирусного вектора crTMV:GFP. Представленные на гистограммах В-Е данные проанализированы с использованием ANOVA. В качестве контроля (control) использованы листья не инфицированных ХБК растений. Разные буквы над столбцами указывают, что различия статистически значимы при $p < 0.05$ (HSD Tukey).

Эффективность агробактериальной трансформации растений зависит от множества факторов, и сама по себе агробактериальная инфекция является стрессовым фактором. В созданной модельной системе на основе ХБК тобамовирусные векторы доставляли путем агроинfiltrации, когда уровень экспрессии *NbKPILP* уже был предварительно изменен: в случае pPVX – повышен, а в случае pPVX:frKPILP снижен. Таким образом, нельзя исключать, что это потенциально могло приводить к разной эффективности

трансформации растительных клеток агробактериями. Чтобы исключить влияние этого предполагаемого эффекта и дополнительно подтвердить, что подавление экспрессии *NbKPILP* отрицательно влияет именно на репродукцию тобамовирусов, был использован следующий экспериментальный подход. Подавление *NbKPILP* вызывали с помощью временно экспрессируемой кассеты 35S-siKPILP (рис. 8), кодирующей 346-нуклеотидный фрагмент *NbKPILP* в смысловой и антисмысловой ориентации, разделенные интроном из гена пируват ортофосфат дикиназы (PDK) *Flaveria trinervia*.



Рисунок 8. Схематическое изображение конструкции 35S-siKPILP

При транскрипции 35S-siKPILP в растительной клетке синтезируется единая РНК, содержащая оба фрагмента *NbKPILP*, разделенные интроном. При выходе из ядра интрон сплайсируется, а в цитоплазме накапливается дцРНК siKPILP, которая индуцирует подавление экспрессии эндогенного *NbKPILP* через механизм РНК интерференции.

