

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Атабекова Анастасия Константиновна

**Функциональный анализ белков, кодируемых бинарным блоком
транспортных генов фитовирусов**

Специальность 1.5.3. Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2026

Диссертация подготовлена в отделе биохимии вирусов растений Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

**Научный
руководитель**

Соловьев Андрей Геннадьевич, доктор биологических наук, профессор

**Официальные
оппоненты**

Вартапетян Андрей Борисович, доктор химических наук, профессор, заведующий отделом химии и биохимии нуклеопротеидов Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Марданова Евгения Сергеевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории систем молекулярного клонирования Института Биоинженерии им. К.Г. Скрыбина Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

Иванов Петр Алексеевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник кафедры вирусологии биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Защита диссертации состоится «4» июня 2026 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.015.4.dissovet@org.msu.ru

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/3914>

Автореферат разослан «__» апреля 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.В. Комарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Вирусы растений – патогены, заражающие широкий круг дикорастущих и культурных растений и приносящие серьезный экономический ущерб сельскому хозяйству. Установление продуктивной инфекции в растении зависит от способности вируса к эффективной репликации и транспорту из первично зараженной клетки сначала в соседние клетки, а затем и по всему растению через сосудистую систему. Клетки растений окружены плотной клеточной стенкой, поэтому фитовирусы вынуждены использовать для транспорта специфические межклеточные каналы – плазмодесмы (ПД), пересекающие клеточные стенки и обеспечивающие прямой контакт между цитоплазмой соседних клеток (Wu, Cheng, 2020). Для этого вирусы растений кодируют транспортные белки (ТБ), обеспечивающие 1) связывание вирусных геномов; 2) транспорт вирусных геномов к ПД; 3) модификацию ПД, приводящую к увеличению их предельной пропускной способности (ППС); 4) транспорт вирусных геномов через ПД в соседние клетки (Morozov, Solovyev, 2024).

Для репликации вирусы формируют из эндомембран клетки специализированные мембранные компартменты - вирусные репликативные комплексы (ВРК), которые создают благоприятную среду и концентрацию всех необходимых для репликации вирусных и клеточных факторов. ТБ некоторых вирусов могут участвовать в ремоделировании мембран и образовании ВРК, ассоциированных с ПД. Считается, что такие ВРК обеспечивают сопряжение процессов репликации и транспорта, позволяя направлять новосинтезированные вирусные геномы непосредственно в каналы ПД (Tilsner et al., 2013). Такое сопряжение изучено для X-вируса картофеля (Potato virus X, PVX), геном которого содержит тройной блок генов (Triple gene block, TGB) – консервативный генный модуль, кодирующий три ТБ, обеспечивающих транспорт вируса. Белки TGB PVX наряду с репликазой отвечают за образование ВРК, обеспечивают транспорт и закоревание ВРК у ПД, образуя ассоциированные с ПД мембранные тельца (PD-associated membrane bodies, PAMBs), являющиеся сайтами репликации PVX (Wu et al., 2019). Не так давно был открыт блок генов, родственной TGB, но кодирующий два ТБ и названный бинарным транспортным блоком (Binary movement block, BMB) (Lazareva et al., 2017). Белки бинарного транспортного блока также образуют PAMBs и являются необходимыми и достаточными для межклеточного транспорта вируса, по крайней мере в растениях *Nicotiana benthamiana* (Lazareva et al., 2017). Установление механизмов, посредством которых ТБ BMB

обеспечивают транспорт вируса, изучение структуры образуемых для этого процесса РАМВs, а также идентификация необходимых для этого взаимодействий важны для понимания молекулярных механизмов транспорта вирусов растений в целом и могут способствовать развитию эффективных методов борьбы с ними.

Цели и задачи исследования

Целью данной работы являлось изучение взаимодействия и функций белков ВМВ1 и ВМВ2, кодируемых бинарным блоком транспортных генов вируса зеленой пятнистости гибискуса (HGSV). Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Проанализировать способность белков ВМВ1 и ВМВ2 взаимодействовать.
2. Исследовать ультраструктуру периферических мембранных телец, образование которых индуцируется белком ВМВ2.
3. Изучить защитный ответ, вызываемый белком ВМВ1 в растениях *N. benthamiana*.
4. Изучить ядерную локализацию белка ВМВ1.

Объект и предмет исследования

Объектом исследования были транспортные белки ВМВ1 и ВМВ2 бинарного транспортного блока HGSV. Предметом исследования было изучение белок-белковых взаимодействий транспортных белков ВМВ, а также характеристика свойств и функций этих белков в растениях.

Научная новизна исследования

Было установлено взаимодействие белков ВМВ и показана необходимость этого взаимодействия для обеспечения транспортной функции, а также картированы регионы белков, участвующие в этом взаимодействии. Впервые была описана ультраструктура вирус-индуцированных периферических мембранных телец, образуемых белком ВМВ2, и на основании данных электронной томографии была создана их 3D-модель. Было обнаружено существование в составе таких телец ранее не описанных специфических межмембранных контактов и предложена возможная модель их образования. Была изучена способность белка ВМВ2 к олигомеризации. Впервые был описан и охарактеризован защитный ответ растения, индуцированный вирусным транспортным белком ВМВ1, а также способность белка ВМВ2 его супрессировать. Была описана ядерная локализация белка ВМВ1 и ее роль в межклеточном транспорте вируса.

Теоретическая и практическая значимость работы

Данная работа дополняет существующие представления о механизмах работы транспортных белков вирусов растений и их взаимодействии с растением-хозяином. Полученные данные об ультраструктуре вирус-индуцированных мембранных компартментов, о взаимодействии транспортных белков и необходимости этого взаимодействия для межклеточного транспорта вируса выявляют важные подробности механизмов вирус-индуцированного ремоделирования клеточных мембран и транспорта вирусов. Эти знания могут способствовать разработке устойчивых сортов растений или решению других задач фитовирусологии, связанных с разработкой эффективных методов противовирусной защиты растений. Полученные данные о механизмах индукции и подавления вирусными белками защитных ответов растения, определяющих возможность межклеточного транспорта вируса, а также данные о важности ядерной локализации одного из вирусных белков для обеспечения эффективного вирусного транспорта способствуют лучшему пониманию фундаментальных принципов взаимодействия вирус-хозяин и также могут способствовать разработке методов противовирусной защиты.

Личный вклад соискателя

Соискатель провел работу с научной литературой по теме диссертации, принимал непосредственное участие в планировании и проведении экспериментальной части работы, статистической обработке и интерпретации полученных результатов. Автор участвовал в подготовке и написании текстов научных публикаций по материалам данной работы. Основные результаты диссертационной работы получены лично автором или при его непосредственном участии. Участие соавторов в некоторых этапах исследования отражено в опубликованных работах.

Методология и методы диссертационного исследования

В исследовании применялись современные методы микроскопии, генетической инженерии, молекулярной биологии, вирусологии, биохимии, биоинформатические и статистические подходы. Используемые методы подробно описаны в соответствующем разделе текста диссертации.

Положения, выносимые на защиту

- 1) Белки BMB1 и BMB2, кодируемые бинарным блоком транспортных генов HGSV, взаимодействуют, и это взаимодействие необходимо для обеспечения транспортной функции.

- 2) Во взаимодействие белков вовлечены С-концевой регион ВМВ1 и N-концевой регион ВМВ2.
- 3) Белок ВМВ2 ремоделирует мембраны ЭПР с образованием телец, ассоциированных с ПД, которые представляют собой структуру из извилистых мембранных цистерн.
- 4) Периферические мембранные тельца, образование которых индуцировано белком ВМВ2, содержат специфические гомотипические межмембранные контакты ЭПР.
- 5) Транспортный белок ВМВ1 вызывает защитный ответ в растениях *N. benthamiana*, который может быть супрессирован белком ВМВ2.
- 6) Белок ВМВ1 локализуется в цитоплазме, нуклеоплазме, а также в ядрышке и тельцах Кахаля.

Степень достоверности и апробация результатов

Результаты были получены с использованием актуальных методик и современного научного оборудования. Эксперименты были проведены с необходимыми контролями и достаточным количеством биологических повторностей. Полученные в ходе работы результаты воспроизводимы и были обработаны методами статистического анализа. Результаты диссертационной работы были представлены на всероссийских научных конференциях с международным участием «Физиология растений и феномика как основа современных фитобиотехнологий» (Нижний Новгород, 2022), «Биология растений в эпоху глобальных изменений климата» (Уфа, 2023), «Экспериментальная биология растений и климатические вызовы» (Екатеринбург, 2024).

По результатам работы опубликовано 5 статей в рецензируемых международных журналах, рекомендованных для защиты в Диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 145 печатных страницах и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, список литературы. Рукопись содержит 2 таблицы и 25 рисунков. Список литературы включает 271 источник.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Изучение взаимодействия белков BMB1 и BMB2 HGSV

Ранее при исследовании субклеточной локализации белков BMB1 и BMB2 HGSV в клетках *N. benthamiana* было показано, что белок BMB2 локализуется в РАМBs, в то время как белок BMB1 локализуется в цитоплазме и нуклеоплазме. При совместной экспрессии, BMB1 направляется в РАМBs, образованные BMB2, и далее по каналам ПД в соседние клетки (Lazareva et al., 2017). Этот факт предполагает взаимодействие белков BMB1 и BMB2.

1.1 Анализ взаимодействия белков BMB1 и BMB2 *in vitro*

Для анализа взаимодействия белков BMB1 и BMB2 *in vitro* был использован метод Far-Western блоттинга. Для успешной экспрессии в бактериях последовательность высокогидрофобного белка BMB2 была модифицирована в соответствии с «QTY-кодом», чтобы заменить интегрированные в мембрану спирали на гидрофильные районы, не нарушая белок-белковых взаимодействий белка (Zhang et al., 2018). Экспрессированный и выделенный из клеток *E. coli* белок BMB1, а также белок дигидрофолатредуктазы (DHFR) мыши, используемый в качестве отрицательного контроля, были разделены в ПААГ-геле и перенесены на мембрану. Мембрану инкубировали с препаратом BMB2-QTY, а соответствующий продукт детектировали антителами, специфичными к BMB2-QTY. BMB2-QTY взаимодействовал с BMB1, но не DHFR (Рис. 1А), таким образом, было подтверждено взаимодействие белков *in vitro*.

1.2. Анализ взаимодействия белков BMB1 и BMB2 *in vivo*

Для подтверждения взаимодействия белков *in vivo* был использован метод резонансного переноса энергии Ферстера (FRET) с визуализацией времени жизни флуоресценции (FLIM) (Schoberer, Botchway, 2014). Листья *N. benthamiana* были агроинфильтрованы для коэкспрессии GFP-BMB1 и BMB2-mRFP. Время жизни флуоресценции GFP измерялось в РАМBs, в которых колокализуются белки BMB1 и BMB2. В качестве контролей коэкспрессировали GFP-BMB1 с BMB2 (контроль без акцептора), и GFP-BMB1 с BMB2 и mRFP (контроль, где акцепторный флуорофор не слит с BMB2). Было обнаружено, что время жизни флуоресценции GFP в случае коэкспрессии GFP-BMB1 и BMB2-mRFP падало на 0,9 нс по сравнению с отрицательными контролями, что соответствует эффективности FRET 36%, с высокой степенью достоверности подтверждая взаимодействие BMB1 и BMB2 в клетках *N. benthamiana* (Рис. 1В).