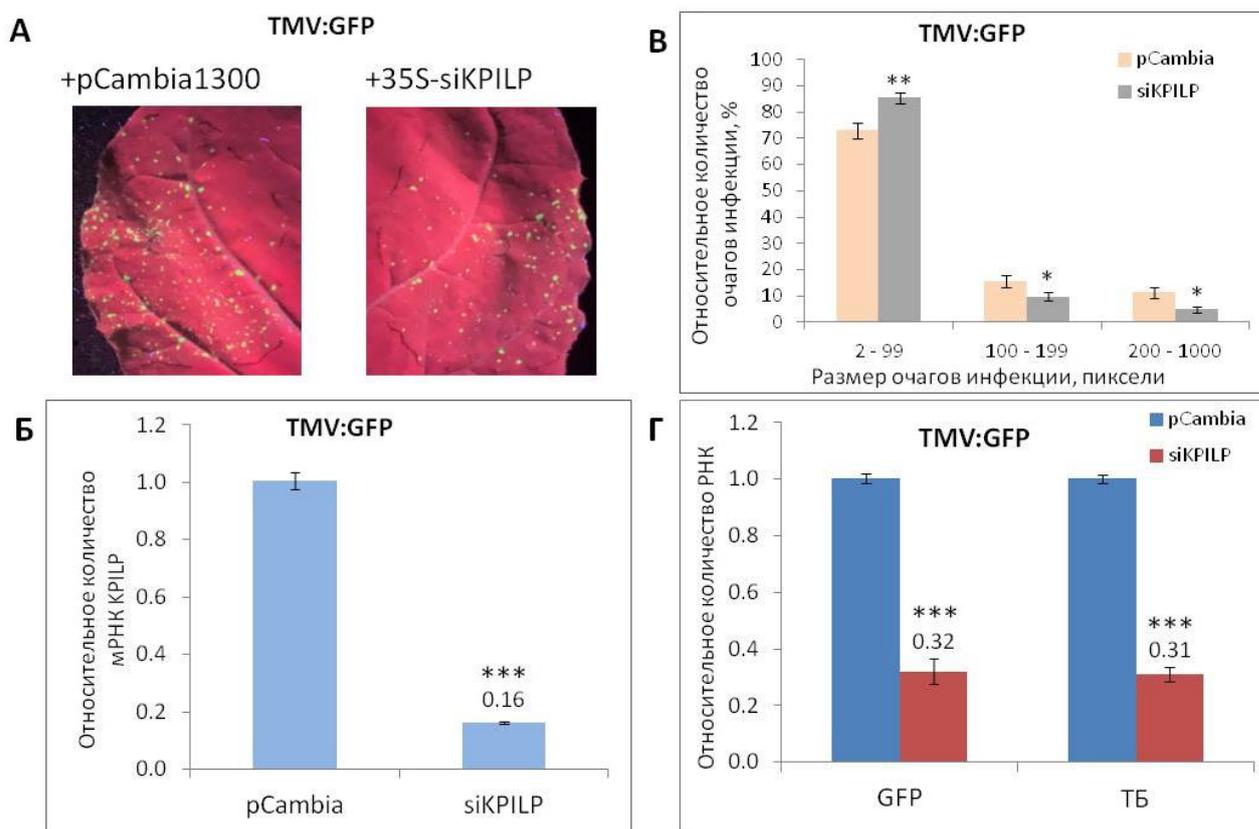


Рисунок 9. Подавление экспрессии *NbKPILP* с помощью транзientной экспрессии 35S-siKPILP снижает эффективность репродукции ВТМ. А – визуализация в ультрафиолетовом свете очагов инфекции в листьях *N. benthamiana*, агроинфильтрованных TMV:GFP совместно с вектором pCambia (слева) или с 35S-siKPILP (справа) на 3 д.п.и. Б – относительное количество мРНК *NbKPILP* в тех же листьях. В – процент очагов разного размера, экспрессирующих TMV:GFP. Г – относительное количество РНК генов транспортного белка ВТМ (ТБ) и GFP, оцененное ОТ-кПЦР. Б и Г, уровень накопления мРНК *NbKPILP* в листьях, агроинфильтрованных бинарным вектором pCambia, был принят за 1. Данные проанализированы с использованием двухвыборочного t-критерия Стьюдента. ***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$, *, $p < 0.05$.

Векторы TMV:GFP или crTMV:GFP вводили в листья *N. benthamiana* одновременно с конструкцией 35S-siKPILP или pCambia1300 в качестве контроля. Экспрессия 35S-siKPILP была подтверждена ОТ-кПЦР и приводила к ~5-кратному снижению уровня эндогенного *NbKPILP* (рис. 9Б и рис. 10Б).