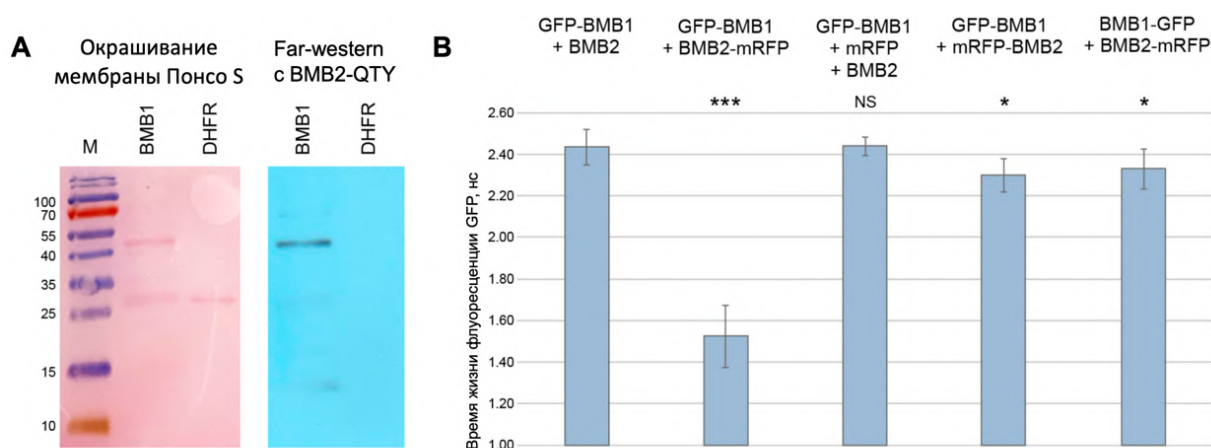


Рисунок 1. Анализ взаимодействия белков BMB1 и BMB2. (А) Far-western экспрессированных в *E. coli* белков BMB1 и модифицированного белка BMB2-QTY. Слева: мембрана, окрашенная Понсо S (BMB1, 43 кДа; DHFR, 25 кДа). Справа: детекция BMB2-QTY с помощью BMB2-QTY-специфичных антител, после инкубации мембраны с препаратом BMB2-QTY. М: маркеры молекулярной массы, указаны в кДа. (В) FRET-FLIM анализ взаимодействия белков в листьях *N. benthamiana*, агроинфильтрированных для экспрессии BMB1 и BMB2. Столбцы обозначают среднее время жизни флуоресценции (нс), а планки погрешностей - стандартное отклонение. Звездочками отмечены статистически значимые по сравнению с отрицательным контролем различия (***, $p < 0,001$; *, $p < 0,05$), NS — статистически незначимо ($p \geq 0,05$). Значимость рассчитывалась согласно t-критерию Стьюдента (здесь и далее).

При FRET-FLIM анализе белков BMB1 и BMB2, слитных с флуорофорами с противоположных концов белков – mRFP-BMB2 (mRFP с N-конца BMB2) и BMB1-GFP (GFP с C-конца BMB1), не наблюдалось значимого снижения времени жизни флуоресценции GFP (Рис.1В), свидетельствуя, что флуорофоры пришитые с N-конца BMB2 и C-конца BMB1 мешают взаимодействию, что предполагает вовлеченность этих участков белков во взаимодействие.

1.3. Картирование участка BMB1, вовлеченного во взаимодействие с BMB2

Для проверки участия C-концевого района BMB1 во взаимодействии с BMB2 был получен мутант BMB1 с делецией 22 аминокислотных остатков с C-конца – BMB1d22. При анализе растений, агроинфильтрированных для экспрессии GFP-BMB1d22 с помощью конфокальной микроскопии наблюдалось сохранение локализации белка в цитоплазме и ядре, характерной для GFP-BMB1 (Рис. 2В,С), а также в ядрышке и субъядерном тельце (Рис. 2D).

Для анализа способности взаимодействовать с BMB2, слитный с GFP BMB1d22 был коэкспрессирован с BMB2-mRFP, а пары белков GFP с BMB2-mRFP и GFP-BMB1 с BMB2-mRFP были коэкспрессированы в качестве отрицательного и положительного контролей, соответственно. В положительном контроле яркая флуоресценция GFP наблюдалась только в РАМВs (Рис. 2F). Мутантный белок GFP-BMB1d22, имел ядерно-цитоплазматическую локализацию в присутствии BMB2-mRFP (Рис. 2G),

аналогично отрицательному контролю (Рис. 2Е). При этом слабая по сравнению с положительным контролем концентрация флуоресценции GFP обнаруживалась в ассоциации с РАМВs, что согласуется с данными о том, что РАМВs расположены в цитоплазматических мешках, которые могут содержать диффузно локализованный GFP (Lazareva et al., 2017). Эти данные свидетельствуют о вовлеченности С-концевого района ВМВ1 во взаимодействие с ВМВ2.

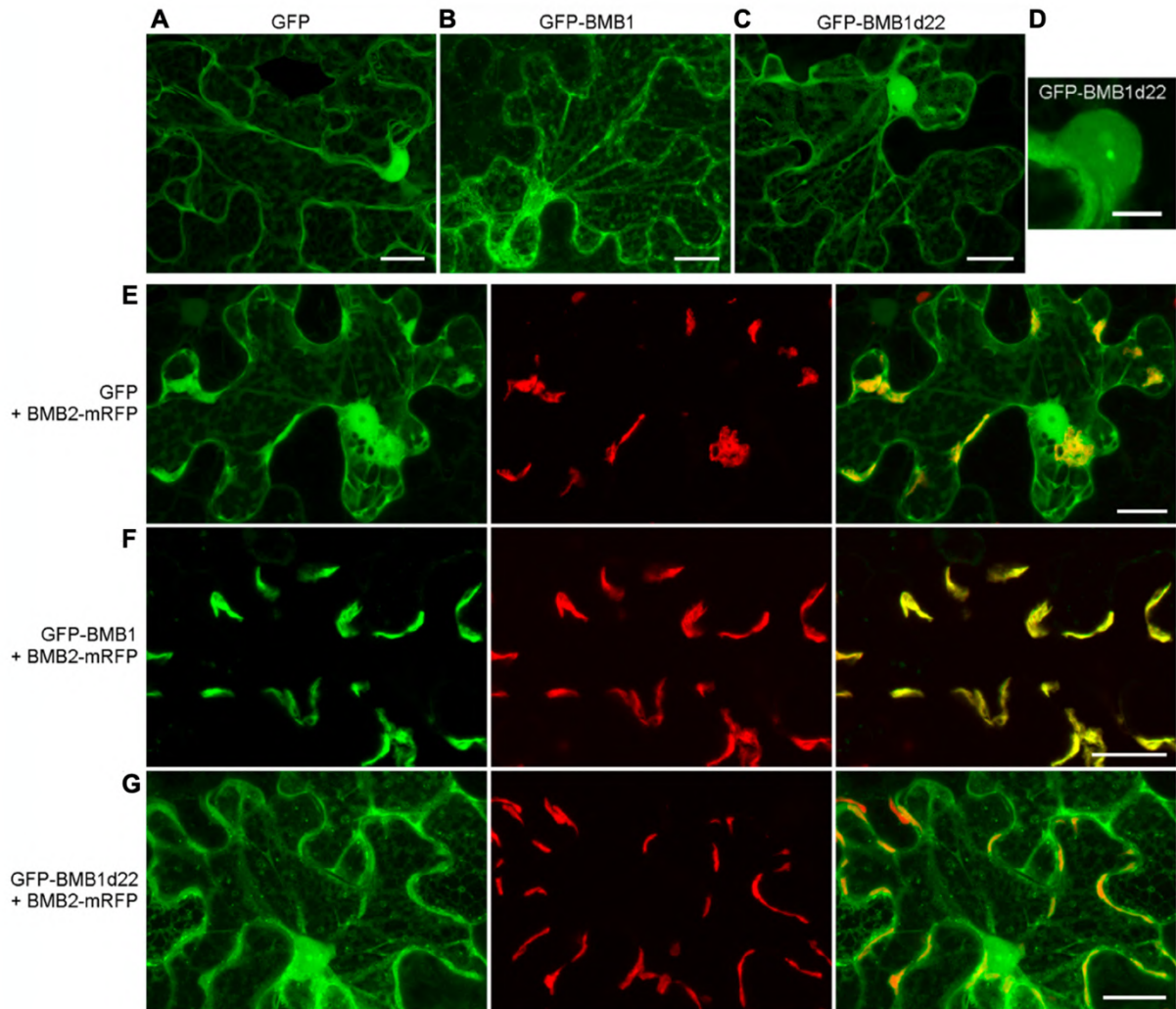


Рисунок 2. Субклеточная локализация GFP-BMB1d22 в клетках *N. benthamiana*. Экспрессия (A) GFP, (B) GFP-BMB1, (C,D) GFP-BMB1d22. Коэкспрессия (E) GFP с BMB2-mRFP, (F) GFP-BMB1 с BMB2-mRFP и (G) GFP-BMB1d22 с BMB2-mRFP. (E-G) левые панели соответствуют каналу GFP, центральные – каналу mRFP, а правые - наложению изображений для каналов GFP и mRFP. Масштабная линейка А–С, F–H: 20 мкм; D, E: 5 мкм.

Способность мутанта ВМВ1-d22 поддерживать межклеточный транспорт вируса в паре с ВМВ2 была оценена в тестовой системе комплементации транспорта репортерной конструкции PVX-POL-GFP, созданной на основе генома PVX и способной реплицироваться и экспрессировать GFP в первично зараженных клетках, но не способной к межклеточному транспорту, в виду отсутствия генов белка оболочки и ТБ. При добавлении к ней функциональной транспортной системы, например, белков

ВМВ1 и ВМВ2, наблюдается образование многоклеточных локусов инфекции, вследствие комплементации межклеточного транспорта (Рис 3А). При коэкспрессии с PVX-POL-GFP мутанта ВМВ1d22 и ВМВ2 комплементации транспорта не наблюдалось, свидетельствуя о необходимости С-концевого района ВМВ1 для взаимодействия с ВМВ2 и обеспечения транспортной функции (Рис. 3В).

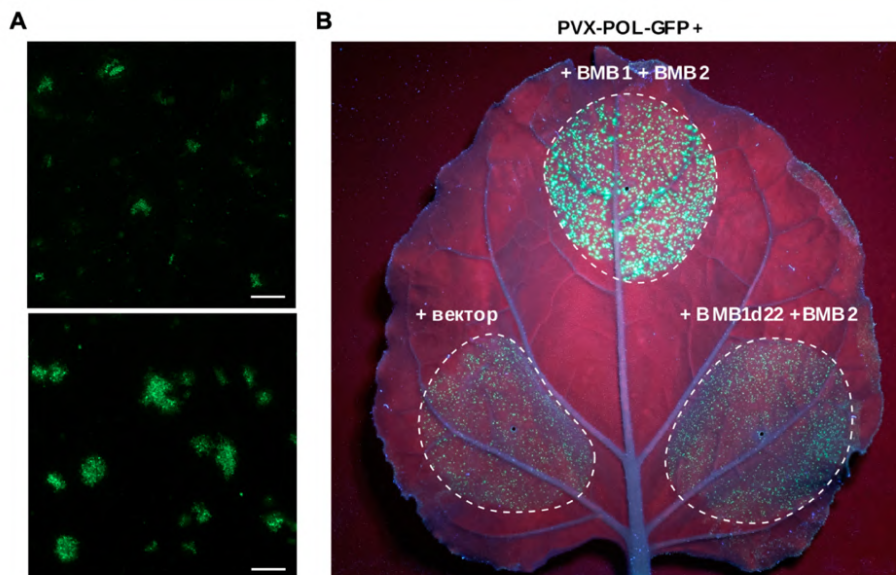


Рисунок 3. Анализ способности ВМВ1d22 комплементировать межклеточный транспорт. (А) Лист *N. benthamiana*, агроинфильтрированный для комплементации транспорта PVX-POL-GFP. Сверху – единично зараженные клетки, снизу – многоклеточные локусы инфекции, образованные вследствие комплементации транспорта PVX-POL-GFP ТБ HGSV. (В) Лист *N. benthamiana*, агроинфильтрированный для коэкспрессии PVX-POL-GFP с ВМВ1 и ВМВ2 (положительный контроль), ВМВ1d22 и ВМВ2, или вектором (отрицательный контроль); 5 дней после инфильтрации (дпи).