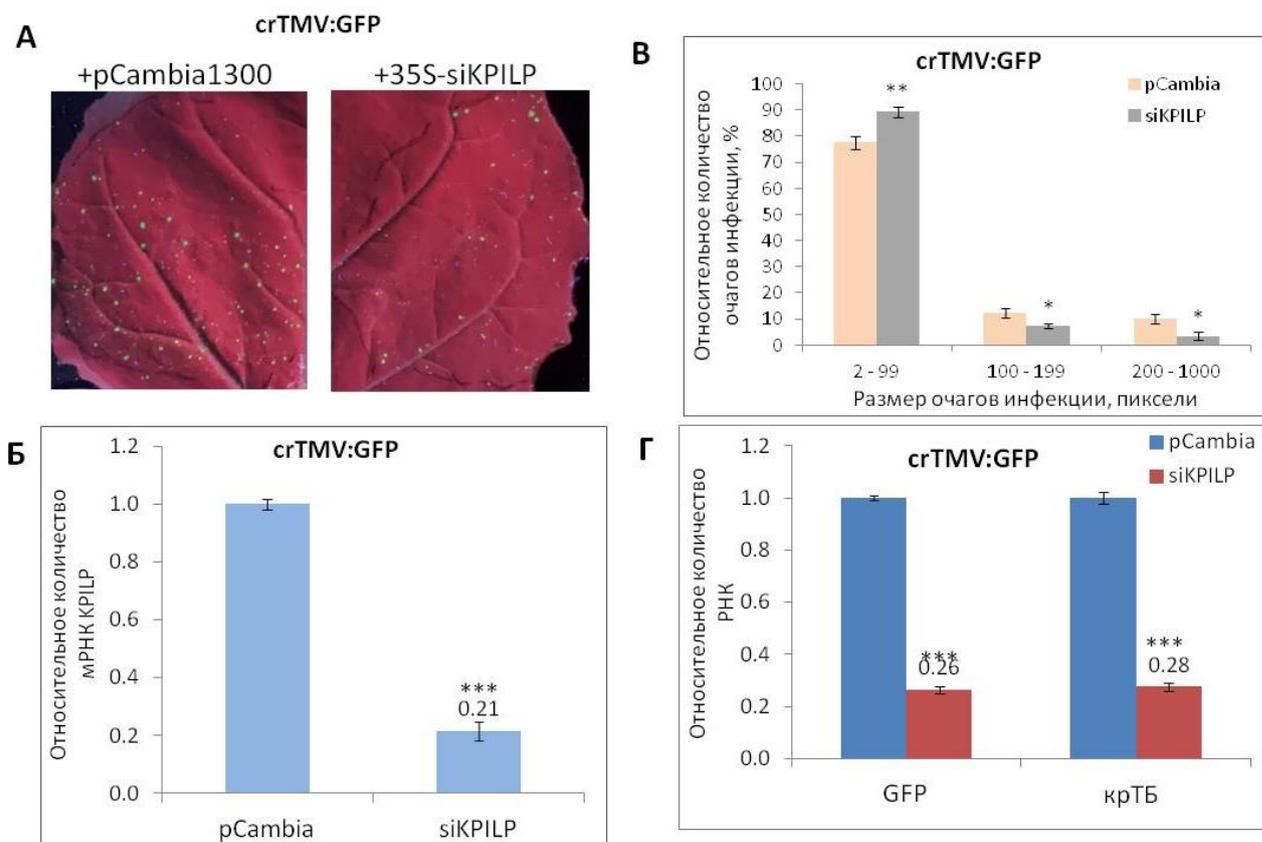


Рисунок 10. Подавление экспрессии *NbKPILP* с помощью siKPILP снижает эффективность репродукции крВТМ. А – визуализация в ультрафиолетовом свете очагов инфекции в листьях *N. benthamiana*, агроинфицированных crTMV:GFP совместно с вектором pCambia (слева) или с 35S-siKPILP (справа) на 3 д.п.и. Б – относительное количество мРНК *NbKPILP* в тех же листьях. В – процент очагов разного размера, экспрессирующих crTMV:GFP. Г – относительное количество РНК генов транспортного белка крВТМ (*крТБ*) и *GFP*, оцененное ОТ-кПЦР. В гистограммах Б-Г представлены средние значения и стандартная ошибка. Б и Г, уровень накопления мРНК *NbKPILP* в листьях, инокулированных бинарным вектором pCambia был принят за 1. Данные проанализированы с использованием двухвыборочного t-критерия Стьюдента. ***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$, *, $p < 0.05$.

Оптимизированное разведение агробактериальной суспензии позволило получить отчетливые зоны тобамовирусной инфекции (рис. 9А и рис. 10А), размер которых отражал эффективность распространения TMV:GFP или crTMV:GFP. Результаты количественной оценки размера очагов инфекции (рис. 9В и 10В) показывают, что подавление экспрессии *NbKPILP*, индуцированное siKPILP, приводило к увеличению на ~10% количества мелких очагов (2-99 пикселей) и уменьшению количества более крупных очагов (200-1000 пикселей) в 3 раза по сравнению с контролем (вирусные векторы, коинфицированные с pCambia1300). Также был оценен уровень накопления вирусной РНК в зонах инфильтрации TMV:GFP или crTMV:GFP (рис. 9Г и 10Г). Результаты ОТ-кПЦР показали, что в зонах с подавленной экспрессией *NbKPILP* накопление транскриптов, содержащих ген транспортного белка (ТБ, крТБ) или GFP снижено в ~3 раза по сравнению с

контролем. Также следует отметить, что количество очагов инфекции тобамовирусов примерно вдвое меньше при подавлении экспрессии *NbKPILP*.