1.4. Картирование региона ВМВ2, участвующего во взаимодействии с ВМВ1

Для идентификации районов белка ВМВ2, участвующих во взаимодействии с ВМВ1, был сделан набор из трех мутантов ВМВ2 (Рис. 4). Мутант ВМВ2-mMid содержит мутации в центральном районе белка, затрагивающие консервативные для ВМВ2-белков аминокислотные остатки. ВМВ2-mN содержит точечные мутации, затрагивающие заряженные, полярные и ароматические аминокислотные остатки в неконсервативном N-концевом домене. ВМВ2-Hydr несет замены двух цистеинов в мембранном домене МВD1, обнаруживаемых и для других ВМВ2 белков.

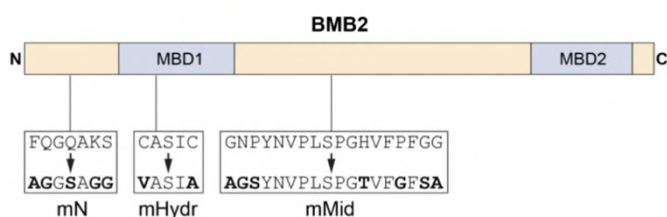


Рисунок 4. Схема внесенных в ВМВ2 мутаций. МВD1 и МВD2 - мембранные домены. Снизу отражены аминокислотные замены, внесенные в последовательность ВМВ2.

Анализ субклеточной локализации слитных с mRFP мутантов показал, что BMB2-mN-mRFP и BMB2-Hydr-mRFP сохраняют локализацию в PAMBs, характерную для BMB2-mRFP (Рис. 5А,В,С). Мутации, внесенные в BMB2-mMid, приводили к нефизиологической агрегации белка (Рис. 5D).

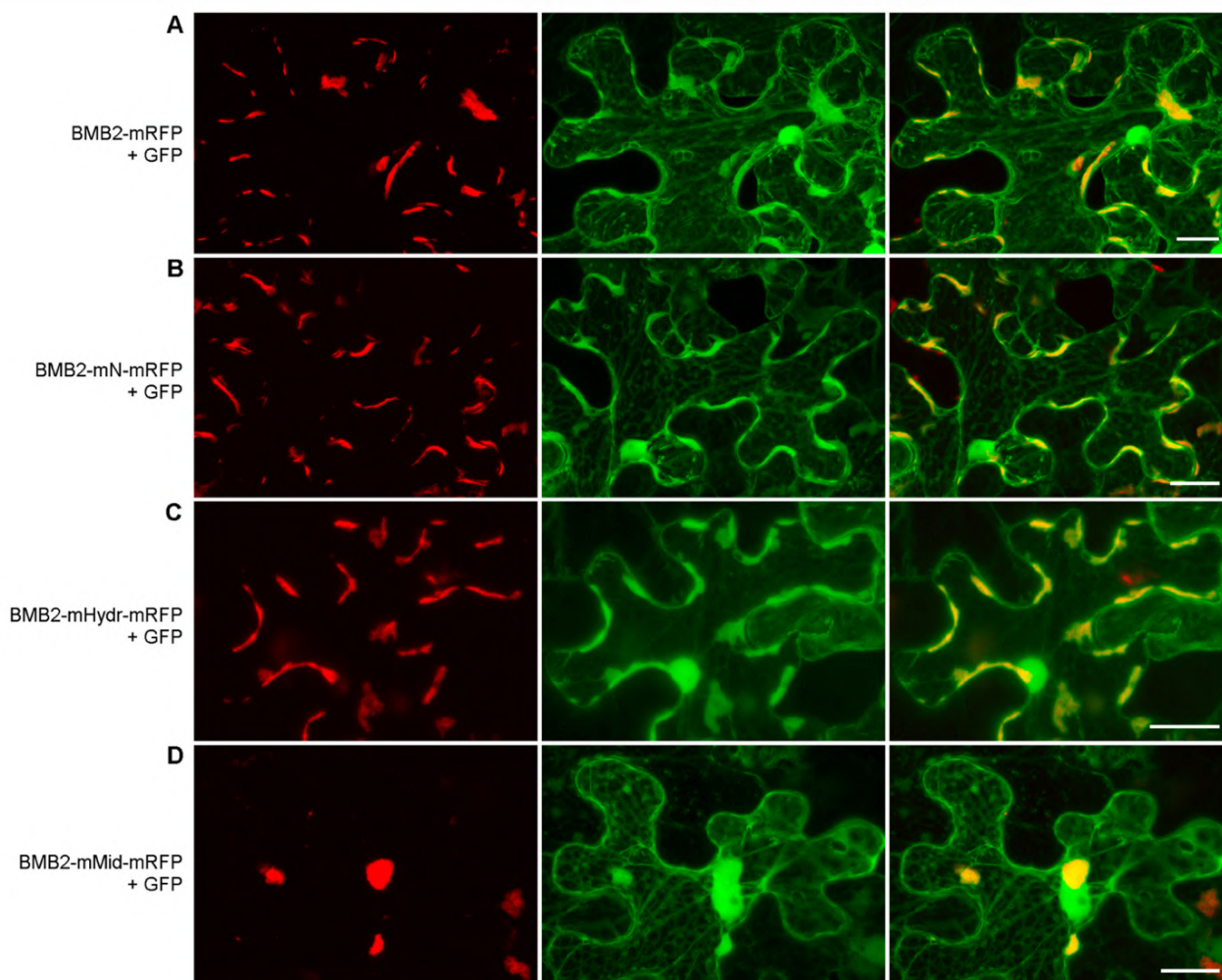


Рисунок 5. Анализ субклеточной локализации мутантов BMB2. Коэкспрессированные с GFP (А) BMB2, (В) BMB2-mN, (С) BMB2-mHydr и (D) BMB2-mMid. Левые панели – канал mRFP, центральные – канал GFP, а правые – наложение изображений для двух каналов. Масштабная линейка: 20 мкм.

При анализе способности направлять внутриклеточный транспорт BMB1, из всех мутантов только BMB2-Hydr сохранял способность направлять GFP-BMB1 в PAMBs (Рис. 6).

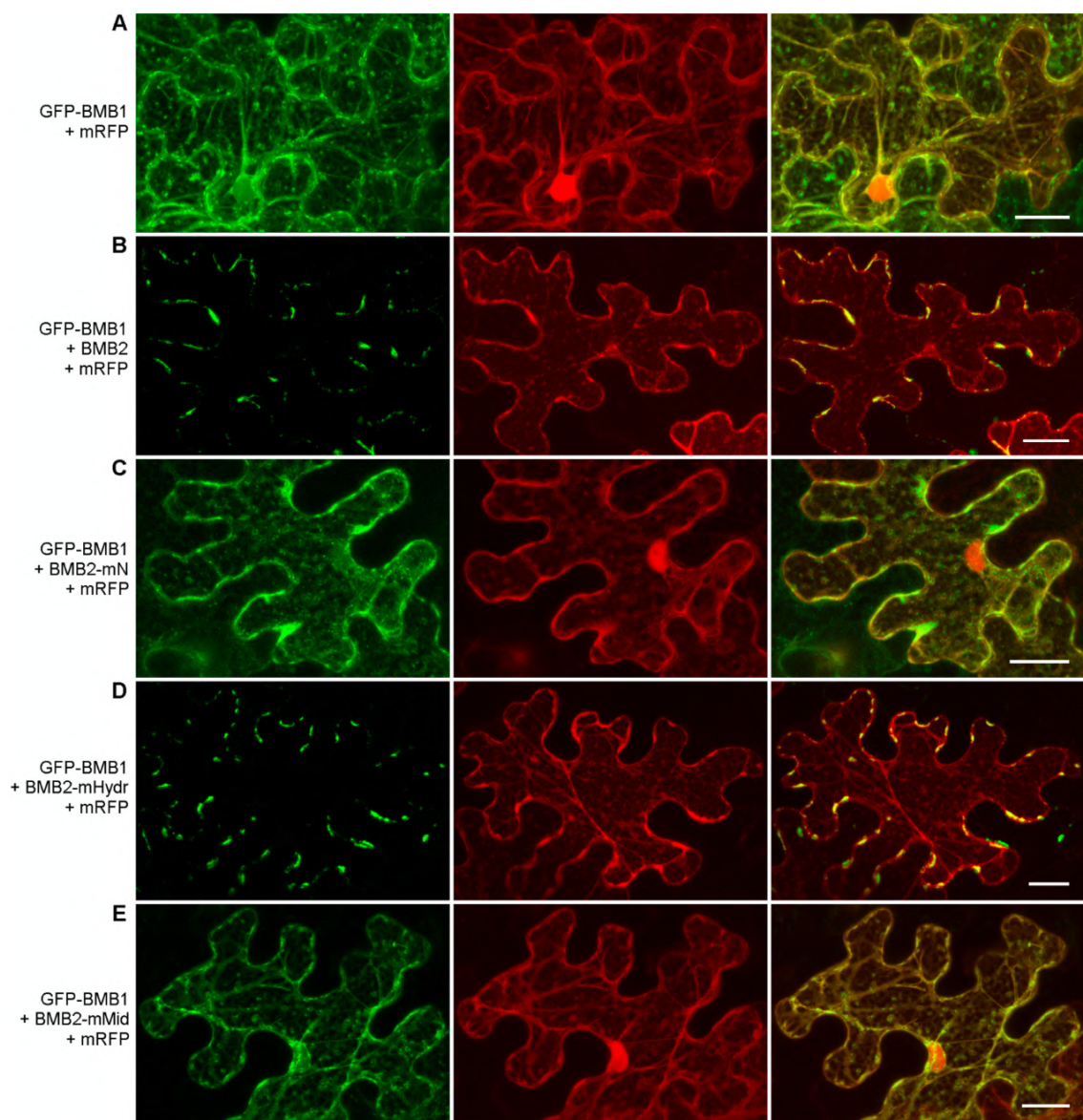


Рисунок 6. Анализ способности мутантов BMB2 направлять GFP-BMB1 в RAMBs. Коэкспрессия GFP-BMB1 с mRFP и либо (С–Е) мутантами BMB2, либо (В) BMB2 дикого типа. Левые панели – канал GFP, центральные — канал mRFP, а правые — наложение изображений для каналов GFP и mRFP. Масштабная линейка: 20 мкм.

Аналогично, в тестах по комплементации транспорта только BMB2-Hydr был способен поддерживать межклеточный транспорт (Рис. 7).

Таким образом, мутации в мембранном домене не отразились ни на способности BMB2 образовывать RAMBs, ни на его транспортной функции. Нефункциональность мутанта BMB2-mMid, вероятно, объясняется его агрегацией (Рис. 5С). Мутант BMB2-mN образовывал RAMBs (Рис. 6В), но не был способен направлять в них BMB1 (Рис. 6С) и поддерживать межклеточный транспорт (Рис. 7), что свидетельствует об участии N-концевого района BMB2 во взаимодействии с BMB1.

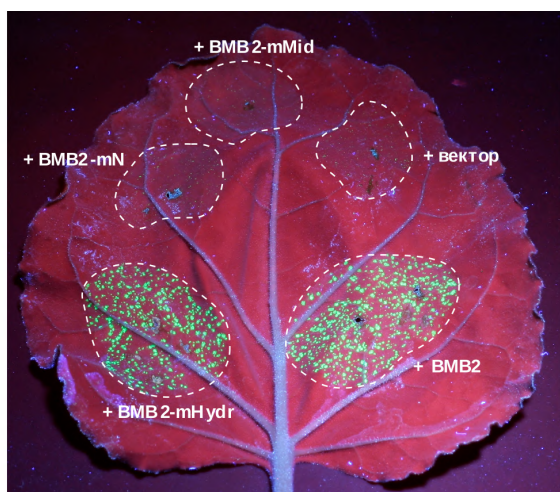


Рисунок 7. Анализ способности мутантов BMB2 поддерживать межклеточный транспорт. Лист *N. benthamiana*, агроинфильтрированный для коэкспрессии PVX-POL-GFP с BMB1, и с одним из вариантов BMB2: BMB2 дикого типа (положительный контроль), BMB2-mN, BMB2-mHydr, BMB2-mMid или вектором (отрицательный контроль); 5 дни.

1.5. Верификация данных мутационного анализа с помощью FRET-FLIM

Листья *N. benthamiana* были агроинфильтрированы для коэкспрессии GFP-BMB1d22 с BMB2-mRFP или GFP-BMB1 с BMB2-mN-mRFP для FRET-FLIM анализа. Также GFP-BMB1 был коэкспрессирован с BMB2-mRFP (положительный контроль) или с BMB2 (отрицательный контроль). В случае пар с мутантными белками время жизни флуоресценции GFP не отличалось от отрицательного контроля (Рис. 8). Таким образом, взаимодействие белков BMB1 и BMB2 происходит при участии С-концевого района BMB1 и N-концевого района BMB2.

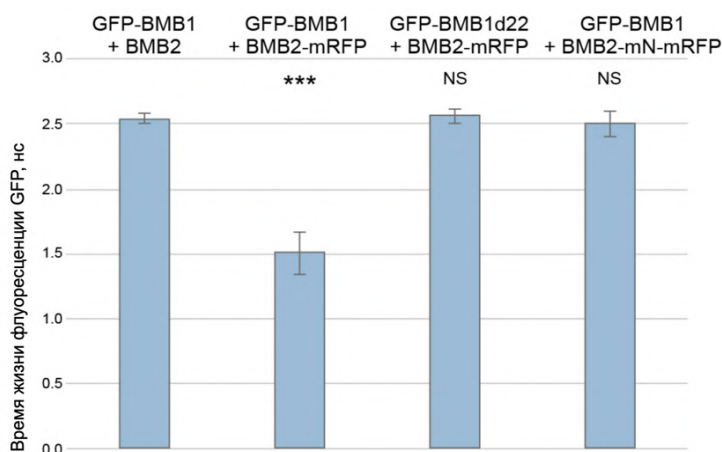


Рисунок 8. FRET-FLIM анализ участия С-концевого района BMB1 и N-концевого района BMB2 во взаимодействии. Листья *N. benthamiana* были агроинфильтрированы для экспрессии указанных пар белков. Столбцы обозначают среднее время жизни флуоресценции GFP (нс), планки погрешностей - стандартное отклонение. Звездочками отмечены статистически значимые по сравнению с отрицательным контролем различия (***, $p < 0,001$), NS — статистически незначимо ($p \geq 0,05$).

2. Исследование структуры PAMBs

2.1. Анализ локализации BMB1 и BMB2 в составе PAMBs, а также в ассоциированных с ними ПД

Локализация BMB1 и BMB2 в составе PAMBs и в ассоциированных с ними ПД была исследована методом иммуноцитохимии (ИЦХ). Растения агроинфильтрировали для экспрессии mRFP-BMB2 или для коэкспрессии GFP-BMB1 с BMB2. ИЦХ

проводили с первичными антителами, специфичными либо к mRFP, либо к GFP, соответственно, в сочетании со вторичными антителами, конъюгированными с 12 нм коллоидным золотом. Частицы золота обнаруживались равномерно распределенными по РАМВs в обоих случаях. Исследование прилегающих к РАМВs ПД в препаратах тканей, экспрессирующих mRFP-ВМВ2, не выявило частиц золота внутри каналов ПД (Рис. 9А,В), хотя в некоторых случаях они были обнаружены у устьев ПД (Рис. 9С).

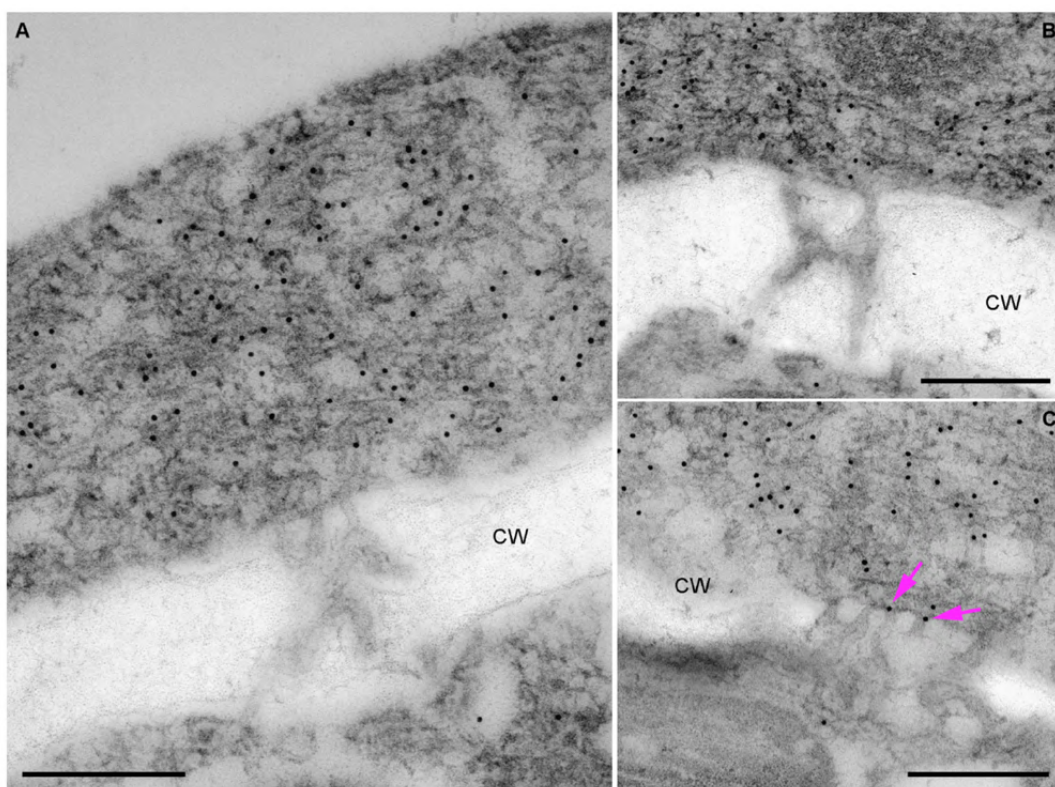


Рисунок 9. ИЦХ анализ ВМВ2, слитного с mRFP в РАМВs в клетках *N. benthamiana*. Локализация ВМВ2 (А, В) в РАМВ и (С) у устьев ПД (розовые стрелки). CW — клеточная стенка. Масштабные линейки: 300 нм.

При коэкспрессии GFP-ВМВ1 с ВМВ2 меченный золотыми частицами белок ВМВ1 в нескольких случаях был обнаружен внутри клеточной стенки, вероятно, в каналах ПД, однако качество визуализации не позволяет это однозначно утверждать (Рис. 10В).

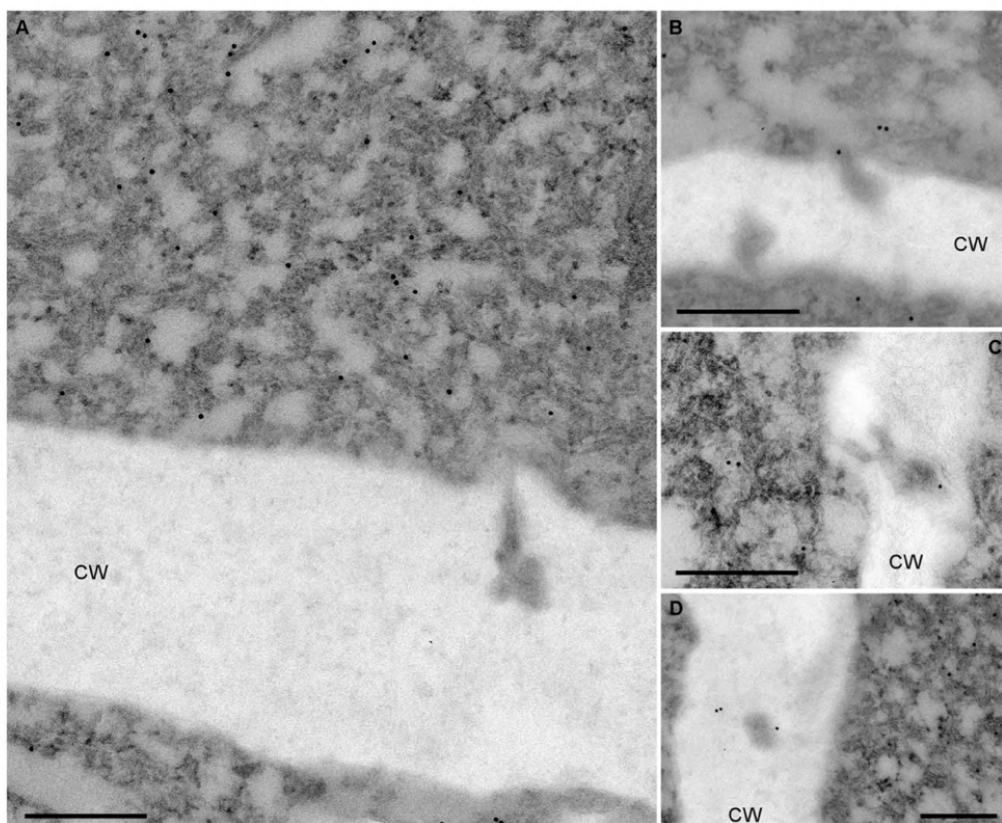


Рисунок 10. ИЦХ анализ GFP-BMB1 в клетках *N. benthamiana*, коэкспрессирующих GFP-BMB1 и BMB2. Локализация GFP-BMB1 (A) в РАМВ, (B) в устье ПД, (C,D) в клеточной стенке (CW), вероятно, в каналах ПД. Масштабные линейки, 300 нм.