В совокупности эти данные указывают на то, что *NbKPILP* не влияет на эффективность агробактериальной трансформации, но влияет на развитие вирусной инфекции. Таким образом, было показано, что повышение экспрессии *NbKPILP* способствует тобамовирусной инфекции как на уровне накопления РНК, так на уровне межклеточного транспорта.

Исследование влияния *NbKPILP* на развитие системной инфекции ВТМ и крВТМ

Для оценки роли *NbKPILP* в развитии системной тобамовирусной инфекции были использованы растения вышеописанной модельной системы: с повышенной и подавленной экспрессией *NbKPILP*, индуцированной векторами pPVX или pPVX:fr*KPILP*, соответственно, и интактные растения того же возраста. Все три группы были инфицированы ВТМ или крВТМ для получения системной инфекции.



Рисунок 11. Внешний вид растений *N. benthamiana* с системной инфекцией ВТМ (А) и крВТМ (Б).

Эксперименты были повторены дважды. В ходе проведения экспериментов было произведено наблюдение за развитием симптоматики, характерной для тобамовирусной инфекции, а именно, некротическое поражение листьев, стебля и черешков, увядание верхушечной части во всех группах растений, а также зафиксировано время гибели. Важно отметить, что системная инфекция ВТМ и крВТМ часто приводит к

возникновению системных некрозов с последующей гибелью растений *N. benthamiana* (рис. 11), в отличие от растений *N. tabacum*. Время проведения экспериментов составляло 40 дней. В группе моск-инокулированных, не зараженных ни одним из вирусов, растений выживаемость на протяжении периода наблюдения составила 100%. Динамика смертности инфицированных растений к 40-му дню представлена на рисунке 12 А и Б.

Вирус-индуцированное подавление экспрессии *NbKPILP* вдвое снижает уровень смертности инфицированных ВТМ растений по сравнению с контрольной группой или с растениями с повышенным уровнем *NbKPILP* (рис. 12А). Однако, инфекция крВТМ не столь чувствительна к отсутствию *NbKPILP*: 90% растений из экспериментальной группы с подавленной экспрессией *NbKPILP* погибли к 40-му дню после инфицирования (рис. 12Б).