2.2. Изучение ультраструктуры РАМВв в режиме AiryScan

Конфокальная микроскопия в режиме сверхвысокого разрешения AiryScan клеток *N. benthamiana*, экспрессирующих mRFP-BMB2, продемонстрировала, что РАМВс представляют собой конденсированные сетчатые структуры (Рис. 11 А,В).

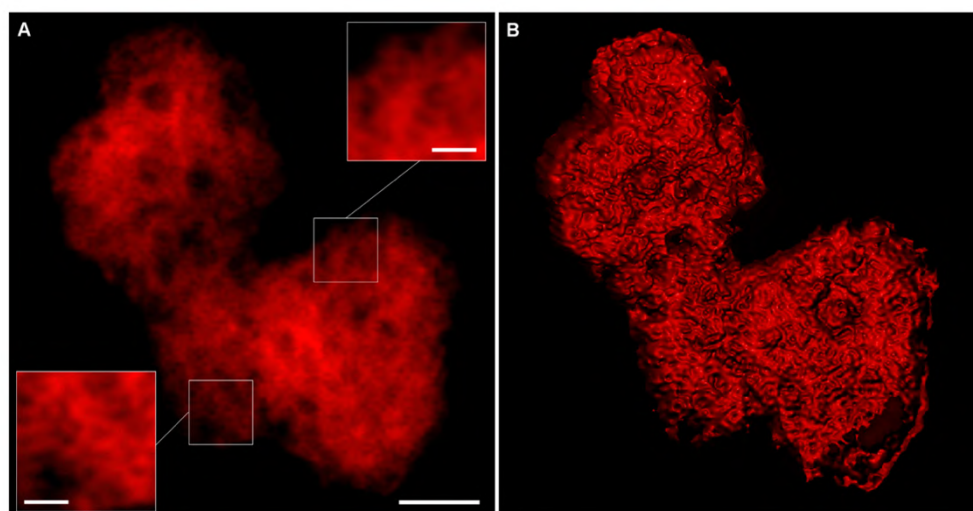


Рисунок 11. Конфокальная микроскопия РАМВс в режиме AiryScan в клетке *N. benthamiana*, экспрессирующей BMB2, слитный с mRFP. (А) Один оптический срез, (В) реконструкция на основе шести срезов. Масштабная линейка - 2 мкм, для увеличенных областей - 500 нм.

2.3. Изучение ультраструктуры РАМВs с помощью ТЭМ

Ультраструктура РАМВs была исследована с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ), продемонстрировавшей, что РАМВs образованы сетью происходящих из ЭПР мембран, выглядевших на тонких срезах как трубочки (Рис. 12А,В). Четко визуализировалось соединение мембран РАМВs с десмотрубочками ПД (Рис. 12С). В некоторых случаях в РАМВs были обнаружены микротрубочки (Рис. 12D).

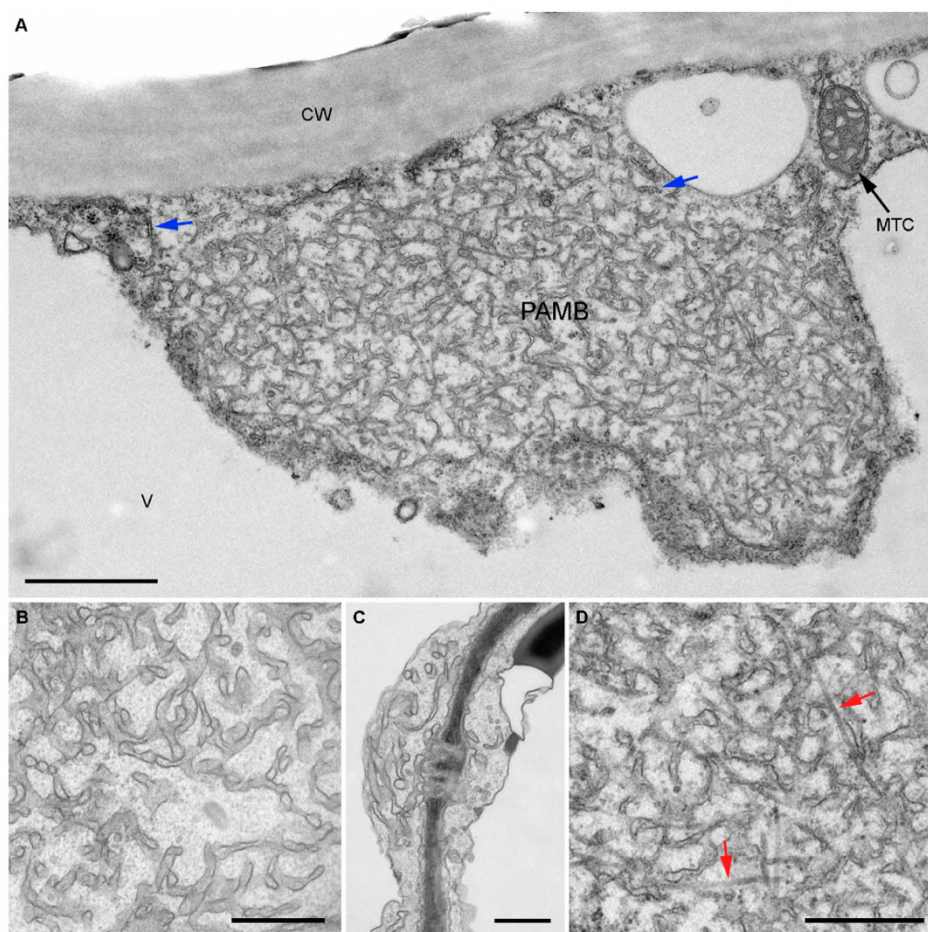


Рисунок 12. ТЭМ РАМВs, в клетках *N. benthamiana*, экспрессирующих ВМВ2. (А) Общий вид РАМВ, (В, D) мембраны в РАМВs, (С) связь мембран РАМВ с десмотрубочками ПД. Масштабные линейки: 1 мкм в (А), 500 нм в (В–D). Синие стрелки указывают на гранулярный ЭПР, а красные - на микротрубочки. CW — клеточная стенка; V — вакуоль; МТС — митохондрия.

2.4. Изучение ультраструктуры РАМВs с помощью электронной томографии

На основании данных двухосевой электронной томографии РАМВs была построена 3D-модель, продемонстрировавшая, что РАМВs представляют собой сконденсированную систему из мембран, подавляющее большинство которых представлено извилистыми цистернами разных форм и размеров (Рис. 13). Те

мембранные структуры, которые на снимках ТЭМ были приняты за трубочки, вероятно, соответствуют поперечным сечениям извилистых цистерн.

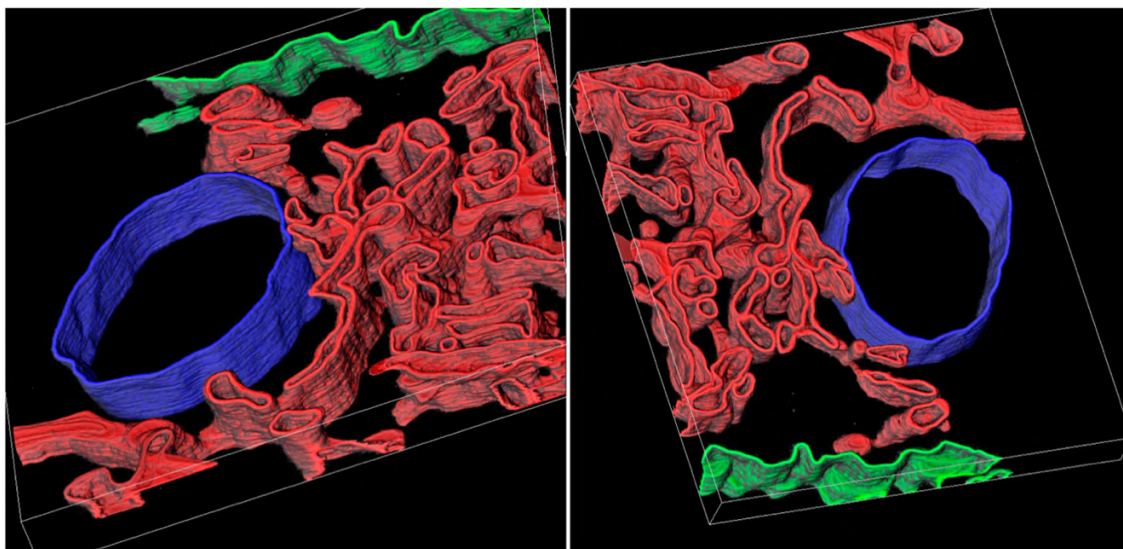


Рисунок 13. 3D-модель фрагмента РАМВ. Красным обозначены производные мембран ЭПР, зеленым — плазматическая мембрана, а синим — мембрана вакуоли. Размер модели 1500 × 1300 × 150 нм.

2.5. Межмембранные контакты внутри РАМВs

При анализе данных томографии было отмечено, что во многих местах мембраны в РАМВs сближаются, но не сливаются (Рис. 14А), напоминая описанные в литературе мембранные контакты (МК) (Pérez-Sancho et al., 2016).

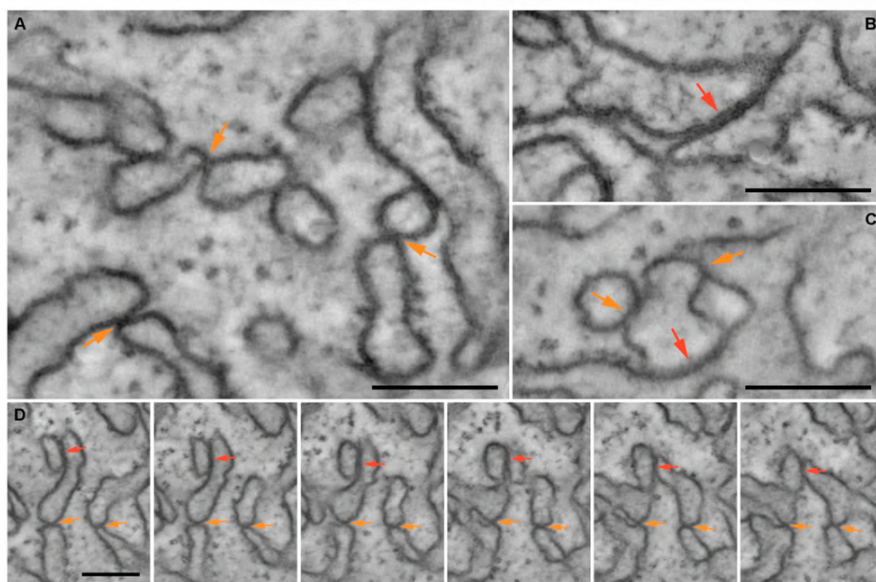


Рисунок 14. Изображения ММК в РАМВs, полученные при электронной томографии. (А–С) ММК в РАМВs. (D) Серия срезов с шагом 18,8 нм. Оранжевые стрелки указывают на «точечные» ММК, а красные - на протяженные ММК. Масштабная линейка 150 нм.

Морфологически такие межмембранные контакты (ММК) в РАМВs можно было разделить на два типа: «точечные» ММК и протяженные, длиной до 200 нм (Рис. 14В). Анализ серии последовательных срезов показал, что «точечные» контакты представляют собой поперечные сечения протяженных контактов (Рис. 14D). Так как

РАМВs содержат множество таких специфических ММК между цистернами, вполне вероятно, что именно они определяют структуру РАМВs.

В отличие от классических МК, характеризующихся зазором в 15-20 нм, в случае ММК в РАМВs не наблюдалось расстояния между мембранами. Было отмечено, что ММК образуются преимущественно с участием изогнутых краев цистерн. Так как ранее было показано, что в клетках, где сеть ЭПР искусственно преобразована в цистерны, ВМВ2 локализуется преимущественно по краям цистерн (Lazareva et al., 2021), можно предположить, что образование ММК может происходить вследствие взаимодействия молекул ВМВ2, расположенных на краях двух цистерн.

2.6. Изучение способности ВМВ2 к олигомеризации

Способность ВМВ2 к олигомеризации была исследована с помощью FRET-FLIM анализа в растениях, агроинфильтрированных для коэкспрессии ВМВ2-GFP либо с ВМВ2-mRFP, либо с нативным ВМВ2 (контроль без акцептора). Падение времени жизни флуоресценции GFP при коэкспрессии ВМВ2-GFP с ВМВ2-mRFP составляло 1,73 нс (Рис. 15А), что соответствует очень высокой эффективности FRET 69,8%, свидетельствуя об олигомеризации ВМВ2 в РАМВs.

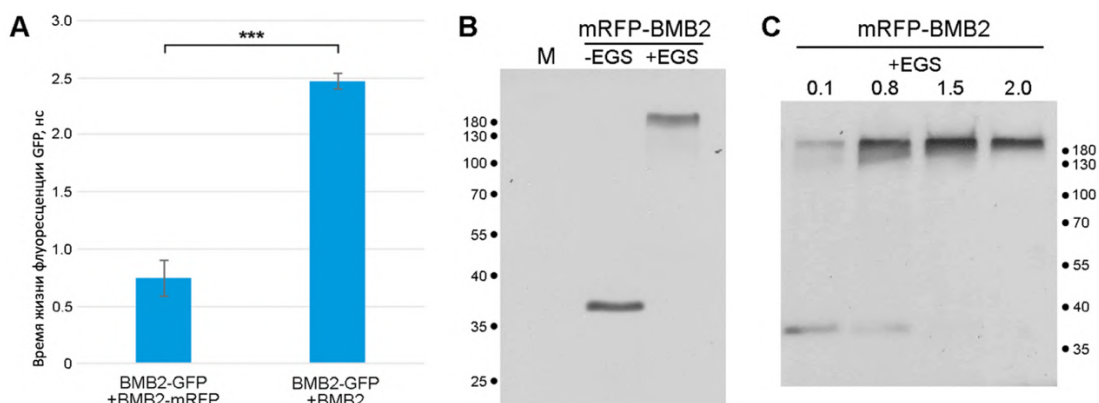


Рисунок 15. Анализ способности ВМВ2 к олигомеризации. (А) FRET-FLIM в *N. benthamiana*, агроинфильтрированных для коэкспрессии ВМВ2-GFP с ВМВ2-mRFP или с ВМВ2. Показаны средние времена жизни флуоресценции (нс); планки погрешностей отражают стандартное отклонение. Звездочками отмечено статистически значимое различие ($p < 0,001$). (В) Сшивание кросслинкером EGS белковых комплексов, образованных ВМВ2. Вестерн-блот анализ мембранных фракций, выделенных из листьев, экспрессирующих mRFP-VMB2, после обработки EGS или без нее. М — неинфильтрированный лист. (С) Сшивание при возрастающих концентрациях EGS, как указано (мМ). Маркеры молекулярной массы белков указаны в кДа.

Также был проведен анализ методом химического «сшивания» белковых молекул. Из листьев *N. benthamiana*, экспрессирующих mRFP-VMB2, выделяли фракцию мембран и обрабатывали кросслинкером (EGS), содержащим две аминокреактивные NHS-эфирные группы, разделенные 12-атомным линкером. Вестерн-блот с анти-mRFP

антителами показал, что в необработанных EGS образцах mRFP-BMB2 детектируется в виде полосы, соответствующей мономеру, а обработанных - в виде полосы с молекулярной массой более 180 кДа (Рис. 15В). При этом обработка возрастающими концентрациями EGS не приводила к образованию комплексов промежуточного размера даже при минимальных концентрациях кросслинкера (Рис. 15С).

Полученные данные свидетельствуют о том, что олигомеризация BMB2 является высококооперативным процессом и, вероятно, может лежать в основе механизма образования ММК в РАМВs.

3. Изучение защитного ответа, вызываемого белком BMB1 в растениях *N. benthamiana*

3.1. Характеристика защитного ответа на BMB1 в растениях *N. benthamiana*

Было отмечено, что листья *N. benthamiana*, агроинфильтрованные для экспрессии BMB1, подвержены увяданию и некротизации в местах инфильтрации на 4-5 день (Рис. 16А).

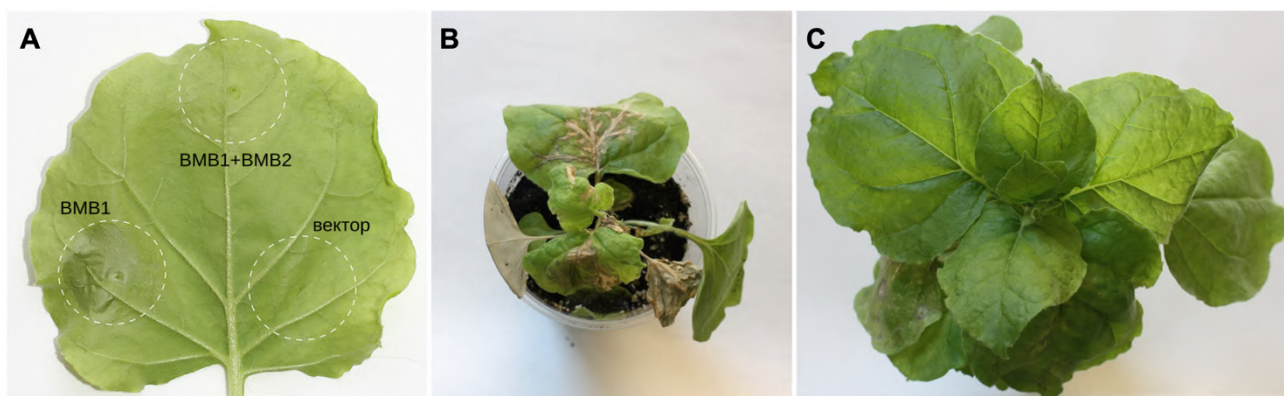


Рисунок 16. BMB1 вызывает защитный ответ в *N. benthamiana*. (А) лист, агроинфильтрованный для экспрессии BMB1, BMB1 с BMB2 или вектором на 5 дни. (В,С) Растения, зараженные TRV-BMB1 (В) или TRV-вектором (С) на 11 дни.

Аналогичная картина наблюдалась и при экспрессии BMB1 в составе вектора на основе генома вируса погрелковости табака (tobacco rattle virus, TRV) (Рис. 16Е,Ф). Похожая реакция развивается при гиперчувствительном ответе (hypersensitive response, HR) растения – локальном иммунном ответе, характеризующимся быстрой гибелью клеток.

Листья, агроинфильтрованные для экспрессии BMB1, были проанализированы для характеристики вызываемого защитного ответа. Окрашивание с помощью 3,3'-диаминобензидина (DAB), подтвердило всплеск образования активных форм кислорода (АФК) (Рис. 17А). Окрашивание флуоресцентным красителем,

специфически окрашивающим каллозу, показало увеличение отложений каллозы в 2,5 раза по сравнению с контролем (Рис. 17В,С,Д). С помощью количественной ПЦР было продемонстрировано увлечение в 3,7 раза уровня экспрессии 9-липоксигеназы (9-LOX) (Рис. 17Е), позитивно регулирующей программируемую клеточную гибель при вирусных инфекциях (García-Marcos et al., 2013).

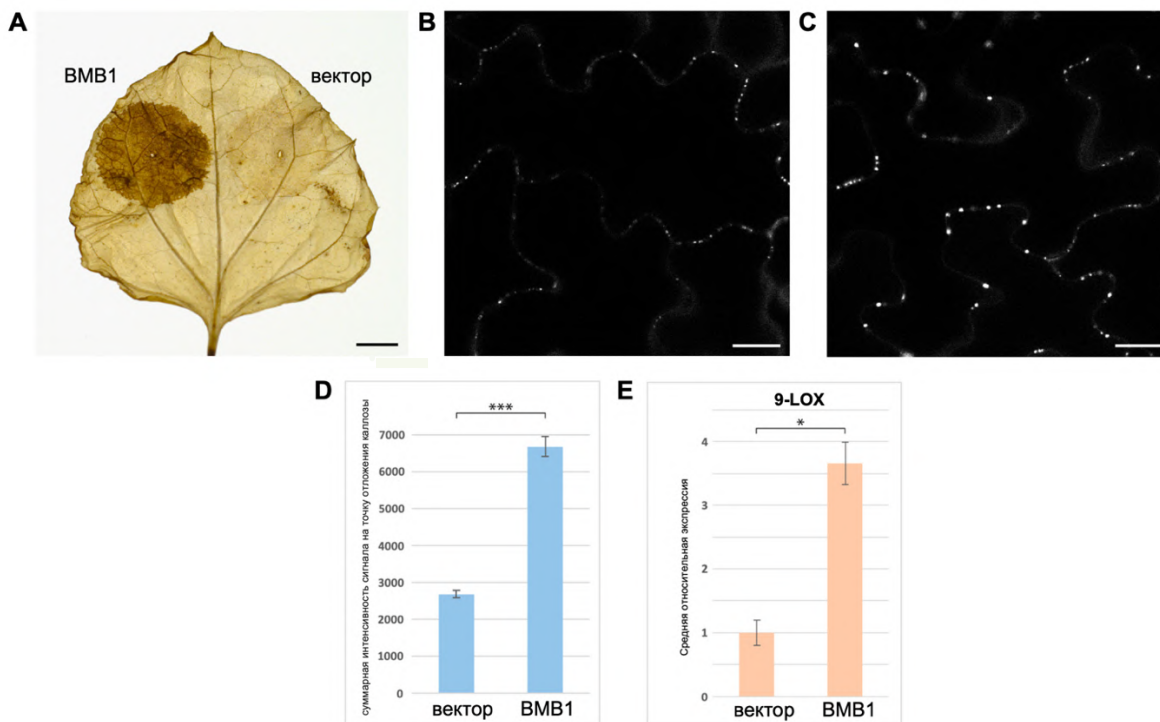


Рисунок 17. Анализ защитного ответа, вызванного ВМВ1 в *N. benthamiana*. Сравнение областей листьев, агроинфильтрированных для экспрессии ВМВ1 или вектором, на 2 дни. (А) Анализ накопления АФК с помощью DAB. (В,С) Окрашивание отложений каллозы анилиновым синим при экспрессии ВМВ1 (С) или вектора (В). Масштабная линейка 20 мкм. (D) Количественная оценка окрашивания отложений каллозы. Показаны значения средних суммарных интенсивностей сигнала на точку отложения каллозы. (Е) Средний уровень экспрессии 9-липоксигеназы по данным количественной ПЦР. (D,Е) Планки погрешностей отражают стандартную ошибку, а звездочки - статистическую значимость (*, $p < 0.5$, ***, $p < 0.001$).