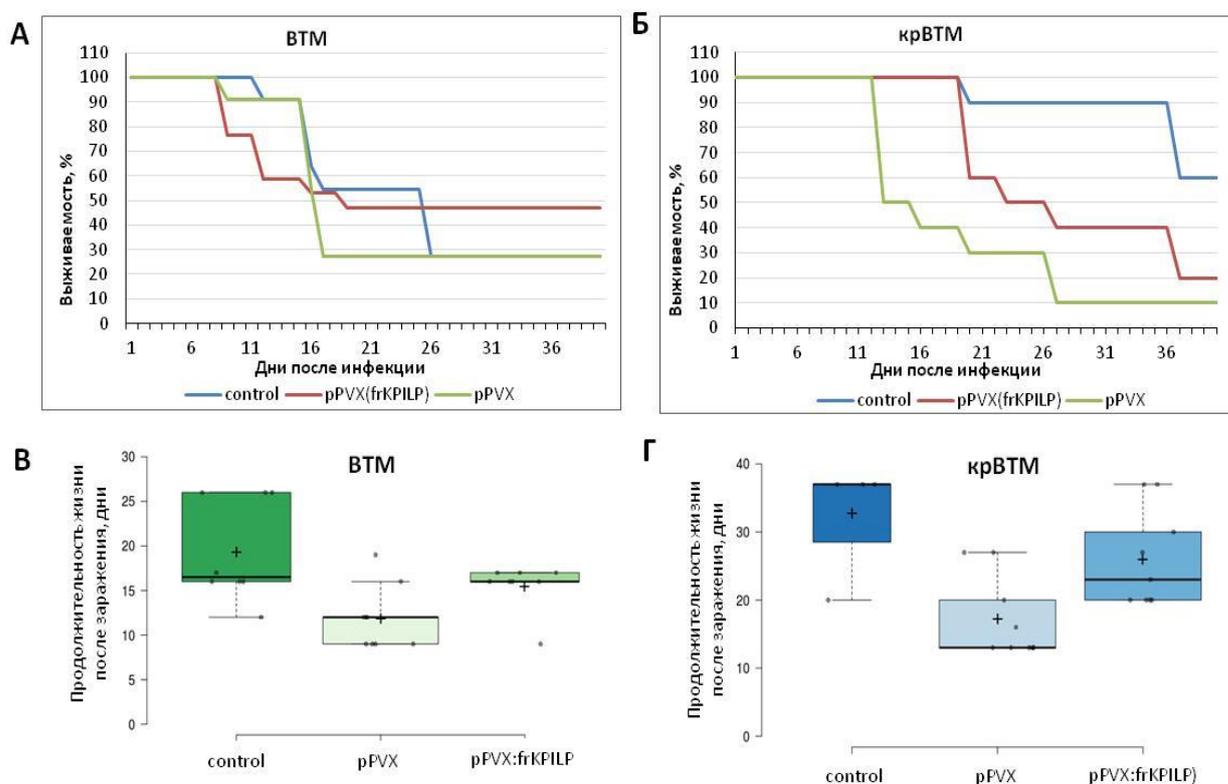


Рисунок 12. Подавление экспрессии *NbKPILP* приводит к повышению устойчивости *N. benthamiana* к тобамовирусной инфекции. А и Б – выживаемость растений *N. benthamiana*, зараженных ВТМ (А) и крВТМ (Б). В и Г – оценка продолжительности жизни растений *N. benthamiana*, инфицированных ВТМ (В) и крВТМ (Г). В эксперименте использованы растения, инфицированные ХВК (pPVX), растения с сайленсингом *NbKPILP* (pPVX:frKPILP) и контрольные (control), выживаемость моск-инокулированных растений составила 100% на протяжении периода наблюдения; данные представлены как 25% и 75% процентиля (границы коробки), максимальное и минимальное значение - верхняя и нижняя границы усов, выпадающие значения обозначены отдельно стоящими точками.

Еще один параметр, который был проанализирован – это средняя продолжительность жизни растений в каждой группе. Большинство растений, инфицированных pPVX, погибли примерно через две недели после заражения ВТМ, а их среднее время жизни составило $11,9 \pm 1,2$ дней, в то время как растения с подавленным *NbKPILP* имели немного большую продолжительность жизни ($15,5 \pm 0,9$ дней). Среднее время жизни растений контрольной группы составило $19,4 \pm 2$ дней (рис. 12В). В случае

заражения крВТМ половина растений, инфицированных рPVX, погибла через две недели, а средняя продолжительность жизни в этой группе составила $17 \pm 1,9$ дней (рис. 12Г). В группе растений, инфицированных рPVX:frKPILP и подавленным уровнем экспрессии *NbKPILP*, среднее время жизни было больше, чем в группе растений, инфицированных рPVX, и составило $26 \pm 2,3$ дней. А среднее время жизни в контрольной группе без инфекции ХВК составило $32,8 \pm 4,3$ дней. Таким образом, растения с вирус-индуцированным сайленсингом *NbKPILP* продемонстрировали повышенную устойчивость к инфекции ВТМ и крВТМ по сравнению с растениями с активированной экспрессией *NbKPILP*, для которых была характерна более высокая смертность и скорость развития симптоматики. Приведенные результаты позволяют утверждать, что *NbKPILP* стимулирует развитие этих тобамовирусов.