Таким образом, экспрессия ВМВ1 в растениях *N. benthamiana* индуцирует защитный ответ, сопровождающийся накоплением АФК, отложением каллозы и повышением экспрессии 9-LOX. Однако, механизм возникновения HR-подобной реакции, индуцированной ВМВ1, все же отличается от классического HR (Solovieva et al., 2013) более медленным развитием, что, возможно, связано с необходимостью достижения некоего порогового уровня накопления ВМВ1 для индукции защитного ответа.

3.2. ВМВ2 супрессирует защитный ответ, индуцированный ВМВ1

При изменении стандартного соотношения ВМВ1 к ВМВ2 (1:1) в экспериментах по комплементации транспорта, в случае избытка ВМВ1 размер локусов инфекции

уменьшался, а при избытке ВМВ2 – увеличивался (Рис. 18А,В). Это кажется закономерным, так как ВМВ1 вызывает защитный ответ, а ВМВ2 способен увеличивать ППС ПД. Мы предположили, что эффект в случае избытка ВМВ2 может быть также связан со способностью ВМВ2 подавлять защитный ответ растения на ВМВ1. При коэкспрессии вместе с ВМВ1 белка ВМВ2 не наблюдалось некротизации, характерной при экспрессии ВМВ1 (Рис. 16А).

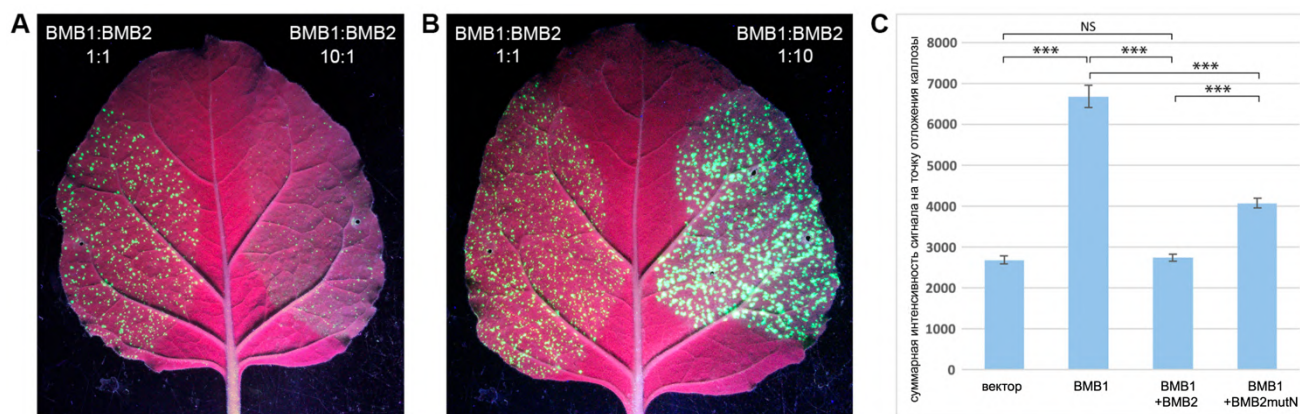


Рисунок 18. ВМВ2 супрессирует защитный ответ, индуцированный ВМВ1. (А,В) Листья *N. benthamiana*, агроинфильтрированные для коэкспрессии PVX-POL-GFP с различными соотношениями ВМВ1 к ВМВ2, равными 1:1, 1:10 или 10:1 на 4 дни. (С) Количественная оценка окрашивания отложений каллозы при экспрессии ВМВ1, ВМВ1 с ВМВ2 или ВМВ1 с ВМВ2mutN. Столбцы отражают средние суммарные интенсивности сигнала на точку отложения каллозы, а планки погрешностей - стандартную ошибку. Звездочки обозначают статистическую значимость различий (***, $p < 0.001$), NS, статистически незначимо ($p > 0,05$).

Чтобы удостовериться, что этот эффект связан с подавлением защитной реакции, а также чтобы проверить, связано ли это с ВМВ2-зависимым секвестрированием ВМВ1 в РАМВs, мы оценивали защитный ответ путем сравнения уровней отложения каллозы в областях, агроинфильтрированных для экспрессии ВМВ1, ВМВ1 с ВМВ2, а также ВМВ1 с ВМВ2-mutN – мутантом ВМВ2, неспособным направлять ВМВ1 в РАМВs (Рис. 18С). Полученные данные свидетельствуют о способности ВМВ2 супрессировать защитный ответ растения на ВМВ1, но этот эффект может быть лишь частично объяснен ВМВ2-зависимым направлением ВМВ1 в РАМВs.

4. Изучение ядерной локализации ВМВ1

4.1. Анализ ядерной локализации ВМВ1

При изучении субклеточной локализации мутанта ВМВ1-d22, было обнаружено, что он локализуется в цитоплазме, нуклеоплазме, а также в ядрышке и субъядерных структурах. При тщательном изучении подобная субъядерная локализация, хотя менее выраженная, была обнаружена и для GFP-ВМВ1. Было показано, что GFP-ВМВ1 и

GFP-BMB1-d22 колокализуются с фибрилларином (mRFP-fib2), маркером ядрышка и телец Кахаля (Рис. 19А,В). Обработка лептомицином В, ингибитором CRM1-зависимого ядерного экспорта, приводила к концентрации GFP-BMB1 в ядре (Рис. 19D), предполагая ядерно-цитоплазматическое перемещение BMB1.

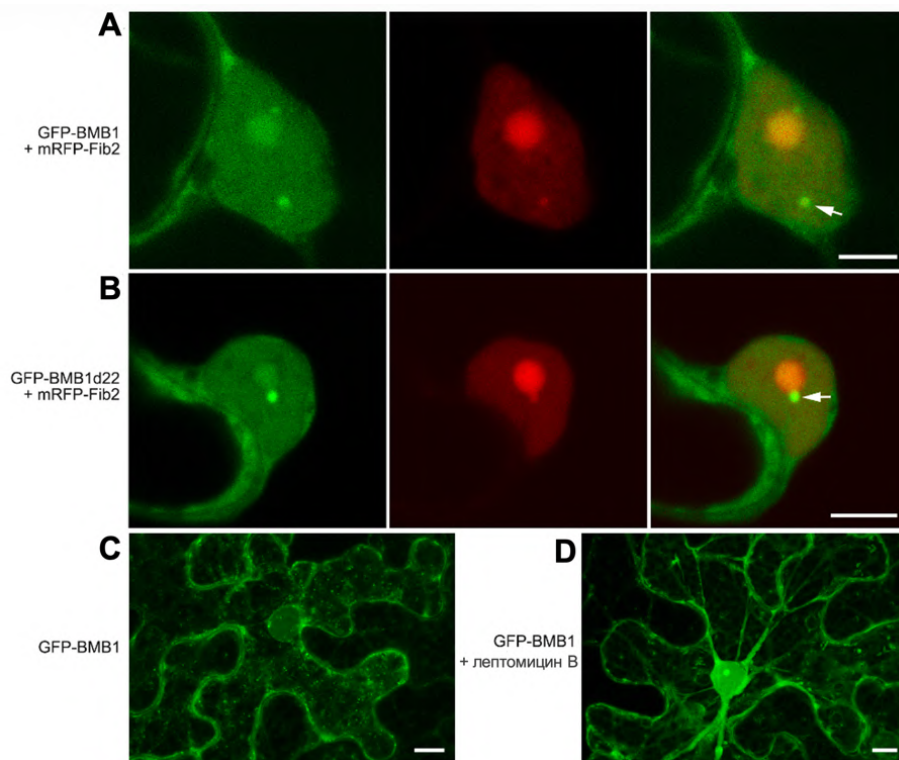


Рисунок 19. Локализация BMB1 в субъядерных структурах. Кожэкспрессия с mRFP-Fib2 (А) GFP-BMB1 (В) GFP-BMB1d22. (С,Д) Обработка лептомицином В. (А,В) левые панели – канал GFP, центральные — канал mRFP, а правые — наложение изображений для двух каналов. Стрелками обозначены тельца Кахаля. Масштабная линейка: (А–D, F) 5 мкм; (Е, F) 10 мкм.

4.2. Анализ BMB1 с искусственно добавленными NES или NLS

Нам не удалось идентифицировать сигналы, отвечающие за ядерную локализацию BMB1 ни с помощью веб-сервисов для предсказания таких сигналов, ни с помощью мутагенеза областей, расположенных на поверхности белка. Поэтому для анализа функций белка BMB1 в ядре к N-концу BMB1 были искусственно добавлены сигнал ядерной локализации (NLS) Т-антигена SV40 (PKKKRKVEDP) и сигнал ядерного экспорта (NES) белка-ингибитора цАМФ-зависимой протеинкиназы (ELALKLAGLDIN). В качестве отрицательного контроля использовался FLAG-эпитоп (DYKDDDDK). Анализ субклеточной локализации этих белков, слитных с GFP, показал, что добавление NLS приводило к аккумуляции белка в ядре (Рис. 20В), а вот добавление NES не повлияло на локализацию (Рис. 20D). Замена последовательности NES на другую (NES2 из HIV-1 Rev (LQLPPLERLTL)) также не повлияла на локализацию белка (Рис. 20Е). Поэтому в дальнейших экспериментах NES-BMB1 не использовался. При коэкспрессии с BMB2-mRFP GFP-NLS-BMB1 как релокализовался в PAMBs, так и сохранял локализацию в ядре (Рис. 20G).