На основе полученных результатов предложена модель, описывающая свойства и функции *NbKPILP* в системе взаимодействий вирус-растение (рис. 13).

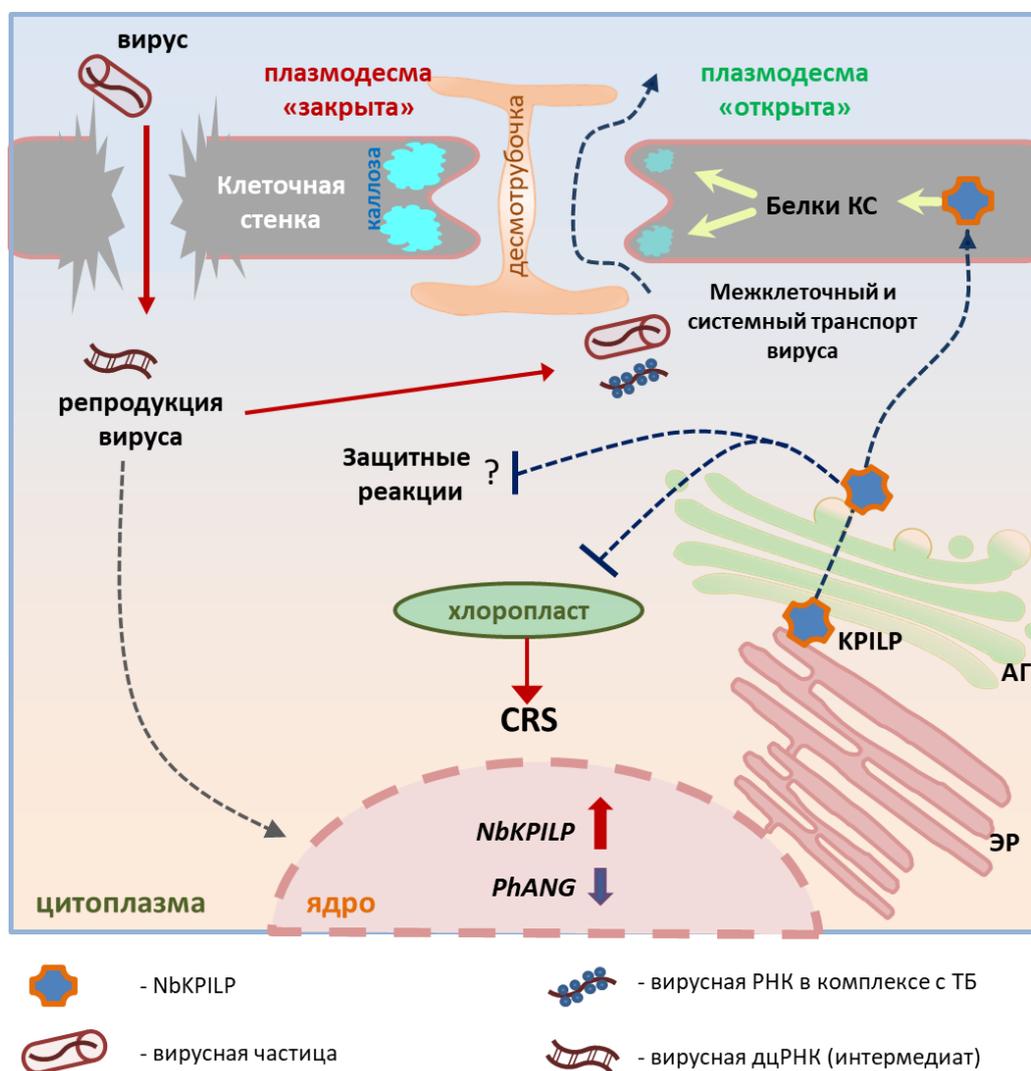


Рисунок 13. Модель, описывающая функции *NbKPILP* на фоне тобамовирусной инфекции. Пояснения в тексте. АГ – аппарат Гольджи; ЭР – эндоплазматический ретикулум; КС – клеточная стенка; CRS – Chloroplast Retrograde Signaling, ретроградный хлоропластный сигналинг; PhANG – Photosynthesis-Associated Nuclear Genes, гены, ассоциированные с фотосинтезом.

При попадании вирусного генома в клетку происходит активация экспрессии *NbKPILP*. Накопление в инфицированной клетке *NbKPILP* приводит к подавлению генов, ассоциированных с фотосинтезом, функций хлоропластов и изменению паттерна ретроградных хлоропластных сигналов, а также, вероятно, подавлению защитных реакций. Внутриклеточная секреция приводит к накоплению *NbKPILP* в клеточной стенке и гидролизу каллозы, вероятно, при участии других белков клеточной стенки. Измененный паттерн ретроградного сигналинга также может приводить к деградации каллозы по другим механизмам. В совокупности, в результате подавления антивирусной защиты клетки и гидролиза каллозы вокруг плазмодесм создаются условия, благоприятные для активной вирусной репродукции и распространению инфекции по всему растению.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Тобамовирусная инфекция у *N. benthamiana* может сопровождаться довольно тяжелой симптоматикой и развиваться в короткие сроки (от 5 до 14 дней). Симптомы выражаются в изменении пигментации листьев, системном некрозе и гибели всего растения, хотя степень поражения зависит от дополнительных факторов, таких как возраст в момент заражения, количество света и температура окружающей среды, а также от инфекции другими вирусами, действующими синергично. У восприимчивого хозяина быстрое развитие вирусной инфекции возможно только при наличии «благоприятных» условий для всех стадий инфекции – от «распаковки» генома вируса до проникновения в сосудистую систему. Такие «благоприятные» условия определяются наличием провирусных факторов в клетке. Одним из провирусных факторов, способствующих быстрому развитию тобамовирусной инфекции у *N. benthamiana* является гомолог ингибитора пептидаз Кунитца, *NbKPILP*. В самом начале настоящего исследования о роли и функциях *NbKPILP* было известно довольно мало: количество его мРНК в корнях значительно превышает уровни в листьях, а экспрессия его гомолога в табаке, *NtKPILP*, коррелирует с накоплением ВТМ в инфицированных листьях. Но какое значение для ВТМ при этом имеет его активация на фоне инфекции – данный вопрос был открыт.

В ходе проведенного исследования был выявлен ряд свойств *NbKPILP*. Во-первых, показано, что экспрессия *NbKPILP* повышается в ответ на заражение таксономически разными вирусами: в тысячи раз в ответ на тобамовирусы и в ~10 раз - на инфекцию потексвируса. В дальнейшем было выявлено, что *NbKPILP* принимает участие в регуляции многих жизненно важных процессов: в метаболизме каллозы вокруг плазмодесм и регуляции межклеточного транспорта, углеродном метаболизме, в регуляции генов, ассоциированных с фотосинтезом, и ретроградном сигналинге. Доказана однозначная провирусная роль *NbKPILP* для развития тобамовирусных инфекций ВТМ и крВТМ. При этом на развитие потексвирусной инфекции, на первый взгляд, *NbKPILP* влияния не оказывает, хотя детального исследования в отношении ХВК не проводилось.