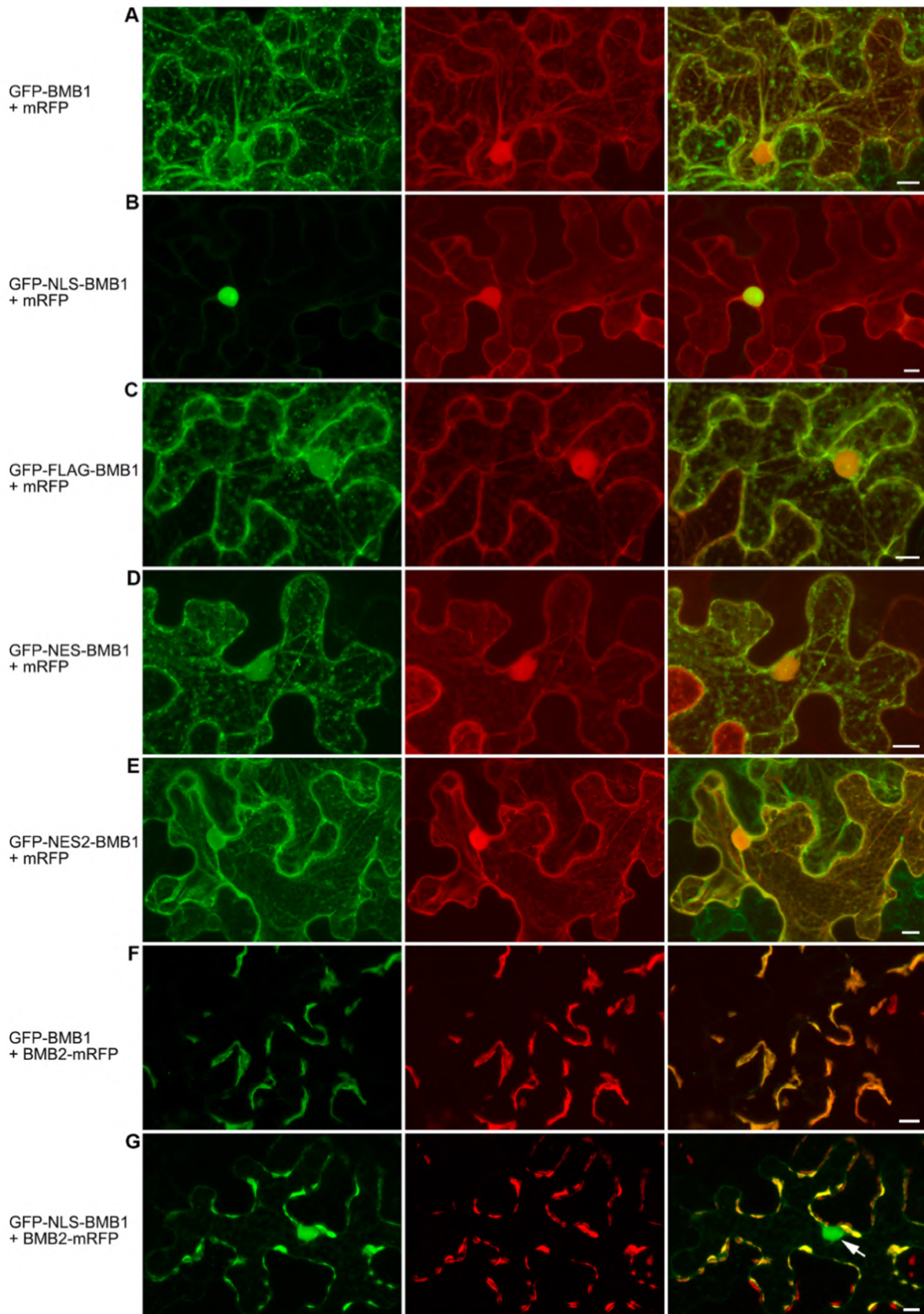


Рисунок 20. Анализ субклеточной локализации BMB1 с добавленными NLS, NES, NES-2 или FLAG. *N. benthamiana*, агроинфилтрированные для коэкспрессии mRFP с (A) GFP-BMB1, (B) GFP-NLS-BMB1, (C) GFP-FLAG-BMB1, (D) GFP-NES-BMB1, (E) GFP-NES2-BMB1. Коэкспрессия (F) GFP-BMB1 и BMB2-mRFP и (G) GFP-NLS-BMB1 и BMB2-mRFP. Левые панели – канал GFP, центральные – канал mRFP, а правые — наложение изображений для каналов GFP и mRFP. Масштабная линейка: 10 мкм.

NLS-BMB1 был протестирован в экспериментах по комплементации транспорта (Рис. 21А). Неожиданно, коэкспрессия с BMB2 как NLS-BMB1, так и FLAG-BMB1, использованного в качестве контроля, приводила к образованию локусов большего размера, чем в случае белка BMB1 дикого типа. Однако эффект NLS-BMB1 был более выраженным, что было подтверждено количественно (Рис. 21А,В). Мы предположили, что последовательности с N-конца BMB1 ингибируют развитие защитной реакции на BMB1. Количественное измерение отложений каллозы показало, что добавление и NLS, и FLAG ингибировало защитную реакцию, индуцированную BMB1, но в одинаковой степени в обоих случаях (Рис. 21С), при этом размеры локусов инфекции в случае NLS-BMB1 были больше, чем наблюдаемые для FLAG-BMB1 (Рис. 20В). Это позволяет полагать, что ядерная локализация BMB1, приводит к более эффективному транспорту вируса.

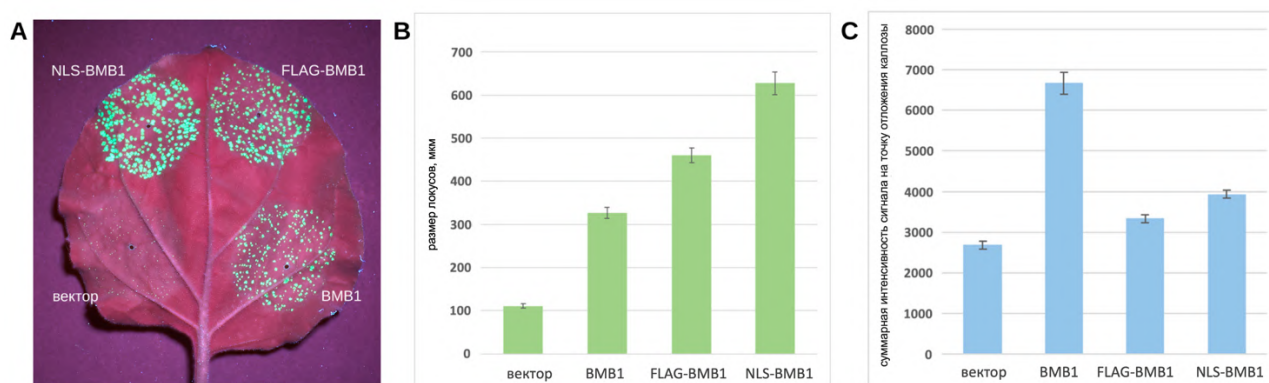


Рисунок 21. Влияние добавленных к BMB1 NLS и FLAG на функции белка. (А) Влияние на межклеточный транспорт. Лист *N. benthamiana* агроинфицированный для коэкспрессии PVX-POL-GFP и BMB2 с BMB1, FLAG-BMB1, NLS-BMB1 или вектором. (В) Количественная оценка диаметров локусов инфекции. (С) Количественная оценка данных окрашивания отложений каллозы. Показаны значения средних суммарных интенсивностей сигнала на точку отложения каллозы. (В,С) Планки погрешности отражают стандартную ошибку. Различия статистически значимы ($p < 0,001$).

Заключение

Экспериментальные данные, полученные в работе, вносят вклад в современные представления о механизмах работы ТБ на примере белков BMB1 и BMB2, кодируемых бинарным блоком транспортных генов HGSV. Было установлено, что для обеспечения транспортной функции необходимо взаимодействие между белками BMB1 и BMB2, в котором принимает участие С-концевой район BMB1 и N-концевой район BMB2. Был идентифицирован новый тип реорганизации клеточных мембран вирусными белками, отличный от описанных ранее для других фитовирусов. Было показано, что мембранные компартменты, образованные вследствие ремоделирования

мембран ЭПР вирусным белком ВМВ2, представляют собой сложную сеть из извилистых цистерн. Особенностью таких структур является наличие протяженных ММК между цистернами, где две мембраны ЭПР сближаются, и видимого зазора между ними не наблюдается. Это морфологически отличает ММК от классических МК между ЭПР и другими органеллами (Pérez-Sancho et al., 2016) и является следствием экспрессии вирусного белка ВМВ2. Была предложена модель, согласно которой способность белка ВМВ2 к высококооперативной олигомеризации лежит в основе формирования подобных структур, хотя данное предположение требует дальнейших исследований. В рамках изучения взаимодействия вирус-растение было показано, что ТБ ВМВ1 вызывает индукцию защитного ответа в растениях *N. benthamiana*, причем эта защитная реакция подавляется, когда ВМВ1 экспрессируется совместно с ВМВ2, что предполагает возможность того, что регуляция относительных уровней экспрессии ТБ во время вирусной инфекции может модулировать как транспорт вируса, так и индуцированную защитную реакцию растений.

Несмотря на прогресс последних лет, молекулярные механизмы транспорта вирусов растений и регулирующие этот процесс взаимодействия вирус-растение, остаются в значительной степени неизученными. Полученные в работе данные дополняют существующие представления об этих процессах.

Выводы

1. Транспортные белки ВМВ1 и ВМВ2 НGSV взаимодействуют *in vitro* и *in vivo*.
2. Во взаимодействии белков принимают участие С-концевой район ВМВ1 и N-концевой район ВМВ2.
3. Взаимодействие белков ВМВ1 и ВМВ2 необходимо для межклеточного транспорта вируса.
4. Вирусный белок ВМВ2 индуцирует образование из мембран ЭПР телец, ассоциированных с ПД, которые представляют собой конденсированную структуру из извилистых, плотно сложенных мембранных цистерн.
5. ВМВ2-специфические мембранные тельца содержат множество протяженных межмембранных контактов между цистернами ЭПР.
6. Белок ВМВ1 вызывает защитный ответ в растениях *N. benthamiana*, а белок ВМВ2 способен его супрессировать.
7. Белок ВМВ1 локализуется в цитоплазме, а также в ядре в составе ядрышка и телец Кахаля.

Список публикаций по теме диссертации

Статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология

1. Lazareva E.A., **Atabekova A.K.**, Morozov S.Y., Solovyev A.G., Lezzhov A.A., Heinlein M. Virus genome-based reporter for analyzing viral movement proteins and plasmodesmata permeability // *Methods in Molecular Biology*. 2022. Vol. 2457. P. 333-349. EDN: HGOHWE. DOI: 10.1007/978-1-0716-2132-5_23. Импакт-фактор 0,354 (SJR). Доля участия 30%. 1,0625 п.л.

2. Solovyev A.G., **Atabekova A.K.**, Lezzhov A.A., Solovieva A.D., Chergintsev D.A., Morozov S.Y. Distinct Mechanisms of Endomembrane Reorganization Determine Dissimilar Transport Pathways in Plant RNA Viruses // *Plants*. 2022. Vol. 11, № 18, P. 2403. EDN: OTANVL. DOI: 10.3390/plants11182403. Импакт-фактор 4,1 (JIF). Доля участия 40%. 1,1875 п.л.

3. **Atabekova A.K.**, Lazareva E.A., Lezzhov A.A., Solovieva A.D., Golyshev S.A., Skulachev B.I., Solovyev I.D., Savitsky A.P., Heinlein M., Morozov S.Y., Solovyev A.G. Interaction between Movement Proteins of Hibiscus green spot virus // *Viruses*. 2022. Vol. 14, № 12, P. 2742. EDN: IZPNIO. DOI: 10.3390/v14122742. Импакт-фактор 3,5 (JIF). Доля участия 70%. 1,0625 п.л.

4. **Atabekova A.K.**, Golyshev S.A., Lezzhov A.A., Skulachev B.I., Moiseenko A.V., Yastrebova D.M., Andrianova N.V., Solovyev I.D., Savitsky A.P., Morozov S.Y., Solovyev A.G. Fine Structure of Plasmodesmata-Associated Membrane Bodies Formed by Viral Movement Protein // *Plants*. 2023. Vol. 12, № 24, P. 4100. EDN: RBKYGH. DOI: 10.3390/plants12244100. Импакт-фактор 4,1 (JIF). Доля участия 60%. 0,9375 п.л.

5. **Atabekova A.K.**, Lazareva E.A., Lezzhov A.A., Golyshev S.A., Skulachev B.I., Morozov S.Y., Solovyev A.G. Defense Responses Induced by Viral Movement Protein and Its Nuclear Localization Modulate Virus Cell-to-Cell Transport // *Plants*. 2024. Vol. 13, № 18, P. 2550. EDN: YSGALQ. DOI: 10.3390/plants13182550. Импакт-фактор 4,1 (JIF). Доля участия 70%. 1,125 п.л.