В исследовании не были оценены изменения уровня экспрессии *NbKPILP* во времени на фоне инфекции ВТМ, но можно предположить, что на ранних стадиях развития инфекции *NbKPILP* участвует в запуске необратимых изменений в фотосинтетическом аппарате и активации межклеточного транспорта. *NbKPILP* не был обнаружен в хлоропластах, но существует четкая обратная корреляция между фотосинтезом и экспрессией *NbKPILP*, активируемой во время тобамовирусной

инфекции. Более того, вирусы могут использовать *NbKPILP* для подавления активности хлоропластов, тем самым влияя на противовирусный ответ и регулируя свой транспорт от клетки к клетке и на большие расстояния. На основании полученных результатов можно рассматривать *NbKPILP* как провирусный клеточный фактор и одну из генетических детерминант восприимчивости, «спящую» в надземной части интактного растения, но активируемую вирусной инфекцией. Остается без ответа вопрос о том, оказывает ли тобамовирусная инфекция прямое влияние на экспрессию *NbKPILP*, или же в этом регуляторном пути участвуют и другие белки. Следовательно, поиск потенциальных партнеров *NbKPILP* и клеточных факторов выше и ниже каскада, в котором участвует *NbKPILP*, может пролить свет на других участников этого регуляторного модуля и является предметом дальнейшего исследования.

ВЫВОДЫ

1. Экспрессия *NbKPILP* активируется на фоне развития инфекции X вируса картофеля, вируса табачной мозаики и вируса табачной мозаики крестоцветных у растений *Nicotiana benthamiana*.
2. На фоне вирусного патогенеза *NbKPILP* регулирует физиологический статус растения, а именно, участвует в регуляции ретроградных сигналов хлоропластов, углеводного метаболизма и межклеточного транспорта.
3. *NbKPILP* стимулирует репродукцию и межклеточный транспорт ВТМ и крВТМ.
4. *NbKPILP* способствует развитию системной тобамовирусной инфекции.
5. Подавление экспрессии *NbKPILP* через механизм РНК интерференции повышает выживаемость растений при тобамовирусном патогенезе.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях

1. **Ershova N**, Kamarova K, Sheshukova E, Antimonova A, Komarova T. A novel cellular factor of *Nicotiana benthamiana* susceptibility to tobamovirus infection // *Frontiers in Plant Science*. — 2023. — Vol. 14. — P. 1224958. doi:10.3389/fpls.2023.1224958. ИФ WoS JIF 4.1. Доля участия 70%. 1,5 п.л.
2. **Ershova N**, Sheshukova E, Kamarova K, Arifulin E, Tashlitsky V, Serebryakova M, Komarova T. *Nicotiana benthamiana* Kunitz peptidase inhibitor-like protein involved in chloroplast-to-nucleus regulatory pathway in plant-virus interaction // *Frontiers in Plant Science*. — 2022. — Vol. 13. — P. 1041867. doi:10.3389/fpls.2022.1041867. ИФ WoS JIF 4.1. Доля участия 70%. 1,8 п.л.
3. Dorokhov Y, **Ershova N**, Sheshukova E, Komarova T. Plasmodesmata Conductivity Regulation: A Mechanistic Model // *Plants*. — 2019. — Vol. 8, no. 12. — P. 595. doi:10.3390/plants8120595. ИФ WoS JIF 4.0. Доля участия 30%. 2,5 п.л.
4. Шешукова Е.В., **Ершова Н.М.**, Комарова Т.В., Бронштейн А.М., Дорохов Ю.Л. Экспрессия генной матрицы, кодирующей гомолог ингибитора пептидазы Кунитца,

контролируется как на уровне трансляции, так и транскрипции // Биохимия — 2018. — Т. 83, № 10. — С. 1562 – 1571. ИФ РИНЦ 1,696. Доля участия 20%. 1,1 п.л.

[Sheshukova EV, **Ershova NM**, Komarova TV, Bronstein AM, Dorokhov YL. The Expression of Matryoshka Gene Encoding a Homologue of Kunitz Peptidase Inhibitor Is Regulated Both at the Level of Transcription and Translation. Biochemistry (Mosc.) — 2018. — Vol. 83, no. 10. — P. 1255–1262. doi:10.1134/S0006297918100103. ИФ WoS JIF 2.3. Доля участия 20%. 0,9 п.л.]